© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Methode zur Verfertigung längerer Schnittserien mit Celloidin.

Von

Dr. István Apáthy

aus Budapest.

Seit Jahren beschäftige ich mich damit, eine Methode auszuprobiren, nach welcher in Celloidin eingebettete Objecte ohne besondere Mühe und Zeitverlust auch in größere Serien von Schnitten zerlegt werden könnten. Es handelt sich hier hauptsächlich um Objecte von geringem Durchmesser und bedeutender Länge (z. B. Würmer), von welchen vollständige Querschnittserien verfertigt werden sollen. Bisher bediente man sich zu diesem Zweck so zu sagen ausschließlich der Paraffinmethode. Was man von Celloidinmethoden kannte, war allerdings dazu geeignet, größere Schnitte, bei welchen es nicht auf besondere Feinheit ankam, in Reihen zu ordnen, und leistete daher auch das Seine beim Studium des Gehirnes etc., noch mehr aber für topographische Arbeiten; allein vor der Mühe, ein mehrere Centimeter langes Object in eine Serie von 5—10 μ dicke Schnitte zu zerlegen, schrak Jedermann zurück, und die Schwierigkeiten erschienen, je kleiner die Schnittfläche war, um so größer.

Und doch hat das Celloidin, namentlich für die Histologie, manche unschätzbaren Vortheile, welche das Paraffin schon wegen der Natur des Einbettungsverfahrens unmöglich erreichen kann. Bei geeigneter Conservirung und Färbung zeigen Celloidinschnitte Einzelheiten in der Structur, und zwar in erster Linie von Bindegewebe und Intercellularsubstanz, die selbst bei der sorgfältigsten Paraffineinbettung vollkommen verborgen bleiben. Allerdings hören wir von manchen

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Morphologen, es komme ihnen darauf nicht an, und sie haben gewiss Recht, indem sie solche Feinheiten nicht beschreiben; es ist aber immerhin besser, über etwas zu schweigen, was man gesehen hat, als über das, was man nicht gesehen hat, und nicht genöthigt zu sein, anstatt Epithel eine Schicht Kerne ohne Zellgrenzen, wie es nur zu oft auch an nicht schematischen Abbildungen geschieht, zu zeichnen. Andererseits macht das Überwiegen gewisser Gewebselemente in dem Object, z. B. eine größere Menge dicht gelagerter Muskeln, oder das Vorhandensein von viel Dotterkörnchen das Schneiden in Paraffin beinahe unmöglich; wogegen dies in Celloidin gar nicht beeinträchtigend wirkt.

Das Alles ist, glaube ich, genügender Grund, um in vielen Fällen anstatt zum Paraffin zum Celloidin zu greifen und, wenn das Verfertigen von Celloidinserien nicht allzu große Schwierigkeiten in den Weg legt, sich sogar für einen eventuell größeren Aufwand an Zeit durch die Resultate entschädigt zu finden. Ein größerer Aufwand an Zeit ist aber bei der zu beschreibenden Methode gar nicht nöthig; denn den Vortheil der größeren Schnelligkeit gewähren über die Celloidinserie nur die sog. Bandwurmschnitte, und es ist sehr fraglich, ob dieser Vortheil nicht durch die Nachtheile des quergestellten Messers ganz aufgehoben wird.

Die Schnitte, namentlich wenn sie klein waren, wurden bisher meistens einzeln mit der betreffenden Flüssigkeit (Alkohol oder Öl) auf den Objectträger gebracht, dort ausgebreitet und geordnet, wobei aber bei der Ausbreitung des zweiten Schnittes der erste immer in großer Gefahr war, weggeschwemmt zu werden; und so war es beinahe unmöglich, eine größere Anzahl kleiner Schnitte in Ordnung zu halten. Nach meiner Methode hingegen werden die Schnitte erst dann auf den Objectträger gebracht, wenn sie schon fertig geordnet sind, indem sie einfach wie eine Matrize von einem Streifen Pauspapier auf das Glas abgezogen werden. Das überflüssige Öl wird mittelst Löschpapier abgetrocknet und die Adhäsion genügt, die Schnitte beim Dazugeben des Balsams und Auflegen des Deckgläschens vollkommen unbewegt zu behalten. Die Schnitte bilden bei der Unlöslichkeit des Celloidins ganz homogene Lamellen, aus welcher, wenn das Einbetten gut war, keine einzige Zelle weggeschwemmt werden kann. Natürlich wird auch hier bei den ersten Versuchen ein Jeder gewiss auf manche kleine Schwierigkeiten stoßen; dem ist aber bei jeder Methode so, und nur Übung kann da helfen.

Ich verfahre also folgendermaßen. Das Object wird nach be-

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

liebiger Fixirung einfach in Alkohol gehärtet. Was das allmähliche Übertragen in absoluten Alkohol betrifft, so muss ich darauf aufmerksam machen, dass kein Object ohne größeren Nachtheil für histologische Feinheiten länger als 12 Stunden in schwächerem oder auch 50%igem Alkohol verweilen kann. Ja sogar 70%iger Alkohol fängt nach 24 Stunden an, in irgend einer Weise langsam macerirend zu wirken. Längere Zeit für histologische Zwecke aufbewahren kann man nur in 90—95%igem Alkohol, jedoch nicht in absolutem, welcher nach längerer Zeit auch nachtheilig wird. Sind die Objecte dagegen schon in Celloidin eingebettet, so können sie in 80%igem Alkohol Jahre lang vollkommen unverändert verbleiben.

Die Färbung geschieht in toto, und zwar, wenn kein Theil des Objectes von irgend einer freien Oberfläche weiter als höchstens 2—3 mm entfernt ist, am besten mit Hämatoxylin und Chromsalz nach der Methode, welche vor einigen Jahren Heidenhain[1] zuerst beschrieben hat, welche ich aber bereits ein Jahr vor seiner Mittheilung ausübte, allerdings in einer etwas verschiedenen Weise. Diese behalte ich auch heut zu Tage bei; denn ich fand Heidenhain's Angaben, hauptsächlich was die Dauer der Einwirkung seiner Reagentien betrifft, in den meisten Fällen nicht zweckmäßig. Ein 8—10stündiges Verweilen der zu färbenden Stücke in Hämatoxylin macht sie zu dunkel und höchstens noch für äußerst dünne Schnitte brauchbar, und wenn sie 8—10 Stunden im doppelt- oder einfach chromsauren Kali liegen, so werden sie zu brüchig und ebenfalls undurchsichtig. Eine einstündige Einwirkung von $^1/_2$%igem Hämatoxylin, von welchem man möglichst viel nimmt, ist das Maximum; für kleinere Objecte genügen 10 Minuten. Das Kaliumsalz ($^1/_2$—1%) soll auch nie länger als eine Stunde einwirken, aber in reichlicher Menge benutzt und so lange erneuert werden, bis sich um das Object keine braune Wolke mehr bildet. Dann muss letzteres erst in Wasser und nachher in 70%igem Alkohol (dieser wird mehrmals erneuert) ausgewaschen und in Alkohol absolutus zurückgebracht werden, um darin vor der Einbettung nunmehr höchstens 12 Stunden zu verweilen. So erzielt man eine rein stahlgraue Färbung, welche durchsichtig genug ist, um die feinsten Einzelheiten des histologischen Bildes, die kleinsten Fasern, die weichsten Plasmacontouren etc. wie auf einer Zeichnung sogar an 20 μ dicken Schnitten hervortreten zu lassen.

---

[1] Arch. Mikr. Anat. 24. Bd. 1884. p. 468—470 und ebenda 27. Bd. 1886. p. 383.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Die Celloidinstücke mit dem Objekt, dessen Achsenrichtung in gutem Celloidin immer zu erkennen ist, werden zurecht geschnitten und in bekannter Weise auf Korke geklebt; man achte nur darauf, dass die Schnittfläche wo möglich keine unregelmäßige oder spitzwinkelige Form besitze; denn solche Schnitte breiten sich, hauptsächlich beim Einreißen der Ecken, auf dem Öle gelegentlich viel schwerer als rechtwinkelige aus. Das Messer wird der Schlittenbahn möglichst parallel gestellt und nach jedem 5.—10. Schnitte mit 95%igem Alkohol benetzt, welcher für Bergamottöl genügend entwässert und Celloidin noch nicht löst. Die Schnitte hebt man von dem Messer mit einem spitzigen Pinsel ab und bringt sie auf die Oberfläche von Bergamottöl (in einer flachen Glasdose über weißem Grunde), ohne auf ihr Zusammengerolltsein zu achten; denn ist das Öl gut, so schwimmt das Object darauf langsam herum, breitet sich dabei sofort vollkommen aus und hellt sich auch, ohne weißliche Trübungen zu bekommen, in einer Secunde gänzlich auf; erst nach einigen Minuten sinkt es langsam zu Boden.

Von allen zur Celloidintechnik empfohlenen Ölen ist Bergamottöl allein in jeder Hinsicht zweckmäßig; allenfalls kann man sich mit Origanumöl helfen, aber seine Einwirkung ist zu heftig, auch oxydirt es zu sehr und lässt die Färbung nicht selten (Anilinfärbungen immer) erbleichen. Das gute Bergamottöl ist rein grasgrün oder hat höchstens einen schwachen gelblichen Ton (gelbes Öl ist immer schlecht), riecht absolut nicht nach Terpentin, mengt sich mit 90%igem Alkohol noch ohne jegliche Trübung oder Ausscheidung von Wassertropfen an der Oberfläche; die kleine Wolke, welche an letzterer beim Daraufhauchen entsteht, muss in einer Minute spurlos verschwunden sein; Anilinfarben dürfen darin in 48 Stunden noch keine merkliche Bleichung erleiden, Celloidin darf absolut nicht ererweichen; im Gegentheil, das durch starken Alkohol eventuell erweichte Celloidin der Schnitte muss in Bergamottöl eine größere Zähigkeit erlangen.

Man schneide vorher Pauspapier in Streifen, etwa so breit, wie der Objectträger, und wenigstens dreimal so lang wie das Deckglas. Die Form des letzteren wird auf das eine Ende des zurecht geschnittenen Streifens gezeichnet. Das Papier selbst muss vollkommen glatt, gut geölt und durchsichtig sein und mit einer gewissen Steife auch Biegsamkeit vereinigen. Der Streifen wird nämlich mit seinem freien Drittel möglichst horizontal in das Öl hinein gehalten, und zwar von dem Mittel- und Ringfinger von unten gestützt, von dem Daumen

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

und Zeigefinger von oben fixirt, wodurch ihm der Länge nach gleichzeitig auch eine kleine, nach oben gerichtete Concavität verliehen werden soll. So kann die frei hervorragende Papierfläche, auf welcher die Schnitte geordnet werden sollen, eine kleine Last, ohne sich umzubiegen, leicht tragen. Während nun die linke Hand den Papierstreifen über dem Spiegel des Öles hält, zieht die Rechte mit dem kleinen Finger den Schlitten des Mikrotoms und stellt auch die Mikrotomschraube immer weiter ein. Zwischen Ring- und Mittelfinger derselben Hand hält man, ihn mit dem Daumenballen stützend, einen feinen, elastischen Pinsel; zwischen Mittel-, Zeigefinger und Daumen eine Präparirnadel, welche sehr spitz, aber unbiegsam sein soll. Mit dem Pinsel wird der Schnitt vom Messer, wo er in dem reichlich vorhandenen 95%igen Alkohol liegt und schon während des Schneidens genügend entwässert wurde, abgehoben und auf das Öl gebracht. Hier verfolgt man mit dem Papierstreifen darunter seine Bewegung, bringt ihn in der Nähe der Stelle, wo er zu liegen kommen soll, mit Hilfe des Papieres zum Stillstand und zieht ihn mit der Nadel an einer Ecke des Celloidins aus dem Öl auf das Papier. Das Öl fließt ab und der Schnitt bleibt auf dem Papier liegen. So ordnet man die einzelnen Schnitte sogleich in Querreihen, welche immer 2—3 mm über dem Öl gehalten werden, um ein Wegschwimmen zu vermeiden. Das übrige Papier bleibt im Öl und wird nur in dem Maße, als es sich mit den Schnitten bedeckt, allmählich ganz aus dem Öl gehoben. — Ist so die erwünschte Zahl von Schnitten auf dem Papier in Ordnung gebracht, dann lässt man das Öl von dem langsam schiefer gerichteten Papier abfließen und streift noch die untere Fläche über Löschpapier ab, so dass die obere Fläche (welche die Schnitte trägt) von Öl eben noch benetzt bleibt. Nun wird das Papier herumgedreht, so dass die Schnitte nach unten schauen. In dieser Haltung wird der Streifen auf den vorher sorgfältig (am besten über einer Spiritusflamme) abgetrockneten Objectträger von seinem freien Rande an, welcher hier, mittelst einer Nadel festgehalten werden kann, allmählich niedergelassen. Dann wird er mit einer Präparirnadel angeglättet und mit Löschpapierstreifen unter schwachem Druck abgetrocknet. Nun muss das Pauspapier, durch welches man die ganze Serie deutlich sieht, behutsam abgelöst oder mittelst einer drehrunden Sonde abgerollt werden. Lagen die Schnitte dem Papier glatt an und waren sie in der richtigen Weise mit Öl eben nur noch benetzt, dann werden alle, ohne

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

aus ihrer Lage zu gerathen, auf dem Objectträger, wie ein Abziehbild, zurückbleiben. Sind aber in Folge unvorsichtigen Verfahrens einige Schnitte am Papier haften geblieben, so bringt man das Papier, nachdem man die daran noch befindlichen Schnitte mit Öl minimal befeuchtet hat, genau in seine frühere Lage auf dem Objectträger zurück, drückt es nochmals ein wenig an und löst es dann wieder ab; oder sind jene Schnitte schon ganz trocken geworden, so fasst man sie einzeln mit der Pincette, wie Paraffinschnitte, hebt sie vom Papier ab und bringt sie in die Lücken der Serie.

Sobald die Schnitte alle in Ordnung auf dem Objectträger sind, legt man einen feinen Löschpapierstreifen mit satinirter, ja nicht rauher Oberfläche, darauf und streift einige Mal mit dem Finger leise darüber hinweg, um das Öl gänzlich zu entfernen. Jetzt kann man den Tropfen Canadabalsam dazu geben und das Deckgläschen auflegen, ohne jegliche Gefahr, dass sich die Schnitte aus ihrer Lage fortbewegen werden. Völlige Entfernung des Öles leistet die Garantie dafür, dass auch die heikelsten Färbungen (Hämatoxylin oder Anilin) nie erblassen. Man darf aber auch die Schnitte nicht nahe dem Rande des Deckgläschens legen; denn jede Entfärbung beginnt am Rande und schreitet von da nach innen fort.

In der beschriebenen Weise ist es mir gelungen, 100 und noch mehr Schnitte unter Einem Deckgläschen in vollständiger Serie zu beherbergen, und zwar in nicht längerer Zeit, als die Paraffinmethode beansprucht. Hat man aber z. B. einen langen, dünnen Wurm in Querschnitte zu zerlegen, so kann man das Verfahren eben so wie in Paraffin noch beschleunigen. Es ist nämlich mit einem guten Messer leicht, 7—10 μ dicke, ja sogar manchmal noch dünnere Schnitte (bis 5 μ) in der Größe eines Quadratcentimeters zu verfertigen. Man bettet also zuerst den ganzen, sorgsam gestreckten Wurm in Celloidin ein, zerlegt ihn dann in mehrere kürzere Stücke und bettet diese in ihrer natürlichen Reihenfolge neben einander nochmals ein. So kann man mit Einem Zuge des Mikrotommessers 10—20 Querschnitte gewinnen und unter Berücksichtigung ihrer Reihenfolge auch ohne Schwierigkeiten studiren. Dasselbe Verfahren gilt natürlich für sehr kleine Objecte, z. B. Eier oder Embryonen, wo man die Achse so wie so nicht gerade stellen kann.

Da das Celloidin gleich dem Paraffin durch chitinige Hüllen, Cuticula, Cocons etc. nur schwer in die Tiefe dringt, so ist es, um auch hier darauf aufmerksam zu machen, angezeigt: 1) Anfangs

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

ziemlich dünne, leichtflüssige Lösungen zu benutzen und allmählich zur Concentration, welche die Einbettungsmasse selbst haben soll, überzugehen, wobei man, wenn es ohne Nachtheil für das Object geschehen kann, die Flüssigkeit oft umrührt; 2) zweimal einzubetten, und zwar das erste Mal nur um das Object schonender in Stücke schneiden oder etwa einen Cocon öffnen oder Eier etc. mit dem Mikrotom anschneiden zu können.

Neapel, im November 1887.

Druck von Breitkopf & Härtel in Leipzig.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel

Jahr/Year: 1886/87

Band/Volume: 7

Autor(en)/Author(s): Apathy István

Artikel/Article: Methode zur Verfertigung längerer Schnittserien mit Celloidin. 742-748