

# Theoretische und praktische Beiträge zur Untersuchung der Zellen der peripherischen Ganglien

(mit 3 Abbildungen)

von Dr. P. BACSICH, Assistent.

Betrachten wir die Untersuchungsmethoden der peripherischen Ganglienzellen, so sehen wir, daß hier ebenso wie beim Centralnervensystem 2 verbreitete und wichtige Richtungen vorherrschen. Die eine Richtung ist die Nissl'sche Tigroid-Färbungsmethode samt ihren Modifikationen, die andere ist die Silberimprägnationstechnik. Genauer ausgedrückt können wir sagen daß bei pathohistologischen Untersuchungen hauptsächlich Tigroid-Färbungsmethoden, bei den morphologischen Forschungen dagegen meist Imprägnationsmethoden angewendet werden.

Infolge der Unverläßlichkeit und Umständlichkeit des Silber-Imprägnationsverfahrens besteht das Bestreben, eine zuverlässigere, einfachere, auch bei ausgedehnteren Untersuchungen leicht durchführbare Methode zu finden, welche durch genaues Kenntlichmachen der einzelnen Zellentypen eines Ganglions auf die überaus wichtige Frage, wie die prozentuelle Zusammensetzung der verschiedenen Zellen eines Ganglions beschaffen sei, Aufschluß gibt.

Als solche Methode erwies sich das prolongierte Osmiumverfahren von KISS (1932). Mit dieser Methode gelang es zwei Typen von Zellen mit einer bis dahin nicht wahrgenommenen Sicherheit zu unterscheiden. Die einen sind die hellen (sensorischen), die andern die dunklen (sympathischen) Nervenzellen.

An anderer Stelle dieses Bandes ist dieses Verfahren ausführlich beschrieben. Im Wesentlichen handelt es sich bei dem KISS'schen Verfahren um eine sekundäre Osmium-Einwirkung. Nach dem Fixieren in 4%-igem neutralen Formol wird das Material auf 5—10 Tage in eine 1%-ige wässrige Osmiumlösung gebracht, die öfters aufgeschüttet werden muß.

Das Verfahren besitzt mehrere Vorteile, welche aber erst nach längeren Arbeiten mit ihm warzunehmen sind. Das Osmium kann nämlich bei dem sekundären Verfahren viel besser und tiefer in die Gewebe eindringen, als es bei dem primären der Fall ist, bei dem, die sich an der Oberfläche bildende Kruste das weitere Eindringen von Osmium verhindert.

Durch das Prolongieren der Behandlung wird den Elementen, die eine größere Affinität zum Osmium besitzen, die Möglichkeit gegeben, sich während der langdauernden Einwirkung vollkommen mit Osmium zu sättigen. Zu dieser vollständigen Sättigung mit Osmium in der reichlich gebrauchten Lösung war bei dem alten Verfahren keine Zeit. Die osmiumbindenden Elemente zeichnen sich gegenüber jenen von geringerer Affinität durch tiefschwarze Färbung aus, wodurch es möglich wird, sie deutlich zu erkennen. Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens ist es, daß wir es nach einfacher Formalinfixierung durchführen können, sodaß übriggebliebenes Material auch noch zu anderen Methoden verwendet werden kann. Auch kann diese Osmium-Methode abweichend von den empfindlichen Silber-Imprägnationsmethoden an älteren, 12—24 Stunden alten Leichenmaterial durchgeführt werden. Ein längeres Stehen des Materials in Formalin beeinträchtigt die Güte der Ergebnisse nicht. Es ist öfters geschehen, daß wir erst 4—5 Tage nach der Gellért'schen Formalinfixierung (s. d. Band, S. 37.) die Hirnnerven herauspräparierten und von diesen vorzügliche Präparate erzielten. Neben einem solchen Stand der Erfahrungen tauchten die beiden Fragen auf, die wir versucht haben zu beantworten: 1. Von welchem Bestandteil der Zellen das Osmium gebunden wird? 2. Ob die einfache aber etwas teure Osmium-Methode nicht durch eine andere, billige und leicht durchführbare Imprägnation oder Färbungs-Methode ersetzt werden könnte?

*Ad. 1.* Zur genauen Bestimmung des Wirkungsmechanismus des Osmiums muß auch die Frage beantwortet werden, ob die Kiss'schen dunkeln und hellen Zellen nicht auch bei dem primären Osmiumverfahren d. h. nach einfacher Osmiumfixierung erscheinen.

Es ist bekannt, daß Osmium eines der schonungsvollsten Fixierern ist, das in den Zell-Eiweißen keine (FISCHER 1899,

HARDY 1899, MÖNKENBERG—BETHE 1899), oder nur eine ganz geringe, kaum wahrnehmbare Flokkulation verursacht (BERG 1903—1904.). Gerade diese schonungsvolle Einwirkung ist der Grund dafür, daß wir beim primären Verfahren bei weitem nicht die markanten Unterschiede erhalten, wie bei der Anwendung der sekundären Methode. Darum können wir behaupten, daß das Fixieren in Formalin nicht nur die ganze Methode vereinfacht, sondern auch die Reaktion beschleunigt und dadurch die Differenzierung begünstigt.

Die Affinität, die das Osmium zu den Fetten und fettartigen Verbindungen besitzt, macht es wahrscheinlich, daß die Unterschiede in der Färbung auf den verschiedenen Lipoidgehalt der Zellen zurückzuführen sind. Das Bild (Abb. 1.) ähnelt jenem,

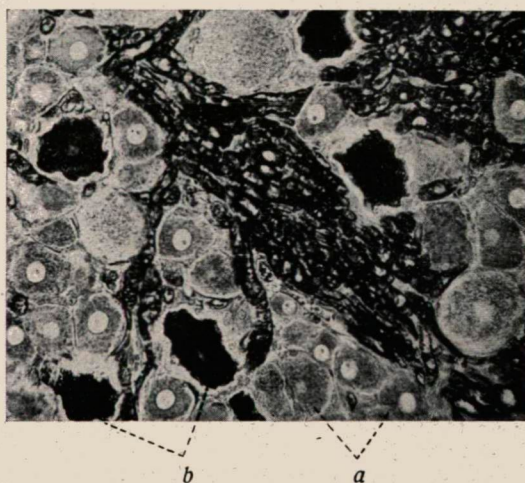


Abb. 1.

Ggl. spinale der Katze. Prolongierte Osmiumverfahren.

a : sensorische, b : sympathische Zellen.

das wir mit Hilfe des Tigroidverfahrens erhalten. Es war also anzunehmen, daß das Osmium die aus Eiweißkörpern bestehenden Bestandteile der Nervenzellen sichtbar macht, umso mehr, da wir wissen, daß außer den Fetten auch verschiedene andere organischen Stoffe die Osmiumsäure reduzieren können.

Um diese Frage endgültig zu lösen, nahmen wir zwei entsprechende Ganglien der beiden Seiten, lösten aus dem einen

nach der Formalinfixierung mit 96%-igem Alkohol die Lipide heraus und behandelten dann beide mit Osmium.

Während nun das unbehandelte Ganglion sehr schöne Färbung erkennen ließ, war in dem mit Alkohol behandelten bloß eine sehr schwache, gleichmäßige Färbung zu beobachten. In diesem Ganglion waren die Zellen sehr schwer, eigentlich nur auf Grund ihrer eigenartigen Form von einander zu unterscheiden (Abb. 2.).

Auf Grund dieser Versuche können wir mit Sicherheit behaupten, daß die Osmiumreaktion auf dem Lipoidgehalt der Zellen beruht. Wir dürfen also annehmen, daß die dunkeln Zellen vermöge ihres größeren Lipoidgehaltes mehr Osmium binden können, als die hellen.

Diese Behauptung wird auch durch folgende Beobachtungen unterstützt: Wenn wir ein nach Kiss mit Osmium behandeltes Präparat der Einwirkung von Hydrogen-Superoxyd aussetzen, dann löst sich das metallische Osmium aus den Zellen heraus. Färben wir dann diese Präparate nach irgend einer Methode, so finden wir daß sämtliche Nervenzellen, insbesondere aber die vorher dunkelgefärbten, die Farbe sehr schwer annehmen, wobei der Zellenkörper eigenartig glänzend und flimmernd wird. Die schlechte Färbung und diese eigenartige Erscheinungsform ist auf das Zurückbleiben von Lipoidsubstanzen in der Zelle zurückzuführen, die das Eindringen der Farbe verhindern. Dieses Lipoid ist aus den Zellen durch keinerlei Lösungsmittel zu entfernen; es verwandelt sich, ebenso wie das Myelin der peripherischen Nerven infolge der Ka. bichrom. Behandlung durch das Osmium in eine mit Lipoidlösungsmitteln unlösbare Form. Daß das Osmium diese Wirkung tatsächlich auf die lipoidhaltigen Nervenzellen ausübt, beweist auch die Tatsache, daß die anderen Gewebe nach der Lösung des Osmiums auch mit anderen Methoden tadellos gefärbt werden können.

*Ad. 2.* Zur Ersetzung der Kiss'schen prolongierten Osmium-Methode führten wir eine große Anzahl von Versuchen durch. Zuerst versuchten wir durch eine Modifikation der Silber-Imprägnationsmethoden, oder durch Ausfindigmachen eines neuen Imprägnationsverfahrens diese Frage zu lösen. In dieser Richtung fanden wir aber kein positives Ergebnis. Die Versuche haben uns nur überzeugt, daß die Labilität und die

Umständlichkeit der Imprägnationsmethoden ein solches Bestreben unmöglich machen.

Ein glücklicher Zufall gab unsern schon beinahe am toten Punkt angelangten Versuchen einen neuen Stoss. Wir benützten nämlich bei der Osmiumbehandlung eines menschlichen spinalen Ganglions zu wenig Osmium, das nur zur Färbung der peripherischen Partien des Materials genügte, während die centralen Partien, wie sich das beim Schneiden zeigte, durch Osmium unberührt waren. Da die peripherischen Teile vollkom-



Abb. 2.

Ggl. spinale der Katze. Lipoidauslösung mittels 96<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-igen Alkohols. Prolongiertes Osmiumverfahren.  
a : sensorische, b : sympathische Zellen.

men brauchbar waren, färbten wir diese Schnitte mit dem in unserem Institut gebräuchlichen, durch Essigsäure angesäuerten Eosin nach. Bei der Betrachtung der Schnitte stellte sich heraus, daß die dunklen Zellen der von Osmium nicht gefärbten Gebiete, wenn auch schwer, aber wegen ihrer eigenartigen multipolaren Gestalt und ihrer etwas intensiveren Färbung durch Eosin doch erkennbar waren. Dieser letztere Umstand deutete auf ein Abweichen von der Struktur der sensorischen Zellen hin.

Diese Spur verfolgend versuchten wir die verschiedensten Färbungsmethoden. Wir arbeiteten mit Block- und Schnittfär-

bungen. Endlich machten wir bei der bekannten Toluidinblaufärbung halt. Schon die ersten Präparate ließen uns vermuten, daß wir uns auf dem richtigen Weg zur Lösung der Frage befinden. Es gelang im Verlaufe der Versuche den Kiss'schen Präparaten fast gleichwertige, die beiden verschiedenen Zellen schön hervorhebende Schnitte zu erzielen. (Abb. 3.).

Unser Verfahren besitzt zwei sehr wichtige Punkte auf denen die Reaktion beruht: A) Die andersartige Fixierung des Materials. B) Das modifizierte Färbeverfahren.

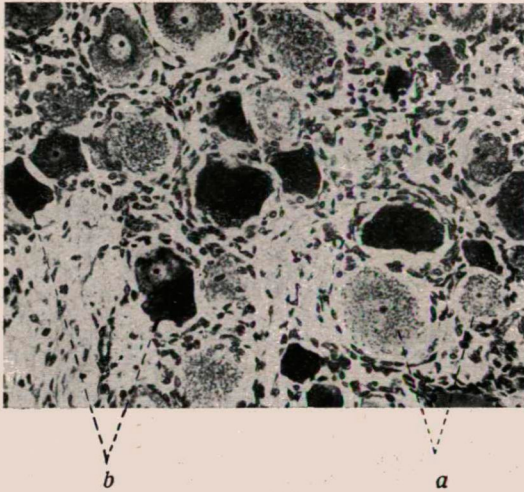


Abb. 3.

Ggl. Gasseri des Schweines. Modifiziertes Toluidinverfahren.

a: sensorische, b: sympathische Zellen.

A) Zur Toluidinblaufärbung wird im allgemeinen die von NISSL empfohlene Fixierung in 96%-igem Alkohol empfohlen. In vorliegendem Falle benützten wir aber ebenso wie beim prolongierten Osmium-Verfahren 4%-iges Formalin. Bei dieser Einwirkung erschienen die dunkeln und hellen Zellen in ihrem Unterschiede viel deutlicher als bei der Anwendung von 96%-igem Alkohol. Dieses Ergebnis bestärkte uns in unserer Auffassung, daß die Fixation in Formalin bei der unterschiedlichen Färbung der dunklen und hellen bzw. sympathischen und sensorischen Nervenzellen einen aktiven Anteil nimmt.

B) Das in Formalin fixierte und zur Lösung der Lipide mit 96%-igem Alkohol behandelte Material wurde in 0.5%-iger wässriger Toluidinblaulösung gefärbt. Diese Konzentration ist bedeutend größer, als die allgemein angewendete. Eine konzentriertere Lösung gebrauchte nur LENHOSSÉK, als er 1898 die Toluidinblau-Färbung in die Untersuchungstechnik des Nervensystems einführte.

Durch Anwendung dieser konzentrierteren Lösung erreichten wir, — daß wir unsere Präparate in 15 Minuten ohne jede Erwärmung färben konnten. Auf diese Weise fiel das umständliche Erwärmen, das bei unvorsichtiger Anwendung zum Schrumpfen der Präparate führen konnte und das langwierige Färben in kalten, dünnen Lösungen weg. Das wichtigste Ergebnis dieses so modifizierten Verfahrens ist, daß die eine größere Affinität zeigenden sympatischen Zellen bei der kurzen Färbungsdauer eine viel größere Menge Farbe aufnehmen konnten, als die sensorischen. Deutlicher gesagt, arbeitet die schwach konzentrierte Lösung langsam und gleichmäßig, die konzentriertere dagegen rasch und mit großen Unterschieden in der Färbung der einzelnen Zellen. Einen Nachteil besitzt allerdings diese Methode gegenüber dem Kiss'schen prolongierten Verfahren. Sie ist nämlich am Material, das älter als 6—8 Stunden ist, nicht mit vollem Erfolg durchführbar.

### Kurze Beschreibung des Verfahrens.

1. 24 stündiges Fixieren in 4%-igem Formalin.
  2. Auslösen der Lipide in öfters gewechselttem 96%-igem Alkohol.
  3. Kombinierte Einbettung mit der von uns verbesserten Barta-Kisser'schen Einbettungsmethode ohne abs. Alkohol. (Bacsich 1932.)
  4. Färbung 15 Minuten in 0.5%-iger Toluidinblaulösung.
  5. Auswaschen in destilliertem Wasser solange das Präparat noch Farbwolken hinterläßt.
  6. Differenzierung in 70—96% und abs. Alkohol. Die Differenzierung ist bei mikroskopischer Kontrolle solange durchzuführen, bis die dunklen und hellen Zellen gut zu unterscheiden sind. Dauer etwa 30 Minuten.
  7. 30 Minuten Klären in Terpeneol.
  8. Abschliessen mit in Xylol oder Terpeneol gelöstem Canadabalsam.
- Ein Abwaschen mit Xylol nach der Klärung in Terpeneol darf nicht vorgenommen werden, da dadurch — wegen der Verunreinigung des Xylols des Handels — die schöne, helle Farbe sehr oft in eine schmutzig — gelb-

lich — grüne übergeht und genaue Beobachtungen unmöglich werden. Diese Präparate verlieren ihre Farbe auch gewöhnlich viel schneller als die anderen.

Ein Abtupfen der Präparate mit Filtrierpapier soll womöglich nicht vorgenommen werden, denn die feinen kleben gebliebenen Härchen des Papiers zeigen sich, trotzdem sie unter dem Mikroskop nicht zu sehen sind, als störende Verunreinigungen auf den Mikrophotogrammen. Diese eigenartige Erscheinung konnten wir interessanterweise nur bei den Toluidin-Präparaten beobachten.

Die am selben Material ausgeführte Kiss'sche Osmium Methode und das Toluidinblau-Verfahren gibt uns auf folgende sehr wichtigen Fragen Aufschluß:

Der verschiedene Aufbau der sensorischen und sympathischen Nervenzellen erscheint, wie auf Abbild. 1. und 3. zu erkennen ist zweifellos bewiesen. Während die sensorischen Zellen einen schütterten Aufbau mit geringer lipoid- und eiweißhaltiger Granulation zeigen, können wir mit dem Osmium, wie auch mit der Toluidinblau-Färbung den dichten Aufbau der sympathischen Zellen leicht zu erkennen. Auf Grund dieser Beobachtung ist anzunehmen, daß dem verschiedenen Aufbau der Zellen auch eine verschiedene Funktion entspricht.

Die zweite Frage die von uns beantwortet wird (Abb. 1. u. 3.), bezieht sich auf den allgemeinen inneren Aufbau der Nervenzellen. Es fällt auf, daß trotz den verschiedenen Methoden, die zu den Untersuchungen des Zellenaufbaues angewendet wurden, die Struktur der Zellen in ihren Einzelheiten gleich erscheint. Beide Methoden zeigen in den sensorischen Zellen eine feine, pulverförmige Körnelung, desgleichen sehen wir bei beiden Verfahren die viel dichtere und gröbere Körnelung der sympathischen Zellen. Offenbar werden also durch beide Verfahren dieselben Bestandteile der Zellen sichtbar gemacht. Diese unsere Beobachtung unterstützt auch die moderne Auffassung der Zellenbiologie (SEHRT 1927, GOLDMANN 1928, BACSICH 1932) wonach, die in der Funktion der Zellen aktiv teilnehmenden Granula, in unserem Falle das Tigroid, bzw. die das Tigroid aufbauenden kleineren Körnchen der Nervenzellen aus einer Mischung von Eiweiß- und Lipoidkörperchen bestehen. Die vielfach benützten NISSL'schen Methoden machen den eiweißhaltigen, die Osmium Methoden dagegen den lipoidhaltigen Teil der Körnelung sichtbar.



### Zusammenfassung.

1. Die Kiss'sche Methode steht als sekundäres Osmiumverfahren in ihrem Wert zweifellos über dem primären Verfahren. Zum ausgeprägten Zustandekommen der Reaktion ist ein vorheriges Fixieren in Formalin unbedingt nötig.

2. Die Kiss'sche Methode ist auch an älterem Material, oder auch an solchem, das längere Zeit in Formalin gelegen ist, mit Erfolg anzuwenden.

3. Das Zustandekommen der charakteristischen Reaktion beruht auf dem verschiedenen Lipoidgehalt der sensorischen und sympathischen Nervenzellen.

4. Die prolongierte Methode kann an frischem Material durch unseres Toluidinblau-Verfahren ersetzt werden. Die Modifikation besteht aus dem Einschalten der Formalinfixierung und dem Gebrauch einer kontrastreich arbeitenden 5% -igem Toluidinblau-Lösung.

5. Dem verschiedenen Bau der sympathischen und sensorischen Nervenzellen muß auch eine verschiedene Funktion entsprechen.

6. Die Körnelung in den Nervenzellen besteht aus Eiweiß und Lipidstoffen, die einesteils mit dem Toluidinverfahren und anderesteils mit dem prolongierten Osmiumverfahren sichtbar gemacht werden.

### Literatur.

- Bacsich, P.* 1932. Histologische Einbettung ohne absoluten Alkohol. (Ungarisch). Orvosi Hetilap. Jahrg. LXXVI. No. 2.
- 1932. Neuere Ergebnisse mit der Einbettung ohne absoluten Alkohol. Ztschr. f. wiss. Mikr. Bd. 49.
- 1932. Untersuchungen über den Fettgehalt der Leukozyten. Fettfärbungsmethode in den Leukozyten. (Ungarisch.)
- Berg, W.* 1903. Beiträge zur Theorie der Fixation, mit besonderer Berücksichtigung des Zellerkerns und seiner Eiweißkörper. Arch. mikr. Anat. Bd. 62. S. 367.
- 1904. Weitere Beiträge zur Theorie der histologischen Fixation. Arch. mikr. Anat. Bd. 65. S. 298.
- Borehart, M.* 1904. Über die Anwendung Osmiumsäure auf das Centralnervensystem niederer Wirbeltiere. Journ. Psych. u. Neurol. Bd. 3. S. 127.

- Fischer, A.* 1899. Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena. G. Fischer.
- Gellért, A.—Bacsich, P.* 1932. Neuere Ergebnisse und Erwägungen zur Theorie und Technik der Weigert'schen Markscheidenfärbung. Siehe diesen Bd. S. 243.
- Gellért, A.* 1932. Das Verhältnis des Sympathicus zu den Hirnnerven beim Menschen und bei einigen Tieren. Siehe diesen Bd. S. 37.
- Goldmann, J.* 1929. Zur Frage der Lipoidgranula in den Blutelementen der blutbildenden Organe und des peripherischen Blutes. Ztschr. f. mikr. Anat. Forsch. Bd. 18. S. 143.
- Hardy, B.* 1899. On the structure of cell protoplasm. P. I. The structure produced in a Cell by Fixative and Postmortem change. The Structure of Colloidal Matter and the Mechanism. of Setting and of Coagulation. Jour. Phys. V. XXIV. S. 158.
- Kiss, F.* 1932. The sympathetic elements of the cranial and spinal ganglia. Journ. of Anatomy.
- 1932. Die sympathischen Elemente der kranialen und spinalen Ganglien. Siehe diesen Bd. S. 13.
- Krause, R.* 1927. Enzyklopedie der mikr. Technik. 3. Aufl. Bd. III.
- v. *Lenhossék, M.* 1898. Bemerkungen über den Bau der Spinalganglienzellen. Neurol. Ztrbl. Bd. 17. S. 577.
- Mönkenberg, G.—Bethe, A.* 1899. Die Degeneration der markhaltigen Nervenfasern der Wirbeltiere unter hauptsächlichlicher Berücksichtigung des Verhaltens der Primitivfibrillen. Arch. mikr. Anat. Bd. 54. S. 135.
- Romeis, B.* 1928. Taschenbuch der mikrosk. Technik. 12. Aufl.
- Sehrt, E.* 1927. Histologie und Chemie der Lipoide der weissen Blutzellen und ihre Beziehung zur Oxydasereaktion, sowie über den Stand der modernen Histologie der Zellipoide.
- Spielmeyer, W.* 1924. Technik der mikr. Untersuchung des Nervensystems. 3. Aufl.
-