

Aus der Konservierenden Abteilung des Zahnärztlichen Institutes,
Stockholm.
(Vorstand: Dozent G. WESTIN.)

Eine Methode für Untersuchung der Blutmenge und der feineren Gefässe in der Zahnpulpa und im Knochenmark.

Von
SVEN SELLMAN.

611. 314018.

Die Kapillaren geben durch ihre Menge und Anordnung die notwendige Berührungsfläche für den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe. Die Bedürfnisse der verschiedenen Organen sind nicht die gleichen, auch schwankt im einzelnen Organ der Blutstrom entsprechend dem Bedarf. Aus guten Gründen können wir annehmen, dass die Durchblutung in grossem Umfang durch die eigene Kontraktilität der Kapillaren bestimmt wird, und dass sich das Kapillar-system durch Erweiterung oder Verengerung den Bedürfnissen anpasst.

Die Gefässe der Haut und Schleimhäute können teilweise an Lebenden beobachtet werden. Die meisten Untersuchungen müssen aber an fixiertem Gewebe geschehen. Es gibt mehrere Methoden für solche Gefässstudien, von denen viele mühsam und dem Zufall unterworfen sind. Sie geben auch gewöhnlich nur eine qualitativ-morphologische Darstellung des Gefäss-systems und berücksichtigen nicht die oben erwähnten physiologischen Variationen. Auf welche Weise die deskriptive Anatomie zur Darstellung des Pulpagefäss-systems gekommen ist, ist mir nicht näher bekannt. Injektionen von gefärbten, gelatinösen Massen in die Gefässe können immer nur mit wechselndem Erfolg geschehen. Ob dieses Verfahren überhaupt beim Zahnorgan möglich ist, scheint mir fraglich. KROGH hat bei seinen bekannten Untersuchungen Tuschinjektionen an lebenden Tieren angewandt. Diese Methode ist freilich an menschlichen Zähne nicht

anwendbar. Eine naturgetreue Darstellung durch plastische Rekonstruktion des gesamten Gefäßsystems wäre wohl eine zu mühselige Arbeit, wenn nicht gar unmöglich infolge Verschiebung der feinsten Details durch ungleiche Streckung der Schnitte, Messerführung usw. Vor der sog. »Rekonstruktion im Kopfe« muss, wie in **ROMEIS'** Taschenbuch betont wird, besonders gewarnt werden. Sie führt fast immer, wenn es sich um komplizierte Objekte handelt, zu Missverständnissen und Trugschlüssen.

Es schien mir darum nützlich ein Verfahren zu prüfen, das von **T. SJÖSTRAND** (1934) angegeben ist. Seine Methode ist relativ einfach, fordert keine Vorbereitungen und gestattet nicht nur eine direkte Beschreibung der Anordnung der mit Erythrocyten gefüllten Gefäße sondern auch eine quantitative Berechnung der Blutmenge, die während der zu untersuchenden Verhältnisse im Organ oder Organteil vorhanden ist. Die Methode basiert auf einer spezifischen Färbung der Erythrocyten mit Hilfe der katalytischen Wirkung des Hämoglobins auf Benzidin(oder Orthotolidin)-Wasserstoffsuperoxydlösung. Bei Oxydierung geht Benzidin in eine farbige Verbindung über. Bezüglich der Einzelheiten wird auf die Originalarbeit von **SJÖSTRAND** hingewiesen. (Vgl. **LEPEHNES** Hämoglobinfärbung.)

Dieses Verfahren lässt sich allerdings nicht unmittelbar auf die Zahnpulpa anwenden, wenn man eine genaue Auffassung von der Beziehung des Kapillarnetzes zum Dentin und zu den Odontoblasten haben will. Um die Hartgewebe schneiden zu können, muss man sie entkalken. Die Entkalkung zerstört aber die katalytische Wirkung der Erythrocyten und macht damit die Voraussetzung einer erfolgreichen Färbung zu nichte. Isolierte Pulpen können dagegen recht gut nach den Originalvorschriften behandelt werden. Am besten verfährt man auf folgende Weise. Nach kurzer, kräftiger Fixierung (20 % neutrales Formol) wird der Zahn vorsichtig gespalten, die Pulpa herausgenommen und nochmals für c:a 20 Min. in die Fixierungslösung gebracht. Danach eine Viertelstunde in die Färbelösung (Orthotolidin-Wasserstoffsuperoxyd-Alkohol) gelegt und schliesslich im Gefriermikrotom geschnitten. Will man Paraffinschnitte herstellen, so bringt man nach beendeter Färbung das Objekt durch Azeton (20 Min.), Benzol (20 Min.) in Paraffin (mindestens 3 Stund.). Färbung der aufgeklebten Paraffinschnitte, wie es **SJÖSTRAND** beschreibt, ist mir nicht gelungen. Dagegen erhält man schöne Resultate mit

Stückfärbung des frischen Präparates vor dem Fixieren. In mit Orthotolidin gefärbten Präparaten erhalten die Blutkörperchen eine braune Farbe, das übrige Gewebe wird nur schwach grünlich tingiert.

Die isolierte Pulpa ist aber nicht für eingehendere Untersuchungen über den feineren Bau in der Nähe der Odontoblasten geeignet. Das Odontoblasten haftet nämlich an der Dentinwand fest, und das weiche Pulpagewebe wird beim Entfernen oft längs der sog. Weil'schen Schicht zerrissen. Ausserdem entstehen fast unvermeidlich Geweberupturen und Instrumenteninsulte durch das gewaltsame Spalten des Zahnes. Um diese Übelstände zu vermeiden und die Pulpagesäße in ihrer naturgetreuen Beziehung zum Dentin darzustellen habe ich versucht, Entkalkungspräparate anzufertigen ohne die spezifische Hämoglobinfärbung zu beeinträchtigen. Ich ging davon aus, dass die Färbung möglichst bald geschehen sollte, ehe das Objekt durch allzu viele katalyszerstörenden Flüssigkeiten gewandert war, und dass das gefärbte Pulpagewebe gegen die schädliche Wirkung der Entkalkungssäuren geschützt werden sollte. Letzteres versuchte ich durch Schnellentkalkung und vorherige Paraffindurchtränkung zu erreichen.

Mit folgendem Verfahren habe ich guten Erfolg gehabt. Der frisch extrahierte Zahn wird vorsichtig trepaniert und in eine von SLONIMSKI und LAPINSKI angegebene Fixierungslösung gebracht.

Ferricyankalium	3 g
Formalin (35 %)	20 ccm
Aqua dest.	110 ccm

Betreffs dieses Fixierungsmittels verweise ich auf diese Autoren.

Nach 12-stündiger Fixierung wird der Zahn einige Minuten mit Wasser abgespült, und danach der Schmelz mit einem Karborundumstein weggeschliffen. Das Dentin greift man mit einem der grössten Rundbohrer an und entfernt unter Schonung der Pulpa und Belassung einer dünnen Dentinwand um sie herum, soviel wie nötig ist für freie Führung des Mikrotommessers. Die um die Pulpa stehengebliebene Dentinwand soll möglichst überall gleichmässig dünn, fast durchsichtig sein. Die Pulpa legt man zweckmässig an einigen indifferenten Stellen frei.

Spülen in Leitungswasser über Nacht.

Färben 20 Min. in SJÖSTRANDS Lösung:

I	{	Orthotolidin	0.8 g
		Spiritus conc.	40 ccm
II	{	Perhydrol	6 ccm
		Alkohol (70 %)	60 ccm

Im Verhältnis 2 : 3 gemischt.

Entwässern in wasserfreiem Azeton $\frac{1}{2}$ Stunde, zweimal gewechselt.

Benzol $\frac{1}{2}$ Stunde, zweimal gewechselt, eventuell Evakuierung.

Paraffin (evt. mit Wachs gemischt) 6—12 Stunden.

Aus dem Paraffin wird der Zahn nun herausgenommen, das Dentin mit einem Excavator oder dgl. rein geschabt, alle Stellen, wo die Pulpa frei liegt, dagegen mit aufgeschmolzenem Paraffin geschützt. Dann folgt das

Entkalken in 5 % Salpetersäure 9—12 Stunden,

Natriumsulfatlösung 5 % 6—12 St.

Fliessendes Wasser 6—12 St.

Danach Azeton, Benzol, Paraffin wie früher.

Für dicke Schnitte dürfte eine 5 % Beimengung von Wachs vorteilhaft sein. Dieser Zusatz soll die Geschmeidigkeit erhöhen.

Das Schneiden muss mit einem guten, stabilen Mikrotom geschehen, am besten einem speziell für Hartgewebeschnitte bestimmten. Entsprechend dem Zweck der Untersuchung muss die Schnittdicke innerhalb weiter Grenzen variieren, von 4 μ bis 150 μ . Aufkleben und Montierung wie gewöhnlich.

Mit Vorteil macht man Ganzpräparate auf folgende Weise. Nachdem man das eingebettete Objekt in das Mikrotom eingespannt hat, schneidet man soviel davon ab, bis man auf das zu untersuchende Niveau gekommen ist, wonach der Zahn vom Paraffin gereinigt und über Benzol in Kanadabalsam geführt wird. Das Montieren auf Tragglas geschieht am besten so, dass man einen ungefärbten Celluloidring (z. B. Ringmatrize aus Celluloid oder mit Hilfe von Celluloidstrips und Azeton hergestellt) auf das Glas stellt, ihn mit zähem Balsam füllt und den Zahn, die Schnittfläche nach oben, hineinversenkt. Ein kleines Deckglas wird auf die Fläche gelegt und mit dünnem Balsam gefestigt. Trocknen mehrere Tage im Thermostat.

Wie oben erwähnt ermöglicht diese Methode eine qualitativ-morphologische Darstellung der Anordnung der offenstehenden (mit Blutkörperchen gefüllten) Gefässe in einer Weise, die man sonst nur bei Injektions- oder Korrosionspräparate zu sehen be-

kommt. Am schönsten sind die oben beschriebenen Ganzpräparate, die ausserordentlich gut das Gefäßsystem in situ zeigen, so dass man den Eindruck gewinnt, als ob man durch ein Fenster in die Pulpa hineinblickte. Es kann durchfallendes oder auffallendes Licht oder auch beide kombiniert benutzt werden. Opakilluminator ist nicht notwendig. Um ein wirklich stereoskopisches Sehen zu erreichen, verwende man ein binokulares bildaufrichtendes Präpariermikroskop. Abb. 1 zeigt die Photographie eines solchen Präparates. Es stellt das Kapillarnetz am Boden und den Seitenwänden des Cavums eines oberen Molaren dar.

Abb. 2, 3, 4 sind dicke Schnitte (100 μ) desselben Zahnes. Die feinen Kapillaren sind perifer gesammelt unmittelbar hinter den Odontoblasten. Diese randgestellten Gefäße vertreten also das Kapillarnetz in Querschnitt. Der grosse zentrale Teil der Pulpa ist relativ blutarm, nur die zu- und abführenden Gefäße und ihre Verästelungen haben dort ihren Verlauf. Kapillaren kommen nur spärlich vor.

Es dürfte auch möglich und von nicht geringerem Interesse sein, diese Methode auf Knochenmark anzuwenden. Bisher war es unmöglich Präparate davon in der Weise herzustellen, dass das Mark intakt in seiner Beziehung zum Knochen mit dieser selektiven Erythrocytenfärbung behandelt war. Entweder musste man das herausgekratzte Mark isoliert nach SJÖSTRAND färben oder auch auf diese Färbung verzichten und gewöhnliche Entkalkungspräparate machen. Der Verfasser besitzt einige Quer- und Längsschnitte von entkalkter Kaninchen-tibia, bei denen die Erythrocyten recht gut gefärbt sind (Abb. 5). Die Herstellung der Präparate war ungefähr die gleiche, wie die oben für die Zahnpulpa beschriebene. Der frische Röhrenknochen wird sofort oder nach kurzem Fixieren mit einer feinen Laubsäge quer in zentimeterlange Stückchen zerlegt. Die Stückchen werden fixiert, in Wasser abgespült, in SJÖSTRANDS Lösung gefärbt und durch die gewöhnlichen Flüssigkeiten in Paraffin gebracht. Erst nach der Paraffindurchtränkung wird der überflüssige Knochen mit Bohrern und Schleifsteinen entfernt. Will man Längsschnitte haben, so spaltet man erst jetzt den Knochen mit der Laubsäge. Entkalken einige Stunden, danach die gleiche Behandlung, wie sie für Zähne beschrieben ist.

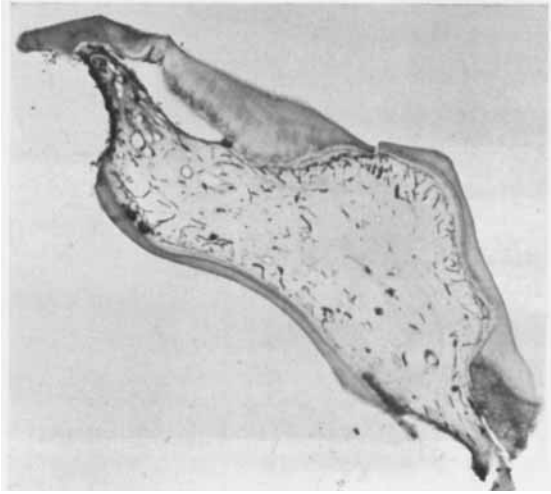


Abb. 3. Querschnitt desselben Zahnes 100 μ .
18 \times . Mikrosummar.



Abb. 4. Ein Pulpahorn. Das Kapillarnetz teilweise
tangential geschnitten.

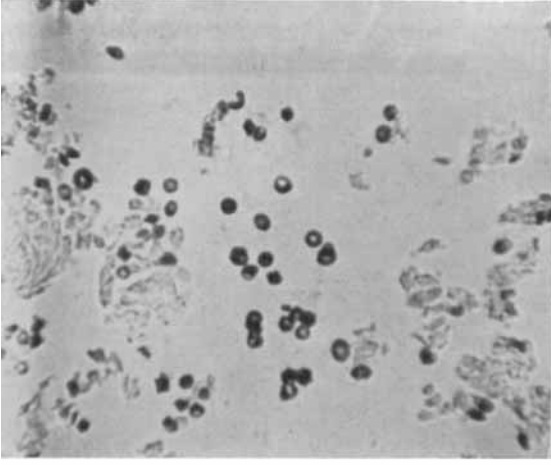


Abb. 5. Querschnitt des Knochenmarks. Die
Erythrocyten treten deutlich hervor. 4 μ .

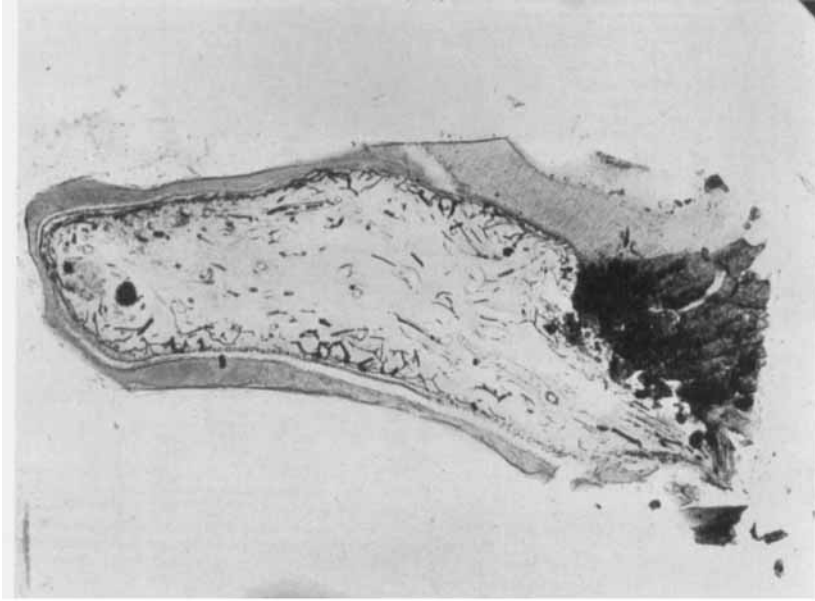


Abb. 2. Querschnitt desselben Zahnes 100 μ .
18 \times . Mikrosommar.

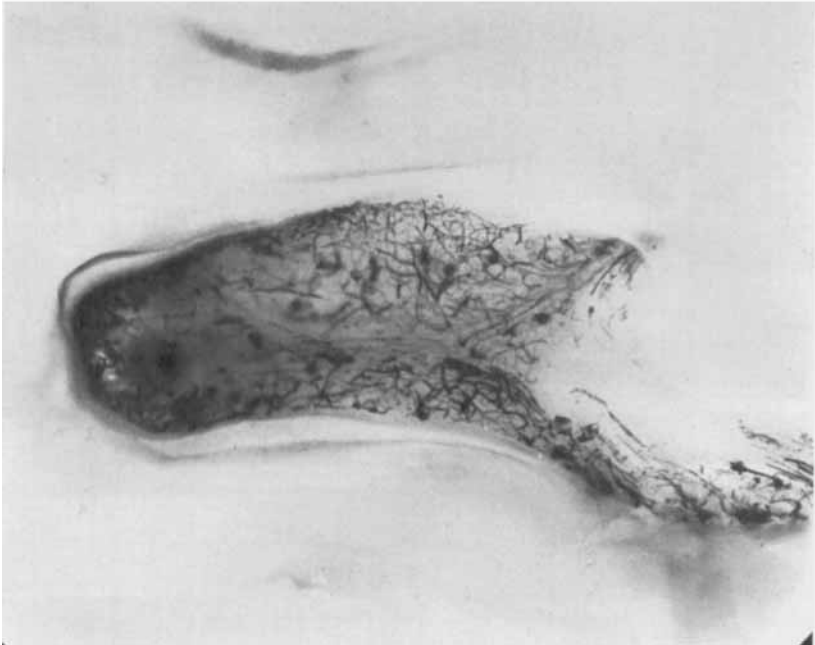


Abb. 1. Gefäße des Cavumbodens eines oberen Molaren.
»Ganzpräparat« 18 \times . Mikrosommar.

SELLMAN: Untersuchung der Blutmenge in der Zahnpulpa.

Die grösste Bedeutung dieses Verfahrens liegt darin, dass es eine zahlenmässige Berechnung der Blutmenge gestattet. Nur die Erythrocyten sind gefärbt, und sie treten im Schnitt so deutlich hervor, dass man sie zählen kann. Die Schnitte sollen von geeigneter Dicke sein z. B. 4μ , und die Blutkörperchen werden pro Quadrat im Okular- oder Objektquadratnetz gezählt. Es ist auf die Weise leicht die Anzahl per cmm Gewebe zu berechnen. SJÖSTRAND gibt an, dass mit geeigneter Quadratgrösse und Schnittdicke der Mittelfehler bei 25 Berechnungen von 3 bis 5 Prozent schwankt.

Die erhaltenen Zahlen geben natürlich nicht den absoluten Wert der Blutmenge im lebenden Organ. Erstens ist das Präparat durch die technische Bearbeitung etwas geschrumpft, ein Faktor, der schwer zu berechnen ist. In ROMEIS' Taschenbuch wird für Paraffinschnitte eine Schrumpfung bis zu 20 % angegeben. In diesen von Hartgeweben umgebenen Objekten ist die Schrumpfung wahrscheinlich nur sehr gering, doch kann man sie nicht ganz ausser Betracht lassen. Zweitens schneidet das Mikrotom nicht absolut gleich dicke Schnitte, und drittens ist die Streckung auf dem Tragglas wie bekannt eine willkürliche Operation. Diese und andere Fehlerquellen werden ausführlich von SJÖSTRAND besprochen. Für den Vergleich zwischen einheitlich behandeltem Material sind sie jedoch von geringer Bedeutung.

Ich glaube, es würde von grossem Interesse sein, nach dieser Methode die Blutversorgung der Pulpa zu prüfen. Wir wissen ja bisher nichts von der normalen Durchblutung der Pulpa und ihrer Regulation, wir kennen nicht die Möglichkeiten der physiologischen Variationen in der Blutmenge usw. Altersveränderungen, Folgen von Vitaminmangel, Suprarenin- und Corbasil-Wirkung und anderes mehr kann Gegenstand experimenteller Untersuchungen sein. Die morphologischen Veränderungen des Gefäss-systems, die Zahl und Ausdehnung der Gefässe sowie die Verteilung der Blutmenge könnten weiter geklärt werden. Hieraus dürfte sich ohne Zweifel ein Gewinn für die wissenschaftliche Beurteilung vieler physiologischen und pathologischen Zustände ergeben.

Zusammenfassung.

Verf. hat eine im Jahre 1934 von SJÖSTRAND zur Färbung der roten Blutkörperchen angegebene Methode modifiziert, derart

dass sie für entkalktes Material, nämlich für Zahnpulpa und Knochenmark verwendbar ist. Die SJÖSTRANDSche Methode gründet sich auf die katalytische Wirkung von Hämoglobin (Methämoglobin) auf eine Lösung von Benzidin (oder Orthotolidin) und Wasserstoffsperoxyd. Durch diese selektive Färbetechnik können die Kapillaren und die feinen Blutgefässe in ihrer Funktion klar gezeigt werden, und es ist auch möglich, die Blutkörperchen zu zählen, und so ein quantitatives Mass für den Blutgehalt des Gewebes zu erhalten. Es scheint dem Verfasser von grossem Interesse zu sein, das Kapillarsystem in der Pulpa und die Variation des Blutgehaltes bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen zu studieren.

Summary.

The author has modified a method of staining the red blood corpuscles published by SJÖSTRAND 1934, so as to make it applicable to decalcified material, viz. the tooth pulp and bone marrow. The SJÖSTRAND method is based on the catalytic effect of (met)hemoglobin on a solution of benzidine (or orthotolidine) and hydrogen peroxide. By means of this selective staining technique the capillaries and the fine blood-vessels in function can be clearly shown, and it is also possible to count the blood corpuscles as a quantitative measure of the blood content in the tissue. It seems to the author that it should be of a certain interest to study the capillary system in the pulp and the variation of blood content in different physiologic and pathologic conditions.

Résumé.

L'auteur a modifié une méthode de coloration des hématies, publiée en 1934 par SJÖSTRAND, la rendant ainsi applicable aux matériaux décalcifiés; soit à la pulpe dentaire et à la moelle osseuse. La méthode de SJÖSTRAND se base sur l'effet catalytique de la (met)hémoglobine sur une solution de benzidine (ou d'orthotolidine) et de peroxyde d'hydrogène. Grâce à cette technique de coloration sélective les capillaires et les fins vaisseaux sanguins en fonction peuvent être nettement décelés, de même qu'il est possible de compter les hématies et de donner ainsi une mesure quantitative du sang contenu dans le tissu. Il semble à l'auteur

que ce serait d'un certain intérêt d'étudier le système capillaire de la pulpe et les variations du contenu sanguin dans les diverses phases physiologiques et pathologiques.

Literatur.

- KROGH, Die Anatomie und Physiologie der Kapillaren, Berlin 1929.
ROMEIS, Taschenbuch der mikroskopischen Technik, Berlin u. München 1928.
SJÖSTRAND, Skand. Arch. f. Physiol. Bd LXVIII.
SLONIMSKI & LAPINSKI, Ztschr. f. Zellforschung und mikr. Anat. Bd XVI.
-

Address:

Hantverkargatan 63,

Stockholm.