

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin  
[Direktor: Prof. Dr. R. Rössle].)

## Über ein neues Verfahren zur Darstellung des Stützgerüsts der Organe.

Von

Dr. Guilherme de Oliveira

Assistent der medizinischen Fakultät Coimbra, Portugal.

(Eingegangen am 12. August 1936.)

Seitdem *Bielschowski* zur Darstellung des Bindegewebes die Verwendung kolloidaler Silberlösungen einführte, sind zahlreiche Methoden angegeben worden, welche auf dem gleichen Grundprinzip beruhen. Die heute meist angewandten Methoden haben den Nachteil, daß sie teils sehr lange Zeit beanspruchen, teils technisch schwierig und unzuverlässig sind und die versilberbaren Elemente des Bindegewebes nicht mit der nötigen Deutlichkeit und Selbständigkeit zur Darstellung bringen. Jedem, der sich mit Versilberungen beschäftigt hat, sind die Schwierigkeiten bekannt, das Ablösen der Schnitte nach der ammoniakalischen Silberlösung zu vermeiden. Andererseits sind die erlangten Färberesultate nicht eindeutig, indem sich die kollagenen Fasern in wechselnd starker Weise mitanfärben. Ein wesentlicher Mangel für die Darstellung der feineren Faserverhältnisse, insbesondere der Beziehungen zwischen Gitterfasern und Zellprotoplasma ist weiterhin die Tatsache, daß Zellkern und Protoplasma nur unvollkommen durch nachträgliche Färbung mit Kernechtrot dargestellt werden können. Dieser Nachteil macht sich besonders bei Untersuchung des Reticulums von Lymphknoten und gleichartig aufgebauten Geweben geltend.

In der letzten Zeit sind zwei Silberimprägnationsmethoden veröffentlicht worden, von denen die eine den Zweck hat, den Nachteil der Nachfärbung zu beseitigen, und die andere, die Dauer der Ausführung zu verkürzen. *Suarez* hat eine Modifikation der *Hortegaschen* doppelten Silberimprägnation ausgearbeitet, die darin besteht, die Schnitte durch zwei ammoniakalische Silberlösungen zu bringen. Bei seiner Methode findet eine doppelte Imprägnation statt, erstens in einer ammoniakalen Lösung von Silbercarbonat und alsdann in einer kolloidalen Lösung von Silberchromat. Mit dieser Methode gelingt es gleichzeitig das Protoplasma der Zellen zu färben, und zwar in einer anderen Tönung als in der des Gitter- und Kollagengerüsts. Dadurch wird ein Studium der bestehenden Beziehungen zwischen Protoplasma und extracellulären Fasern möglich, was einen großen Vorteil für die Beurteilung der feinaulichen Eigenschaften des Gewebes bedeutet. Leider ist die Methode

nicht für Paraffinschnitte geeignet, da diese bei den höheren Temperaturen, in die sie bei der kolloidalen Silbercarbonatlösung gestellt werden müssen, schrumpfen, zerreißen und sich vom Objektträger ablösen. Das gleiche gilt für die Gefrierschnitte, wenn es sich um schlecht erhaltenes Gewebe handelt.

Um Zeit zu ersparen, hat *Wilder* in der neuesten Zeit eine Methode ausgearbeitet, die sehr schnell ausgeführt werden kann. Diese Methode hat aber den Nachteil, daß sie eine geringe Empfindlichkeit besitzt und wie die anderen bekannten Methoden eine Zellnachfärbung verlangt. Außerdem werden manchmal die Gitterfasern und die dünnsten kollagenen Fasern in gleicher Weise dargestellt, so daß nach dieser Methode eine sichere Entscheidung über den Gehalt an Gitterfasern nicht getroffen werden kann. Es ist somit nur eine sehr einfache und schnelle Methode, die uns dazu dienen kann, eine Übersicht des Stützgerüsts eines Gewebes zu geben. Sie ist aber nicht ausreichend, um die feinsten Einzelheiten darzustellen, die wir bei einer eingehenden histologischen Untersuchung berücksichtigen müssen. Im Laufe unserer Untersuchungen über die Retothelsarkome der Lymphknoten sind uns die Schwierigkeiten der Technik und die Unvollkommenheit der Ergebnisse bei den bekannten Silberimprägnationsmethoden hemmend genug entgegengetreten. Gerade bei diesen Tumoren ist es besonders nötig, daß die Beziehungen zwischen Zellen und Fasern klar dargestellt werden, da diese sehr wichtig für die Kenntnis und die Klassifikation derartiger Tumoren sind. Hierbei wird auch die Frage der Entstehung der Gitterfasern aufgeworfen, welche nur mittels einer sehr empfindlichen Silberimprägnationsmethode geprüft werden kann.

Mit Rücksicht darauf haben wir eine Methode ausgearbeitet, die aus einer Kombination zwischen den beiden oben erwähnten Verfahren besteht und ihre Vorteile in sich vereinigt. Mit unserer Methode konnten wir sehr bequem mit Paraffinschnitten arbeiten und die feinsten argyrophilen und kollagenen Fasern darstellen. Die ersten treten deutlich schwarz und die zweiten rot-violett hervor, so daß eine scharfe Unterscheidung zwischen den beiden möglich ist.

Gleichzeitig konnten wir damit den Verlauf von Gitterfasern innerhalb der Protoplasmafortsätze und im Protoplasma selbst beobachten. Besonders bei den embryonalen Formen der Retothelsarkome haben wir intraplasmatisch gelagerte Fibrillen festgestellt, wie man aus der Abbildung der vorhergehenden Arbeit ersehen kann. Zu diesem Vorteil der Darstellung der kollagenen Fasern und der argyrophilen bis in das Protoplasma hinein kommt noch die Schnelligkeit des Verfahrens hinzu. Sobald man mit der Technik vertraut ist, beansprucht die Methode knapp eine Stunde. Unserer Erfahrung nach ist die Methode insbesondere für die mesenchymalen Organe sehr geeignet. Von den parenchymreichen

Organen erhält man bei der Leber am schwersten gute Resultate. Vor allen Dingen müssen die Schnitte dünn sein ( $4-5\mu$ ), was für die anderen Organe auch sehr vorteilhaft, obwohl nicht unbedingt nötig ist. Die Dünne der Schnitte ermöglicht außerdem ein schnelleres Arbeiten, da man bei der ammoniakalischen Silberchromat- und der Goldchloridlösung das Verbleiben des Präparates um 5 Min. abkürzen kann.

Nach diesen Vorbemerkungen soll die Technik im einzelnen geschildert werden:

Das Material wird wie üblich 24 Stunden in 10%igem Formol fixiert und in Paraffin eingebettet. Möglich ist auch die Fixierung mit absolutem Alkohol und nach *Zenker*. Die Paraffinschnitte werden wie gewöhnlich mit Eiweißglycerin aufgeklebt und zuerst 5 Min. im Brutschrank von 56, danach im Brutschrank von 38 getrocknet — nur für schwierige Gewebe wie Knorpel empfiehlt sich die Anwendung von Objektträgern, die nach *Heringa* und *Ten Berge* mit Aufklebegelatine überzogen sind. Wenn man es eilig hat, können die Schnitte nach 55 Min. Trocknung im Brutschrank von 56 und 10 Min. im Brutschrank von 38 sofort weiter verarbeitet werden. Dies bedeutet einen sehr großen Vorteil gegenüber den anderen Methoden, bei denen die Schnitte sich leicht vom Objektträger ablösen, selbst wenn sie sorgfältig aufgeklebt werden, was lange Zeit beansprucht. Die Schnitte werden sorgfältig entparaffiniert, durch die Alkoholreihe in Aqua destillata und danach in die folgenden Flüssigkeiten gebracht:

1. Phosphormolybdänsäure 10% . . . . . 1 Min.  
(In brauner Flasche lange haltbar.)
2. Abspülen in Aqua dest. . . . . 10—20 Sek.
3. Uranyl nitrat 1% . . . . . 5 Sek.  
(In brauner Flasche lange haltbar.)
4. Abspülen in Aqua destillata . . . . . 5 Sek.
5. Übertragen der Schnitte in *Foots*che Lösung . . . . . 1 Min.  
(Jedesmal neu zuzubereiten.)
6. Kräftiges Abspülen in reichlich 95%igem Alkohol . . . . . 5 Sek.  
Dabei trübt sich der Alkohol leicht.  
(95% Alkohol aus absolutem Alkohol herstellen!)
7. Reduktion in einer Mischung von Formalin, Uranyl nitrat und Aqua destillata . . . . . 1 Min.  

Aqua destillata . . . . .	100 ccm
Formalin 40%ig neutral . . . . .	3 ccm
Uranyl nitrat 1%ig . . . . .	1 ccm

 (In brauner Flasche lange haltbar. Erneuern sobald trüb geworden.)  
 Die Schnitte nehmen eine hellbraune Farbe an.
8. Waschen in Aqua destillata . . . . . 3—5 Min.
9. Imprägnierung in ammoniakalischer Silberchromatlösung im Brutschrank von 56° . . . . . 15—20 Min.  
Die Schnitte werden hierbei rötlich-braun.  
(Lösung ist jedesmal neu zuzubereiten und vor dem Gebrauch anzuwärmen.)
10. Waschen in Aqua destillata . . . . . 3—5 Min.

11. Reduktion in einer Mischung von Formalin, Hydrochinon und  
 Aqua destillata . . . . . 1 Min.  
     Formalin 40% neutral . . . . . 30 cem  
     Hydrochinon . . . . . 0,30 cem  
     Aqua destillata . . . . . 70 cem  
 (In brauner Flasche lange haltbar.)  
 Die Schnitte werden dunkelbraun.
12. Waschen in Leitungswasser . . . . . 3— 5 Min.
13. Vergoldung in einer 0,2%igen gelben Goldchloridlösung im Brut-  
 schrank von 56° . . . . . 5—10 Min.  
 (Die Lösung ist in brauner Flasche lange haltbar und vor dem  
 Gebrauch anzuwärmen.)
14. Fixierung in Natriumthiosulfat 5% . . . . . 6—10 Min.
15. Waschen in reichlichem Leitungswasser — Alkoholreihe —  
 Kanadabalsam.

Im übrigen sind für die Ausführung der Methode die sonst für die empfindlichen Verfahren notwendigen Sauberkeitsmaßnahmen zu beachten. Zum Spülen ist reichlich Aqua destillata zu verwenden und dieses einmal zu wechseln. Zum Gebrauch der Lösungen sind schmale Kuvetten zu 50 cem geeignet. Die Schnitte sind häufig zu bewegen. Es wird empfohlen, die Schnitte beim Wechseln der Lösungen langsam herauszuziehen, damit die Flüssigkeiten so weit als möglich ablaufen können, besonders sorgfältig bei der *Foots*chen Lösung und dem 95%igen Alkohol. Bei fibrinhaltigem Material ist zur Vermeidung von Niederschlägen das Formol-Hydrochinon (11) in ungebrauchtem Zustand zu verwenden.

#### *Bereitung der Silberlösungen.*

A. *Foots*che Lösung: Zu 5 cem einer 10%igen Silbernitratlösung wird Ammoniak tropfenweise hinzugefügt, bis der sich bildende Niederschlag sich vollkommen wieder auflöst. Dann fügt man 5 cem einer 3%igen Natronlauge hinzu und löst den dadurch gebildeten Niederschlag mit tropfenweise hinzugefügtem Ammoniak auf. Danach füllt man mit Aqua destillata auf 50 cem auf.

B. Silberchromatlösung: Zu 5 cem einer 10%igen Silbernitratlösung werden 10 cem einer 5%igen wässerigen Kaliumbichromatlösung zugefügt. Der sich bildende Niederschlag wird in einem hohen Meßzylinder mit Aqua destillata gewaschen, bis das nach Absitzenlassen überstehende Wasser nicht mehr gefärbt ist. Dieses gießt man ab, gibt 40 cem Aqua destillata hinzu und weiter unter dauerndem Umschütteln tropfenweise Ammoniak, bis der Niederschlag bis auf eine deutlich erhaltene Trübung aufgelöst ist. Danach füllt man auf 85 cem auf.