

(Aus dem Anatomischen Institute in Turin. [Direktor: Prof. Dr. G. Levi].)

Zur Methodik der Fettfärbung in Gewebekulturen.

Von

Z. Szantroch (Krakau).

Mit 4 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 31. Mai 1932.)

Für den histologischen Nachweis aller morphologisch sichtbaren Fettstoffe in Gewebekulturen kommen hauptsächlich solche Färbemethoden in Betracht, die einerseits alle Fettarten nachzuweisen imstande wären, andererseits die Eigenschaft hätten, elektiv nur Fettsubstanzen zu färben, indem sie alle anderen Zellbestandteile ungefärbt zurücklassen. Unter den heute üblichen Fettfärbemethoden entspricht diesen Bedingungen nur die Sudan III- (bzw. Scharlach-) und Osmiumfärbung, aber auch nicht vollkommen. Nämlich durch die Färbung der Gefrierschnitte von in Formalin fixiertem Material mit Sudan III, unter strenger Vermeidung von fettlösenden Regantien, werden zwar die meisten Glycerinester elektiv gefärbt, doch bleiben die Palmitin- und Stearinester ungefärbt, wie dies von *Kaufmann* und *Lehmann* nachgewiesen wurde. Durch Osmierung werden dagegen auch einige, wenn auch nur wenige, fettfreie Massen wie Eleidin, Gerbsäure und andere mitgeschwärzt.

Betreffs der üblichen Sudanfärbung der Gefrierschnitte, so sind die mit ihr zu erhaltenden Ergebnisse keineswegs völlig befriedigend, was auch in der Tatsache zum Ausdruck kommt, daß von Zeit zu Zeit neue Arbeiten erscheinen (*Kaufmann* und *Lehmann*, *Romeis*, *Froboese* und *Spröhnle*), welche eine Verfeinerung der Fettfärbung mit Sudan bezwecken. Die technische Schwierigkeit liegt wie bekannt darin, daß die Lösungsmittel für Sudan, also vor allem Alkohol, als solche auch für die Fette gelten. Diesem Übelstande sucht man dadurch abzuhelpfen, daß man an Stelle der früher üblichen Sudanlösung in 96% (*Ziegler*) oder 90% (*Sata*) eine Lösung in 70% (welche neuerdings von *Froboese* und *Spröhnle* empfohlen wird), oder nach *Romeis* in 40% Alkohol anwendet. Durch die Herstellung einer Sudanlösung in Natronlauge nach der Vorschrift von *Herzheimer* läßt sich der Gebrauch von Alkohol vollständig vermeiden, doch werden dabei, wie es *Michaelis* und *Romeis*

hervorheben, die Zellen nicht unbedeutend geschädigt. Deswegen wird die Anwendung dieses Verfahrens für Gewebekulturen, welche besonders zarte Objekte darstellen, beeinträchtigt.

Ich habe an über 300 in 10% Formalin fixierten Zuchten von verschiedenen Geweben die Färbekraft von Sudanlösungen in 95%, 80%, 70% und 40% Alkohol geprüft und festgestellt, daß keine von diesen Lösungen für die Darstellung von Fettstoffen in Gewebekulturen vollauf befriedigende Ergebnisse zeitigt. Es stellt sich nämlich heraus, wenn man die mit stärkeren Sudanlösungen (in 95—80% Alkohol) gefärbten Kulturen mit lebenden ungefärbten Vergleichskulturen vergleicht, daß die Menge der Fetttropfen in den mit Sudan gefärbten Kulturen immer bedeutend geringer ist als die Zahl der Fetttropfen in den Vergleichskulturen, wo die Tropfen bei gewisser Übung, besonders in älteren Kulturen leicht an ihren physikalischen Eigenschaften zu erkennen sind. Auch die Verteilung und die Form der mit Sudan gefärbten Tropfen entspricht nicht ähnlichen Verhältnissen in den lebenden Vergleichszuchten. Während nämlich alle Tropfen der Vergleichszuchten rundlich oder leicht eiförmig (nur sehr große Tropfen) sind, findet man in den mit Sudan behandelten Zellen allerlei unregelmäßige Formen, welche offenbar durch Zusammenfließen von mehreren Tropfen zustande gekommen sind. Eine Verlängerung der Zeit der Färbung bringt noch mehr diese Erscheinungen zum Ausdruck. Nur in der tiefen, am Deckgläschen haftenden Schicht von Zellen kann man stellenweise eine richtige Rotfärbung der Fetttropfen, unter Beibehaltung ihrer rundlichen Form antreffen. Aus allen diesen Angaben ist leicht zu ersehen, daß diese Veränderungen der Fetttropfen in den mit Sudan behandelten Kulturen auf die lösende Wirkung von Alkohol zurückzuführen sind. Eine Verkürzung der Zeit der Färbung verhindert zwar in gewissem Grade die Verunstaltung und Auflösung der Tropfen, bewirkt aber dann eine unvollständige mangelhafte Färbung der Fetttropfen mit Sudan bis zum völligen Ausbleiben der Färbung in der tiefen am Deckgläschen haftenden Zellschicht. Durch Anwendung schwächerer Lösungen, also in 70% oder sogar in 40% Alkohol, und entsprechende Verlängerung der Färbungsdauer werden diese Schwierigkeiten keineswegs beseitigt, nur der ganze Vorgang bis zur völligen Auflösung der Tropfen spielt sich hier binnen einigen, und bei Anwendung von 40% Alkohol sogar in mehr als 24 Stunden ab, während er unter Wirkung hochprozentigen Alkohols schon in einigen Minuten abgelaufen ist. Es ist somit auch durch Anwendung von Sudanlösungen in schwachprozentigem Alkohol nicht möglich, eine gute gleichmäßige und gleichzeitige Färbung aller Schichten der Präparate von Gewebekulturen zu erhalten. Darin besteht gerade der Unterschied zwischen der Sudanfärbung der gleichmäßig selten über 20μ dicken Schnittpräparate in der üblichen histologischen Technik und der Färbung der Gewebekulturen „in toto“, wo die Dicke

des zu färbenden Präparates von Fall zu Fall zwischen etwa 50 und 200 μ schwankt, selbst in einem und demselben Präparate.

In der Bestrebung, eine befriedigende Leistungsfähigkeit der Sudanfärbung auch für die Gewebezuchten herzustellen, habe ich vor allem die Wirkung alkoholischer Sudanlösungen auf Fetttropfen in Wasser-, in Plasmaemulsionen und in Gewebekulturen von den ersten Sekunden bis zur völligen Auflösung der Fetttropfen unmittelbar unter dem Mikroskop untersucht. So konnte ich feststellen, daß diese Wirkung drei Stufen erkennen läßt, welche im mikroskopischen Bilde sich ziemlich scharf abgrenzen.

Im ersten Stadium kommt es zur Sättigung der Fetttropfen mit Sudan. Die Tropfen werden dabei wenigstens zweimal so groß als vor der Färbung. Die Aufnahme des Farbstoffes geht (in hochprozentigen Lösungen) sehr rasch vor sich, so daß öfters eine vorübergehende Herabsetzung der Konzentration der Sudanlösung in der Umgebung eines größeren oder einer Gruppe kleiner in Färbung begriffener Tropfen wahrzunehmen ist, eine Herabsetzung, welche jedoch bald durch Diffusionsvorgänge ausgeglichen wird. Im erstarrten und fixierten Plasma-medium der Gewebekulturen ist die Geschwindigkeit der Diffusionsvorgänge geringer als etwa in einer Wasseremulsion, was zur Folge hat, daß dort der Ausgleich der Konzentrationsunterschiede langsamer zustande kommt. Infolgedessen kann man öfters beobachten, daß einer von zwei angrenzenden Tropfen rotgefärbt ist, während der andere nur einen gelblichen Stich oder sogar keine Spur von Färbung aufweist. Aber schon nach einigen Sekunden, sobald die lokale Konzentration des Farbstoffes ausgeglichen ist, nimmt auch dieser Tropfen die gleiche rote Färbung an. Die Kenntnis dieser Tatsache halte ich insofern für lehrreich, als sie es nicht gestattet, auf Grund einer stärkeren oder schwächeren (rot, orange, gelb) Färbung der Fetttropfen mit Sudan etwa einen Schluß auf die im Tropfen enthaltenen Fettarten zu ziehen (vgl. bei *Krontowski*). Trotz der Größezunahme behalten die gefärbten Tropfen anfangs ihre charakteristische rundliche, bei sehr großen Tropfen manchmal auch leicht eiförmige Gestalt bei. Da aber die stoßweise erfolgende Speicherung des Farbstoffes fort dauert, kommt es zum Platzen einzelner Tropfen, welche folglich eine unregelmäßige Form annehmen. Eine vollständige Verwischung der ursprünglichen Form und Verteilung der Fetttropfen kommt weiterhin dadurch zustande, daß benachbarte Tropfen zusammenfließen, und zwar unter Bildung von Halbmonden, Ringen, Zickzackformen usw. Das Platzen und Zusammenfließen der Fetttropfen und die sich anschließende Verunstaltung und Verwischung des ursprünglichen Bildes ist für das zweite Stadium kennzeichnend (Abb. 1 gibt diesen Zustand richtig wieder).

Im dritten Stadium kommt hauptsächlich die lösende Wirkung des Alkohols zum Ausdruck. Die verunstalteten Tropfen werden immer

flacher, dann kraterförmig, und schließlich wird die ursprüngliche Anwesenheit und Verteilung der Fetttropfen in gut fixierten Präparaten nur in dem Protoplasma, dessen Maschen einst die Fetttropfen einnahmen, erkennbar.

Aus all den angeführten Beobachtungen geht hervor, daß eine gute Färbung der Fetttropfen mit alkoholischer Sudanlösung nur im ersten Stadium ihrer Wirkung zu erreichen ist. Um jedoch eine gleichmäßige Färbung in allen Schichten der Gewebekultur zu ermöglichen, müßte man die Zeitdauer des ersten Stadiums der Wirkung alkoholischer Sudan-

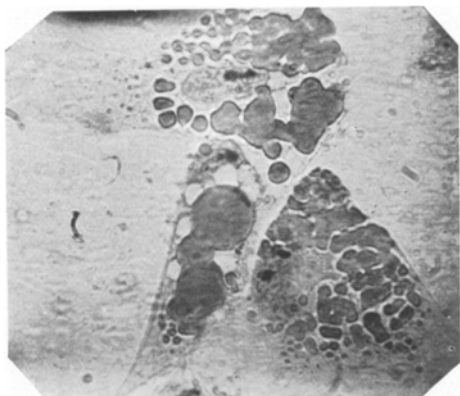


Abb. 1. H.-Embryo, 7 Tage. Herzkultur 120 Stunden alt. Zusammenfließen von Fetttropfen. Mikrophot. Vergr. 750 mal.

lösung bedeutend verlängern.

Dies könnte man nur durch die Herabsetzung der die Fettstoffe lösenden Wirkung von Alkohol bzw. durch Verminderung der Fähigkeit der Fette, sich in Alkohol zu lösen, erreichen. Ich suchte nun den Nachteil der fettlösenden Wirkung der alkoholischen Sudanlösung durch eine Sättigung derselben mit Olivenöl zu beseitigen. Solche ölgesättigte Sudanlösung in 95% Alkohol ergibt tatsächlich binnen 2 bis 4 Min. eine in allen Schichten der im Plasma gezüchteten

Gewebe ziemlich gleichmäßige rote Färbung sämtlicher Fetttropfen. Es besteht andererseits ein Nachteil dieser Färbung in einer gewissen Verschleierung des Gesichtsfeldes. So versuchte ich weiterhin, die Löslichkeit der Fetttropfen in alkoholischer Sudanlösung durch gleichzeitige Wirkung von Formol herabzusetzen. Ich habe mich nämlich im Versuch überzeugt, daß die Löslichkeit eines Tropfens von Olivenöl im Alkohol, dem Formalin zugefügt wurde, bedeutend geringer ist, als in reinem Alkohol von gleicher Konzentration, was offenbar mit Zunahme des Unterschiedes in der Oberflächenspannung zwischen Fett und Alkohol-Formolgemisch zusammenhängt. In einer Reihe von Versuchen mit Sudanlösungen in verschiedenen Alkohol-Formolgemischen habe ich folglich festgestellt, daß eine schöne gleichmäßige Färbung sämtlicher Fetttropfen in den Gewebekulturen im festen Medium mit folgender Mischung am leichtesten zu erreichen ist:

Gesättigte Sudanlösung in 95% Alkohol 4,
Formalin (40% Formaldehydlösung) . . 1.

Die Kulturen sind so zu färben, daß sie an der Oberfläche dieser Farblösung schwimmen. Färbezeit je nach der Dicke der Kultur 2–5 Min.; nachher auswaschen

in fließendem Wasser: einige Minuten lang. Für die Kernfärbung ist besonders verdünntes *Delafieldsches* Hämatoxylin geeignet. Einschließen in Gummisirup. Die gesättigte Sudanlösung in 95% Alkohol ist bei Zimmertemperatur herzustellen, es ist darauf zu achten, daß die Lösung tatsächlich gesättigt sei. Ein Filtrieren ist überflüssig. Jedesmal kann man die nötige Menge von der Stammlösung abpipettieren, welche aber erst einige Tage nach der Bereitung vollständig klar und gebrauchsfähig ist. Die Zugabe von Formalin muß immer unmittelbar vor der Färbung erfolgen, denn sonst wird mit der Zeit die Konzentration der Lösung und das Verhältnis zwischen ihren Teilen geändert. Mit anderen Worten: man muß immer mit frischer Lösung arbeiten. Die Färbung hat den Vorteil, daß eine vorherige Fixierung unnötig ist; die gleichzeitig erfolgende Fixierung scheint hier nur Günstiges zu leisten.

Das Verfahren hat sich auch für Stückfärbung gut bewährt; ich habe Embryonen in der Formalin-Sudanlösung fixiert und gleichzeitig gefärbt; nachträglich wurden sie in Gelatine (Methode von *Heringa* und *Ten Berge*) eingebettet und durch die Gefriermethode geschnitten.

Für die Kulturen in flüssigen Medien, wo die Zellen der schützenden Schicht des erstarrten Plasmas entbehren, ist die Anwendung hochprozentiger Alkoholgemische wegen der dadurch bewirkten Schrumpfung der Zellen nicht zu raten. Eine Fixierung solcher Kulturen vor der Sudanfärbung mit anderen Fixierflüssigkeiten hilft nichts. Ich habe derartige Kulturen mit gutem Ergebnis folgendermaßen behandelt:

Nach vorsichtigem Abpipettieren des flüssigen Mediums läßt man die zu färbende Kultur so lange bei Zimmertemperatur liegen (gewöhnlich 5—15 Min.), bis die noch etwa zurückgebliebene Flüssigkeit soweit ausgedunstet ist, daß die Kultur nur noch feucht aussieht. Nachher Fixieren und Färben in folgender Lösung:

Gesättigte Sudanlösung in 70% Alkohol 4
Formalin 1

Nachher vorsichtig auswaschen, mit Hämatoxylin nachfärben und in Gummisirup einschließen. Die Herstellung der gesättigten Sudanlösung in 70% Alkohol hat im Brutofen bei einer Temperatur von etwa 30° zu erfolgen. Die Lösung ist nach einigen Stunden gebrauchsfähig. Sonstige Maßnahmen wie bei den vorher angegebenen Verfahren.

Bei gut ausgeführter Färbung, sowohl mit der stärkeren, als auch mit der schwächeren Lösung, bekommt man schöne rundliche, rot- bzw. orangegefärbte Tropfen (vgl. Abb.2). Nur in älteren Kulturen oder in den Zellen, wo die Tropfen sehr dicht zusammengedrängt sind, kommt

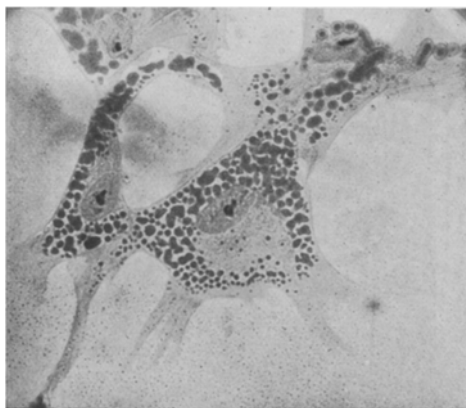


Abb. 2. H.-Embryo, 7 Tage. Herzkultur 96 Stunden alt. Färbung mit Alkohol-Formol-Sudanlösung. Mikrophot. Vergr. 500 mal.

es hier und da zum Zusammenfließen einiger benachbarter Tropfen, was sich nicht vollständig vermeiden läßt, indem die Färbung immer mit einer bedeutenden Größenzunahme der Fetttropfen einhergeht, was übrigens für die Erforschung kleinster, staubförmiger Tröpfchen sogar von Vorteil ist.

Jede Sudanfärbung, die an fixierten Gewebekulturen erfolgt, gibt natürlich die Verhältnisse in der toten Zelle wieder. *M. R. Lewis* teilt mit,

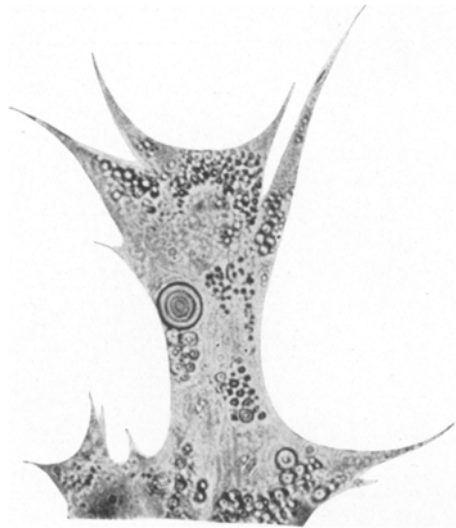


Abb. 3. H.-Embryo, 7 Tage. Herzkultur 72 Stunden alt. Vitale Färbung mit Sudan. Mikrophot. Vergr. 750 mal.

er habe eine vitale Sudanfärbung erhalten, indem er 24 Stunden alten Kulturen verdünntes mit Sudan gefärbtes Eidotter hinzufügte. Ich versuchte mehrmals dieses Verfahren, konnte aber höchstens eine blaßgelbe, kaum sichtbare Färbung der Fetttropfen erzielen.

Eine sehr einfache Methode einer direkten Scharlachfärbung der in „Albumen de Ricin“ enthaltenen Fettstoffe gibt *Policard* an. Er beschreibt das Verfahren folgendermaßen:

„Une goutte de solution (Scharlachlösung) dans la benzine est évaporée sur la lame; il reste adhérent au verre une mince couche d'aiguilles cristallines

microscopiques. Sur ce tapis de cristaux de colorant une couche d'albumen de Ricin est déposée et rendue adhérente par une légère pression. Les fines aiguilles de couleur, mises en contact des cellules et pénétrant peut-être même dans leur intérieur, se dissolvent en l'huile en la colorant en rouge.“

Ich habe nun versucht, die Kulturen unmittelbar über einer Schicht von Sudanpräzipitat zu züchten und auf diesem Wege eine Vitalfärbung mit Sudan zu erhalten. Die in diesem Sinne von mir eingeleiteten Versuche haben befriedigende Ergebnisse gezeitigt. Es ergab sich nämlich, daß man auf diese Weise nicht nur eine schöne orangerote Färbung aller Fetttropfen erzielen (vgl. Abb. 3), sondern auch die ganze Kultur weiterzüchten, teilen und überpflanzen kann. Die Färbung selbst führe ich folgendermaßen aus: Auf ein Deckgläschen wird ein Tropfen gesättigter Sudanlösung in 95% Alkohol gebracht. Der Tropfen — mit einer Glasschale vor Staub geschützt — hat langsam bei Zimmertemperatur auszutrocknen, währenddessen er sich zu einer dünnen gleichmäßigen Schicht ausbreitet, welche nach der Abdunstung einen feinen

Niederschlag von Sudankrystallen zurückläßt. Ist das Deckgläschen vollständig trocken, so setzt man darauf in üblicher Weise eine beliebige Kultur an. Es ist jedenfalls darauf zu achten, daß bei Anwendung von Instrumenten die zarte Schicht von Sudanniederschlag nicht abgekratzt werden darf.

Was endlich den Nachweis mit Osmiumsäure anbelangt, so kann ich hier nur kurz angeben, daß für eine schöne und vollständige Sichtbarmachung der Fetttropfen in den Gewebekulturen nur die sog. primäre Färbung in Betracht kommt. Die Behandlung muß stets in frischen 2%igen Lösungen und wenigstens 3 Tage erfolgen. Auf diese Weise bekommt man sehr schöne (vgl. Abb. 4) und naturgetreue Bilder. Die sog. sekundäre Osmiumfärbung ist wenigstens für die Gewebekulturen unratsam, weil dabei viele Tropfen in ihrer Form geändert, andere — besonders kleine — durch Wirkung von Alkohol auch gelöst werden.

Die Bilder, welche man mit Alkohol-Formol-Sudan-gemischen, mit vitaler Sudanfärbung und mit Osmiumsäure erhält, sind ungefähr gleichwertig. Jedenfalls für die Erforschung kleinster, staubförmiger Fetttropfchen leisten die angegebenen Alkohol-Formolsudanlösungen besonders gute Dienste.

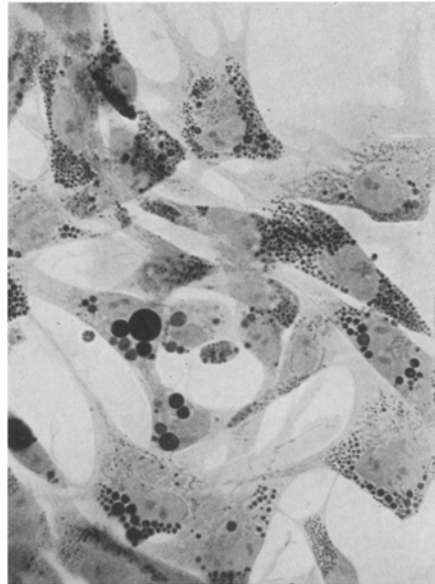


Abb. 4. H.-Embryo, 7 Tage. Herzkultur 72 Stunden alt. Primäre Osmiumfärbung. Mikrophot. Vergr. 500 mal.

Schrifttum.

Proboese, C. u. G. Spröhle: Untersuchungen zur Theorie und Technik der Sudanfärbung. Z. mikrosk.-anat. Forsch. **1928**. — *Kaufmann, C. u. E. Lehmann*: Über den histochemischen Fettnachweis im Gewebe. Virchows Arch. **270** (1928). — *Krontowski, A. u. L. Poleff*: Über das Auftreten von lipoiden Substanzen in den Gewebekulturen. Beitr. path. Anat. **58** (1914). — *Policard A. u. G. Mangenot*: Recherches cytologiques sur l'état de l'huile dans les graines oleagineuses. La graine mûre. Academie Sci. **1923**. — *Romeis, B.*: Zur Methodik der Fettfärbung mit Sudan III. Virchows Arch. **264** (1927).