

(Aus dem Institut für Histologie und Embryologie der Universität Wien.
Vorstand: Prof. Dr. Viktor Patzelt)

Über die Verwendungsmöglichkeit des Elektronenmikroskops in der zyto- und histologischen Forschung

Von ALFRED PISCHINGER, Graz

Die Frage, welche neuen Möglichkeiten sich mit der Entwicklung und dem Bau des Übermikroskops auch in der zyto- und histologischen Forschung eröffnen, ist früh aufgeworfen und vom technischen Standpunkt aus schon abgehandelt worden. Es steht außer Zweifel, daß sich die hohe Steigerung des Auflösungsvermögens bei der Erfassung des Baues biologischer Strukturen auswirken muß. Leider aber ist die Anwendung des Elektronenmikroskops gegenüber einem gewöhnlichen Licht- auch Ultraviolettlichtmikroskop aus später zu behandelnden Gründen stark eingeschränkt. Deshalb hatten Zyto- und Histologie bisher nur wenig Forschungsergebnisse aufzuweisen, die den schon vorliegenden bakteriologischen, chemischen, technischen und physikalischen auch nur annähernd gleichwertig wären. Der Grund dafür liegt darin, daß Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop bestimmte Vorbereitungen des Objektes verlangen, denen sich bei biologischen Objekten größeren Ausmaßes bisher erhebliche Schwierigkeiten entgegenstellten. Sie ergeben sich aus der Eigenart des Elektronenstrahles: der für eine Bilderzeugung nötige gerade Verlauf ist nur im Hochvakuum gegeben. Außerdem ist das Elektronenlicht heiß und hat schließlich eine geringe Durchdringungskraft. Diese Umstände verlangen, abgesehen von einer besonderen Justierung, auch eine ungewöhnliche Dünne der Objekte. Es gingen bisher alle Bestrebungen, histo- und zytologisches Material zu untersuchen, davon aus, genügend dünne Schnitte zu erzielen oder durch andere Kunstgriffe, wie Abklatsch, Ausbreitung oder feinste Zerkleinerung der Objekte, die nötigen Voraussetzungen zu schaffen (A. BAUD, 1950).

Nach meiner Meinung ist aber damit die Hauptfrage noch gar nicht berührt. Sie liegt darin, daß man nie genau sagen kann, was in einem präparierten Gewebe wirklich lebenswahr ist und was durch die Technik hineingetragen wurde —, die gleiche Frage, die auch in der gewöhnlichen Lichtmikroskopie nicht vernachlässigt werden darf. Sie gilt bei der Übermikroskopie ganz besonders, weil die Auflösung um ein Vielfaches höher ist als im Lichtmikroskop. Dazu kommt noch, daß an Objekten oft bewußt Zerstörungen vorgenommen werden müssen, z. B. Hämolyse für Untersuchung von Erythrozytenbestandteilen, um Strukturen für die elektronenmikroskopische Abbildung aufzuschließen.

In den letzten Jahren meiner zytologischen Forschertätigkeit galt mein Bemühen nicht zum geringsten der Klärung solcher Fragen für den Auflösungsbereich der Mikroskopie im gewöhnlichen Lichte. Ich mußte mich überzeugen, daß es eigentlich nur wenig zytologische Beobachtungen gibt, die aus den eben umrissenen Gründen als gesichert gelten können. Dazu nur folgende Beispiele: es ist heute noch unentschieden, ob der Bürstenbesatz bzw. Kutikularsaum des Darmepithels und der Niere aus Stäbchen oder Röhrcchen aufgebaut ist. Bei einer schonenden Technik kann man meist weder die eine noch die andere Struktur sehen, so daß es noch nicht einmal sicher ist, ob nicht beide Zustände Kunstprodukte sind, das heißt, der Saum eigentlich nur im molekularen Bereich einen gerichteten Bau hat. Röhrcchen oder Stäbchen wären dann Artefakte, die zwar den Grundbau bis zu einem gewissen Grad widerspiegeln, aber als solche tatsächlich nicht bestehen. Ein anderes Beispiel ist die Myofibrille. Man kann bis heute noch nicht sicher sagen, ob der Zustand mit der komplizierten Querstreifung im Leben tatsächlich einer Erschlaffung entspricht. Ich erinnere daran, daß auch v. EBNER, damals der beste Kenner des Muskels, in seinen letzten Arbeiten die Frage offen läßt, ob die ruhende Fibrille gegliedert oder glatt sei. Mir will nach meinen seinerzeitigen Erfahrungen und den Experimenten BOERNERs scheinen, daß die Querstreifung mit dem Z-Streifen Ausdruck einer Überdehnung ist.

Die Beispiele ließen sich leicht noch vermehren. Um aber das, worum es geht, kurz zu kennzeichnen, möchte ich eine Beobachtung schildern, die ich bei meinen letzten, bisher nur vorläufig (1944) mitgeteilten, aber demnächst ausführlich erscheinenden Kernuntersuchungen machte. Damals habe ich mit tiefgeköhltem Messer Schnitte durch unfixiertes Gewebe gemacht, auf dem Objektträger aufgefangen und in eine gewöhnliche, nicht

neutralisierte Formollösung zur Fixierung senkrecht eingestellt. Ich bemerkte, daß aus dem Schnitt Stoffe fließen, die auf dem Glase unter dem Einfluß des Fixans erstarren und gleichsam wie eine „Fahne“ neben dem Schnitt haften bleiben. Es sind Stoffe, die sich mit Methylenblau intensiv färben. Die Erscheinung bleibt aus, wenn man neutralisiertes Formol nimmt. Es werden also bei der Fixierung aus den Organen manchmal Stoffe gelöst. Es sei daran erinnert, daß mit nur wenigen Ausnahmen fast alle Fixierungsmittel, nachdem in ihnen Organe behandelt worden waren, einen flockigen Bodenbesatz haben. Dieser besteht natürlich aus schwer und langsam fixierbaren Substanzen des Präparates, die austreten, bevor sie fixiert werden. Wenn nun schon eine nicht unbeträchtliche Menge von Stoffen allein bei der Fixierung entweicht, zu denen dann noch die durch Alkohol, Äther, Xylol usw. löslichen kommen, so kann doch gar nicht erwartet werden, daß die Strukturen von Zellen und Geweben unverändert bleiben. Zieht man noch in Betracht, daß alle unsere Fixantien Denaturierungen, Flockungen, Entmischungen an den Biokolloiden machen, so muß man sich in der Tat wundern, daß die Zytologie so lange, ja bei vielen Strukturen selbst heute noch den Ergebnissen unserer mikroskopischen Technik so großes Vertrauen schenken konnte. Solche Überlegungen müssen ganz besonders für die Elektronenmikroskopie gelten, nicht nur deshalb, weil sich die Fehlerquellen durch das Hochvakuum und die Hitze des Lichtes beträchtlich erhöhen können, vielmehr noch aus dem Grunde, weil noch gar nicht abzuschätzen ist, was die Präparation in Dimensionen, die das Übermikroskop auflöst, anrichtet. Vor allem wird das Ausmaß der „Zerstörungen“ nicht bei allen Elementen gleich sein. Man wird offenbar auch hier, analog wie bei lichtmikroskopischen Forschungen, bis zu einem gewissen Grad sozusagen zwischen submikroskopisch-anatomischen und eigentlichen molekular- oder kolloidfeinbaulichen Untersuchungen unterscheiden müssen. Ergebnisse über Zilien- und Geißelapparate, etwa bei Spermien, und ähnliche Beobachtungen mit organologischem Charakter dürften von vornherein mehr Vertrauen beanspruchen können als solche über den submikroskopischen Feinbau von Elementen zytoplasmatischer Natur oder des Zellkernes, die bekanntlich in ihrer Konstitution äußerst empfindlich sind. Aber auch da wird man noch differenzieren müssen. Wenn z. B. DRAPER und HODGE in Myofibrillen stäbchenförmige Elemente darstellen von einer Länge entsprechend jener, die H. H. WEBER auf röntgenographischem Wege für die Bausteine (Polypeptidketten) der Myofibrille ermittelt hat, dann läßt sich schließen, daß diese Elemente eben durch die Präparation morphologisch nur unwesentlich verändert werden. Bei zytoplasmatischen oder Untersuchungen am Zellkern dürfte es sich dagegen empfehlen, die Beobachtungen zu unterbauen durch vergleichende elektronenmikroskopische Studien an Fällungen mit Fixierungsmitteln aus Lösungen ihrer Baustoffe, wie Eiweiß, Lipoid, Lipoproteide, Nukleohistone.

Bei den Bestrebungen, das Elektronenmikroskop der Histo- und vor allem der Zytologie dienstbar zu machen, ist es also wichtig, das Gesehene auf seinen Wert zu analysieren. Es haben alle Kriterien, die seit den Untersuchungen A. FISCHERS über Bau und Fixierung des Protoplasmas bis zu den letzten Studien ZEIGERS (1949) geltend gemacht wurden, auch bei Arbeiten mit dem Übermikroskop in vollem Umfang berücksichtigt zu werden. Die Eingriffe, die uns erst in die Lage versetzen, histo- und zytologische Objekte zu beobachten, setzen auf alle Fälle Veränderungen. Es ist daher nicht leicht, heute vielleicht sogar noch unmöglich, den unverfälschten Zustand zu erfassen. Wir müssen uns daher vielfach damit begnügen, experimentell gesetzte oder eventuell funktionell bedingte Abweichungen von gewohnten Strukturbildern einer Zelle oder eines Zellelements festzustellen, die Eigenschaften der Baustoffe zu studieren, um daraus unsere Schlüsse abzuleiten. Dabei ist der Grundsatz des Äquivalentbildes streng einzuhalten, den ich seinerzeit wie folgt festgelegt habe: Das Resultat einer Untersuchung ist abhängig vom Zustand des Untersuchungsobjektes und der eingehaltenen Technik. Wenn die Technik so schonend ist, daß nicht die Artefakte größer sind als die in Frage stehenden Änderungen in den Strukturen und eine solche Technik stets konstant bleibt, dann erst können wir aus den Beobachtungen einigermaßen verlässliche Schlüsse auf den ursprünglichen Zustand des Objektes ableiten.

Natürlich muß die Technik um so subtiler sein, je feinere und empfindlichere Elemente in Betracht stehen, ganz besonders im Auflösungsbereich des Elektronenmikroskops. Was nützen uns schließlich noch so starke Vergrößerungen und Auflösungen, wenn man nicht weiß, ob das Dargestellte unnatürliche Entstellungen sind oder den natürlichen Strukturen einigermaßen adäquat ist. Fixantien mit grobflockenden Eigenschaften scheiden daher von vornherein aus. Es kommen nur zwei Mittel in die engere Wahl: der Formaldehyd und das Osmiumtetroxyd, von denen wieder das zweite den Vorzug zu haben scheint, weil es viele Lipoid für die Einbettung weitgehend alkoholfest macht. Möglicherweise wirkt sich auch das zurückgehaltene Metall auf die Differenzierbarkeit des Gefüges günstig aus. Allerdings darf nicht vergessen werden, daß auch bei OsO_4 zu prüfen ist, ob es im Submikroskopischen ebenso Gutes leistet wie im Mikroskopischen.

Völlig abzulehnen ist meines Erachtens die Paraffineinbettung. Wer einmal vom gleichen formfixierten Stück, etwa einer Drüse, einen ungefärbten Gefrierschnitt in Wasser eingeschlossen vergleicht mit einem ebensolchen Paraffinschnitt, wird sich davon überzeugen, welche Zerstörungen diese Einbettung macht. Möglicherweise bietet das native Präparat verbunden mit einer zweckmäßigen Isolierungs- und Trocknungstechnik eine Basis, die zumindest den Ausgang für weitere technische Studien bilden kann.

Zusammenfassung

Für histo- und zytologische Forschungen mit dem Elektronenmikroskop genügt es nicht, einfach die Schnittdicke möglichst herabzusetzen. Die Tatsache, daß Fixierung und Einbettung schwere Artefakte machen, ist um so mehr zu berücksichtigen, je höher die Auflösung des Mikroskops ist. Es wird nötig sein, neue Wege einer schonenden Präparation zu suchen.

Summary

For histologic and cytologic research with the Electron Microscope, it is not sufficient to diminish the thickness of the sections. The higher the microscopes magnification and resolving power, the more the fact that fixing and embedding causes severe artefacts should be taken into account. It is therefore necessary to seek less destructive preparations in new ways.

Literatur

Boerner-Patzelt D., Z. mikroskop.-anat. Forsch. **18** (1929). — Baud A., Bull. d'Hist. appl. et de techn. mikroskop. **27** (1950). Hier weitere Literatur. — Brettschneider L. H., Mikroskopie **5** (1950). — Draper M. H. und Hodge A. J., The Austral. J. exper. Biol. and Med. Science **27** (1949). — Fischer A., Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena 1899. — Jung F., Klin. Wsch. **24/25** (1947). — Marton L., Bull. Akad. r. Belg. Sc. **20** (1934); **21** (1935). — Pischinger A., Zelforsch. mikroskop. Anat. **26** (1937); Z. mikroskop.-anat.Forsch. **52** (1942); Wr. klin. Wschr. **57** (1944). — Ries E., Grundriß der Histophysiologie. Leipzig 1938. — Weber H. H., Naturwiss. **27** (1939). — Wolpers C., Naturwiss. **29** (1946); Klin. Wschr. **26** (1948). — Zeiger K., Z. Zelforsch. mikrosk. Anat. **22** (1935); Physikalisch-chemische Grundlagen der histologischen Methodik. Dresden und Leipzig 1938; Z. Zelforsch. mikrosk. Anat. **34** (1949).

(Aus dem Anatomischen Institut der Universität Kiel. Direktor: Prof. Dr. med. W. Bargmann)

Die elektive Darstellung einer marklosen diencephalen Bahn

Von WILHELM BARGMANN

Mit 6 Abbildungen

Über den Verlauf zentraler vegetativer markloser Fasersysteme lassen sich bekanntlich nur schwer klare Aussagen gewinnen, da wir über eine der Markscheidenmethode bezüglich der Zuverlässigkeit gleichwertige Methode für die Darstellung markloser Fasern nicht verfügen. Daher dürfte die Mitteilung von einigem Interesse sein, daß es möglich ist, bei sämtlichen Klassen der Wirbeltiere wenigstens ein bestimmtes Fasersystem mit Hilfe einer Färbemethode elektiv hervortreten zu lassen.

Besonders die Untersuchungen von SCHARRER und seinen Mitarbeitern haben gezeigt, daß sich in den Ganglienzellen des Nucleus supraopticus und paraventricularis der Säuger und Reptilien und des diesen Kernen homologen Nucleus praectopticus der Amphibien und Fische sekretorische Prozesse abspielen. In ausgedehnten Untersuchungen haben wir feststellen können, daß die im Zytoplasma der Nervenzellen anscheinend auf Kosten der Nisslsubstanz entstehenden granulären Sekretionsprodukte sich mit der von GOMORI (1941) für andere Zwecke angegebenen Chromhaematoxylin-Phloxin-Methode elektiv tingieren lassen (Abb. 1 und 2). Die Lokalisation der Gomori-positiven Granula beschränkt sich nun nicht auf die Leiber der Ganglienzellen, vielmehr verteilt sich die Gomori-positive Substanz über die gesamte Länge der vom Nucleus paraventricularis und supraopticus bzw. praectopticus ausgehenden marklosen Axone (Abb. 3—6). Die Nervenzellausläufer enthalten teils feine Granula in gleichmäßiger Verteilung, meistens aber in Knotenbildungen verschiedensten Kalibers, so daß das eigenartige Bild von Perlschnurfasern (Abb. 4) resultiert. Diese Fasern lassen sich in schütterem Verband (Abb. 5) eindeutig vom Nucleus paraventricularis zum Nucleus supraopticus verfolgen. Von hier aus ziehen die mit Sekretkörnchen beladenen Axone der Ganglienzellen des Nucleus supraopticus zum Hypophysenstiel (Abb. 6) — in dem

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: 1950

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Pischinger Alfred

Artikel/Article: [Über die Verwendungsmöglichkeit des Elektronenmikroskops in der zyto- und histologischen Forschung. 287-289](#)