

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn  
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL).

## Über die Silberimprägnation der LANGERHANSSEN Inseln mit der Methode von BODIAN.

Von

GISELA HELLWEG.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 9. Mai 1955.)

Seitdem das glykogenmobilisierende Hormon des Pankreas, das Glukagon, als 2. Hormon in den LANGERHANSSEN Inseln lokalisiert wurde, ist es ein dringendes Anliegen geworden, die Zahl der im gesunden und kranken Pankreas vorhandenen besonderen Inselzellen genau zu erfassen (BARGMANN). Lag es doch nahe, ebenso wie man die Insulinbildung in die B-Zellen lokalisiert hatte, nunmehr die Glukagonbildung den A-Zellen zuzuschreiben. An gefärbten Schnitten lassen sich aber die A-Zellen kaum richtig auszählen, da so und so oft die für die Zuordnung der Zellen maßgebende Färbung der Körnchen zu wenig markant ist. Die Feststellung, daß die argyrophilen Zellen der Inseln (HAMPERL 1932) den A-Zellen entsprechen (FERNER), schien hier einen neuen Weg zu öffnen. Man sieht sich allerdings dabei 2 Schwierigkeiten gegenüber:

1. wird von manchen Seiten angezweifelt, ob die durch die Silberimprägnation dargestellten Zellen tatsächlich sämtliche A-Zellen und nur A-Zellen umfassen (CREUTZFELDT, BURKL);
2. ist die Imprägnationsmethode bis in die allerletzte Zeit ein Gegenstand von Kontroversen gewesen (s. FERNER).

Zu dem ersten dieser beiden Punkte wollen wir uns hier nicht äußern, sondern nur auf die technischen Schwierigkeiten der Darstellung eingehen. HAMPERL hat seinerzeit mit der Methode nach GROS-BIELSCHOWSKY gearbeitet, ihrem Ausfall aber keine zu große Wichtigkeit beigemessen, weil er sie für „launisch“ hielt. Die Methode ist inzwischen verbessert und verfeinert worden, doch hängt auch heute noch viel davon ab, ob man „ausversilbert“; d. h. je nach der Zeit, die man die Schnitte im Silberbad beläßt, könnte der Kreis der imprägnierten Zellen größer oder kleiner ausfallen. Es wird auch zugegeben (FEYRTER), daß es nur dem in der Methode Erfahrenen gelingt, wirklich alle silberimprägnierbaren Zellen und nur diese zu imprägnieren, und daß selbst der Geübte nicht immer vor Mißserfolgen gesichert sei.

Demgegenüber schien nun die Imprägnationsmethode mit Protargol nach BODIAN den Vorteil zu besitzen, immer nur denselben Kreis von

Zellen auch in den Inseln darzustellen (CREUTZFELDT). Das von BODIAN (1936) zur Darstellung der Nervenfibrillen eingeführte Verfahren wurde 1944 durch DAWSON und BARNETT so abgeändert, daß sich an Stelle der Nervenfasern jetzt Granula bestimmter Zellen elektiv darstellen. Später hat dann HAMPERL die Methode für die Imprägnation der argyrophilen Zellen noch weiter vereinfacht.

Leider mußten wir aber hören, daß das vom Marburger Institut her empfohlene Verfahren an anderen Stellen nicht zu den gewünschten Ergebnissen führte. Tatsächlich konnten wir selbst, nachdem unsere alten Protargolbestände aufgebraucht waren, mit den neugelieferten ebenfalls keine zufriedenstellenden Ergebnisse mehr erzielen, und zwar weder mit dem von Bayer neuhergestellten Protargol, noch mit der unter dem Namen Protargol-S (for staining) von der amerikanischen Firma Winthrop-Stearns in den Handel gebrachten Substanz. Es kam nur zur Bildung von Silberniederschlägen, gelegentlich auch zu einer leichten Bräunung der argyrophilen Zellen.

Protargol ist chemisch gesehen ein Albumose-Silber, dessen Zusammensetzung nicht konstant sein kann. Je nach dem Darstellungsweg wird sein Silbergehalt schwanken, wenn auch wohl ein Mindestprozentsatz an Silber garantiert ist. Es war daher weder den Bayer-Werken möglich, ein chemisch dem alten völlig identisches Protargol wiederherzustellen, noch konnten wir mit einer in seiner chemischen Struktur genau festliegenden Substanz arbeiten.

Ich habe mich daher bemüht, rein empirisch durch Variieren der einzelnen Teilvergänge bei der Durchführung der Methode mehrere uns von den Bayer-Werken zum Testen übersandte Chargen des neuen Protargols der ursprünglichen Methode anzupassen und diese damit wieder brauchbar zu machen.

### Material und Methodik.

Von der ursprünglichen Imprägnationsmethode wurde nacheinander jeder Schritt in Konzentration und Zusammensetzung der Lösungen sowie in Zeitdauer der Einwirkung abgeändert. Ausgehend von der besonderen Bedeutung der BODIAN-Methode zur Darstellung der argyrophilen Zellen im Pankreas wurde zum Testen zunächst nur menschliches Leichenpankreas verwandt. Die darauf abgestimmte Methode wurde weiterhin auf ihre Brauchbarkeit für die argyrophilen Zellen in Magen-Darmtrakt, Hypophyse, Nebennieren sowie für die A-Zellen bei Pferd, Kaninchen, Hund, Ratte und Maus geprüft.

### Ergebnisse.

Die Zeit, die zwischen Tod und *Fixieren* des Gewebes verstreicht, spielt keine wesentliche Rolle, jedoch hat es sich als günstig erwiesen,

diese Zeitspanne nicht unter 6 Std zu wählen, da sich die A-Zellen sonst zuweilen nicht imprägnieren lassen. Wurde das Gewebe innerhalb von 6—48 Std nach dem Tode fixiert, so erhält man die besten Resultate. Nach 48 Std ist die Autolyse zu weit vorgeschritten, um noch Zellstudien zu ermöglichen. Während es früher möglich war, nach Formol- und nach Bouinfixierung gute Imprägnationsergebnisse zu erzielen, ist uns eine Imprägnation mit dem neuen Protargol ausschließlich nach Formolfixierung gelungen. Die Zeit, für die man das einmal durchfixierte Gewebsstück noch weiter in Formol beläßt, beeinflußt die Imprägnation in keiner Weise.

Nach der üblichen Paraffineinbettung haben wir zum *Aufkleben der Schnitte* auf den Objektträger neben Eiweißglycerin auch die eiweißfreie RUYTERSche Flüssigkeit (Aceton 2 cm<sup>3</sup>, Methylbenzoat 1 Tropfen, Aqua dest. 8 cm<sup>3</sup>) benutzt und erhielten mit letzterer eine konstante und gleichmäßige Imprägnation der A-Zellen im Gegensatz zum Eiweißglycerin. Dies mag zum Teil auf der Schutzkolloidwirkung des Eiweißes beruhen, die ein Zusammentreten niedergeschlagener feinster Silberteilchen zu kolloidalen verhindern könnte; je größer aber die Silberteilchen, desto tiefer ihre Schwärzung (ZEIGER).

Bringt man die entparaffinierten Schnitte gleich in die Protargollösung, so ist es trotz Abändern aller weiteren Schritte zwar möglich, eine konstante Imprägnation der A-Zellen zu erreichen, doch bleibt der Untergrund dabei zu dunkel, so daß sich die imprägnierten Zellen nur mit der starken Vergrößerung deutlich genug von ihm abheben. Eine wesentliche Aufhellung aller nicht imprägnierten Gewebsstrukturen gelingt, wenn man die entparaffinierten Schnitte für 24 Std (oder länger) *in 40%igem Formalin vorbehandelt*. ZEIGER nimmt an, daß Formalin durch Steigerung der negativen Ladung das Reduktionsvermögen der argyrophilen Zellen erhöht und damit die Bildung von Silberkeimen begünstigt.

Bei der nun folgenden Imprägnation der Schnitte in der *Protargol*-lösung scheinen mehrere Faktoren von Bedeutung zu sein. Zunächst der pH-Wert der wäßrigen Lösung: positive Ergebnisse haben wir nur erzielt innerhalb eines pH-Wertes von 7,8—6,8 vor der Imprägnation, der dann während der Imprägnation auf 6,8—6,0 absinkt. Liegt der pH-Wert vor der Imprägnation über 8,0, so kommt es zur Schwärzung nicht nur der Granula der A-Zellen, sondern auch der Zellkerne und weiterer Gewebsstrukturen, je höher man geht. Bei einem Anfangs-pH-Wert von unter 6,8 dagegen finden sich nur Niederschläge, jedoch keinerlei Imprägnation von Gewebsstrukturen. Im allgemeinen besteht kein Unterschied im pH-Wert oder im Ergebnis der Imprägnation bei Verwertung einer 1%igen oder 2%igen Protargollösung. — Unterschiede

im  $p_H$ -Wert der Protargollösung können aber auch durch  $p_H$ -Schwankungen des destillierten Wassers zustande kommen, dessen  $p_H$ -Wert möglichst nicht unter 5,8 liegen sollte, denn eine Pufferung kann durch das ionenfreie Protargol nicht erfolgen. Ein nachträglicher Zusatz z. B. von Natrium-Bicarbonat oder Ammoniak zur Einstellung eines höheren  $p_H$ -Wertes ist nicht möglich, da dann gar keine Imprägnation zustande kommt.

Es ist gut vorstellbar, daß auch der *Silbergehalt* des Protargols für die Intensität der Imprägnation von Bedeutung ist, wobei sich schwer entscheiden läßt, ob ein größerer oder kleinerer Silbergehalt günstiger ist. Von den verschiedenen von uns getesteten Protargolchargen der Bayer-Werke haben wir z. B. mit einer Charge konstant positive Ergebnisse erzielt, die einen Silbergehalt von 0,27—0,30% und einen  $p_H$ -Wert von 6,9 der 1- und 2%igen Lösung aufweist. Verwendbar ist außerdem das von der amerikanischen Firma Winthrop-Stearns hergestellte „Protargol-S“ (Silbergehalt 7,74%,  $p_H$  der 1%igen Lösung 7,6); jedoch imprägnieren sich die Granula der argyrophenen Zellen mit dem amerikanischen Protargol nur braun, nicht tiefschwarz. Die Bayer-Werke haben inzwischen auf unsere Veranlassung die oben erwähnte, zur Imprägnation brauchbare Charge ausschließlich für histologische Zwecke reserviert und mit der Bezeichnung „für die Bodian-Methode“ in den Handel gebracht.

Setzt man an Stelle von Kupfer andere *Metalle* der Protargollösung zu, so kommt es mit Kobalt, Zink und Blei überhaupt nicht zur Imprägnation, mit Magnesium und Aluminium erzielt man eine hellbraune Imprägnation, während man mit Kupfer die weitaus besten Ergebnisse erhält. Als optimale Menge hat sich uns ein Zusatz von 4 g auf 100 cm<sup>3</sup> Protargollösung erwiesen, wobei es keine Rolle spielt, ob das Kupfer am Grund des Gefäßes liegt oder frei in der Lösung aufgehängt wird. In jedem Fall darf es erst zusammen mit den zu imprägnierenden Schnitten in die Lösung gebracht werden.

Das *Alter* der Protargollösung liegt am günstigsten zwischen 3 Std bis zu 8 Tagen. — Die *Dauer* der Imprägnation erreicht ihr Optimum zwischen 3 und 24 Std. Die Imprägnation wird nach den ersten 2 Std nicht mehr stärker, offenbar, weil dann bereits der  $p_H$ -Wert unter 6,8 abgesunken ist. Doch läßt sich nach etwas längerer Imprägnationsdauer oft ein noch etwas hellerer Untergrund erzielen. Im Gegensatz zur Silberimprägnationsmethode nach BIELSCHOWSKY-GROS sind auch nach 24 Std lediglich und gleich stark dieselben Zellen imprägniert, die es auch schon nach 2 Std waren. — Das *Temperaturoptimum* während der Imprägnation liegt bei einer Brutschranktemperatur von 48°.

Aus der Protargollösung gelangen die Schnitte nach kurzem Abspülen in Aqua dest. in die *Hydrochinonlösung*. Diese wird am besten stets frisch angesetzt. Es genügt eine Einwirkung von 5 min bei Zimmertemperatur, bei der darauffolgenden Einbringung in die *Oxalsäurelösung* eine solche von 3 min. — Durch anschließendes Vergolden läßt sich keine wesentliche Verbesserung des Ergebnisses erzielen.

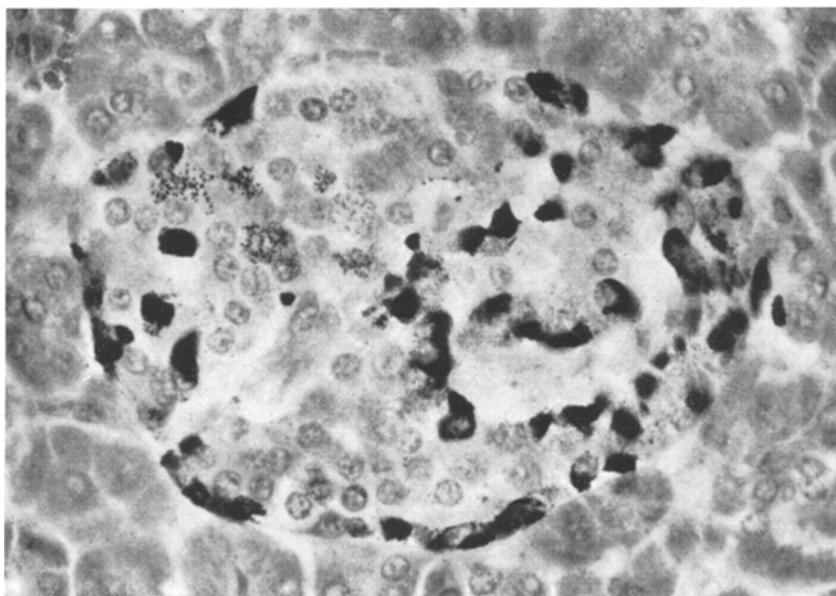


Abb. 1. LANGEBHANS'sche Insel mit argyrophilen Zellen, Imprägnation mit Protargol.

Für die argyrophilen Zellen des *Magen-Darmtraktes*, der *Hypophyse* und der *Nebenniere* gelten grundsätzlich die gleichen Regeln. Nur besteht hier im Gegensatz zu den A-Zellen des Pankreas ein Unterschied in der Farbintensität der Imprägnation je nach der Imprägnationsdauer: nach 3 Std sind die argyrophilen Zellen hellbraun, nach 5—8 Std etwas dunkler braun und erst nach 24 Std tief schwarz imprägniert. Wir haben daher die Präparate aus dem Magen-Darmkanal, der Hypophyse und Nebenniere immer 24 Std in der Protargollösung gelassen. Die Zahl der jeweils imprägnierten Zellen bleibt jedoch auch hier stets gleich und ist somit unabhängig von der Dauer der Imprägnation.

Bei *Ratte* und *Kaninchen* ist es uns nicht gelungen, eine Imprägnation der A-Zellen des Pankreas zu erzielen, und auch bei *Pferd*, *Hund* und *Maus* erhielten wir nur ganz schwach hellbraun imprägnierte A-Zellen. Dagegen imprägnieren sich die argyrophilen Zellen des Magen-Darm-

traktes bei diesen Versuchstieren mehr oder weniger dunkelbraun. Weitere kleinere Abänderungen der Methode würden vielleicht auch hier zu besseren Ergebnissen führen.

Zusammengefaßt führt folgende Abänderung der ursprünglichen BODIAN-Methode zu den besten Ergebnissen, d. h. schwarz imprägnierten Zellen auf hellgelbem Grund (s. Abb. 1):

Zu verwenden sind Paraffinschnitte von in Formol fixiertem Material. Zum Aufkleben auf den Objektträger muß eine eiweißfreie Lösung verwendet werden, am besten RUYTERSche Flüssigkeit (Aceton 2 cm<sup>3</sup>, Methylbenzoat 1 Tropfen, Aqua dest. 8 cm<sup>3</sup>).

1. 24 Std Vorbehandeln der entparaffinierten Schnitte in 40%igem Formalin.

2. Abspülen in Aqua dest.

3. 12—24 Std in 1—2%ige wäßrige Lösung von Protargol Bayer „für die Bodian-Methode geeignet“ (p<sub>H</sub> 7,9—6,9), der auf 100 cm<sup>3</sup> 4 g metallischen Kupfers zugesetzt sind, unter Lichtabschluß bei 48° C.

4. Abspülen in Aqua dest.

5. 5 min in folgender Lösung: Hydrochinon = 1 g, Natriumsulfit = 5 g, Aqua dest. = 100 cm<sup>3</sup>.

6. Abspülen in Aqua dest.

7. 3 min in 2%ige wäßrige Oxalsäurelösung.

8. Aqua dest., aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Balsam.

### Zusammenfassung.

Durch kleine Abänderungen der ursprünglichen Silberimprägnationsmethode von BODIAN ist es gelungen, ein von Bayer neu hergestelltes Protargol der alten Methode anzupassen und diese damit wieder brauchbar zu machen. Wichtig erscheint dabei vor allem: das Aufkleben der Schnitte auf den Objektträger mit RUYTERScher Flüssigkeit; das Vorbehandeln der entparaffinierten Schnitte in 40%igem Formalin; ein Anfangs-p<sub>H</sub>-Wert der Protargollösung von mindestens 6,8.

Die Bayer-Werke haben jetzt eine Protargolcharge in den Handel gebracht, mit der sich konstante Imprägnationsergebnisse erzielen lassen. Es wäre daher ratsam, nur dieses Protargol für die Imprägnation der argyrophilen Zellen zu verwenden.

### Literatur.

BARGMANN, W.: Die Zytologie der LANGERHANSSchen Inseln. Verh. dtsch. Ges. Verdgs- u. Stoffw.krkh. **16**, 121 (1952). — BODIAN, D.: A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. Anat. Rec. **65**, 89 (1936). — BURKL, W.: Über die Versilberbarkeit der trüben Zellen in der Bauchspeicheldrüse des menschlichen Keimlings. Z. Zellforsch. **35**, 357 (1951). — CREUTZ-FELDT, W.: Zur Deutung des Silberzellbildes und anderer Pankreasbefunde beim

508 GISELA HELLWEG: Über die Silberimprägnation der LANGERHANSCHEN Inseln.

Diabetes mellitus und Inseladenom. Beitr. path. Anat. **113**, 133 (1953). — DAWSON, A. B., and J. BARNETT: BODIAN's Protargol method applied to other than neurological preparations. Stain Technol. **17**, 115 (1944). — FERNER, H.: Die Markierung der A-Zellen des Inselsystems beim Menschen durch Silberimprägnierung nach GROS-SCHULTZE. Virchows Arch. **326**, 22 (1954). — FEYRTER, F.: Die Markierung der A-Zellen des Inselsystems beim Menschen durch Silberimprägnierung nach GROS-SCHULTZE. Virchows Arch. **326**, 22 (1954). — HAMPERL, H.: Über argyrophile Zellen. Virchows Arch. **286**, 811 (1932); **321**, 482 (1952). — ZEIGER, K.: Physiko-chemische Grundlagen der histologischen Methodik. Dresden u. Leipzig 1938.

Dr. GISELA HELLWEG, Pathologisches Institut der Universität Bonn.