

Mit 1 Abbildung

Von DR. P. WILFLINGSEDER

(Chirurgische Klinik [Prof. B. Breitner] und Histologisch-Embryologisches Institut der Universität Innsbruck [Prof. G. Sausser])

Auf der Suche nach „festen Beziehungen“ zwischen Morphologie und Funktion und Wachstum, die mehr Licht in das biologische Geschehen bringen könnten (BREITNER), haben seit der Jahrhundertwende Maß und Zahl einen hervorragenden Platz gewonnen.

Weitumspannende Folgerungen haben sich aus den Gesetzmäßigkeiten, denen die Zellkerngröße unterworfen ist, ergeben (SAUSER-Bioquantentheorie), und es bleibt kaum mehr ein Gebiet der biologischen Forschung, welches durch die quantitativ-zytologische Arbeit nicht befruchtet worden ist.

Als Martin HEIDENHAIN mit seiner Protomerentheorie der synthetischen Morphologie das Tor geöffnet hatte, waren es gleich eine Reihe von Forschern, die dem genialen, deduktiv gezielten Wurf durch Messen den soliden Boden mathematischer Relationen erarbeiten konnten (BOVERY, HERTWIG, HEIBERG).

Die landläufige Mikrometrie beschränkte sich auf die Feststellung von Mittelwerten aus etwa 20—30 gemessenen Kerndurchmessern. Sie diente lediglich der ziemlich wertlosen Angabe von sehr schwankenden Durchschnittswerten der Zellkerngröße verschiedener Organe, wie wir sie heute noch in den Lehrbüchern finden. Die Karyometrik ist ein verhältnismäßig junger Forschungszweig. Sie beginnt mit der Entdeckung des Gesetzes vom rhythmischen Wachstum der Zellkerne in ganzzahligen Proportionen eines Grundquantums durch einen Schüler HEIDENHAINs, den Tübinger Anatomen JAKOBJ im Jahre 1925. JAKOBJ gelangte zu seinen Ergebnissen durch die Einführung einer subtilen Meßtechnik und seiner variationsstatistischen Untersuchungsmethode.

Besonders von anatomischer Seite sind in den letzten 20 Jahren sämtliche Organe des Menschen und die verschiedensten Organe von Tieren und Pflanzen karyometrisch untersucht worden. Die Gültigkeit des JAKOBJschen Gesetzes hat sich ausnahmslos bestätigt.

Die karyometrische Kontrolle der gesunden und erkrankten Zellen bei verschiedener Funktion und bei Geschwulstwachstum führten zur Entdeckung weiterer interessanter mathematischer Gesetzmäßigkeiten im Zelleben.

Entsprechend der Fragestellung besonders auf histophysiologischem, histogenetischem und histopathologischem Gebiet wurden nicht nur praktische Resultate gefördert, sondern auch die Methode der Kernmessung sowie das Darstellungsverfahren weiterentwickelt. Die scharfe Kritik innerhalb zweier Jahrzehnte hat vereinzelte Irrtümer aufgedeckt, Fehler beseitigt und Einwände widerlegt, so daß wir heute in der Karyometrik ein Untersuchungsverfahren besitzen, das vielen praktischen Anforderungen der biologischen Forschung voll genügen kann.

Die Methodik im wesentlichen zu beschreiben, sei die Aufgabe der folgenden Ausführungen.

Eine Voraussetzung für allgemein vergleichbare Resultate der Kernmessung ist die vollkommen gleichmäßige Handhabung der Materialentnahme und der präparatorischen Technik. Es kann daher im Hinblick auf die Gleichartigkeit des Ausgangsmaterials nur lebenswarm fixiertes Material verwendet werden. Zur Konservierung eignet sich wegen der gleichmäßigen Durchdringung des Gewebes am besten die Heidenhainsche Susalösung mit nachfolgender Paraffineinbettung. Die relative Veränderung der Zellkerngrößen bei Verwendung verschiedener Fixierung und Einbettungsmethoden sind verschiedentlich untersucht worden (HERTWIG, DEUTIKE). Der Volumsabfall der Kerne beträgt je nach Material, Fixierflüssigkeit und Einbettung 30 bis 55%, was zu berücksichtigen wäre, wenn man sich die wahre Größe der lebenden Zellkerne vor Augen halten wollte. Die Ergebnisse der verschiedenen Autoren divergieren aber in bezug auf den Volumsabfall bei verschiedener präparatorischer Technik so weit, daß uns die Verwendung von Umrechnungskoeffizienten nicht zulässig erscheint und Vergleiche von Meßresultaten verschiedener Autoren nur dann angestellt werden dürfen, wenn die Gleichheit der Methode garantiert ist.¹⁾

Die günstigste Schnittdecke beträgt im allgemeinen 8 Mikra, wie die Erfahrung und die Berechnung mit großem mathematischem Apparat (BAUER) bestätigt haben.

Die Färbung verändert die Kerngrößen nicht mehr; sie kann daher je nach Material variieren. Besonders gute Konturen geben Eisenhämatoxylin, Delafield, Chromotrop und Azan. Die Anforderung an die Qualität der Präparate ist außerordentlich hoch zu stellen.

Nach dem histologischen Befund werden die gewünschten Ausschnitte mit Hilfe eines Projektionszeichenapparates („Me F“ der Firma Reichert) etwa auf das 2000fache vergrößert und alle im Zentrum des Projektionsfeldes scharf abgebildeten Zellkerne gezeichnet. Mit Hilfe des Feintriebes gelingt es bei einiger Übung schnell, die Konturen jener Zellkerne herauszufinden, deren Zentrum im Schnitt liegt. Diese größten Kugelschnitte sind an der scharfen Kontur leicht zu erkennen. Liegt die Kernmittelzone, deren Dicke PFUHL mit ein Mikron berechnet, nicht im Schnitt, dann wird die Kernmembran auch nicht tangential getroffen und damit unscharf erscheinen. Die viel diskutierte Gefahr, Kernkalotten mitzumessen, besteht bei entsprechender Aufmerksamkeit also nicht. In den korrekt nachgezeichneten, annähernd kreisförmigen Kernkonturen werden der kleinste und der größte Durchmesser bestimmt. Beträgt die Differenz beider höchstens 10% des

¹⁾ Die Messungen mit dem Mikrometerschraubenokular erreichen im allgemeinen nicht die Genauigkeit der Zeichen-Projektionsmethode. Die Arbeit mit dem Mikrometerschraubenokular ist allerdings bedeutend einfacher und zeitsparend. Für besondere Fragestellungen, wie Erytropoese (LEIBETSEDER), sind ebenso brauchbare Resultate erzielt worden.

größeren, so ist die Anwendung der Kugelformel¹⁾ zur Berechnung des Kernvolumens gestattet. Der wirkliche Radius ergibt sich als halbes arithmetisches Mittel obiger Durchmesser, geteilt durch die Vergrößerung. Die Volumsbestimmung länglicherer Kerne (z. B. Follikelepithelzellen) erfolgt nach der Formel für Rotationsellipsoide²⁾ oder durch entsprechende Annäherung an andere, zusammengesetzte Rotationskörper (z. B. glatte Muskelzellen = Zylinder mit 2 endständig aufgesetzten Halbkugeln). Mit der Abweichung von der Rotationsform ist der Meßkunst allerdings ein Ende gesetzt.

Die Meßgenauigkeit darf dem Auflösungsvermögen des Mikroskopes nicht nachstehen. Bei einer 200fachen Vergrößerung ist die Ablesung auf der Zeichnung mit 0,5 mm hinreichend genau, da 0,5 mm Zeichenabstand 0,25 Mikra im Präparat entsprechen und sich der mögliche Fehler bei der Reduktion des Durchmessers auf den Halbmesser auf 0,125 Mikra reduziert, einen Wert, der tatsächlich ja schon unter der theoretischen Auflösungsgrenze liegt. Beim Reichertschen „Me F“, das sich bei unserer eigenen karyometrischen Arbeit sehr bewährt hat, liegt mit der numerischen Apertur 1,30 die Grenze des Auflösungsvermögens bei 0,21 Mikra.

Die Fehler, welche beim Abzeichnen bzw. durch die Strichdicke entstehen, gleichen sich bei einer genügend großen Zahl von Messungen durch ihre Plus- und Minuswerte aus. Unregelmäßig gestaltete Kernbilder werden von der Messung ausgeschieden. Bei kugeligen Kernen z. B. darf eine Durchmesserdiffereenz nicht über dem als Grenze des Auflösungsvermögens berechneten Streifenabstand liegen.

Ausgehend von dieser Forderung, ergibt sich für die häufigsten Zellkerngrößen des Menschen (50—250 Kubikmikra) bei Anwendung der Kugelformel die oben angeführte maximal zulässige Durchmesserdiffereenz von 10%.

Die eingangs erwähnten mathematischen Gesetzmäßigkeiten, die dem biologischen Geschehen innewohnen, werden aber erst offenkundig, wenn die bunte Fülle der angefallenen Kernvolumina variationsstatistisch ausgewertet wird. Das Problem der materialgerechten Statistik der Kerngrößen hat vor kurzem der Berner Anatom E. HINTZSCHE einer befriedigenden Lösung zugeführt. Seit JACOBJs Entdeckung hatte man sich zunächst damit begnügt, die Häufigkeiten anfangs nach den Kerndurchmessern und später nach den Volumswerten in Säulen zu ordnen. Die Größe der einzelnen Klassen hing dabei von der jeweils beobachteten Meßgenauigkeit ab, die damit im Durchmesser z. B. bei der Zeichenmethode im allgemeinen um 0,5—0,25 μ differierten. Die von JACOBJ beschriebenen Häufigkeitsmaxima waren dabei zwar immer zu erkennen; da sich diese aber auf Volumsklassen aufbauten, die durch die Millimeterablesung bedingt sind, fielen sie nicht immer mit den von HINTZSCHE geforderten „materialgerecht“ ermittelten Maxima zusammen. Bei der graphischen Darstellung erhielten die Kurven auffällig oft bizarre Formen, wurden mit steigendem Volumen in die Länge

¹⁾ $v = \frac{4}{3} r^3 \pi$. ²⁾ $v = \frac{4}{3} ab^2 \pi$, worin a die große, b die kleine Halbachse bedeuten.

Beispiel: 200 Kerne aus einer Struma nod. par. tubul. mikro-

Kernvolumen Kubikmikra	61	66	71	Zur Berechnung der Regelklasse eine Variation, zwischen zwei Nullfrequenzen herausgegriffen											
				76	82	87	93	100	106	113	121	128	136	143	152
Anzahl der Kerne (Frequenz)	0	2	0	0	1	10	6	18	11	23	15	38	11	8	5
	2		0		17		52		64		22				
Jakobische Symbole und Unter- klassenkoeffizienten	0,5		0,59		$0,71\left(\frac{\sqrt{2}}{2}\right)$		0,84		K 1		1,19				

Aus der Variation mit dem größten Maximum, in diesem Fall aus ($v_{76} - v_{180}$) wird die Regelklasse als geometrisches Mittel berechnet.

$$K_1 \text{ ist also gleich } \sqrt[157]{\frac{\text{Anzahl der gemessenen Kerne}}{\text{Produkt der Volumina der gemessenen Kerne}}} = \sqrt[157]{82 \cdot 87^{10} \cdot 93^6 \cdot \text{usw.} \dots \cdot 171^5}$$

$$\log K_1 = \frac{\log 82 + 10 \log 87 + 6 \log 93 \text{ usw.} + 2 \log 171}{157}$$

$$\text{Regelklasse } K_1 = 126,5 \text{ Kubikmikra}$$

gezogen und abgeflacht. Selbst bei normalem Gewebe zeigten die Kurven keine Ähnlichkeit mit jener, die als „Gaußsche Kurve“ (variationsstatistisch als „Kurve der Normalverteilung“ bekannt) zu erwarten gewesen wäre. Trägt man nämlich auf der Abszissenachse, wie oben erwähnt, die Kernvolumina auf, so erheben sich die Häufigkeits(Frequenz)maxima über Abszissenwerten, die eine geometrische Reihe mit dem Faktor 2 bilden: Die Maxima rücken also mit wachsenden Volumswerten (nach rechts) immer weiter auseinander, während sie sich mit sinkenden Volumswerten immer mehr zusammendrängen. Da man aber eben aus der Lage der Häufigkeitsmaxima das bedeutsame Gesetz abgeleitet hatte, demzufolge das Volumswachstum der Kerne in Verdoppelungsschritten erfolge und man dabei jeden dieser Schritte als biologisch gleichwertig betrachten müsse, forderte HINTZSCHE, daß auf der Abszissenachse anstatt der Volumswerte deren Logarithmen aufgetragen werden müßten (siehe Abb. 1). Durch diese Maßnahme wird nämlich erreicht, daß die Frequenzmaxima, die „Kernklassen“, äquidistant werden, da die Logarithmen einer geometrischen Reihe (hier: $1/2 \quad 1 \quad 2 \quad 4 \quad 8$) eine arithmetische Reihe bilden.

Mit der Einführung des Logarithmus ergab sich auch die Möglichkeit, die Regelkerngröße, als das geometrische Mittel aus den gesamten Volumswerten, wie HINTZSCHE angab, verhältnismäßig einfach, nämlich arithmetisch zu berechnen (siehe Tab. 1).

fol. (60 a ♀, Operationsmaterial lebenswarm in Susa fixiert)

die Spanne															
162	171	180	191	200	210	221	233	245	256	268	283	295	308	322	338
9	2	0	0	3	4	2	1	11	15	13	2	0	0	0	0
2				9			40				2				0
1,41 ($\sqrt{2}$)				1,68			K 2				2,38				2,82 ($2\sqrt{2}$)

Die Klasseneinteilung erhält man wie in Tabelle 2 ersichtlich ist. Die tatsächlich gefundenen Volumsklassen werden innerhalb der berechneten Klassengrenzen (Tabelle 2, Kolonne 5) zusammengefaßt. Damit kann der Kernindex abgelesen werden: K 1 32 % : K 2 15 %. Zur graphischen Darstellung werden auf der Abszisse die Koeffizienten (= Klassenvolumen) mit ihrem log-Wert (Tabelle 1) aufgetragen, auf der Ordinate der Anteil in Prozenten (Abb. 1). Die Aufstellung der „Normalkurve“ erfordert zusätzlich einige statistische Rechenarbeit wie in Tabelle 3 gezeigt wird.

HINTZSCHE bestimmte die Größenverteilung der Osteoklastenkerne und der Epithelzellkerne von menschlichen Eierstockfollikeln und konstruierte dazu die Normalkurven, das sind Kurven Gaußscher Verteilung, mit gleicher Streuungsbreite (siehe Tab. 3). Er fand eine Übereinstimmung der beiden Kurven in jenen Fällen, wo sich das Gewebe in einem „ausge-

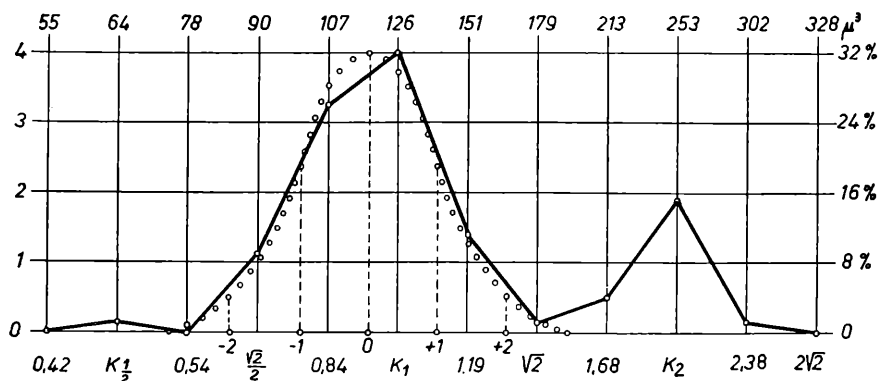


Abb. 1.

Bestimmung der Klassengrenzen, der Klassenmitten (Kolonne 5) und der Klassenkoeffizienten für die im untersuchten Fall ermittelte Regelklasse 126,5 Kubikmikra. Alle notwendigen Werte für die Kernklassen unterhalb und überhalb $K_1 - K_2$ werden in einfacher Weise fortlaufend durch Halbierung bzw. Verdoppelung der Zahlen in Kolonne 1 und 5 gewonnen.

1	2	3	4	5
Jacobische Symbole und Unterklassenkoeffizienten	Log. der Klassenkoeffizienten	Log. Volumen der Regelklasse $K_1 = 126,5$ Kubikmikra	Log. des Volumens von $K_1 - K_2$	Volumen der Klassen von $K_1 - K_2$ Kubikmikra
K 1	0,00000	2,10321	2,10321	126,5
1,09	0,03763		2,13994	138
K 1,19	0,07526		2,17757	151
1,30	0,11289		2,21420	164
K 1,41	0,15052		2,25238	179
1,54	0,18815		2,29046	195
K 1,68	0,22578		2,32809	213
1,83	0,26341		2,36572	232
K 2	0,30103		2,40334	253

glichenen“ Zustand befand, also keine besondere funktionelle oder Wachstumsfähigkeit des Organes vorlag¹⁾.

HINTZSCHE sieht damit die Möglichkeit gegeben, jede Abweichung der Kerngrößenverteilung eines Gewebes von der normalen Variationsregel zu messen und so einen objektiven, mathematischen Ausdruck für veränderte oder auch krankhafte Funktion oder für Wachstumsanomalien zu gewinnen. Der theoretische und praktische Wert eines solchen Messens liegt auf der Hand. So konnten z. B. der Einfluß von Medikamenten und Giften (CLARA, KRAEMER) und die Wirkung kanzerogener Substanzen karyometrisch kontrolliert werden, und neuere Untersuchungen stehen zur Diskussion, wie weit die Karyometrik praktisch diagnostischen Wert in der Klinik jener Geschwülste besitzt, bei denen die bisher bekannten morphologischen Kriterien oft nicht genügen (DE QUERVAIN, SMITH, WILFLINGSIEDER). SMITH verglich die Größen der Kernkörperchen bei gut- und bösartigen Schilddrüseneschwülsten und fand, daß sie sich wie 1 : 2,6 verhalten. Wir haben die Größenverteilung der Zellkerne des Schilddrüsenepithels und verschiedener gut- und bösartiger Kröpfe untersucht und dasselbe Verhältnis ($1 : 2\sqrt{2} = 1 : 2,8$) nachgewiesen. Dieser Blastomkoeffizient $\sqrt{2}$ liegt genau zwischen 2 Gipfeln der „logonormalen“ Kurve gut-

¹⁾ Anmerkung bei der Korrektur: Am Schweizer Anatomenkongreß 1948 wurde von HINTZSCHE ein besonders anschauliches Darstellungsverfahren für das Kernverteilungsgesetz beim Zyklus der Uterusschleimhaut demonstriert.

Berechnung der „Normalkurve“ zum Beispiel von Tabelle 1
(Formeln nach A. SCHWARZ)

f (Frequenz laut Tabelle 1, aber prozentuell angeschrieben)	x	x f	x ² f	y der Normal- kurve	y ₁ der tatsächlichen Verteilung zu dieser Normalkurve auf x - μ ₁ = x + 0,382
8,5	- 2	- 17	36	0,54	1,125 (K 0,71)
26	1	- 26	26	2,42	3,250 (K 0,84)
32	0	0	0	3,99	4,000 (K 1)
11	+ 1	+ 11	11	2,42	1,375 (K 1,19)
1	+ 2	+ 2	4	0,54	0,125 (K 1,41)
Σ (Summe) 78,5		- 30	77	9,92	
$\log y = \log 3,99 - \frac{x^2}{\sigma^2} \quad \log e = 0,6010 - 0,2171 x^2$ (der Normalkurve) $\sigma^2 (= \text{mittlere quadratische Abweichung}) = \frac{\Sigma \text{ der } x^2 f}{\Sigma \text{ der } f} = \frac{77}{78,5} \doteq 1$ $y_1 = \frac{\Sigma y \text{ der Normalkurve}}{\Sigma f} f = \frac{9,92}{78,5} f \doteq \frac{1}{8} \cdot f$ (der tatsächlichen Verteilung) Die Abweichung der O-Ordinate der Normalkurve von der Kurve der tatsächlichen Verteilung ergibt sich aus der Formel $\mu_1 = \frac{x \cdot f}{\Sigma f} = -0,382.$ Diese O-Ordinate fußt somit auf dem Wert der „idealen“ Regelklasse.					

artiger Kröpfe. Diese Kerngruppe ist auch HINTZSCHE deshalb wiederholt aufgefallen. In unseren Untersuchungen erwies sich diese „Mittelklasse“ als Häufigkeitsmaximum der parafollikulären Zellen und ebenso als Kernklasse der Zellen maligner Schilddrüsenadenome. Zur Beleuchtung karyometrischer Möglichkeiten in der Erforschung histogenetischer Probleme sei erwähnt, daß diese Geschwulstzellenklasse mit dem Faktor $\sqrt{2}$ quantitativ auch identisch ist mit der von FLORENTIN schon 1930 gemessenen Kernklasse des parafollikulären Epithels der Schilddrüse, den interfollikulären Zellen NONIDEZ' und den „Hellen Zellen“ GODWINS und FEYRTERS¹⁾.

¹⁾ Anmerkung bei der Korrektur: LEIBETSEDER brachte kürzlich karyometrisch den Nachweis, daß die Erythropoese in fünf Sukzedanteilen vor sich geht, die formale Genese der Megaloplasten bei perniziöser Anämie in acht Halbierungsteilungen. Wr. Z. inn. Med. 29 (1948): 397, und Forsch. Tir. Ärzteschule 1948, Innsbruck; im Druck.

Zur Handhabung der Meßresultate hat sich uns die Verwendung einer Formel, ähnlich jener, wie sie schon CLARA 1928 vorgeschlagen hat, gut bewährt. Die Jacobyschen Symbole $K^{1/2}$, K_1 , K_2 , K_4 usw. für die Hauptkernklassen haben wir auf Unterklassen ausgedehnt. Bei der Wahl von 3 Zwischenklassen lauten die Koeffizienten 0,50 0,59 0,71 0,84 1,00

1,19 1,41 1,68 2,00 usw. Wird zu diesen Koeffizienten die Prozentzahl der in der jeweiligen Gipfelklasse gefundenen Kerne angefügt, dann haben wir einen einfachen Index (siehe Tab. 1), der für viele praktische Fragestellungen schon einen sehr guten Überblick gibt und eine karyometrische Diagnose erlaubt. Für besondere Fragestellungen ist nach HINTZSCHE die Konstruktion der Normalkurve zweckmäßig (Tab. 3). Es müßten dann zum obigen Index noch Charaktere, wie Wölbungskoeffizient, mittlere quadratische Abweichung, Maß der Asymmetrie oder andere kommen. Der weniger Geübte wird dem so komplizierten Index dann aber die vergleichende graphische Darstellung der Kurven vorziehen (Abb. 1).

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die moderne Karyometrik wurde kurz umrissen, die Meßtechnik und das Darstellungsverfahren praktisch erläutert und unter Anführung neuerer Einzelergebnisse auf die Bedeutung dieser Untersuchungsmethode in der Biologie hingewiesen.

Literatur

- Bauer H., Zellforsch. **23** (1936a): 280.
 Breitner B., Schilddrüsenchirurgie. Wr. klin. Wsch. **13/14** (1944): 157.
 Clara M., Z. mikrosk. anatom. Forsch. **22** (1929): 145.
 Florentin P. und Grujic M., Recherches caryometrique sur la glande thyroide du cobage. Comptes rendu de la Soc. Biol. **105** (1930), 3: 938.
 Jacoby W., Arch. Entwicklungsmechanik **41** (1941): 584 (Literatur!).
 Hintzsche E., Statist. Problemeder Kerngrößenforsch. Experientia **1/4** (1945).
 — Biologische Statistik durch materialgerechte Klasseneinteilung. Vortrag in Schweiz. Ges. Statistik und Volkswirtschaft, 1946.
 — Über Normalkurven der Kerngrößenverteilung. Mitt. naturforsch. Ges., Bern, **4** (1946): 20.
 Kraemer D. Z., Epidermal nuclear size in methylcholanthrene induced carcinogenesis. Anat. Rev. **94** (1946): 289.
 Pfuhl W., Untersuchungen über zweikernige Zellen Z. mikroskop. anatom. Forsch. **22** (1930): 557.
 De Quervain M., Die Struma maligna. Enke, Stuttgart, 1941.
 Sauser G., Z. Zellforsch. **23** (1935): 577.
 — Über Bioquanten. Tyrolia, Innsbruck, 1946.
 Schwarz A., Über Umgang mit Zahlen. Oldenburg, Berlin, 1943.
 Smith, zitiert nach De Quervain und pers. Mitt. Dr B. Dobyns, Boston.
 Wilflingseder P., Über Zellkerngrößen der gesunden und kropfkranken Schilddrüse. Schweiz. med. Wschr. **77** (1947).
 — Über die Bedeutung der Zellkerngrößen beim Kropf und im besonderen beim Adenom. Aus Forsch. Tiroler Ärzteschule 1945 bis 1947: 343.
 — Funktion und Geschwulstwachstum im Bild der Zellkerngrößen. Der Krebsarzt **2** (1947): 249.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1948

Band/Volume: [3](#)

Autor(en)/Author(s): Wilflingseder P.

Artikel/Article: [Karyometrik. 243-250](#)