

- Prof. S. Ramón y Cajal in Madrid.
 Prof. Cl. Regaud in Lyon.
 P. F. Reinsch in Erlangen.
 B. Rezník in Neuhaus i. B.
 E. Richter in Jena.
 Prof. Dr. P. Schiefferdecker in Bonn.
 Dr. E. Schoebel in Neapel.
 Prof. Dr. A. Schuberg in Heidelberg.
 Dr. E. Stransky in Wien.
 Prof. Dr. K. Strehl in Erlangen.
 Dr. A. von Tompa in Budapest.

Ueber einige Methoden der Silberimprägnirung
 zur Untersuchung der Neurofibrillen, der Achsen-
 cylinder und der Endverzweigungen.

Von

Prof. S. R. Cajal

in Madrid.

Unsere dreijährige Beschäftigung mit mikrotechnischen Methoden, die mit der Reduction von Silbersalzen arbeiten, hat uns mit einem Verfahren bekannt gemacht, das — ohne Mühe und mit grosser Sicherheit — selective Färbungen (schwarz oder kaffeebraun auf gelbem Grunde) der BETHE- und SIMARRO'schen Neurofibrillen gewinnen und gleichzeitig die granulären Structures des Nucleolus und des Nucleoplasmas der markhaltigen und markfreien Achsen, der pericellularen Nervenverzweigungen und der AUERBACH'schen Endknospen zu Stande kommen lässt.

Da die Einzelheiten der Methode und die mit ihr gewonnenen Resultate ausführlich bereits in spanischer Sprache veröffentlicht worden sind,¹ dürfen wir uns an dieser Stelle darauf beschränken,

¹) CAJAL, S. R., Un sencillo procedimiento de impregnacion de las fibrillas interiores del protoplasma nervioso. Arch. latinos de Medicina y Biología. N° 1. 20 Octubre 1903.

— Un sencillo metodo de coloracion selectiva del reticulo protoplasmico y sus efectos en los diversos organos nerviosos. Trab. del Lab. de Invest. biol. N° 4. Tom. II, Diciemb. 1903.

— Algunos metodos de coloracion de los cilindros ejes, neurofibrillas y nidos nerviosos. Trab. del Lab. de Invest. biol. Tom. III, N° 1, 1904.

die Grundzüge der neuen Technik zu skizziren und ganz summarisch auf die damit gewonnenen Ergebnisse einzugehen.

I. Erste Methode: besonders zur Färbung der Neurofibrillen kleiner und mittlerer Nervenzellen.

Die Methode erfordert zwei Manipulationen: 1) Eintauchen der Objecte in eine Lösung von Silbernitrat. — 2) Reduction des Silber-salzes en bloc in einer neutralen Lösung von Hydrochinon oder Pyrogallussäure:

1. Eintauchen der Objecte in das Silberbad. — Stücke des Nervengewebes von etwa 3 mm Stärke werden — frisch oder spätestens einige Stunden nach dem Tode — 3 Tage lang im Thermostaten bei einer Temperatur von 30 bis 35° C. in folgender Lösung belassen.

Silbernitrat	0.75 bis 3 g
Aqua destillata	100 „

Besonders zu betonen ist, dass die Benutzung des Thermostaten zu den unerlässlichen Vorbedingungen für das Gelingen der Präparate gehört: denn das Wesentliche der neuen Methode besteht in einer besonderen, bisher nicht näher analysirbaren Wirkung, welche die Wärme auf die Verbindungen des Silbers mit organischen Bestandtheilen der Neurofibrillen ausübt. Möglicher Weise besteht die Wirkung in beginnender Reduction; denn wenn die Objecte „reif“ sind für die Reduction (siehe unten), zeigen sie auf Schnitten eine braungelbe Färbung. — Im Sommer kann man auf die Benutzung des Thermostaten verzichten, vorausgesetzt, dass die Temperatur über 22° C. gestiegen ist. Man wird aber alsdann die Einwirkungs-dauer verlängern und die Objecte 2 bis 3 Tage länger dem Silberbad aussetzen müssen.

Die kleinen Objecte — beispielsweise Stückchen vom Rückenmark der Kaninchen, der Katze, des Hundes, neugeborener oder wenige Tage alter Thiere — verbleiben in der Silbernitratlösung 2 $\frac{1}{2}$ bis 3 $\frac{1}{2}$ Tage. Belässt man die Objecte noch länger in der Lösung, so ist ihre „Reifephase“ bereits überschritten, und es resultiren keine schwarzen oder kaffeebraunen Färbungen, sondern rothe auf dunkel-ockerfarbenem Grunde.

Grössere Objecte, die von ausgewachsenen Thieren stammen, wie etwa Rückenmark, Bulbus und Kleinhirn des Kaninchens, erfordern im allgemeinen eine längere, viertägige Einwirkungs-dauer des Silbernitrats, das Grosshirn 5 Tage. Die Resultate fallen verschieden aus je nach den Dimensionen und der Zahl der behandelten Stücke, nach der Art des Thieres und der Temperatur. Man muss für jeden einzelnen Fall die Frist, die bis zur „Reife“ der Präparate erforderlich ist, durch Probiren ermitteln. Man beachte dabei, dass dann, wenn die Objecte vorzeitig aus der Silberlösung genommen werden, beim Reduktionsverfahren ein körniger Niederschlag entsteht — namentlich über den Neurofibrillen und den Dendriten. Lässt man hingegen die Objecte zu lange in der Lösung, so entsteht eine klare Gelb- oder Braunfärbung oder erkennbare Niederschlags-partikel, ohne jedoch die erforderlichen Contraste sichtbar werden zu lassen.

Von grosser Wichtigkeit ist ferner die Concentration der Silberlösung. Als allgemeine Regel hat zu gelten: je schwächer die Concentration der Lösung ist, um so grösser wird der Contrast in der Färbung der Neurofibrillen und des Untergrundes; und umgekehrt, je stärker die Concentration ist, desto schwächer heben sich die Neurofibrillen ab. Dafür aber fixiren die kräftigen Lösungen die Zellen besser, und die AUERBACH'schen Endknospen werden besser gefärbt, während die schwachen Lösungen ausgezeichnete Färbungen der Nucleolen und der intranuclearen MANN- und LENHOSSÉK'schen Bacillarkörper geben. — Bei unseren Versuchen kommen daher ständig folgende Lösungen zur Anwendung:

1.5 procentige Lösung; sie ist in der Mehrzahl aller Fälle anwendbar. Die Neurofibrillen werden recht gut imprägnirt und gleichzeitig die Nucleolen und verschiedene Endverzweigungen (im Kleinhirn etc.) gut gefärbt.

0.75- bis 0.5 procentige Lösung; sie giebt gute Resultate bei Untersuchung der Embryonen und der neugeborenen Thiere und färbt die Neurofibrillen und Nucleolen sehr kräftig. Bei Material von erwachsenen Thieren wirkt sie jedoch auf die Zellen etwas zusammenziehend.

3 procentige Lösung; wir verwenden sie bei Material, das vom Menschen oder grösseren Säugethieren stammt. Die Neurofibrillen und die pericellularen Verzweigungen werden gut gefärbt.

5- bis 6 procentige Lösung; wir benutzen sie bei Untersuchung der wirbellosen Thiere, wenn namentlich die AUERBACH'schen

Knospen imprägnirt werden sollen. Die Nucleolen färben sich sehr schwach oder bleiben farblos. —

2. Reduction. — Die Objecte werden leicht gewaschen (ein oder 2 Minuten in destillirtem Wasser) und dann auf 24 Stunden in folgende Lösung gebracht:

Pyrogallussäure oder Hydrochinon	1 bis 2 g
Wasser	100 "
Formol	5 "

Das Formol ist dabei nicht durchaus unentbehrlich, aber es fixirt und härtet ein wenig das Nervengewebe und macht vielleicht auch die Vertheilung des Silbers feiner. Man kann auch etwas Natriumsulfit hinzufügen; gewöhnlich aber vermeiden wir es, da diese Substanz die Imprägnationsfarbe ein wenig abbleichen lässt. Die alkalischen Carbonate wirken in gleichem Sinne; sie schwächen die Intensität der Imprägnation ab und lassen oft in den äusseren Schichten der Präparate Niederschläge entstehen.

3. Einbetten. — Die Stücke werden einige Minuten in destillirtem Wasser gewaschen, in Alkohol gehärtet und in Celloidin eingebettet. Man kann auch die Präparate in Paraffin einbetten, doch darf man kein Paraffin nehmen, das die Präparate zum Schrumpfen bringt, denn durch die Behandlung mit Formol und namentlich mit Pyrogallussäure hat das Nervengewebe eine allzu grosse Härte und Brüchigkeit angenommen.

Die mit dem Mikrotom angefertigten Schnitte sollen 10 bis 30 μ dick sein. Sie werden in Dammar eingeschlossen, ohne vorherige Färbung. —

Nicht alle Schnitte sind zur Untersuchung geeignet. Die oberflächlichsten sind zu dunkel, die innersten — wenn die Stücke gross waren — sind ungenügend imprägnirt und zu hell gefärbt. Die Schnitte, welche der Mittelzone entsprechen, haben einen hell kaffeebraunen oder rothbraunen Ton und sind am besten zur Untersuchung der Neurofibrillen geeignet. —

Die Methode, die wir soeben geschildert haben, hat folgende Vortheile:

- 1) Sie ist einfach, und der gute Ausfall ist sicher.
- 2) Sie färbt sehr leicht die kleinen und mittleren Neurone aus Rückenmark, Bulbus, Kleinhirn, die Ganglien etc.

3) Sie ist anwendbar für den Menschen und alle Säugethiere und giebt — nach geringen Modificationen — auch beim Nervengewebe der Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische gute Resultate.

4) Sie eignet sich ausgezeichnet zur Untersuchung des Fötus, des neugeborenen und des wenige Tage alten Thieres, dessen Neurofibrillen (stärker als beim erwachsenen) intensiv schwarz oder kaffeefarben sich tingiren und sehr deutlich ihre Verästelungen und Anastomosen erkennen lassen.

5) Sie imprägnirt die feinen, secundären Fasern des Reticulum, die bei Untersuchung nach BETHE'S, SIMARRO'S und DONAGGIO'S Methoden entgangen waren.

6) Man kann mit ihr ausser den Neurofibrillen alle Endverzweigungen färben und alle Structureinzelheiten der grauen Substanz deutlich machen.

7) Ueberdies hat sie den grossen Vorzug, die Neuroglia ungefärbt zu lassen und desgleichen die künstlichen Netzbildungen in der weissen und grauen Substanz (GOLGI'S und BETHE'Sches Netz). Durch diesen Umstand wird es ausgeschlossen, bei ihrer Anwendung Irrthümer zu begehen und etwa zufällig entstandene Kunstproducte, die ihre Entstehung der coagulirenden Wirkung der Reagentien verdanken, und welche die intracellularen Räume umgeben oder füllen, als nervöse Organe anzusprechen.

II. Methode zur Färbung der markhaltigen Achsencylinder und der Neurofibrillen der grossen Zellen.

Die oben geschilderte Methode lässt ebenso wie alle früher zur Färbung des Reticulums empfohlenen Methoden die Achsencylinder völlig oder fast ganz ungefärbt, und namentlich die Einschnürungen scheinen gar keine selective Färbung annehmen zu können. Wenn man jedoch in dem vorhin geschilderten Verfahren mit Silbernitrat und nachfolgender Reduction eine Vorbehandlung der Objecte einschaltet — Fixirung der Objecte in reinem oder ammoniakalischem Alkohol —, erhält man sehr schöne Färbungen der Achsencylinder, der Einschnürungen, Gabelungen etc.

Nachfolgend geben wir in Kürze die verschiedenen Phasen des modificirten Verfahrens an.

- 1) Fixirung der Gewebstücke durch 24stündigen Aufenthalt in 97procentigem Alkohol.

2) Die Präparate werden einige Secunden lang in destillirtem Wasser gewaschen und im Thermostaten bei einer Temperatur von 30 oder 35° C. in folgender Lösung belassen:

Silbernitrat	1 g
Wasser	100 „

3) Man wäscht die Objecte einige Secunden lang, um das oberflächlich anhaftende Silbernitrat abzuspuhlen und bringt sie in folgende reducirende Lösung:

Hydrochinon	2 g
Wasser	100 „
Formol	5 „

Zuweilen fügen wir noch 0.5 g Natriumsulfitanhydrit hinzu, um die Reduction zu beschleunigen. Gewöhnlich kann man darauf verzichten, vorausgesetzt, dass die Stücke nicht zu gross sind. — Das Sulfit wirkt hier wie eine schwache Base.

4) Waschen der Stücke, Entwässern, Einbetten in Celloidin etc. Die Achsencylinder werden kaffeeschwarz, die Neurofibrillen der grossen Zellen braun oder rothbraun gefärbt. Auch im Kleinhirn bekommt man schöne Körbe (PURKINJE'sche Zellen).

Wenn sich die Imprägnation an den Schnitten aus den inneren Schichten als zu schwach erweist, so behandelt man sie mit einer Goldlösung. Wir stellten sie nach folgendem Recept her:

Sulfoeyansaures Ammonium	3 g
Unterschwefligsaures Natrium	3 „
Goldchloridlösung, einprocentige	einige Tropfen.

Die Präparate werden gewaschen, entwässert, aufgehehlt, in Dammar eingeschlossen.

III. Methode zur Färbung der marklosen Fasern und der Endverzweigungen.

Ein besonderes Interesse gewinnt die Alkoholhärtungsmethode dadurch, dass man ihre Resultate modificiren kann, indem man die Länge der Einwirkungsdauer des Alkohols variirt. Wenn man die Gewebstücke nicht 24 Stunden wie oben, sondern 3 Tage lang der Wirkung des Alkohols aussetzt, so kommt die Reduction des Silbernitrats nur in den markscheidenlosen Nervenfasern, in den pericellu-

laren Verzweigungen und den Endknospen zu Stande. Die Neurofibrillen sind in den Präparaten fast vollständig unsichtbar, desgleichen die markhaltigen Achsenstränge, die einen hellgelblichen Ton angenommen haben. Diese Präparationsmethode ist werthvoll für Untersuchungen aus dem Gebiete der pathologischen Anatomie, denn durch das neue Verfahren lassen sich mit grösster Sicherheit Elemente der grauen Substanz sichtbar machen, welche durch die bisher angewandten Methoden bei Material von erwachsenen Thieren nicht nachgewiesen werden konnten.

IV. Methode zur Färbung der Neurofibrillen, der grossen Zellen und der feinen Nervenfasern.

Die soeben behandelte Alkoholhärtungsmethode giebt den Neurofibrillen ein körniges Aussehen, — die gewöhnliche, sub I beschriebene Methode wird daher durch sie nicht überflüssig gemacht. Wenn man aber die Vorbehandlung und Fixirung nicht mit reinem Alkohol vornimmt, sondern mit ammoniakalischem, so gelingt es, die Neurofibrillen der motorischen Nervenzellen, der grossen Verbindungszellen des Bulbus, des Kleinhirns, Grosshirns, Ganglien etc. sehr gut zu imprägniren. So wie das oben gegebene Recept giebt auch dieses Verfahren sehr befriedigende Resultate bei neugeborenen Säugthieren, bei welchen man den Verlauf der markhaltigen Achsencylinder gut studiren kann: diese färben sich schwarz. Die Endverzweigungen und die marklosen Fasern dagegen werden hell kaffeebraun. — Man verfährt wie folgt.

1) Die Gewebstücke werden in ammoniakalischen Alkohol von folgender Zusammensetzung gebracht:

Alkohol, 97procentig	100 ccm
Ammoniak	0.5 bis 1 „

Sind die Stücke sehr gross oder besonders zahlreich, so empfiehlt sich die Anwendung eines 1.5procentigen ammoniakhaltigen Alkohols, oder man verlängere die Einwirkungsdauer des ammoniakalischen Alkohols auf 2 Tage.

2) Die Präparate werden in destillirtem Wasser ausgewaschen und in die 1.5procentige Lösung von Silbernitrat eingetaucht.

3) Reduction in derselben Lösung wie beim oben beschriebenen Alkoholverfahren.

Die besten Resultate betreffend die Färbung der Neurofibrillen wurden erzielt, wenn die Präparate 24 bis 36 Stunden im ammoniakalischen Alkohol verblieben. Bei längerem Aufenthalt fällt die Imprägnation des Protoplasma-Reticulums zu schwach aus, und es beschränkt sich die Reduction auf die feinsten Nervenfasern, die in der grauen Substanz einen eng verflochtenen Plexus bilden.

Wie bei dem Verfahren mit reinem Alkohol werden auch hier die zu schwach gefärbten Schnitte mit Goldchlorid nachbehandelt, um die Contraste zu verstärken. —

Statt des Alkohols — mit oder ohne Ammoniak — kann man schliesslich auch noch ammoniakalisches Formol in Anwendung bringen:

Formol	20 ccm
Wasser	100 „
Ammoniak	0·5 „

Man lässt das Formol 24 Stunden auf die Gewebstücke einwirken; es färben sich die Endknospen wie die pericellularen Verzweigungen. — Zu beachten ist, dass vor dem Uebertragen in die Silbernitratlösung die Objecte vom Formol und Ammoniak befreit und zu diesem Zweck 12 Stunden lang in fliessendem Wasser ausgewaschen werden müssen.

* * *

Die soeben geschilderten Methoden gestatten bei passender Anwendung systematisch alle nervösen Bestandtheile der grauen und weissen Substanz sichtbar zu machen. Sie haben mich zu werthvollen und völlig neuen Ergebnissen beim Studium der pathologischen Anatomie der Nervenkrankheiten geführt, indem sie mich mit Veränderungen des intracellularen Reticulums, des Nucleolus, der marklosen Fasern und der Endknospen bekannt machten, die sich mit den bisher vorliegenden mikrotechnischen Methoden nicht hätten nachweisen lassen.

Madrid, 4. März 1904.

[Eingegangen am 8. März 1904.]

Notiz über Hämatein und Hämalan.

Von

P. Mayer

in Neapel.

Im Laufe der 15 Jahre, die seit meiner ersten Publication über Hämatein vergangen sind, habe ich allmählich wohl alle Methoden zu seiner Darstellung aus dem Hämatoxylin selber erprobt. Es handelt sich dabei bekanntlich um eine Oxydation, die allerdings leicht zu weit getrieben werden kann und dann unbrauchbare Producte liefert. Als Oxydantia sind bisher theils von Anderen, theils von mir verwandt worden: Luft, Sauerstoff, Kaliumhypermanganat, Magnesiumhydroxyd, Wasserstoffhydroxyd, Kalium- und Ammoniumpersulfat, Quecksilberoxyd, Kaliumnitrit, Salpetersäure, rothes Blutlaugensalz — also eine stattliche Reihe.¹ Von diesen hat mich, wenn es auf die Herstellung trocknen Hämateins ankommt, ihrer Einfachheit halber die von mir 1891 angegebene Methode der Oxydation an der Luft in Gegenwart von freiem Ammoniak noch am ehesten befriedigt; allerdings erhält man durch sie nicht das reine Hämatein, sondern seine Verbindung mit Ammoniak, indessen für die Mikrotechnik ist dies weiter nicht von Belang, denn die Menge des Ammoniaks ist relativ sehr gering und daher unschädlich. Neuerdings habe ich aber eine Methode ausfindig gemacht, die sowohl noch einfacher ist und rascher zu arbeiten gestattet, als auch das Hämatein selber liefert. Seit Jahr und Tag nämlich stelle ich mir das Hämalan direct aus dem Hämatoxylin durch Oxydation mit Natriumjodat (NaJO_3) her — hierüber s. unten — und bin nun dazu übergegangen, das Hämatein in analoger Weise zu bereiten. Ich verfare dabei wie folgt.

Zur völligen Ueberführung des Hämatoxyllins in Hämatein gehören auf 9 Theile des ersteren 2 Theile von Natriumjodat.² Um

¹) Genauerer hierüber s. in LEE u. MAYER, Grundzüge der mikroskopischen Technik. 2. Aufl. Berlin. p. 171.

²) In die Mikrotechnik wurde dieses Salz 1898 durch CH. K. BUSCH eingeführt, der es den Osmiumlösungen zusetzt. Weiter scheint es bisher nicht verwandt worden zu sein.