Veränderungen der Struktur und Färbbarkeit der mit hochfrequentem Schall behandelten markhaltigen Nervenfasern des Frosches.

超音波で処理された蛙の有髄鞘神経線維の構造と染色性の変化.

Kazuyuki HASHIMOTO 橋本和幸.

(Eingegangen am 10. August 1957.)

Die Nervenfasern sind bekanntlich an lipoider Substanz reich. Die im Titel zum Ausdruck gebrachte Untersuchung wurde an Nervenfasern, die nach der Beschallung nur 5 Minuten lang mit 5%igem Formalin fixiert waren, so daß also ihre Baustoffe noch in naturnahen Zuständen vorhanden waren, vorgenommen. Man färbte die Nervenfasern mit mittelstark polarem, lipoidfärbendem Viktoriablau (schwach positiv geladen) und Irisolechtblau BL (schwach negativ geladen). Außerdem wurden die Nervenfasern zum Vergleich statt mit Formalin mit Osmiumsäure fixiert und im ungefärbten Zustand beobachtet.

I. Material und Methode.

Es wurde der Stamm des Nervus ischiadicus der *Rana nigromaculata* gleich nach dem Tode ausgenommen. Eine Hälfte von ihm wurde zur Kontrolle in 0.6%iger Kochsalzlösung aufbewahrt, die andere Hälfte wurde in ein Glasröhrchen von 1.8 cm Kaliber, 0.5 mm Wanddicke und 18.5 cm Länge mit 2 cc physiologischer Kochsalzlösung gebracht. Das Glasröhrchen wurde so in das Öl des Beschallungsgerätes gehalten, daß seine Kuppe sich in die Mitte zwischen der Öloberfläche und Bergkristallplatte stellte. Das Beschallungsgerät war der S—200 Typus von SHIMAZU. Die Wellenfrequenz betrug 710 kc, wobei 150 mA aus 1,500 V eingeführt wurden. Die Schwingung dauerte 10 Minuten bis 2 Stunden lang. Um die Wärme des Öles des Gerätes während seiner Wirkung unter 15°C zu halten, wurde die Wasserkühlröhre immer benutzt.

Das beschallte und das Kontrollnervenstück wurden in kleinere Stückchen geschnitten und auf einem Objektglas mit Nadeln vorsichtig zerfasert. Man klebte die unter dem Mikroskop zu vergleichenden Nervenfasern auf ein und demselben Objektglas auf, fixierte sie in mit 0.6%iger Kochsalzlösung bereiteter 5%iger Formalinlösung 5 Minuten lang bzw. in 1%iger Osmiumsäure 30 Minuten lang und wusch sie mit Wasser. Die formalinfixierten Nervenfasern wurden mit zwei lipoidfärbenden Farbstoffen folgenderweise gefärbt. Man verdünnte eine 2%ige alkoholische Lösung von Viktoriablau (von MERCK) kurz vor dem Gebrauch mit Wasser auf das 200fache, so daß die Lösung 0.01%igen Farbstoff und 0.5%igen Alkohol enthielt. Die Färbung vollzog sich 3 Minuten lang. Man verdünnte auch eine

2%ige alkoholische Lösung von Irisolechtblau BL (von BAYER) mit Wasser auf das 100fache. Diesmal enthielt die Lösung 0.02%igen Farbstoff und 1%igen Alkohol, und die Färbung erfolgte 10 Minuten lang. Die Präparate wurden leicht mit Wasser gewaschen. Das auf dem Objektglas überflüssige Wasser wurde mit Fließpapier an einer Kante abgetupft.

Die gefärbten formalinfixierten Präparate wie auch die mit Osmiumsäure geschwärzten wurden in Gummisirup eingeschlossen und danach innerhalb 30 Minuten mikroskopiert und photographiert.

Die feine Struktur der Markscheide verändert sich, wie bekannt, bei der Fixierung mit Formalin sehr stark, daß die durch den hochfrequenten Schall hervorgerufenen Veränderungen der Markscheide durch die Wirkung von Formalin überdeckt werden können. Es waren deshalb eine Reihe von Vorproben vor der eigenen Untersuchung notwendig. Man fixierte Nervenfasern in mit 0.6%iger Kochsalzlösung bereiteten Formalinlösungen von verschiedener Konzentration verschieden lange und färbte sie mit Viktoriablau. Aus den Untersuchungen ergab sich, daß je höher die Formalinkonzentration war und je länger die Fixation dauerte, eine um so gröbere netzförmige Struktur in der Markscheide auftrat. Man konstatierte, daß nach einer 5minütigen Fixierung mit 5%igem Formalin die Markscheide unter dem gewöhnlichen Mikroskop fast strukturlos erscheint und fast keine netzige Struktur durch die Viktoriablaufärbung dargestellt wird. Die so gefärbte Markscheide zeigte übrigens wenigstens während 30 Minuten keine merkliche Änderung ihrer Struktur.

II. Ergebnisse der Untersuchung.

A. Färbung beschallter Nervenfasern nach Formalinfixierung mit schwach basischem, mittelstark polarem Viktoriablau.

1. Färbung der normalen Nervenfasern.

Die Nervenfasern, die wie oben mit Formalin kurz fixiert und in 0.6%iger Kochsalzlösung oder im Gummisirup eingeschlossen sind, bestehen aus dem strukturlosen Achsenzylinder und der ihn umgebenden stark lichtbrechenden Markscheide. Die Nervenfasern weisen RANVIERSche Einkerbungen und SCHMIDT-LANTERMANNsche Einschnürungen auf.

Mit Viktoriablau färbt sich die Markscheide verhältnismäßig stark und der Achsenzylinder schwächer, wie in Abb. 1 dargestellt ist. Die SCHMIDT-LANTERMANNschen Einkerbungen sind in der Markscheide erkennbar. Die die Markscheide umgebende dünne SCHWANNsche Scheide läßt sich aber nicht wahrnehmen, nur daß gelgentlich scharf abgegrenzte ovale SCHWANNsche Kerne stärker als die Markscheide gefärbt angetroffen werden. In der Nähe der RANVIERSchen Einschnürung wird der Achsenzylinder, wie es MORITA (1953) bemerkt hat, stärker gefärbt als in anderen Stellen.

2. Nach 10minütiger Beschallung.

Nach 10 minütiger Beschallung wird die Markscheide, wie man es in Abb. 2 sieht, mit Viktoriablau viel besser färbbar. Die Markscheide ist immer noch strukturlos und zeigt nunmehr keine SCHMIDT-LANTERMANNsche Einkerbun-

gen. Es ist bemerkenswert, daß von der Innenfläche der Markscheide nach dem Achsenzylinder hin mit Viktoriablau stark färbbare Myelinmassen in halbkugliger und kugliger Form stellenweise vorspringen. Die Färbbarkeit des Achsenzylinders bleibt fast nicht verändert.

3. Nach 30minütiger Beschallung.

Die Markscheide der Nervenfasern wird nach 30 Minuten langer Beschallung mit Viktoriablau wieder etwas schwächer färbbar. Halbkuglige, pilzförmige und kuglige Vorsprünge aus der Innenfläche der Markscheide vermehren sich, wie in Abb. 3 dargestellt ist. Die Markscheide wird nicht selten an den RANVIERSchen Einschnürungen zerstört, und aus diesen Stellen fließt die Myelinsubstanz in wolkiger oder schlauchartiger Form aus.

4. Nach 1stündiger Beschallung.

Die Markscheide wird mit Viktoriablau bei weitem schlechter färbbar. Der Raum in der Markscheide ist nun mit stark gewundenen Schläuchen und zusammengefloßenen Massen aus aufgequollener Myelinsubstanz erfüllt (Abb. 4). Diese Myelinsubstanz ist auch nicht gut färbbar. Außer diesen stark veränderten dicken Nervenfasern gibt es dünnere Fasern mit sehr dünner Markscheide, welche weniger beschädigt sind. Im Allgemeinen tritt die Veränderung durch die Beschallung umso weniger auf, je dünner die markhaltigen Nervenfasern sind.

5. Nach 2stündiger Beschallung.

Die Markscheide wird, wie in Abb. 5 gezeigt ist, weitgehend gestört. Die an der Wand gebliebenen Reste der Markscheide sind vielerorts zerrissen und ungleichmäßig gefärbt. Die Färbbarkeit der Myelinsubstanzen hat in weitem Masse abgenommen. Selbst nach 2stündiger Beschallung verändert sich die Struktur der sehr feinen Nervenfasern nur gering, ihre Markscheide ist immerhin mit Viktoriablau schlechter färbbar geworden.

B. Färbung beschallter Nervenfasern nach Formalinfixierung mit schwach saurem, mittelstark polarem Irisolechtblau BL.

1. Färbung der normalen Nervenfasern.

Die Markscheide der mit Formalin kurz fixierten Nervenfasern wird mit Irisolechtblau BL schwach blau mit violetterem Ton gefärbt, und der Achsenzylinder nimmt die Farbe viel schwächer an (Abb. 6). In der Markscheide sind SCHMIDT-LANTERMANNsche Einkerbungen bemerkbar. Der SCHWANNsche Kern ist mit Irisolechtblau BL nicht zu färben. Der Achsenzylinder färbt sich in der Nähe der RANVIERSchen Einschnürung stärker als in den anderen Abschnitten.

2. Nach 10minütiger Beschallung.

Nach 10minütiger Beschallung werden die Markscheide der Nervenfasern mit Irisolechtblau BL viel besser färbbar, wie oben beim Fall der Färbung mit Viktoriablau (Abb. 7). Die aus der Innenfläche der Markscheide vorsprungenen kugligen Myelinmassen färben sich auch gut.

3. Nach 30minütiger Beschallung.

Danach wird die Markscheide wieder schlechter mit Irisolechtblau BL anfärbbar, wie in Abb. 8 gezeigt ist. Sie färbt sich übrigens nicht gleichmäßig stark.

Die Färbung der im Innern der Nervenfasern vorgespungenen zahlreiche Myelinmassen erfolgt auch unregelmäßig stark.

4. Nach 1stündiger Beschallung.

In dem Innenraum der Markscheide sind gewundene schlauchartige Myelinmassen zu sehen. Die Myelinsubstanz wird nun alle mit Irisolechtblau BL sehr schwach angefärbt.

5. Nach 2stündiger Beschallung.

Die Myelinsubstanz färbt sich, wie nach 1stündiger Beschallung, sehr schwach (Abb. 10).

C. Fixierung und Schwärzung beschallter Nervenfasern mit Osmiumsäure.

In Abb. 11—15 sind normale und 10 Minuten bis 2 Stunden lang beschallte, mit Osmiumsäure 30 Minuten lang behandelte Nervenfasern gezeigt. Die Schwarzbarkeit der Markscheide mit der Osmiumsäure nimmt mit der Dauer der Beschallung zu, bis schließlich nach 2stündiger Beschallung die Markscheidensubstanz am tiefsten tingiert wird. Die Schwärzung deutet darauf hin, daß durch die lang dauernde Beschallung eine stark reduzierend wirkende Substanz in Freiheit gesetzt wird. Weil diese Substanz sich nicht stark mit obigem lipoidfärbenden Viktoriablau und Irisolechtblau BL färbt, muß sie hauptsächlich Neutralfett sein.

III. Auswertung.

Die Markscheide der Nervenfasern ist reich an Lipoid, welches letzteres durch eine demaskierende Wirkung von den meisten histologischen Fixierungsflüssigkeiten befreit und chemisch wie auch histologisch viel besser nachweisbar wird. In solchen Fällen kommt aber die Markscheide in sehr naturweisen Zuständen zur Beobachtung. In vorliegender Untersuchung fixierte man, um freies Lipoid in möglichst naturnahen Zuständen untersuchen zu können, die Nervenfasern vom Frosch in einer mit 0.6%iger Kochsalzlösung bereiteten 5%igen Formalinlösung, und zwar nur 5 Minuten lang. Die angewandten lipoidfärbenden Farbstoffe waren schwach basisches, also schwach positiv geladenes Viktoriablau (von MERCK) und schwach saures, also schwach negativ geladenes Irisolechtblau BL (von BAYER). Der letztere Farbstoff ist im Gegenteil zu anderen sauren lipoidfärbenden Farbstoffen in niedrigprozentigem Alkohol leicht löslich und eignet sich deshalb zum Zweck unserer Untersuchung.

In normalen Nervenfasern wird die Markscheide mit obigen beiden Farbstoffen stärker gefärbt als der Achsenzylinder. Der letztere läßt sich in der Nähe der RANVIERschen Einschnürung etwas besser färben als in den übrigen Abschnitten.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß nach kurzer Beschallung sich die Färbbarkeit der Markscheide mit den beiden Farbstoffen vermehrt, wenn auch nicht in weitgehendem Masse, weil wahrscheinlich das mit Eiweiß verbundene Lipoid, wie von YASUDA (1956) bei der Beschallung der Milchkügelchen beobachtet und erklärt wurde, demaskiert und befreit wird. Dauert die Beschallung länger, so springt die Myelinsubstanz von der Innenfläche der Markscheide merkwürdiger-

weise in Form von Halbkugel, Pilz und Kugel vor. Dies ist so zu erklären, daß die Grenzmembran auf der Innenfläche der Markscheide schwächer und leichter zerbrechlich ist als die äußere, die Markscheide umgebende SCHWANNsche Scheide, und, daß die durch die Wirkung der Ultraschallwellen nach innen ausgeflossene Myelinmassen sich kraft der Oberflächenspannung abkugeln. Im Ablauf der Zeit quellen die Myelinmassen schlauchartig auf und konfluieren miteinander.

Die obigen Veränderungen treten an dickeren Nervenfasern stärker auf als an dünneren, wie auch bei der WALLERschen Degeneration beobachtet werden.

Durch lange dauernde Beschallung reduziert sich die Färbbarkeit der Markscheidensubstanz mit den beiden Farbstoffen, die einmal zugenommen hatte, wieder vor allem bei der Färbung mit Irisolechtblau BL. Wie oben im Kapitel der Fixierung und Schwärzung der Nervenfasern mit Osmiumsäure besprochen wurde, wird wahrscheinlich die Markscheidensubstanz durch die Beschallung auf längere Zeit weitgehend destruiert, bis schließlich stark reduzierend wirkendes, dipolfreies, mit den mitterstark polaren Farbstoffen nicht zu färbendes Neutralfett reichlich freigelegt wird.

IV. Zusammenfassung.

Die der Wirkung von Ultraschallwellen unterworfenen markhaltigen Nervenfasern von Frosch wurden kurz mit Formalin fixiert und mit lipoidfäbendem Viktoriablau und Irisolechtblau BL gefärbt. Zum Vergleich wurden die Nervenfasern mit Osmiumsäure fixiert und geschwärzt.

Die Ultraschallwellen verursachen zuerst eine deutliche Vermehrung der Färbbarkeit der Markscheidensubstanz mit beiden Farbstoffen. Lipide Substanz wird also durch die Beschallung freigelegt. Zugleich springen Teile der Markscheidensubstanz vielerorts aus der Innenfläche der Markscheide nach innen in kugelige Form vor. Nach weiterer Beschallung nimmt die Färbbarkeit der Markscheidensubstanz ab, und die in das Innere vorgesprungene Markscheidensubstanz quellen schlauchenartig und fließen miteinander zusammen. Die Markscheidensubstanz wird mit der stark oxydierend wirkenden, sich also stark reduzierenden Osmiumsäure immer stärker geschwärzt. Allem Anschein nach wird durch länger dauernde Beschallung dipolfreies, stark reduzierendes Neutralfett reichlich losgelöst, woraus eine Prädominanz desselben gegenüber dem dipolstärkeren Lipoid resultiert.

内 容 自 抄.

超音波を作用させた蛙の有髄鞘神経線維をホルマリンで軽く固定し、類脂質を染める弱塩基性のピクリア青と弱酸性のイリゾールエヒト青 BL で染め、またオスミウム酸で固定し黒化して検べた。超音波により髄鞘は先ず明らかに兩種染料での染色性を増し、類脂質の遊離することが示された。同時に髄鞘の内面の所々から内に向って髄鞘物質が類球形をして突出する。超音波が長く続けば髄鞘物質の染色が減じ、また上記の髄鞘物質の塊は紐の形に膨脹し、迂曲し、互いに融合する。同時にオスミウム酸で強く黒染するようになる。これ等は中性脂肪が多く遊離し、類脂質よりも多くなる結果であろう。

Literatur.

Morita, H.: Versuche, die peripherischen Nervenfasern mit Viktoriablau zu färben. Arch. hist. jap. 5 (1953). — **Seki, M.:** Methodik zur Färbung der freien dipolhaltigen Lipoide in ihren natürlichen Zuständen. Arch. hist. jap. 10 (1956). — **Yasuda, H.:** Färbung durch Ultraschallwirkung zersetzten Milchkügelchen mit lipoidfärbendem Viktoria-blau. Arch. hist. jap. 9 (1956).

Tafelabbildungen.

Erläuterung zu den Tafelabbildungen.

Abb. 1. Isolierte normale Nervenfasern, mit Viktoriablauf gefärbt. Die Markscheide ist besser gefärbt als der Achsenzylinder. 620 $\times$.

Abb. 2. Nervenfasern nach 10minütiger Beschallung. Viktoriablaufgefärbung. Zunahme der Färbung der Markscheide. Kugelförmige Vorsprünge der Myelinsubstanz aus der Innenfläche der Markscheide. 620 $\times$.

Abb. 3. Dieselbe nach 30minütiger Beschallung. Vermehrung der kugeligen Vorsprünge. Die Färbbarkeit der Markscheidensubstanz hat etwas abgenommen. 620 $\times$.

Abb. 4. Dieselbe nach 1stündiger Beschallung. Die Markscheidensubstanz färbt sich noch schwächer. Im Innern der Nervenfasern sieht man gewundene Myelinschläuche. 620 $\times$.

Abb. 5. Dieselbe nach 2stündiger Beschallung. Die Markscheide ist stark gestört. Die Myelinsubstanz färbt sich schlecht. 620 $\times$.

K. HASHIMOTO (1)

1

2

3

4

5

Abb. 6. Isolierte normale Nervenfasern, mit Irisolechtblau BL gefärbt. 620×.

Abb. 7. Nervenfasern nach 10minütiger Beschallung. Färbung mit Irisolechtblau BL. Die Veränderung der Struktur und Färbbarkeit der Fasern wie bei Abb. 2. 620×.

Abb. 8. Nervenfasern nach 30minütiger Beschallung. Färbung mit Irisolechtblau BL. Die Markscheide wird unregelmäßig schwächer gefärbt. Zahlreiche kugelige Myelinmassen im Innern der Fasern. 620×.

Abb. 9. Nervenfasern nach 1stündiger Beschallung. Färbung mit Irisolechtblau BL. Die Markscheidensubstanz wird sehr schwach gefärbt. Gewundene Schläuche von Myelin im Innern der Fasern. 620×.

Abb. 10. Nervenfasern nach 2stündiger Beschallung. Die Markscheidensubstanz ist blaß gefärbt. 620×.

6

7

8

9

10

Abb. 11—15. Normale Nervenfasern (Abb. 11) und die Fasern nach 10- und 30minütiger und 1- und 2ständiger Beschallung (Abb. 12—15). Fixierung mit Osmiumsäure. Die Markscheidensubstanz schwärzt sich mit der Dauer der Beschallung immer stärker. 620×.

11

12

13

14

15