

(Aus der experimentellen Abteilung [Leiter: *P. E. Snesarew*] des Institutes für neuro-psychiatrische Prophylaxe des Volksgesundheitskommisariates [Direktor: Prof. *L. M. Rosenstein*] in Moskau.)

Die Pyridinsodamethode zur Imprägnation der Mesoglia (Hortegazellen, Oligodendroglia, Drenagzellen) und Reticuloendothelzellen (für Gelatin und Celloidinschnitte).

Von

W. K. Belezky.

Mit 11 Abbildungen im Text.

(*Eingegangen am 6. Juni 1931.*)

Wir überzeugten uns bei Untersuchungen mit raschen Niederschlagsversilberungsmethoden, daß die verschiedenen Gewebe, Gewebe aus verschiedenen Fixierungsflüssigkeiten mit verschiedenen pathologischen Veränderungen bei der Durchtränkung immer eine Anpassung der Methode für das zu untersuchende Material brauchen. Die Bestandteile des Gehirns durchtränken sich in anderen Verhältnissen wie die anderer Organe. Sogar verschiedene Abschnitte des Zentralnervensystems brauchen verschiedene Abänderungen bei ein und derselben Methode. Hinweise dieser Art hatten wir schon früher. Bei der Methode von *Schultze* für Neurofibrillen sind für verschiedene Gehirnabschnitte verschiedene Angaben für seine Methode angeführt. Das normale und das pathologische Gehirn haben keine gleiche Methode für die Imprägnation ein und derselben Gebilde. Die Methode muß sich den verschiedenen krankhaften Veränderungen anpassen. Das Gehirn des Erwachsenen und des Embryo durchtränken sich verschieden und wir besitzen eine Reihe von besonderen Methoden für den Embryo. Dasselbe muß man auch vom Gehirn verschiedener Tiere sagen. Außerdem spielt bei der Imprägnation die Bedingungen der Fixation eine Rolle und darum sieht man, daß frische Schnitte sich anders wie alte verhalten. Man muß gestehen, daß die Imprägnation selbst ein physikalisch-chemischer Vorgang ist, der von den physikalisch-chemischen Lebenseigenschaften des Gewebes und der nachfolgenden Fixation abhängt.

Dadurch wird das Vorhandensein so vieler Imprägnationsmethoden, ihre Abänderungen und die Anwendung (Gewöhnung) von fremden

Methoden mit einigen Veränderungen von jedem Untersucher verständlich. Aber diese Änderungen werden tastend ausgeführt, ausgehend aus den Erfahrungen, rein empirisch und sind sehr schwer weiterzugeben. Die Anwendung kann nur durch den Autor selbst übergeben werden. Das trifft zu für fast alle Färbungsmethoden; besonders aber für die Niederschlagsmethoden. Man muß solche Indicatoren aufstellen, welche die Methoden leicht verständlich und mehr oder weniger frei von

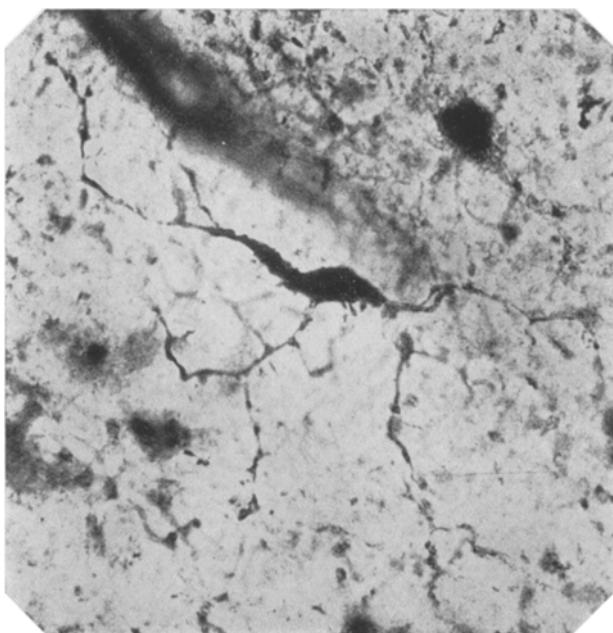


Abb. 1. Hortegazellen. Die Gehirnrinde des normalen Menschen.

Einzelerfahrung machen. Eine vollständige Befreiung von der Erfahrung würde nur dann möglich sein, wenn wir die physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Bestandteile des zu imprägnierenden Gewebes feststellen und ihre Veränderungen in allen Augenblicken der Imprägnation verfolgen könnten. In dieser Richtung werden von uns Versuche gemacht. Der zweite Weg — ist der Weg der „Probe“ und einer gewissen Vergleichung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lösungen und die Aufklärung von bestimmten Bestandteilen. Nehmen wir z. B. an, daß wir bei einer Probe (unter Prüfung mit dem Mikroskop) nicht die Strukturelemente bekommen, welche wir brauchen, so müssen wir wissen, was mit unserer Vorschrift zu machen ist und wie die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lösung oder der Schnitte zu ändern sind, um die nötigen Ergebnisse zu erhalten. So wird die mißlungene

Imprägnation zum Indicator. Dieses lässt aber ein Vorhandensein allgemeiner, schon fest ausgearbeiteter günstigster Grundeigenschaften dieser oder anderer Bestandteile vermuten.



Abb. 2. Oligodendroglia. Die Gehirnrinde des normalen Menschen.

Als uns die Feststellung des Indicators für die Anwendung der Vorschrift der raschen Niederschlagsmethoden für die Imprägnation verschiedener Gewebsteile in verschiedenen Geweben und bei verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften gelang, wurde es für uns möglich

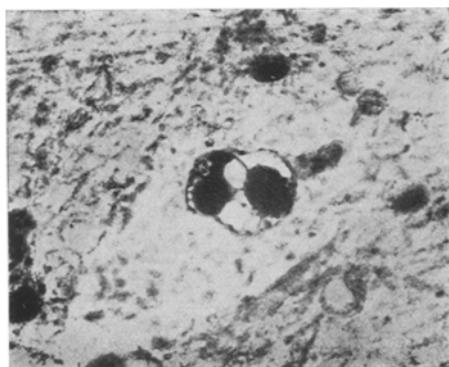


Abb. 3. Zwei Drenagezellen. Die Gehirnrinde des normalen Menschen.

eine jegliche Methode, für jedes beliebige Material, für das eine leichter, für das andere schwerer anzuwenden.

Wir geben unten die Vorschrift für die Imprägnation der Mesoglia an, welche wir bei normalem Gehirn (Abb. 1, 2, 3), Kindergehirn, Embryonen, in schweren Fällen (wo wenig Mesoglia vorhanden ist und wo sie nicht gewuchert oder sogar degeneriert ist) und auch für die Imprägnation der Reticuloendothelzellen außerhalb des Zentralnerven-

systems (Abb. 4, 5, 6, 7, 8, 9) anwenden und weisen bei jedem Punkte seine Bedeutung und die Möglichkeit seiner Veränderung an.

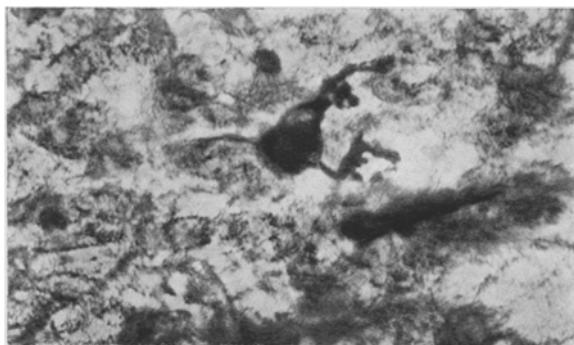


Abb. 4. Embryonale Histiocyten des Hundes.

Diese Angaben sind auch für andere Methoden brauchbar¹. (Für Fälle von diffuser Hyperplasie der Mesoglia ist die Anwendung der

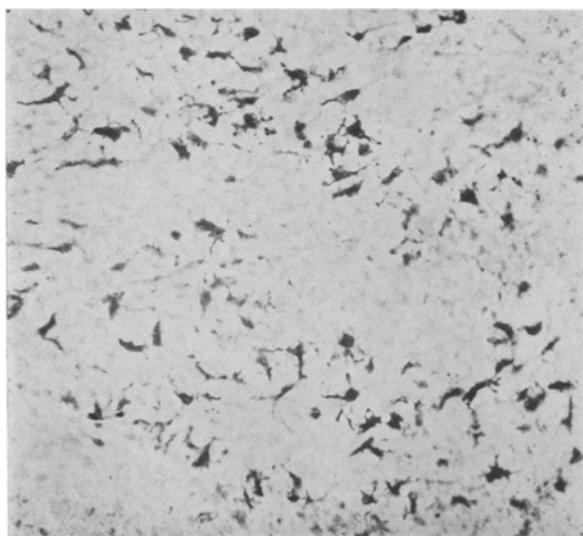


Abb. 5. Reticuloendothelzellen der Milzpulpa der Maus bei experimenteller Recurrens.

früheren Methode mit Ammoniak-Natrium-Silber vorzuziehen.) Wir benutzen, wie früher, hauptsächlich das Einbetten in Gelatine und

¹ Ausführlich bei W. K. Belezky die Hauptangaben, die Anpassung der raschen Niederschlagsmethoden für verschiedene Strukturelemente.

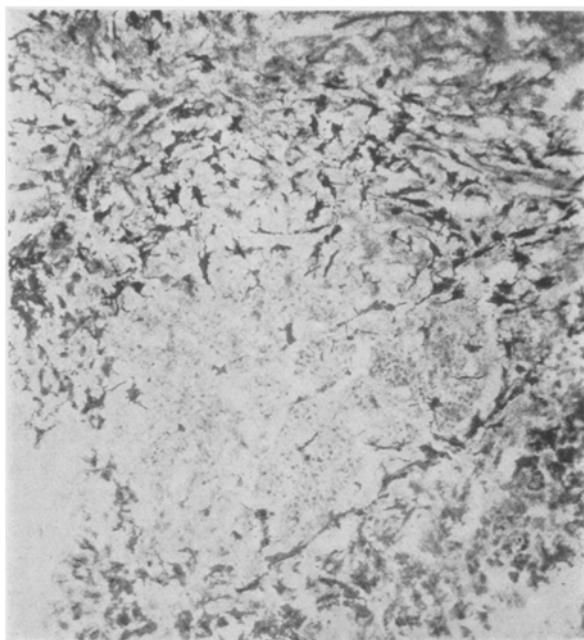


Abb. 6. Reticuloendothelialzellen in einem Milzknötchen der recurrenten Maus.

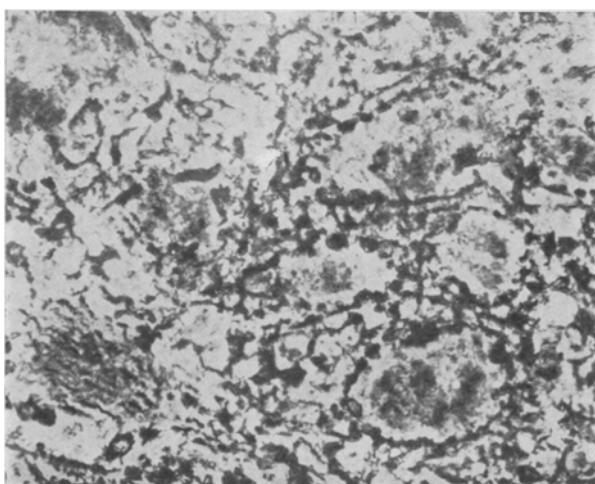


Abb. 7. Syncytium der Reticuloendothelialzellen der Milzpulpa. Experiment. recurrens beider Kaninchen.

Gefrierschnitte, was für viele Methoden parallel mit der Imprägnation der Mesoglia und Reticuloendothels notwendig ist.

Wir wenden auch die beschriebene Methode für Celloidinschnitte an (hauptsächlich um Schnittreihen anzufertigen), dabei benutzen wir

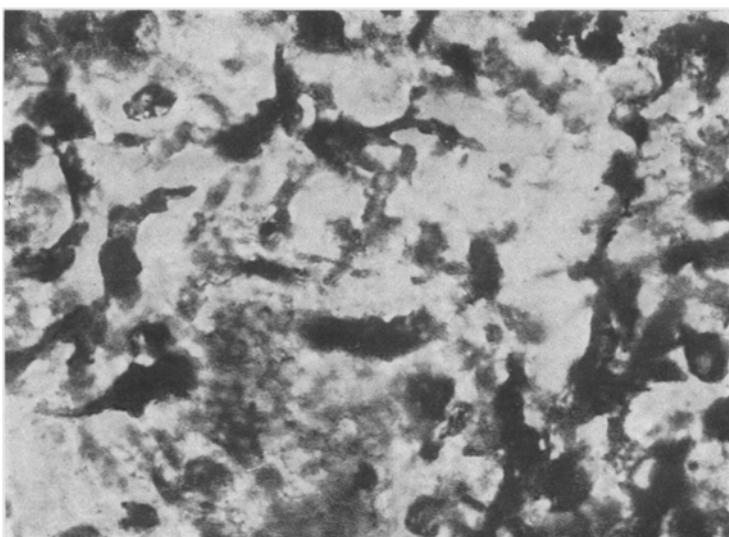


Abb. 8. Histiocyten (Reticuloendothelialzellen) der Milzpulpa bei Poliomyelitis acuta des Menschen.

die unten angegebenen Hinweise für ihre Anpassung zum Material. Die Wichtigkeit solch einer Methode ist ganz augenscheinlich, da dadurch

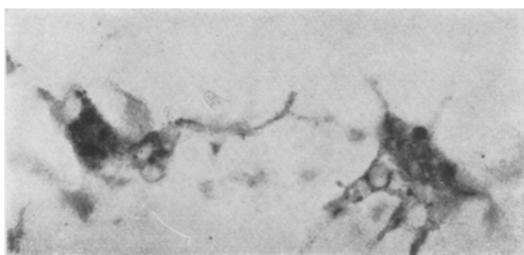


Abb. 9. Vakuolisierte Histiocyten der Maus bei experimenteller Recurrens.

die Möglichkeit der Anwendung der Silbermethode für das Celloidinmaterial erzielt wird, ohne Celloidinentfernung, sich dabei stützend auf seine kolloidalen Eigenschaften.

Es muß bemerkt werden, daß bei der Benutzung der unten beschriebenen Methoden für Celloidinschnitte, einige Struktureinzelheiten besser als bis jetzt von uns beobachtet wurden. Die dabei erzielten Bilder sind zum Erstaunen deutlich ausgeprägt. Die Cellqidinlösung stellt

eine kolloidale Lösung des Zellgewebes im Alkoholäther dar, wie auch die wässrige Gelatinlösung.

Da aber das Celloidin eine große Fähigkeit, die Reduktion des Silbers zu verhindern, besitzt, benutzen wir eine besondere Modifikation, speziell für Celloidinschnitte. Die Lösungen von salpetersaurem Silber und Natrium carbonicum werden als Normallösungen benutzt, um eine größere Genauigkeit zu erzielen, und wir bereiten den Fixator mit bestimmten Ph. Vor der Imprägnation der Schnitte fertigen wir einzelne „Proben“ an. Der Probeschnitt wird feucht mikroskopisch untersucht.

I. Die Methode für Gelatinschnitte.

1. Formalinfixation des frischen Materials in 5—10% Formalin. Das frisch fixierte Material imprägniert sich besser. Im alten Material muß man den Niederschlag von Para-Formoloxyd und Trioxymethylen entfernen, indem man die Stückchen auf 24 Stunden in Ammoniakalkohol (10 cm Methylalkohol + 2 bis 3 Tropfen eines dreifachen Ammoniaks 25%) bringt mit nachfolgender Auswaschung in destilliertem Wasser. Das kann man auch mit den Schnitten im Punkte 6 in 10—20 Minuten ausführen.

2. Auswaschen der Gewebsstückchen in fließendem Wasser von Formalin während 24 Stunden.

3. Einschließen in 24% Karbolgelatine (10% Karbollösung) während 2 bis 3 Stunden bei 37° im zugedeckten Krystallisator. Man kann in Gelatine von 12 bis 24 Stunden lassen, in solch einem Falle muß mit einer verlängerten Imprägnationszeit gerechnet werden. Das muß dann angewendet werden, wenn im Gewebe eine große Anzahl von Bindegewebsfasern vorhanden ist und wenn dessen Imprägnation sich durch die unten beschriebene Methode für Mesoglia und Reticuloendothel nicht verhindern läßt.

4. Gelatine wird abgekühlt, im Laufe einer halben Stunde, und daraus werden Gewebsstücke mit kleinen Mengen von Gelatine an den Rändern herausgeschnitten. Eine weitere Abkühlung, d. h. Verdichtung der Gelatine führt zur Verlangsamung der Imprägnation.

5. Fixation der Gelatingewebsstückchen im neutralen 10% oder im 10% sauren Formalin von Ph = 1,6—1,7 im Laufe von 2—5 Tagen. (Die Wirkung des Hortegafixators ist auf ein Sauergehalt von Ph ungefähr von der genannten Zahl begründet.)

Bei der Fixation in saurem Formalin quillt die Gelatine auf. Ist die Aufquellung eine sehr starke, so muß man Ph mit einem kleineren Säuregehalt anwenden. Wir gebrauchen zur Fixation meist Neutralformalin und wenn es nach der Probe nötig ist, so werden die Schnitte durch eine sauere Flüssigkeit durchgeführt.

6. Gefrierschnitte von 10—25 μ in destilliertes Wasser.

7. Auswaschen im zweiten destillierten Wasser (wenn die Schnitte von vorigen Tagen im Formalinwasser geblieben sind, so müssen sie 2—3mal durch destilliertes Wasser durchzogen werden).

Wenn die Probe bei der weiteren Bearbeitung des Schnittes eine Erhöhung des Säuregehaltes erfordert, so kommen die Schnitte auf 1 Minute und mehr in 1% Essigsäure (man kann eine beliebige Säure benutzen), die Zeit ist von der nachfolgenden Probe abhängig.

Wenn wir mit Celloidinschnitten zu tun haben, so fallen alle vorigen Punkte weg. Die Schnitte werden aus dem Alkohol rasch (5 Sek.) durch destilliertes Wasser geführt und in eine zubereitete Silberlösung gebracht.

8. Imprägnation in einer vorbereiteten Komplexlösung von Pyridinnatronsilber, welche folgendermaßen zubereitet wird: Gleiche Teile Normallösung (man nimmt

mit einer Bürette) Argentum nitricum (Ag NO_3) und Natrumcarbonat (Na_2CO_3) (aus wasserfreiem Pulver vorbereitet), werden in Krystallisator gegossen; der sich bildende Niederschlag von Kohlensäuresilber wird tropfenweise durch Pyridin ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) vollständig aufgelöst.

Zur Auflösung werden viel Tropfen, bis 50 und mehr gebraucht, zuerst rasch, nachher, wenn der Niederschlag sich zu lösen beginnt, tropfenweise bis zur vollständigen Auflösung zugefügt. Pyridin ist eine schwache Base. Durch den Ersatz von Ammoniak bei den früheren Methoden durch Pyridin wird ein größerer Alkal Gehalt des Silberkomplexes $[(\text{Ag/C}_5\text{H}_5\text{N})_2\text{Co}_3]$ vorgebeugt, und ein Überfluß von Alkali beim Zufügen des letzten Tropfens vermieden. Die Bildung des Niederschlags geht nach der Formel: $2 \text{AgNO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3 = \text{Ag}_2\text{CO}_3 + 2 \text{NaNO}_2$. Die Lösung nach der Formel: $\text{Ag}_2\text{CO}_3 + 4 (\text{C}_5\text{H}_5\text{N}) = [\text{Ag}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2]_2\text{Co}_3$. Die Reaktion der Lösung ist alkalisch, Ph ungefähr = 9,4. Im Falle, daß die Probe zeigt, daß man den Grad der Dissoziation der Lösung erhöhen muß, so muß die Lösung zweimal und sogar noch mehrmals verdünnt werden, entsprechend der Probe.

Diese Zusammensetzung von Komplexsilber ist brauchbar für das normale Mesogliagewebe, und wo die Mesoglia in kleiner Menge vorhanden ist.

Für die embryonale Mesoglia und das embryonale Reticuloendothel ist es besser, den Alkal Gehalt der Lösung noch mehr zu vermindern und das Verfahren folgendermaßen auszuführen: Zur Lösung des Argentum nitricum (5 ccm) wird 1 Tropfen der angegebenen Na_2CO_3 Lösung zugesetzt; es bildet sich ein kleiner Niederschlag von Ag_2CO_3 . Bei Zusatz von Pyridin zur Auflösung des Niederschlags bildet sich zuerst ein sich immer vergrößernder Ausfall von nadelförmigen Krystallen; die gebildete Masse löst sich durch den stetigen Zusatz von Pyridin vollständig auf. Durch Pyridin allein wird das Silber nicht niedergeschlagen und nur ein Tropfen von Na_2CO_3 führt mit sich die Bildung einer krystallischen Vereinigung der Silbers mit Pyridin. Diese Lösung kann, wenn es nötig sein soll, bis auf 2–3mal verdünnt werden. Im nötigen Falle wird eine Vermehrung des Alkal Gehaltes der beschriebenen Lösungen durch den Zusatz einiger (1–3) Tropfen NaCO_3 erzielt. Die Silberpyridinsodalösung muß während der Arbeit zugedeckt sein. Die Imprägnation geschieht im Laufe von einigen Sekunden bis auf 1–2 Min. und mehr (abzählen oder nach der Uhr) in verdünnten Lösungen, abhängig von der gegebenen Probe. Die Schnitte ändern ihre Farbe in der Lösung nicht.

9. Ein rasches Durchziehen der Schnitte in destilliertem Wasser mit oder ohne Schütteln der Schnitte, das Auswaschen wird ausgeschlossen, wenn es nötig ist, die folgende Wiederherstellung zu verlangsamen.

10. Die Wiederherstellung des Silbers in 10% neutralem Formalin; beim Schütteln der Schnitte werden sie rasch schwarz, sonst nur langsam. Die Wiederherstellung des Silbers und das Schwarzen der Schnitte muß langsam vor sich gehen. Das dient als gutes Merkmal. Um die Wiederherstellung zu vollenden, müssen die Schnitte 5 Minuten in Formalin liegen. Die Oligodendrogliazellen und Drenagezellen erscheinen eher als die Hortegazellen, aber bei noch langsamerer Wiederherstellung erscheinen sie öfters zusammen.

Wenn die Wiederherstellung (die Bildung von Silberhydroxyd, Silberoxyd und metallischen Silbers) schnell vor sich geht, so muß 10% gewöhnliches Formalin genommen werden (schwacher Säuregehalt ($P = 6,5 - 6,6$) und die Wiederherstellung verlangsamt sich. Man kann sogar den Säuregehalt des Formalins noch mehr verstärken.

11. Auswaschen der Schnitte im Wasser, Übertragen auf Deckglas und mikroskopische Untersuchung des feuchten Präparates.

12. Aufkleben der Schnitte mit Eiweiß, austrocknen und einschließen wie gewöhnlich. Man kann die Schnitte ohne Vergoldung einschließen.

Für die Imprägnation werden 5 Krystallisatoren aufgestellt, für Punkte 7, 8, 9, 10 und 11. Es wird zuerst eine Probe ausgeführt, und nur ein Schnitt durchgeführt. In dem Fall, wenn beim Punkte 10 mikroskopisch die nötigen Elemente fehlen, und an ihrer Stelle folgende imprägnierte Gebilde gefunden werden: Bindegewebsfasern, Gliafasern, protoplasmatische Astrocyten, Chromatin, Tigroid, so bedeutet das, daß das Material und die Lösungen zu stark alkalisch waren und die Reduktion verhältnismäßig schnell vor sich ging; in solchen Fällen muß die Imprägnation oder in kürzerer im Punkte 8, oder bei erhöhter Dissoziation der Lösung in diesem Punkte ausgeführt werden. Es ist besser das letzte zu gebrauchen, da eine Verkürzung der Zeit unbequem ist. Für diesen Zweck kann man die Zeit des Auswaschens im Punkte 9 verkürzen und die Anweisungen der Punkte 8 und 9 für die Verkürzung der Imprägnationszeit benutzen, oder im Punkte 7 den Säuregehalt erhöhen. Es kann auch das Gegenteil vorkommen, nämlich daß, wenn der Schnitt zu sauer und die Lösungen zu verdünnt sind, die Imprägnation sich verlangsamt oder überhaupt nicht gelingt. Mikroskopisch sieht man in solch einem Fall einen Silberniederschlag in den zwischenzelligen Spalten in Form von Klümpchen und feinen Körnern (wir bezeichnen es als „Sand“). Übrigens, das findet man oft bei der typischen Hortegamethode, wenn die Stückchen in speziellen Fixationslösungen mehr als 8—10 Tage liegen (die Stücke werden zu sauer). In solchen Fällen muß man umgekehrt verfahren; vergrößernd ein wenig die Schnelligkeit der Reduktion nach der Abweisung, zufügend von Alkali (Na_2Co_3) zu der Lösung im Punkte 8, oder sogar zum Ammoniak-silber übergehend und das Formalin alkalisierend.

Bei den beschriebenen Methoden mit der Anwendung einer Probe und der Bilder, die wir bei der Probe als Indicator erhalten, konnten wir kein Material finden, das nicht brauchbar wäre für die Darstellung der Mesoglia und in der letzten Zeit auch für die Reticuloendothelzellen. Manchmal beobachtete man, daß bei den aufeinanderfolgenden Proben wir der Reihe nach die aufgezählten Gebilde bis zu den gesuchten erhalten. Man bekommt den Eindruck, daß der hohe Alkaligehalt der Lösungen, und eine schnelle Reduktion zur Herstellung der faserigen Struktur zuerst der Neurofibrillen, dann der verschiedenen Bindegewebsfasern und der faserigen Glia führt. Die allmähliche Verminderung des Alkaligehaltes der Lösung und die Verlangsamung der Imprägnation führt zu der Darstellung der Protoplasmastruktur, der protoplasmatischen Astrocyten, Chromatins und Tigroids, Mitochondrien, Mesoglia und Reticuloendothelzellen. Auf Grund dessen bekamen wir Mesoglia bei stark verdünnten Lösungen nach *Bielschowsky*; das entspricht auch den Beobachtungen *Cajals*, über den Einfluß der Temperatur und der Zeitspanne auf die Imprägnation von verschiedenen Elementen.

II. Methode für die Celloidinschnitte (Abb. 10, 11).

Das verdichtete Celloidin besitzt die Eigenschaft, die Reduktion des Silbers im Formalin stark anzuhalten. Dennoch bedarf man für die

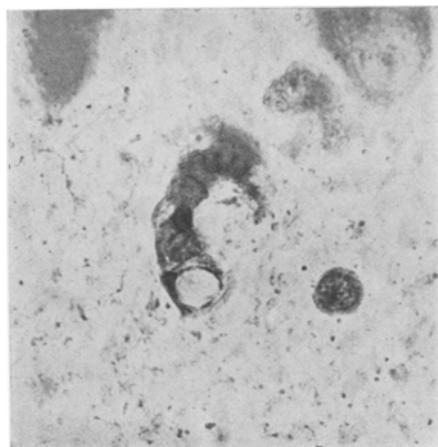


Abb. 10. Eine Reihe der Drenagezellen, welche einen Sinus bilden.

Mesoglia eine kurze Zeit für die Imprägnation in der Silberlösung. Bei diesen Bedingungen bekommt man zu blasse Präparate. Eine verlängerte

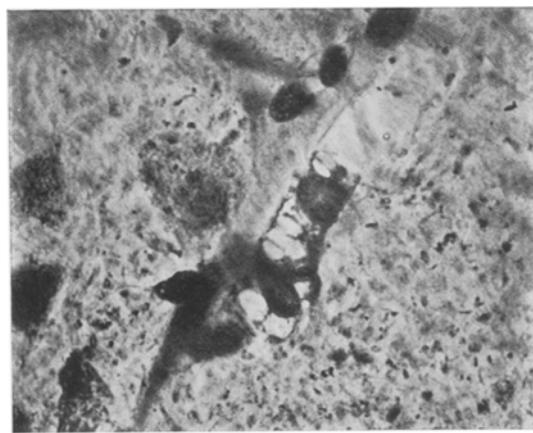


Abb. 11. Eine Reihe der Drenagezellen neben dem Gefäß.

Zeit der Imprägnation führt leicht zu Reduktion von anderen Elementen. Zur Imprägnation der Mesoglia in Celloidinschnitten müssen stärkere alkalische angewendet und die Fähigkeit des Formalins zur Reduktion verstärkt werden. Das letztere ist wichtiger.

Man verfährt folgendermaßen:

1. Die Schnitte werden aus 70° Alkohol durch Aq. dest. durchgeführt (Alkohol hält die Imprägnation im Punkte 2 an).

2. Auf 20 Min. in die Lösung, welche folgend zubereitet wird, gebracht: Zu 5,0 ccm 17% AgNO_3 werden 5 Tropfen 40% Natrii caust. zugesetzt. Der Niederschlag löst sich durch 25% Ammoniak auf. Die Lösung wird 40mal und mehr oder weniger, abhängig vom Material, verdünnt, um eine allerlangsamste Imprägnation weiterhin zu erzielen.

3. Der Schnitt wird rasch durch Wasser (5—10 Sek.) durchgeführt. Längeres Verbleiben wäscht das Silber aus.

4. Das Silber wird in bis zum Kochen gebrachtes 10% neutrales oder gewöhnliches (leicht saueres) auch 10% Formalin gebracht. Heißes Formalin wird genommen, um die zu langsame Reduktion zu beschleunigen.

5. Auswaschen, Kontrolle, Einschließen.

Im Fall, daß der Schnitt in der Lösung nicht genügend lang gehalten worden ist und die Lösung zu stark verdünnt war, imprägnieren sich die Gewebsspalten. Im Falle einer größeren Konzentration und längerer Imprägnation kommen zum Vorschein die Nervenzellen mit Tigroid.
