Färbung der Zellen des Hypoglossuskerns mit lipoidfärbendem Viktoriablau nach der Durchschneidung des Nervus hypoglossus.

舌下神経切断後に舌下核の細胞を類脂質を染めるピクトリア青で染色.

Tetsu KARIYA 狩谷 哲.

(Eingegangen am 12. März 1956.)

Die nach der Durchschneidung eines peripheren Nerven auftretenden Veränderungen der Nervenzellen in ihrem Ursprungskern sind bisher vor allem nach der NISSLfärbung und Versilberung eingehend untersucht worden. Es wurden aber auch in Japan die Veränderungen der Mitochondrien von CHIKUDA (1942), die des GOLGISchen Apparates von SAWADA und CHIKUDA (1943), die der ultrastrukturellen Dichte der Zellbestandteile von IHARA (1948) und die des Vitamin C in den Zellen von KIMURA (1953) u. a. m. untersucht. Es scheint aber weder im In- noch im Ausland noch keine systematische Untersuchung über die Veränderung der freien lipoiden Substanz in den degenerierten Zellen vorhanden zu sein. Es ist zwar wohlbekannt, daß das Fett und Lipoid, worauf z. B. SPIELMAYER (1922) und JAKOB (1927) hingewiesen haben, in den aus verschiedenen Gründen degenerierten Nervenzellen reichlich auftreten. Bei diesen Untersuchungen färbte man aber die fettigen Substanzen in den Zellen meist nach Fixierung in kaustischen Flüssigkeiten mit Scharlachrot oder Sudan III, so daß dabei hauptsächlich das neutrale Fett und diesem verwandte Stoffe oder aber daraus abgespaltene lipide Substanzen gefärbt wurden, aber fast kein natürliches freies Lipoid. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gehirn nach der Durchschneidung des Nervus hypoglossus nur in **Formalin** fixiert, und die Gefrierschnitte wurden mit mittelstark polarem **Viktoriablau** gefärbt.

I. Material und Methode.

Es wurde der Nervus hypoglossus des Kaninchens auf der rechten Seite nahe dem Zungenbein durchschnitten, und das zentrale Schnittende wurde lang ausgerissen. Nach 1, 2, 4, 6, 8, 13, 20, 29 und 35 Tagen wurden die so operierten Tiere gleichzeitig durch eine Luftinfusion in die Vene getötet. Es wurde ihnen die Medulla oblongata entnommen und in 10% igem neutralem Formalin fixiert. Man klebte Gefrierschnitte von 15 μ Dicke auf dem Objektglas nach der LEACHschen Methode auf und färbte sie mit 0.01% iger wässriger Viktoriablauspension bei 37°C 30 Minuten

lang. Ein Teil der Schnitte wurde mit Kernechtrot nachgefärbt. Man schloß die Schnitte nach Abspülen mit Wasser in Gummisirup ein und untersuchte sie unter dem Mikroskop.

Die Viktoriablauseuspension wurde vor dem Gebrauch in der Weise bereitet, daß man eine 1%ige alkoholische Lösung von Viktoriablau von MERCK mit Gummi arabikum 0.5%ig in sich enthaltendem Wasser 100-fach verdünnte.

Zur Kontrolle wurden die Schnitte mit fast pollosem Sudanschwarz B, welches dem Neutralfett verwandtes Lipoid färbt, und mit pollosem Sudan III, welches Neutralfett färbt, gefärbt. Auch wurden die nach der NISSL-schen Methode gefärbten Schnitte vergleichend beobachtet.

II. Ergebnisse der Untersuchung.

Die Resultate der Färbung der Nervenzellen des Hypoglossuskerns nach der Nervendurchschneidung sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Färbungsstärke der Nervenzellen des Hypoglossuskerns nach der Durchschneidung des Nerven.

Nach d. Durchschneidung (Tage)	Mit Viktoriablau (und Sudanschwarz B*)			Mit Sudan III färbbare Granula
	Cytopl. einschließl. NISSLkörner	Granula	Kern	
Kontrolle	+(-)*	+(+)	±(-)	±
1	+(-)	+(+)	±(-)	±
2	+(-)	++(++)	±(-)	±
4	+(+)	++(++)	±(-)	+
6	++(++)	+++(+++)	±(-)	++
8	++(++)	+++(+++)	-(-)	+++
13	++(++)	++(++)	-(-)	+++
20	±(±)	±(+)	-(-)	+
29	±(-)	±(±)	-(-)	±
35	±(-)	-(-)	-(-)	-

*Die Färbung mit Sudanschwarz B ist in Klammern gesetzt.

Bevor wir auf die Veränderungen der Nervenzellen eingehen, möchten wir die *normalen Zellen* besprechen, die in Abb. 1 dargestellt sind. Ihr Cytoplasma färbt sich mit *Viktoriablau* schwach blau. Die Umgebung des Kerns wird etwas besser gefärbt. Die NISSLkörner und die Cytoplasma-grundsubstanz sind *nicht* deutlich unterscheidbar. Man sieht im Cytoplasma zahlreiche mehr oder weniger stark gefärbte feine Granula. Diese Granula sind von verschiedener Größe und Form: rundlich, unregelmäßig rundlich, kurz stäbchenförmig usw. Unter ihnen scheinen die kurz stäbchenförmigen

Abb. 1. Normale Nervenzellen des Hypoglossuskerns, mit Viktoria-blau gefärbt. Das Cytoplasma ist schwach gefärbt. In der Nähe des Kerns liegen Lipoidgranula. Der Kern wird blaß angefärbt. 1000 $\times$.

zum größten Teil Mitochondrien zu sein. Die anderen stark färbbaren rundlichen Granula müssen auch an freiem Lipoid reich sein. Solche Granula liegen zerstreut im Zelleib, besonders um den Kern.

Der Kern wird, wenn man von dem Kernkörperchen, welches immer farbfrei bleibt, absieht, sehr schwach gefärbt.

Nach der Färbung mit *Sudanschwarz B* treten im Cytoplasma stark gefärbte Granula von verschiedener Größe zahlreicher auf als nach der Viktoriablaufärbung. Die Cytoplasmagrundsubstanz und der Kern sind fast nicht färbbar.

Die Cytoplasmagrundsubstanz läßt sich mit *Sudan III* ganz schwach gelb färben. Man findet im Cytoplasma wenige orangerote Fettröpfchen von verschiedener Größe. Der Kern bleibt nicht gefärbt.

1 Tag nach der Nervendurchschneidung.

Man trifft leicht angeschwollene Nervenzellen. Die meisten Zellen sind nicht verändert. Ihre Färbbarkeit mit Viktoriablau, Sudanschwarz B und Sudan III unterscheidet sich noch nicht von der normalen Zellen.

2 Tage nach der Nervendurchschneidung.

Die Hälfte der Zellen sind etwas angeschwollen. Im Cytoplasma vermehren sich mit Viktoriablau und Sudanschwarz B stark färbbare Granula ein wenig. Betreffs der mit Sudan III färbbaren Granula sind noch keine Veränderungen bemerkbar.

4 Tage nach der Nervendurchschneidung.

Fast alle Nervenzellen des Hypoglossuskerns sind angeschwollen. Der

Kern verschiebt sich oft nach einer Seite.

Mit *Viktoriablau* färbt sich das Cytoplasma, wie in Abb. 2 gezeigt wird, etwas stärker blau als das der normalen Zellen. Stark färbbare Granula vermehren sich und finden sich zerstreut im ganzen Zelleib. Sie sind aber besonders reichlich um den Kern vorhanden. Der Kern färbt sich immer noch blaß blau.

Sudanschwarz B färbt das Cytoplasma nunmehr schwach bläulich. In ihm sind stark gefärbte Granula etwas vermehrt zu sehen als vorher. Der Kern bleibt ungefärbt.

Abb. 2. Nervenzellen des Hypoglossuskerns am 4. Tage nach der Nervendurchschneidung, mit Viktoriablau gefärbt. Der Zelleib und Kern sind angeschwollen. Das Cytoplasma färbt sich etwas stärker als das der normalen Zellen. Die Lipoidgranula sind auch etwas vermehrt. 1000 $\times$.

Nach der *Sudan III*-Färbung erscheint das Cytoplasma schwach orange. Orangerot färbbare Fettröpfchen vermehren sich auch.

6 Tage nach der Nervendurchschneidung.

Die Nervenzellen schwellen sich beträchtlich und runden sich etwas ab. Der Kern liegt zumeist exzentrisch.

Das Cytoplasma färbt sich mit *Viktoriablau* stärker und enthält stark färbbare Granula zahlreicher als vorher (Abb. 3 und 4). *Die mit Viktoriablau färbbaren Granula treten zu dieser Zeit am zahlreichlichsten im ganzen Verlauf der Degeneration auf.* Der Kern wird etwas stärker gefärbt als in den normalen Zellen.

Die Färbbarkeit der Zellen mit *Sudanschwarz B* nimmt gleichzeitig

Abb. 3. Am 6. Tage nach der Nervendurchschneidung. Stärkere Färbung des Cytoplasmas und Auftreten von groben Lipoidgranula. 1000 $\times$.

Abb. 4. An demselben Tage wie bei Abb. 3. Starkes Anschwellen des Zelleibes. In der Mitte der Abbildung findet sich eine Zelle mit reichlichen Lipoidgranula, der das Schneiden neben dem Kern gegangen ist. 1000 $\times$.

mit derjenigen mit Viktoriablau zu. Die Färbbarkeit des Cytoplasmas mit *Sudan III* und die Zahl der damit stark zu färbenden Fettröpfchen sind noch ein wenig vermehrt.

8 Tage nach der Nervendurchschneidung.

Die meisten Nervenzellen sind hochgradig deformiert, und der Kern liegt exzentrisch in ihnen.

Die Färbbarkeit des Cytoplasmas mit Viktoriablau ist zwar etwas verstärkt und erreicht den Höhepunkt (Abb. 5), die damit stark färbbaren Granula nehmen aber an Zahl etwas ab. Der Kern büßt wieder seine Färbbarkeit ein.

Abb. 5. Am 8. Tage nach der Nervendurchschneidung. Der Zelleib ist kleiner als am 6. Tage. Das Cytoplasma ist stark gefärbt und schließt dunkel gefärbte Granula ein. 1000 $\times$.

Die Färbung der Zellen mit *Sudanschwarz B* vollzieht sich, wie diejenige mit Viktoriablau. Die mit ihm stark färbbaren Granula sind zahlreicher vorhanden als in früherer Zeit. Die Färbung des Cytoplasmas mit *Sudan III* und die Zahl der Fettröpfchen vermehren sich auch. Zu bemerken ist, daß *in dieser Zeit der Degeneration die Nervenzellen am stärksten mit Sudanschwarz B und Sudan III gefärbt werden.*

13 Tage nach der Nervendurchschneidung.

Die degenerierten Nervenzellen sind nun im Wege der Atrophierung. Der Zelleib ist nämlich etwas verkleinert, und der Kern ist etwas unregelmäßig gestaltet.

Das Cytoplasma färbt sich nunmehr mit *Viktoriablau* schwächer, und die damit stark färbbaren Granula werden etwas weniger gesehen als vorher (Abb. 6). Die Färbbarkeit des Cytoplasmas mit *Sudanschwarz B* hat fast nicht abgenommen, aber die damit stark färbbaren Granula werden etwas weniger gesehen. Man sieht aber mit *Sudan III* färbbare Fettröpfchen

Abb. 6. Am 13. Tage nach der Nervendurchschneidung. Die Zellen verkleinern sich beträchtlich. Ihre Färbbarkeit hat wieder abgenommen. Man sieht mit Viktoriablau nicht färbbare Granula. Der Kern färbt sich nicht. 1000 $\times$.

noch zahlreich.

20 Tage nach der Nervendurchschneidung.

Die Nervenzellen sind hochgradig atrophiert oder fast verschwunden.

Abb. 7. Am 20. Tage nach der Nervendurchschneidung. Die Zellen sind klein. Das Cytoplasma ist mit Viktoriablau schwach färbbar und enthalten damit nicht färbbare Granula aus Neutralfett. 1000 $\times$.

Die Zahl der Nervenzellen hat beinahe um die Hälfte abgenommen. Statt dessen sind die Neurogliazellen vermehrt.

Der Zelleib der atrophiierten Nervenzellen färbt sich mit **Viktoriablau** schwach blau und enthält wenige stark färbbare Granula (Abb. 7). Die mit **Sudanschwarz B** und **Sudan III** färbbaren Granula sind noch viel vorhanden, aber weit weniger als 7 Tage früher.

29 und 35 Tage nach der Nervendurchschneidung.

Die Nervenzellen sind meist verschwunden. Die noch gebliebenen Zellen sind stark atrophiiert und klein. Ihr Zelleib wird mit Viktoriablau schwach gefärbt, aber mit Sudanschwarz B und Sudan III nicht. Im Zelleib sieht man am 29. Tage nach der Nervendurchschneidung mit Viktoriablau, mit Sudanschwarz B und mit Sudan III färbbare Granula in sehr geringer Zahl, und am 35. Tage fast keine solche Granula mehr.

III. Auswertung der Ergebnisse.

Das Cytoplasma und der Kern der normalen, mit Formalin fixierten Nervenzellen des Hypoglossuskerns werden mit Viktoriablau schwach und, von den Granula ausgenommen, mit Sudanschwarz B und Sudan III nicht gefärbt. **Die stark basophilen NISSLKörner werden mit Viktoriablau nicht stärker gefärbt als die Cytoplasmagrundsubstanz.** Die im Cytoplasma vorhandenen mit Viktoriablau, Sudanschwarz B und Sudan III stark färbbaren feinen Granula sind an freiem Lipoid und Neutralfett reich. Solche Granula werden im allgemeinen als Abnutzungsprodukte (wie von JAKOB 1927), oder als eine Aufstapelung (wie von MANDELSTAMM 1935) betrachtet.

Zwei Tage nach der Nervendurchtrennung fängt die Zahl der mit Viktoriablau färbbaren Lipoidgranula an zuzunehmen. Zwei Tage später vermehrt sich die Färbbarkeit des Cytoplasmas ein wenig, und zugleich nehmen die Lipoidgranula noch an Zahl zu. Sechs Tage nach der Nervendurchtrennung wird auch der Kern etwas stärker färbbar, und in dieser Zeit treten die Lipoidgranula am zahlreichlichsten im Cytoplasma auf. **Die Färbbarkeit des Cytoplasmas mit Viktoriablau erreicht den Höhepunkt am 8. Tage,** wobei der Kern wieder nicht färbbar wird und die Lipoidgranula sich an Zahl etwas vermindern. Vom 13. Tage an verfallen die Zellen schnell der Atrophie, und die Färbbarkeit des Cytoplasma und die Zahl der Lipoidgranula vermindern sich rasch.

Die Färbbarkeit des Cytoplasmas und der Granula mit Sudanschwarz B und Sudan III geht nahezu parallel mit derjenigen mit Viktoriablau.

Die Anfangsvermehrung der Färbbarkeit des Cytoplasmas mit Viktoriablau, Sudanschwarz B und Sudan III und die der Zahl der damit färbbaren Granula sind offenbar durch die **Demaskierung** des Lipoides und Fettes bedingt. Die spätere Verminderung der Cytoplasmafärbbarkeit und

Granulazahl, die mit der Atrophie der Zellen erfolgen, läßt sich auf die *Zersetzung* der Substanzen zurückzuführen.

Die Färbbarkeiten des Cytoplasmas und der darin vorhandenen Granula mit Viktoriablau einerseits und die mit Sudanschwarz B und Sudan III andererseits gehen, wie erwähnt, nahezu parallel. Genauer gesagt, vermehren sich die mit Viktoriablau färbbaren Granula früher als die mit Sudanschwarz B und Sudan III färbbaren und erreichen am 6. Tage das Maximum, um dann sich wieder zu vermindern. Die mit Sudanschwarz B und Sudan III färbbaren Granula erreichen aber erst am 8. Tage das Maximum der Zahl und nehmen dann an Zahl ab. Daraus folgt, daß *bei der Degeneration der Nervenzellen das Lipoid sich früher vermehrt, das Neutralfett aber etwas später*, und daß *dann mit dem Fortschreiten der Degeneration die beiden Stoffe sich nahezu parallel vermehren*. Es handelt sich in der vorliegenden Arbeit immer um *freies Lipoid und Fett*. Zu bemerken ist, daß beim Auflösen von Lipoid in Neutralfett die Färbbarkeit des ersteren mehr oder weniger stark eingebüßt wird, da das Viktoriablau sich nicht in dem letzteren löst.

In der Zeit später als 20 Tage nach der Nervendurchtrennung werden stark atrophisierte Nervenzellen weder mit Viktoriablau noch mit Sudanschwarz B und Sudan III gut gefärbt, da das freie Lipoid und Fett weitgehend zersetzt und verloren sind.

IV. Zusammenfassung.

Der Nervus hypoglossus wurde bei Kaninchen auf einer Seite durchgeschnitten, und nach Ablauf einer gewissen Zeit wurde die Medulla oblongata nur in Formalin fixiert und in Gefrierschnitte zerlegt. Man färbte die Schnitte mit mittelstark polarem, lipoidfärbendem Viktoriablau, mit schwach polarem, dem Neutralfett verwandte Stoffe färbendem Sudanschwarz B und mit apolarem, Neutralfett färbendem Sudan III und beobachtete die Resultate vergleichend.

Das Cytoplasma und der Kern der normalen Nervenzellen des Hypoglossuskerns führen nur wenig freies Lipoid. Das Cytoplasma ist an fettigen Granula arm. Nach der Durchschneidung des Nerven vermehrt sich die Färbbarkeit des Cytoplasmas mit den obigen drei Farbstoffen, sowie die Zahl der damit färbbaren fettigen Granula im Cytoplasma. Die Färbbarkeit des Cytoplasmas mit Viktoriablau erreicht am 6. Tage den Höhepunkt, und diejenige mit Sudanschwarz B und Sudan III aber erst am 8. Tage. Alsdann vermindern sich die freien fettigen Stoffe in den Zellen. Die näheren Veränderungen der Färbbarkeit der Zellen mit Viktoriablau im ganzen Verlauf sind in 7 Mikrophotographien dargestellt.

内 容 自 抄.

1 側の舌下神経を切断して種々の日数生かした家兎の延髄を単にホルマリンで固定して氷結切片にし、類脂質を染める中等極性の染料ピクトリア青，中性脂肪に近い物質を染める弱極性の染料ズダン黒 B，中性脂肪を染める無極性の染料ズダン III で染め，その成績が比較観察された。

健常の舌下核の細胞の胞形質と核は遊離の類脂質を含むこと甚だ少量で，胞形質の脂質粒子も乏しい。神経切断後には上記の 3 種の染料での胞形質の染色性と胞形質内のそれ等に染まる脂質粒子の数が増す。そしてピクトリア青で染まる類脂質物質は神経切断 6 日後に，ズダン黒 B とズダン III で染まる中性脂肪様物質は神経切断 8 日後に最高に達する。その後細胞内の遊離の脂肪物質は減少する。

Literatur.

Chikuda, Z.: Die Veränderungen der Mitochondrien in den Nervenzellen in dem Ursprungskern nach der Hypoglossotomie. (Jap.) Juzenkai Z. 47 (1942). — **Ihara, M.**: Die Veränderungen der Strukturdichte der degenerierten Nervenzellen des Nucleus nervi hypoglossi. (Jap.) Kaibo Z. 23(1948). — **Jakob, A.**: Normale und pathologische Anatomie und Histologie des Großhirns. 1927. — **Kimura, Y.**: Die Veränderung des Vitamin C in den Ursprungszellen nach der Ischiadikotomie bei Kaninchen und Katze. (Jap.) Mitt. anat. Inst. Niigata 27 (1953). — **Mandelstamm, M.**: Über die lipoden Einschlüsse in den Zellen der Großhirnrinde. Beitr. path. Anat. 94 (1935). — **Sawada, H. u. Z. Chikuda**: Das Verhalten des Golgischen Apparates in den Nervenzellen des Ursprungskerns bei der Nervendurchschneidung. (Jap.) Juzenkai Z. 48 (1943). — **Spielmayer, W.**: Histopathologie des Nervensystems. 1922.