

ÜBER METHODISCHE FRAGEN DER KERNVARIATIONS- STATISTIK IV. WIRKUNG DER VERSCHIEDENEN FIXIER- UND EINBETTUNGSMETHODEN AUF DAS KERNVOLUMEN

G. INKE, M. PALKOVITS, I. GYÁRFÁS und A. BAJTAI

(Eingegangen am 19. November 1957)

Einleitung

Die sich mit Kernvariationsuntersuchungen befassenden Autoren stimmen im allgemeinen darin überein, dass diese Untersuchungen nur an Materialien vorgenommen werden dürfen, welche auf völlig gleiche Weise behandelt wurden. Dennoch haben bei Untersuchungen nicht experimenteller Natur HINTZSCHE [13], BRÜGGER [3] und andere nach verschiedenen Methoden fixierte und eingebettete Materialien mit gutem Ergebnis verglichen.

Unsere vorliegenden Untersuchungen verfolgten den Zweck festzustellen, inwieweit die durch verschiedene Fixiermittel verursachte Schrumpfung bei gleicher und unterschiedlicher Einbettung voneinander abweicht. Ferner wünschten wir die Frage zu klären, ob bei experimentellen Untersuchungen ein Vergleich der nach verschiedenen Verfahren fixierten und eingebetteten Stoffe zulässig ist, sofern die speziellen Untersuchungszwecke dies erfordern. In der Literatur sind über das Kernvolumen der auf gleiche Weise fixierten, aber verschiedenartig eingebetteten Gewebe einige Angaben vorzufinden. So hatten ARNOLD [2] die Leberzellengröße in Paraffin- und Gefrierschnitten, DIEFFENBACH und FEDERLIN [5], FEDERLIN und KÖSTER [8] das Volumen der Leberzellen in Gefrierschnitten sowie in unfixierten, oder nach verschiedenen Verfahren fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten verglichen. Über die Wirkung der Celloidin- und Celloidin-Paraffineinbettung auf das Kernvolumen sind uns exakte Untersuchungen nicht bekannt.

Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial benutzten wir Leberzellen von Albinoratten. Unsere Wahl fiel vor allem deshalb auf Leberzellen, weil ihre Form der Kugelform am meisten nahekommt und sich an kugelförmigen Kernen die genauesten Messungen vornehmen lassen. Um individuelle Abweichungen und die von CASPERSON und HOLMGREN [4] beschriebenen tageszeitlichen Schwankungen zu vermeiden, entnahmen wir das Material für sämtliche untersuchten Fixiermittel und Einbettungsmethoden vormittags 10 Uhr der Leber eines

etwa 250 g schweren Rattenmännchens. Messungen der Kernvolumen nahmen wir im Zusammenhang mit insgesamt 26 Fixiermitteln und 4 Einbettungsmethoden vor. In Vorversuchen stellten wir fest, ob einerseits zwischen einfacher Paraffineinbettung und Einbettung in Methylbenzoat-Paraffin, andererseits zwischen den mit Gelatineeinbettung und ohne Einbettung gefrorenen Schnitten Unterschiede anzutreffen sind. Wir fanden, dass die Kernvolumenwerte bei einfacher Paraffineinbettung signifikant und wesentlich kleiner sind als bei Einbettung in Methylbenzoat-Paraffin. Zwischen den in Gelatine eingebetteten und ohne Einbettung in gefrorenem Zustand geschnittenen Geweben war keine Differenz vorhanden. Die auf eine Grösse von 3×3 mm geschnittenen Leberstückchen wurden binnen 5 Minuten nach Tötung der Tiere in die vorher zubereiteten Fixiermittel gelegt. Es gelangten folgende Fixiermittel zur Anwendung (in Klammern die Fixierungsdauer in Stunden): 4-, 8-, 40%iges Formol [24], HELLY [6], ORTH [24], ZENKER [24], TELLYESNICZKY [4], HNO_3 -Dampf [2]. Nach diesen Fixiermitteln erfolgte 24stündiges Waschen mit Wasser, nach *Wittmaackscher* Fixierung [48] gelangten 5%ige Na_2SO_4 und anschliessend Waschen unter fliessendem Wasser je 24 Stunden zur Anwendung. Im Anschluss an die Fixierung nach ALLEN [2], BOUIN [24], CARNOY [5], GILSON [6], LANG [6], P. MAYER [6], PETRUNKEVITCH [6], APÁTHY [24], STIEVE [24], SCHAFFER [24] und mittels Azeton [3], Sublimat [4], Supiformeis [24] geschah das Waschen in 70%igem Alkohol, im Anschluss an Fixierung nach ROMEIS [6] in 80%igem Alkohol. Nach Fixierung mit SUBTRIE [24] und SUSA [24] wurde 90%iger, nach SANOMIYA [6] absoluter Alkohol zum Waschen verwendet. Die mit 80%igem und absolutem Alkohol fixierten Gewebe (je 24 Stunden) wurden anschliessend sofort eingebettet.

Neben dem Waschen wurden sämtliche Materialien insgesamt 5 Stunden in den betreffenden Alkoholkonzentrationen aufbewahrt. Bei der Paraffineinbettung befanden sich alle Materialien 17 Stunden in zweimal gewechseltem Methylbenzoat, 1 Stunde in einmal gewechseltem Benzol und $3\frac{1}{2}$ Stunden in einmal gewechseltem Paraffin.

Die mit Alkohol gewaschenen Gewebe wurden zur Herstellung der Gefrierschnitte stufenweise wieder in Wasser überführt. Zwecks Erzielung einer gleichmässigen Schnittdicke wurden die Schnitte mit der von INKE [14] beschriebenen Messerkühlvorrichtung hergestellt.

Die in Celloidin eingebetteten Gewebe wurden nach 5stündiger Alkoholbehandlung 24 Stunden in abs. Alkohol + Äther und 120 Stunden in Celloidin gehalten. Das Celloidin wurde mit Chloroform erhärtet.

Bei der Einbettung in Celloidin-Paraffin wurde der mit Chloroform erhärtete Celloidinblock nach 5stündiger Dehydratation mit Alkohol 12 Stunden in einmal gewechselter Carbol-Benzollösung, $1\frac{1}{2}$ Stunden in einmal gewechselter Benzollösung und $3\frac{1}{2}$ Stunden in einmal gewechseltem Paraffin behandelt. Die obere Zone von 5—600 μ der gewonnenen Blöcke wurde ent-

fernt und die 500 μ breite Randzone bei der Messung unberücksichtigt gelassen (INKE—PALKOVITS, 15], aus jedem Block wurden jeweils 200 Kerne projiziert (H. I.-Obj. 90, Periplan-Okular 15 \times ; die Projektionsentfernung wurde so eingestellt, dass die Endvergrößerung 3000fach sei), und abgezeichnet. Die Kerne als Drehungsellipsoid betrachtend, wurden die beiden grössten senkrecht zueinander stehenden Durchmesser in mm gemessen, auf Grund der Formel $\pi/6 AP^2$ aus dem *Fischer-Inkeschen* Nomogramm [10] der log V-Wert abgelesen und in die von 2,15 log ausgehenden Klassen mit der Ausdehnung $\pm 0,05$ eingereiht. Wir errechneten die Mittelwerte und Streuungen der Volumen der auf verschiedene Weise fixierten Kerne sowie die Ergebnisse des *Studentschen* t-Testes. (Wir können nicht für jedes Fixiermittel Werte bei den verschiedenen Einbettungen angeben. Diese Fälle sind in den Tabellen mit einem * bezeichnet.)

Ergebnisse

Bevor wir den Effekt der einzelnen in ihrer Zusammensetzung und in ihrem Wirkungsmechanismus so unterschiedlichen Fixiermittel auf das Kernvolumen untersuchen, erscheint es am zweckmässigsten, zunächst die Wirkung der Einbettungsmethoden zu analysieren, bei denen eine einheitlichere Einwirkung stattfindet. Dies dürfte schon deshalb erforderlich sein, weil sich die Analyse der Fixiermittelwirkungen unabhängig von der Einbettung schwer durchführen lässt.

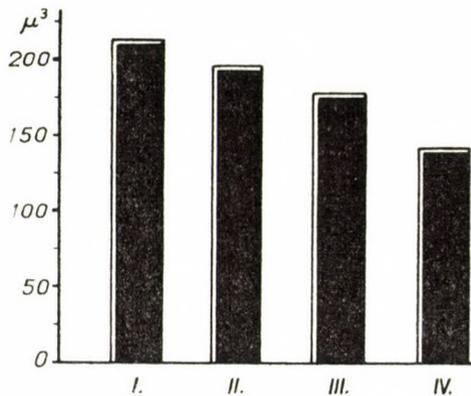


Abb. 1. Absolute Kernvolumenwerte

I. Gefrierschnitte II. Paraffin- III. Celloidin- IV. Celloidin-Paraffineinbettung
 Volumendurchschnittswerte von jeweils 200, insgesamt 5200 Zellkernen bei Anwendung von 26 verschiedenen Fixiermitteln

Da die Fixiermittel in allen Gruppen im grossen ganzen (die mit * bezeichneten ausgenommen) identisch wirken, dürfte die Gruppierung sämtlicher Angaben nach den Einbettungen (einschliesslich der Gefrierschnitte) zulässig sein. Die auf diese Weise gewonnenen Resultate sind auf Abb. 1

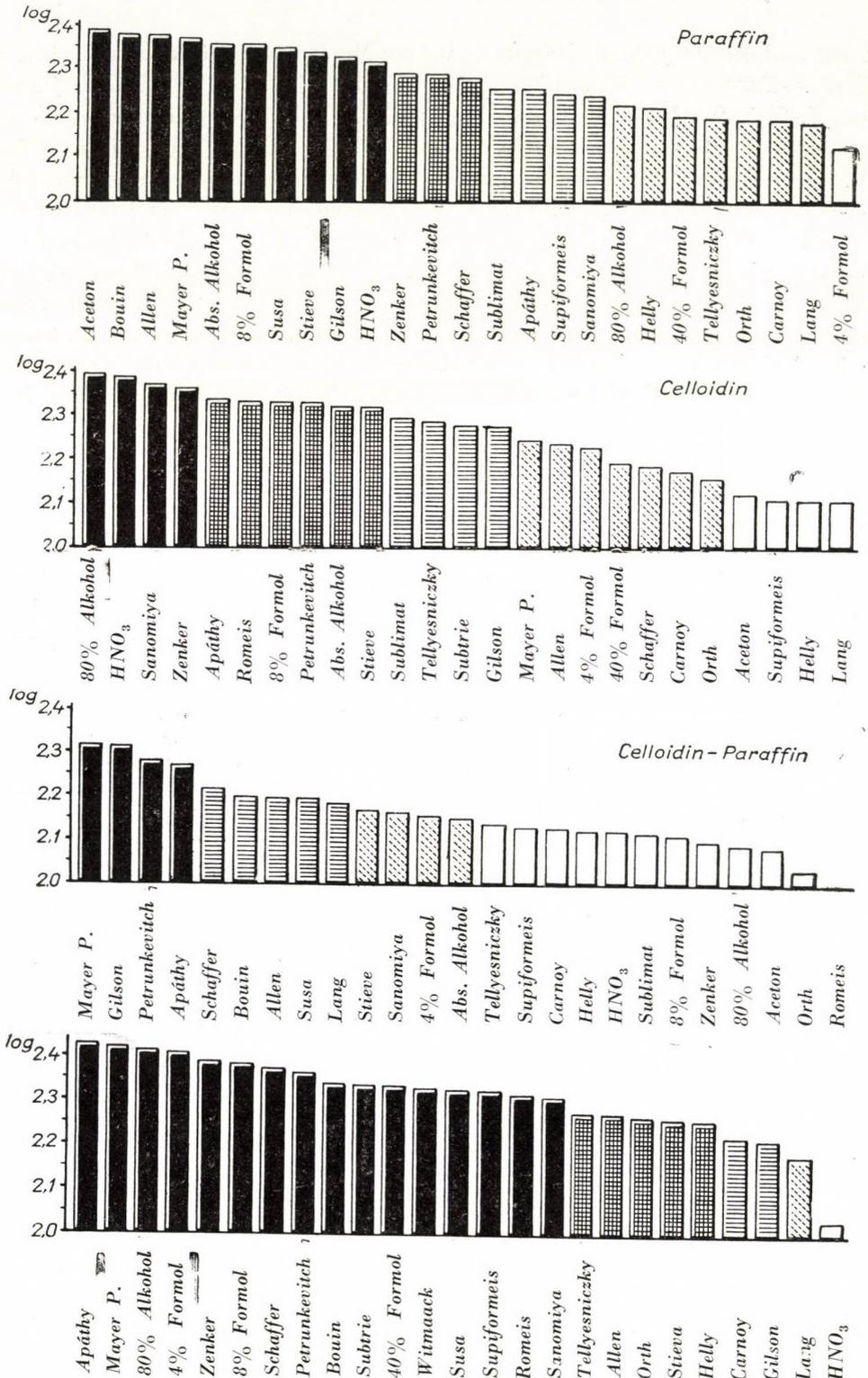


Abb. 2. Die Durchschnittswerte der gleichartig bezeichneten Fixiermittel unterscheiden sich (auf 5%igem Niveau) nicht signifikant voneinander

graphisch wiedergegeben, deren Säulen jeweils den Messungsergebnissen von 5200 Kernen (im Mittelwert) entsprechen. Das höchste Resultat ergaben die Gefrierschnitte (I) 2, 338 log (218 μ^3), sodann in der hier angegebenen Reihen-

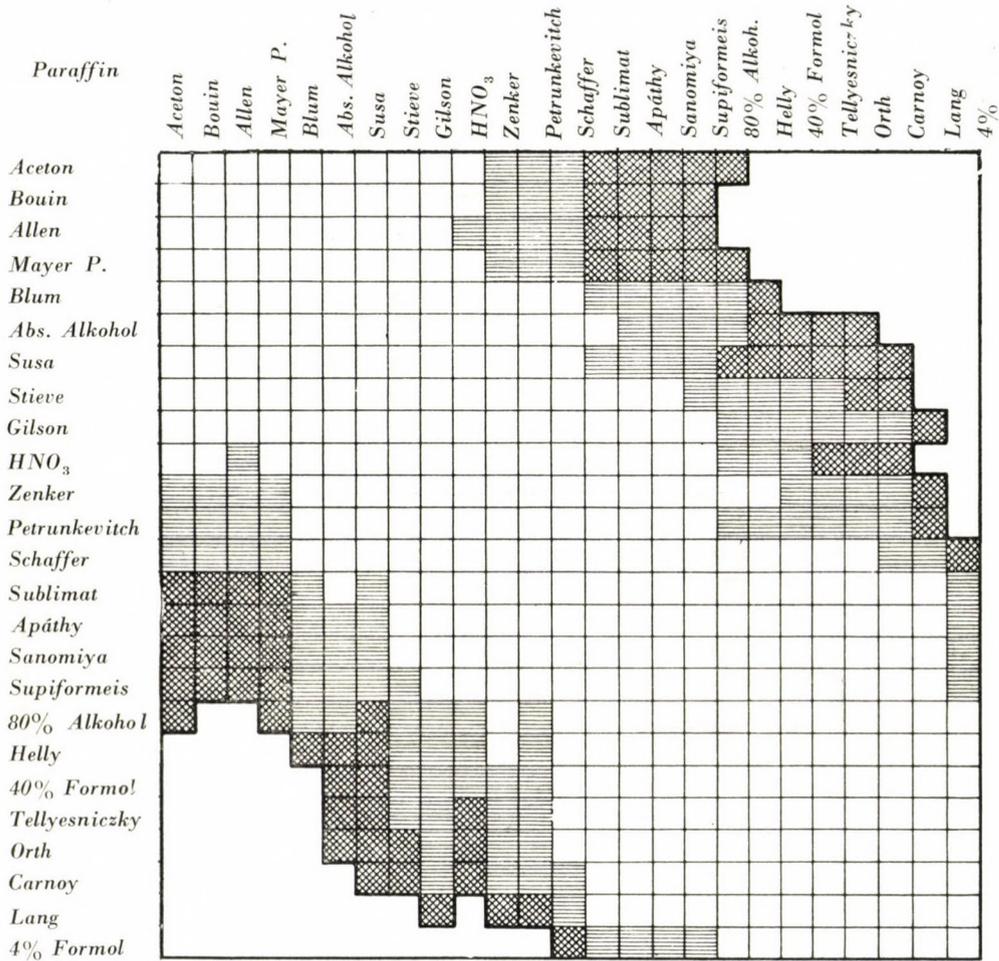


Abb. 3. Ergebnisse des *Studentschen t-Testes* bei Paraffineinbettung in graphischer Darstellung
Bezeichnungen :

- = auf 5%igem Niveau ist die Differenz nicht signifikant
- ▨ = auf 5%igem Niveau signifikant
- ▧ = auf 1%igem Niveau signifikant
- ▩ = auf 0,1%igem Niveau signifikant

folge Paraffin (II) 2, 296 log (198 μ^3), Celloidin (III) 2, 265 log (184 μ^3), Celloidin-Paraffin (IV) 2, 158 log (144 μ^3). Nach dem *Studentschen t-Test* bestehen zwischen den einzelnen Werten signifikante Differenzen.

Die einzelnen Einbettungen kann man auch danach bewerten, mit wie vielen Fixiermitteln die dem Höchstwert nahestehenden, von diesem höchstens

um 12% abweichenden Ergebnisse bei gegebener Einbettung erreicht werden können. Hierüber orientiert (unter anderem) Abb. 2, in der neben den verschiedenen Einbettungen die in log angegebenen Mittelwerte angeführt sind. Die Werte der einzelnen verschiedenartig bezeichneten Säulen stimmen unter-

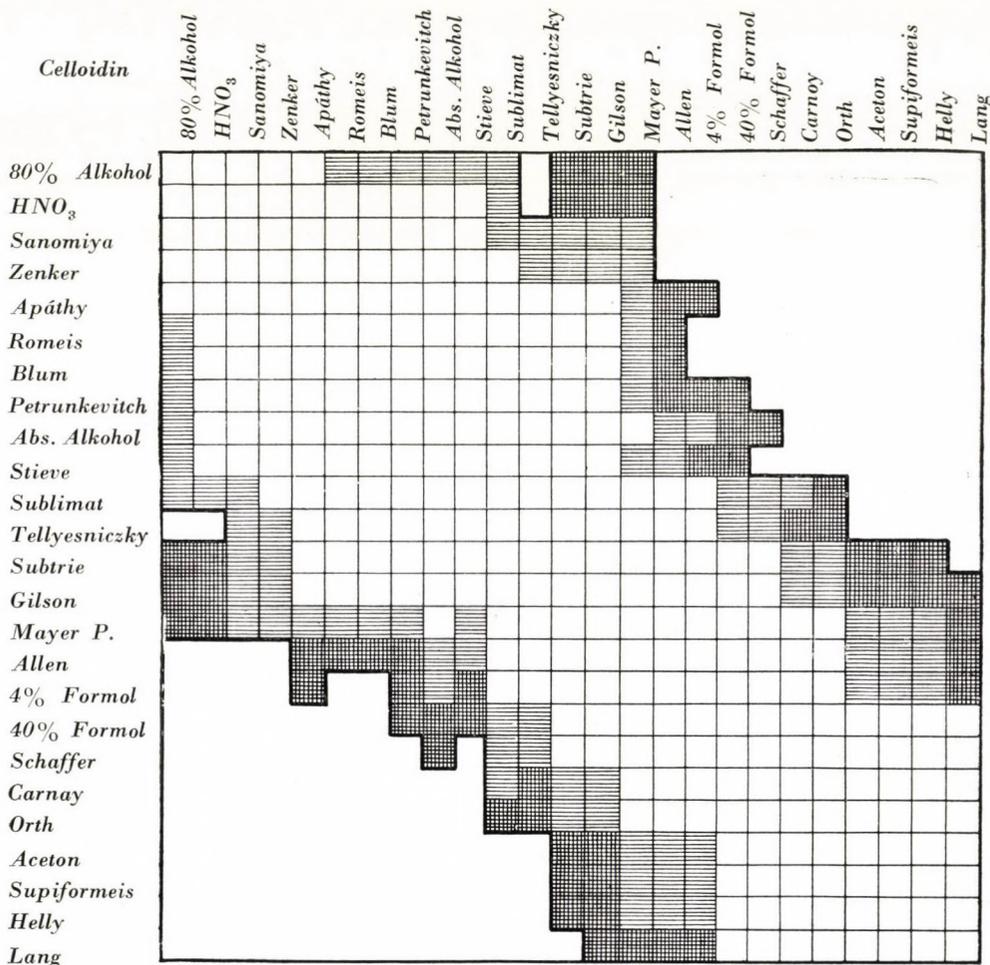


Abb. 4. Ergebnisse des Studentischen *t*-Testes bei Celloidineinbettung in graphischer Darstellung
Bezeichnungen: s. Abb. 3

einander überein, obwohl sich bei der Angabe der Grenze zwischen den sich stufenweise verändernden Werten eine gewisse Willkür nicht vermeiden liess. Die Differenzen zwischen den einzelnen Werten (auf Grund des *t*-Testes auf dem 5-, 1-, 0,1%igen Niveau) sind auf den Abb. 3—6 wiedergegeben.

Bei den Gefrierschnitten geben 16, bei der Methylbenzoat-Paraffin-einbettung 10, bei der Celloidin-Einbettung 4, bei der Celloidin-Paraffin-

einbettung 4 Fixiermittel vom höchsten nicht abweichende Werte. Der Übergang der einzelnen Fixiermittelwerte erfolgt stufenweise, die Celloidin-Paraffineinbettung ausgenommen, bei der mit Ausnahme der ersten 5 und

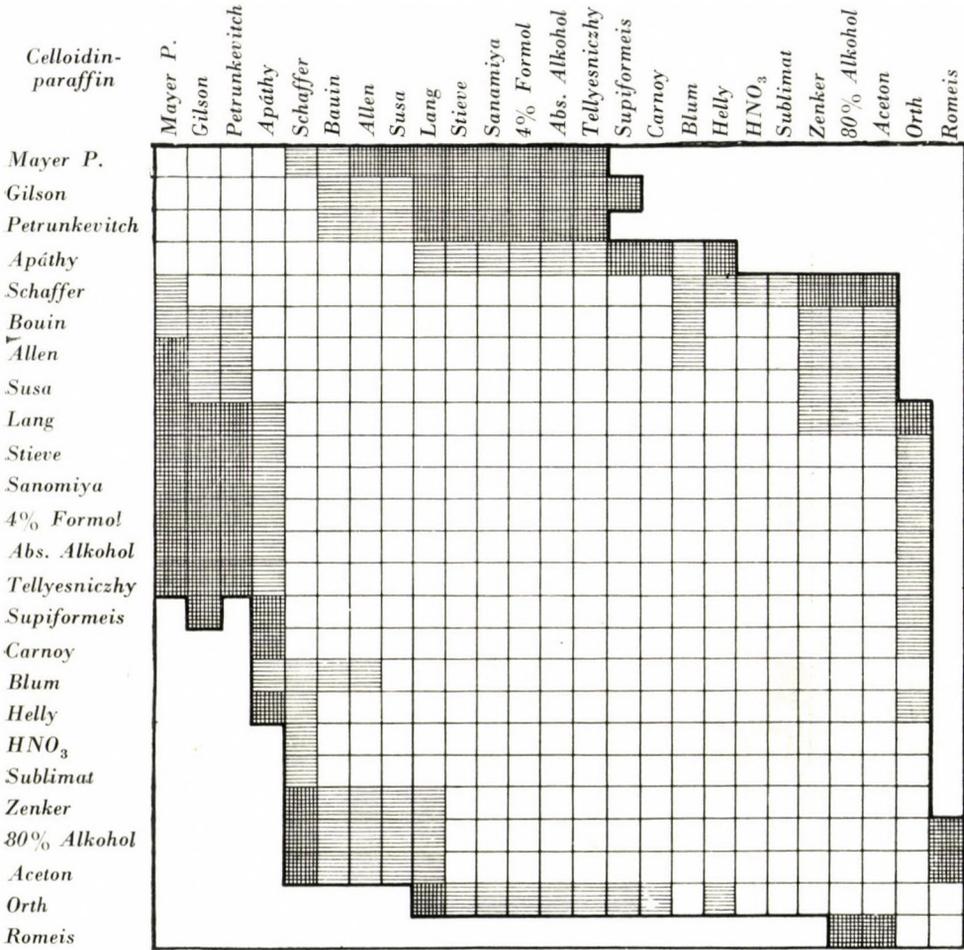


Abb. 5. Ergebnisse des Studentischen t-Testes bei Celloidin-Paraffineinbettung in graphischer Darstellung
 Bezeichnungen : s. Abb. 3

letzten 2 Fixiermittel sämtliche anderen voneinander nicht abweichende niedrige Werte ergeben.

Die Wirkung der einzelnen Fixiermittel auf das Kernvolumen bewerten wir nach 3 Verfahren : 1. Durch Summierung sämtlicher bei der Einbettung gewonnenen Werte ; 2. durch Vergleich der Wirkungen der verschiedenen Fixiermittel bei unterschiedlichen Einbettungen und 3. durch Vergleich der einzelnen Fixiermittel bei gleicher Einbettung.

I. Die gemessenen Mittelwerte sind im log-Wert, die pH-Werte der Fixiermittel (vor dem Einlegen des Materials mit der Bayerischen Indikatorpapierserie gemessen) in bezug auf die einzelnen Einbettungen und zusammengefasst in Tabelle I enthalten.

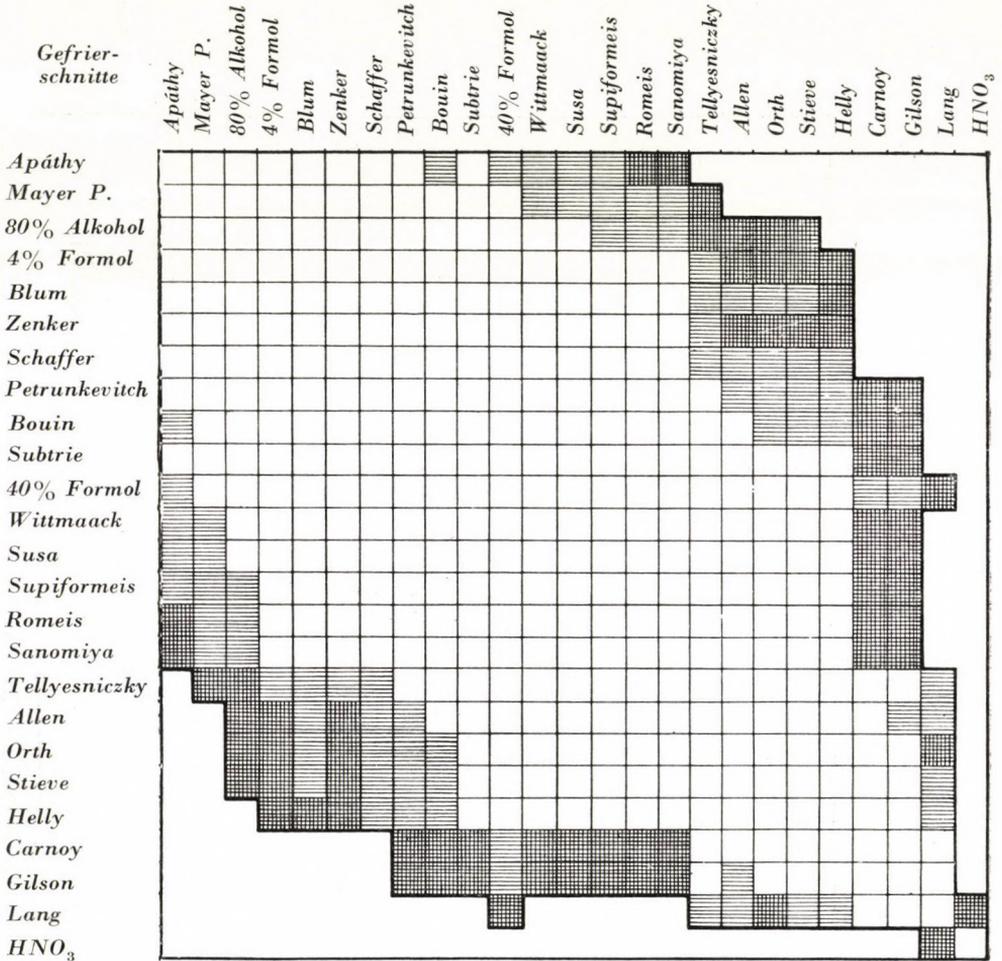


Abb. 6. Ergebnisse des Studentischen *t*-Testes bei Gefrierschnitten in graphischer Darstellung
Bezeichnungen: s. Abb. 3

Das durch Zusammenfassung der bei sämtlichen Einbettungen festgestellten Werte gewonnene Resultat gibt unserer Ansicht nach die Wirkung der einzelnen Fixiermittel auf das Kernvolumen am besten wieder. Abb. 7 zeigt die Werte in graphischer Darstellung. Nach diesen Resultaten kann man die Fixiermittel vom Gesichtspunkt ihrer auf die Kerngrösse ausgeübten Wirkung in unserem Untersuchungsmaterial in 4 Gruppen einteilen (deren Grenzen allerdings mit einer gewissen Willkür gezogen sind).

Tabelle I

Fixiermittel	pH	Gefrier- schnitte	Paraffin	Celloidin	Celloidin- Paraffin	Insgesamt
Mayer	0,5	2,43	2,37	2,24	2,31	2,34
Petrunkevitch	2,0	2,36	2,29	2,33	2,27	2,32
Bouin*	2,0	2,34	2,38	—	2,20	2,31
Apáthy	5,8	2,43	2,25	2,34	2,26	2,30
8% Formol	3,0	2,38	2,35	2,33	2,11	2,29
Susa*	1,7	2,33	2,34	—	2,19	2,29
Zenker	3,0	2,38	2,29	2,36	2,10	2,28
Gilson	1,4	2,21	2,33	2,29	2,31	2,28
Abs. Alkohol	4,6	—	2,36	2,33	2,15	2,28
80%ig. Alkohol	4,5	2,42	2,22	2,39	2,08	2,28
Sanomiya	3,0	2,32	2,25	2,37	2,16	2,27
Stieve	3,2	2,26	2,34	2,33	2,16	2,27
Allen	2,3	2,27	2,39	2,23	2,19	2,27
Schaffer	4,6	2,37	2,28	2,19	2,21	2,26
4% Formol	4,5	2,41	2,12	2,23	2,15	2,23
Sublimat	5,8	—	2,26	2,30	2,12	2,22
Tellyesniczky	3,0	2,27	2,19	2,29	2,14	2,22
HNO ₃ -Dampf		2,04	2,31	2,38	2,13	2,21
40% Formol	3,8	2,34	2,20	2,20	2,11	2,21
Supiformeis	2,3	2,33	2,25	2,11	2,13	2,20
Romeis*	1,4	2,32	—	2,33	1,94	2,20
Azeton*	5,0	—	2,38	2,12	2,08	2,19
Carnoy		2,21	2,19	2,17	2,13	2,18
Helly	3,8	2,26	2,21	2,11	2,13	2,18
Lang	2,6	2,18	2,18	2,11	2,18	2,16
Orth	3,8	2,27	2,19	2,15	2,03	2,16
Subtrie*	1,4	2,34	—	2,28	—	2,31
Wittmaack*	2,3	2,33	—	—	—	—

Für sich allein steht das weitaus beste Ergebnis des P. *Mayerschen* Fixiermittels. Zur zweiten Gruppe rechnen wir 13 Fixiermittel (*PETRUNKEVITCH*, *BOUIN*, *APÁTHY*, 8%iges Formol, *SUSA*, *ZENKER*, *GILSON*, abs. Alkohol, 80%iger Alkohol, *SANOMIYA*, *STIEVE*, *ALLEN*, *SCHAFFER*), zur dritten 8 (4%iges Formol, *SUBLIMAT*, *TELLYESNICZKY*, *HNO₃-DAMPF*, 40%iges Formol, *SUPIFORMEIS*, *ROMEIS*, *AZETON*), in die vierte Gruppe 4 Fixiermittel (*CARNOY*, *HELLY*, *LANG*, *ORTH*).

2. Die nach dem t-Test vorgenommene statistische Auswertung der bei verschiedenen Einbettungen gewonnenen Mittelwerte der einzelnen Fixier-

mittel ist in Abb. 8 enthalten. Auf Grund der Ergebnisse befinden sich die Kerne der mit den einzelnen Fixiermitteln behandelten Gewebe in so verschiedenem physiko-chemischem Zustand, dass sie auf die Nachbehandlung völlig individuell reagieren. Für die besten müssen wir diejenigen Fixiermittel halten, die den Kern in einen physiko-chemischen Zustand versetzen, in dem sie auf die Nachbehandlung überhaupt nicht oder nur sehr wenig reagieren

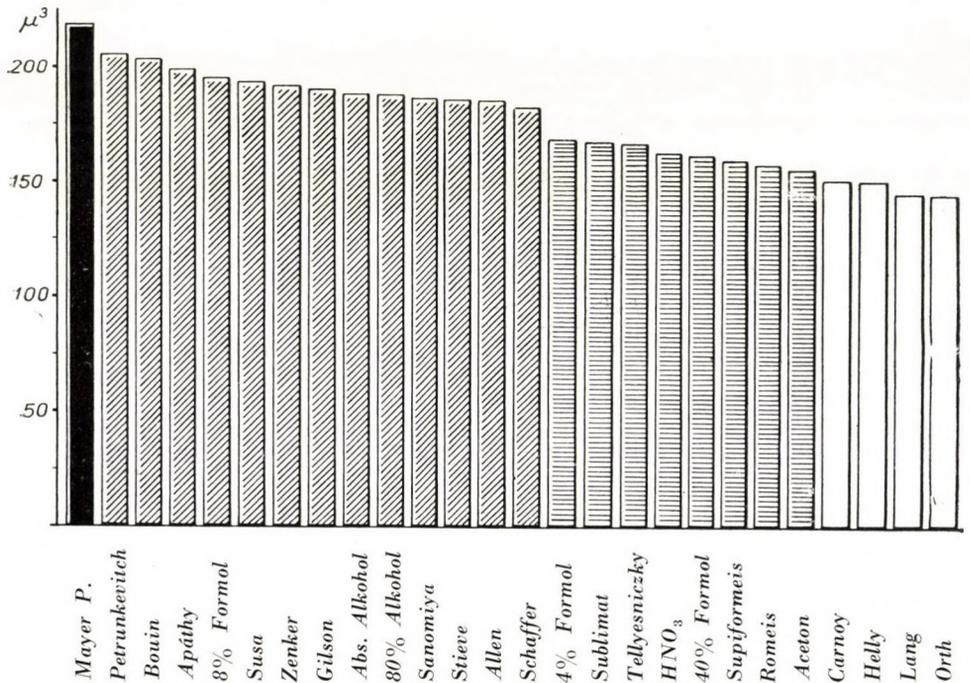


Abb. 7. Volumendurchschnittswerte von je 800 Zellkernen bei 4 verschiedenen Einbettungsverfahren

und gleichzeitig nicht schrumpfen. Zur Vermeidung von Wiederholungen werden wir die Bewertung der einzelnen Fixiermittel nach dem 3. Punkt zusammenfassend angeben.

3. Der Vergleich der verschiedenen Fixiermittel bei gleicher Einbettung auf Grund des t-Testes ergibt sich aus den Abb. 3—6, aus denen hervorgeht, dass sich diese Werte bei gleicher Einbettung, obwohl sich die mit den einzelnen Fixiermitteln gewonnenen Kernvolumenwerte allmählich verändern, nach der statistischen Bewertung auf dem Niveau von 5 bzw. 1% meistens nicht voneinander unterscheiden. Dementsprechend zeigen bei Gefrierschnitten (Abb. 3) auf 5%iger Ebene die ersten 10 Fixiermittel (mit einer Ausnahme), auf 1%iger Ebene die ersten 16 Fixiermittel ein übereinstimmendes Ergebnis. Bei der Paraffineinbettung (Abb. 4) ergeben auf 5%igem 10 und 1%igem Niveau 13 Fixiermittel ein einheitliches Resultat, bei Celloidineinbettung (Abb. 5) auf

5%igem Niveau 5 und auf 1%igem Niveau 11 Fixiermittel. Im Falle der Celloidin-Paraffineinbettung (Abb. 6) zeigen auf 5%iger Ebene 4, auf 1%iger (mit 2 Ausnahmen) 8 Fixiermittel das gleiche Ergebnis.

Bei der Untersuchung der Streuungen konnte zwischen diesen und der Kernvolumengröße in unserem Untersuchungsmaterial keine ständige Korrelation ermittelt werden.

Unter Zusammenfassung all dieser Bewertungsmethoden konnte von den besten Fixiermitteln folgendes festgestellt werden:

a) Das Fixiermittel von P. MAYER ergab das höchste Durchschnittsergebnis, es wirkt gleichmässig und zeigt das schwächste Resultat bei Celloidineinbettung.

b) Das Durchschnittsergebnis der Fixierlösungen von PETRUNKEVITCH und APÁTHY ist ebenfalls günstig, sie wirken ebenso gleichmässig wie das MAYERSche Fixiermittel.

c) Die Resultate der BOUIN-, SUSA-, ZENKERSchen Fixiermittel und der 8%igen Formollösung sind übereinstimmend günstig, ihre Wirkung hat sich vom Gesichtspunkt der Kerngröße in jeder Hinsicht als einheitlich erwiesen.

d) Die GILSONsche Fixierlösung fiel — bei schwächeren Durchschnittsergebnissen — durch ihren gleichmässigen Effekt auf.

e) Bei Gefrierschnitten zeigten noch die 4- und 40%ige Formollösung sowie das SCHAFFERSche und SUBTRIESche Fixiermittel gute Resultate.

f) Bei der Paraffineinbettung ergaben Azeton, das ALLENSche und STIEVESche Fixiermittel sowie abs. Alkohol gute Ergebnisse.

g) Bei der Celloidineinbettung waren die mit HNO_3 -Dampf, den Fixiermitteln nach STIEVE und ROMEIS, ferner absolutem und 80%igem Alkohol erzielten Resultate günstig.

Eine Überraschung waren für uns die mit den Carnoy- und Hellyschen Fixiermitteln, insbesondere mit dem letzteren erzielten schwachen Ergebnisse, da letzteres im Vorversuch bei 24stündiger Fixierdauer das beste Resultat gegeben hatte. Wahrscheinlich war dies auf die kurze Fixierungszeit (6 Stunden) zurückzuführen.

Besprechung

Mit der quantitativen Bewertung der Fixiermittel haben sich mehrere Autoren befasst. Diese Untersuchungen kann man in zwei Gruppen einteilen:

1. Die Volumenveränderungen des Gewebes (Zytoplasma und Kern) wurden von PATTEN und PHILPOTT [11], KAISERLING [16], TELLYESNICZKY [23] und neuerdings von WÜSTENFELD [24] gemessen.

2. Mit der Messung des Zytoplasma- und Kern- bzw. nur des Kernvolumens haben sich HERTWIG [12], EULIG und MOND [7], FEDERLIN und KÖSTER [7],

Allen

	P	G	C	CP
P	▨	++	+++	+++
G	++	▨	-	-
C	+++	-	▨	-
CP	+++	-	-	▨

Bouin

	P	G	CP	C
P	▨	-	+++	▨
G	-	▨	+++	▨
CP	+++	+++	▨	▨
C	▨	▨	▨	▨

Carnoy

	G	P	C	CP
G	▨	-	-	+
P	-	▨	-	-
C	-	-	▨	-
CP	+	-	-	▨

Gilson

	P	CP	C	G
P	▨	-	-	++
CP	-	▨	-	-
C	-	-	▨	-
G	++	-	-	▨

Helly

	G	P	CP	C
G	▨	-	++	+++
P	-	▨	-	+
CP	++	-	▨	-
C	+++	+	-	▨

Lang

	P	CP	G	C
P	▨	-	-	-
CP	-	▨	-	-
G	-	-	▨	-
C	-	-	-	▨

Mayer P.

	G	P	CP	C
G	▨	-	+	+++
P	-	▨	-	+
CP	+	-	▨	-
C	+++	+	-	▨

Orth

	G	P	C	CP
G	▨	+	++	+++
P	+	▨	-	+++
C	++	-	▨	+
CP	+++	+++	+	▨

Petrunkevitch

	G	C	P	CP
G	▨	-	-	+
C	-	▨	-	-
P	-	-	▨	-
CP	+	-	-	▨

Apáthy

	G	C	CP	P
G	▨	+	+++	+++
C	+	▨	+	+
CP	+++	+	▨	-
P	+++	+	-	▨

Sanomiya

	C	G	P	CP
C	▨	-	++	+++
G	-	▨	-	+++
P	++	-	▨	-
CP	+++	+++	-	▨

Stieve

	P	C	G	CP
P	▨	-	-	+++
C	-	▨	-	+++
G	-	-	▨	+
CP	+++	+++	+	▨

Telleyesniczky

	C	G	P	CP
C	▨	-	++	+++
G	-	▨	+	++
P	++	+	▨	-
CP	+++	++	-	▨

Zenker

	G	C	P	CP
G	▨	-	++	+++
C	-	▨	++	+++
P	++	++	▨	+++
CP	+++	+++	+++	▨

8% Formol

	P	G	C	CP
P	▨	-	-	+++
G	-	▨	-	+++
C	-	-	▨	+++
CP	+++	+++	+++	▨

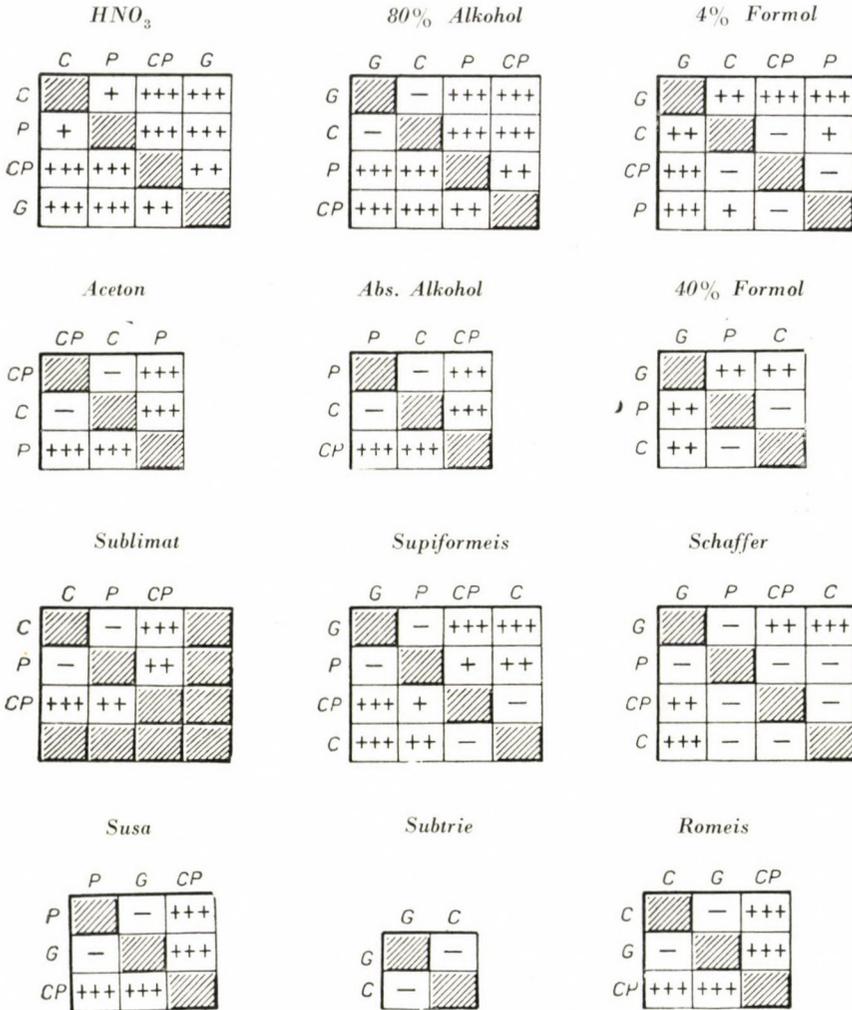


Abb. 8. Differenzen zwischen den Durchschnittswerten bei gleicher Fixierung und verschiedener Einbettung nach dem *Studentschen t-Test*

- = auf 5%igem Niveau ist die Differenz nicht signifikant
- ± = Grenzfall auf 5%igem Niveau
- + = auf 5%igem Niveau signifikant
- ++ = auf 1%igem Niveau signifikant
- +++ = auf 0,1%igem Niveau signifikant

G = Gefrierschnitt
 P = Paraffin-
 C = Celloidin-
 C-P = Celloidin-Paraffineinbettung

In den senkrechten Säulen sind die Werte in der ihrer Grösse entsprechenden Reihenfolge angeführt.

ARNOLD [2], SANDRITTER [21] und andere befasst. Diese Untersuchungen wurden teils so durchgeführt, dass man die gewonnenen Werte mit dem Kernvolumen des als Ausgangswert benutzten frischen Gewebes verglich, teils so, dass man keine Ausgangswerte, sondern nur relative Werte bestimmte. Da die Ausgangswerte meistens praktisch nicht bekannt sind, haben auch wir die Untersuchung dieser relativen Werte vorgenommen. Es sei hier bemerkt, dass die Zytoplasma- und Kernvolumenveränderungen laut HERTWIG nicht parallel verlaufen. Das Verhältnis zwischen Zytoplasma und Kernvolumen lasse sich daher bei der Untersuchung an fixierten Schnitten nach HERTWIG nur schwer oder überhaupt nicht bewerten. Derartige Untersuchungen an Aszitesarkomzellen haben auch wir (GÁTI, INKE, PALKOVITS [11]; GÁTI, INKE, BAJTAI, GYÁRFÁS [12]) im Anschluss an experimentelle Einwirkungen durchgeführt und gefunden, dass sich zwar absolute quantitative Werte nicht bestimmen liessen, aber zwischen den Zytoplasma- und Kernvolumenwerten ziemlich weitgehende Parallelität bestand.

Die bisherigen Untersuchungen bedurften in mehrfacher Hinsicht einer Ergänzung, und zwar weil 1. die Messungen zumeist an wenig Material vorgenommen wurden, 2. die statistische Bewertung der Resultate oft fehlte, 3. die Untersuchungen nur in bezug auf einige der gebräuchlichen Fixiermittel (BOUIN, SUSA, ZENKER, CARNOY, abs. Alkohol, Formol), oft ohne Angabe der Konzentration, vorgenommen worden waren, 4. weil wir unter den Einbettungsmethoden vor allem für die Paraffineinbettung mit und ohne Methylbenzoat-Vorbehandlung, für die Gefrierschnitte, die Carbowachs-Einbettung und in bezug auf die Freezing-drying-Methode Angaben gefunden hatten. Über die Celloidin- und Celloidin-Paraffineinbettung waren keine Angaben anzutreffen. 5. Im Zusammenhang mit den einzelnen Einbettungen ist die Aufenthaltsdauer in den Intermedien meistens in den Mitteilungen nicht angegeben.

Die Ergebnisse der einzelnen Autoren lassen sich aus obigen Gründen, ferner weil sie die gewonnenen Werte im Prozentsatz des Ausgangswertes ohne Angabe des absoluten Volumenwertes anführen, weil sie die relativen Werte teils im Volumen, teils in den mit Planimeter gemessenen Oberflächeneinheiten angeben, sehr schwer vergleichen. Wahrscheinlich ist bei den Einbettungen auch die Einwirkungsdauer der Intermedien vom Gesichtspunkt der quantitativen Resultate nicht indifferent. Wegen der zahlreichen Variationsmöglichkeiten lassen sich diese mit den gegenwärtigen Methoden gar nicht auswerten, obwohl es sehr erwünscht wäre, die in der Praxis benutzten zahllosen Modifikationen mit objektiven Methoden bewerten zu können.

Wir sind uns darüber im klaren, dass unsere Ergebnisse, obwohl sie sich auf ein viel umfangreicheres Material beziehen als die bisherigen Untersuchungen, für andere Gewebsarten als normale Rattenleberzellen streng genommen nur mit Vorbehalten angewandt werden können. Auch die experimentellen Ein-

wirkungen können die Reaktion der Leber auf die Fixiermittel verändern. Die chemische Grundlage dieser Veränderungen kann die durch Wasseraufnahme bedingte, von BENNINGHOFF vorausgesetzte „Kernschwellung“ oder die von ALFERT und Mitarbeitern festgestellte basische Proteinvermehrung sein.

Wir schliessen uns der Meinung von ALFERT und Mitarbeitern an, dass die „Kernschwellung“ keine allgemeine Erscheinung sei, sondern nur in speziellen Fällen zustande komme, während die infolge Vermehrung der Zytoplasmaproteine eintretende Kernschwellung häufiger beobachtet werden könne. EULIG und MOND vermochten *in vitro* mit Adrenalin und Azetylcholin eine Grössenveränderung der Froscherythrozytenkerne herbeizuführen und fanden, von den gebräuchlichen Fixiermitteln sei nur das BOUINSche imstande, die Gewebe so zu fixieren, dass die experimentell zustande gebrachte Differenz auch im Schnitt vorhanden sei. Nach ALFERT und Mitarbeitern [1] lässt sich dasselbe auch mit den von EULIG und MOND als ungeeignet befundenen SUSA- und CARNOYSchen Fixiermitteln sowie mit Formol herbeiführen. Neuestens teilt NEUMANN [18] Ergebnisse mit, welche die Auffassung von EULIG und MOND stützen, doch können seine Resultate wegen des Fehlens der statistischen Auswertung und im Hinblick auf die geringe Zahl der Versuche nicht als beweiskräftig angesehen werden.

Nach den Ergebnissen der Einbettungsversuche unterliegt es keinem Zweifel, dass die in der Kernvariationspraxis allgemein benutzte Methylbenzoat-Paraffineinbettung für quantitative Untersuchungszwecke als geeignet betrachtet werden kann. Gleichzeitig vermochten wir die in qualitativer Beziehung seit langem bekannte Tatsache, dass diese Methode auch quantitativ besser ist als die einfache Paraffineinbettung, objektiv zu beweisen. Die Gefrierschnitte geben im allgemeinen um 12% höhere Werte als die Paraffineinbettung. Hiermit gleichwertig ist nach unseren Vorversuchen die Gelatineeinbettung und nach Literaturangaben auch die Carbowachseinbettung. Die Schrumpfung der Gefrierschnitte ist in der Tat am geringsten, nach unseren Untersuchungen (INKE, PALKOVITS [15]) auch das Ausmass der Randschrumpfung kleiner als bei einfacher Paraffineinbettung, wenn sich auch die Orientierung und vor allem die Aufbewahrung des Materials schwerer durchführen lässt als bei eingebettetem Material. Die Unannehmlichkeiten sind von solcher Art, dass die etwa 12%ige Volumenvergrösserung hierfür keinen Ersatz bietet, um so weniger, als wir meistens nicht absolute, sondern relative Werte zu ermitteln wünschen. Es ist daher zweckmässiger, anstelle von Gefrierschnitten mit Methylbenzoat-Paraffineinbettung zu arbeiten.

Die Celloidin- und Celloidin-Paraffineinbettungen haben sich (zumindest in der unsererseits verwendeten Form) in quantitativer Hinsicht als minderwertiger erwiesen als die Methylbenzoat-Paraffineinbettung. Für karyometrische Untersuchungen halten wir sie daher, insbesondere die Celloidin-Paraffineinbettung, für ungeeignet. Letztere gibt nicht nur ausgeprägt niedrigere

quantitative Werte, sondern in quantitativer Hinsicht geben die Fixiermittel mit Ausnahme der ersten 5 und letzten 2 ein völlig gleichförmiges Bild. Wahrscheinlich spielt sie auch bei experimentellen Abweichungen eine derartige uniformisierende Rolle. Unter Ausserachtlassung der unmittelbaren Wirkung der Fixiermittel lässt sich über den Mechanismus und die Ursachen der Einbettungswirkungen auf die Kerngrösse folgendes sagen: 1. Das Ausmass der Schrumpfung nimmt mit der Zeitdauer der Einwirkung des Intermediums (Benzol, Alkohol, Äther-Alkohol) zu. 2. Die Hitzewirkung von 56° C wirkt (nach entsprechender Dehydratation) weniger schrumpfend als die langwierige Behandlung mit Intermedien, z. B. bei Celloidineinbettung. Auf die Unschädlichkeit der Hitzewirkung deutet ferner, dass wir mit Gelatineeinbettung (sowohl bei 37 wie 56°) Ergebnisse erzielten, die den mit Gefrierschnitten gewonnenen gleichwertig waren.

Die Auswertung der Fixiermittel ergab folgende Resultate:

1. Den Effekt der Fixiermittel kann man nicht unabhängig von der Einbettung bewerten. Es gibt sehr wenige Fixierlösungen, die unabhängig von den Einbettungen in allen Fällen gute Ergebnisse zeigen. Die primäre Schrumpfwirkung, als deren Massstab der Gefrierschnitt angesehen werden kann, zeigt auf Hitzeeffekt (Paraffin), auf Alkoholdauerbehandlung (Celloidin) bzw. Alkoholbehandlung und Hitzewirkung (Celloidin-Paraffin) die verschiedensten Veränderungen.

2. Die durch statistische Auswertung ergänzten Untersuchungen über die Schrumpfwirkung der Fixiermittel führten zu dem Resultat, dass die einzelnen Fixiermittelgruppen die gleiche Schrumpfwirkung aufweisen. Die in der Literatur mitgeteilten Angaben, wonach die Schrumpfwirkungen einzelner Fixiermittel in diesem oder jenem Prozentsatz abweichen, vermag man in Ermangelung der statistischen Auswertung nicht oder kaum zu bewerten.

3. Zwischen der quantitativen Wirkung und dem pH sowie der chemischen Zusammensetzung der Fixiermittel fanden wir folgende Zusammenhänge:

Die durchschnittlichen pH-Werte der das beste Resultat ergebenden und der anderen Fixiermittel sind auf Tabelle II zusammengefasst.

Tabelle II

Die besten

die anderen

	Die besten				die anderen							
	Durchschnitt pH	n	a	b	Durchschnitt pH	n	a	b	Durchschnitt pH	n	a	b
Insgesamt	3,14	26	0,1	5,8	2,42	8	0,5	5,8	3,61	18	0,1	5,8
Paraffin	3,17	25	0,1	5,8	2,38	10	0,1	5,0	3,70	15	2,0	5,8
Celloidin	3,14	25	0,1	5,8	3,06	10	0,1	5,8	3,18	15	0,5	5,8
Cell.-Par.	3,14	26	0,1	5,8	2,86	5	0,5	5,8	3,37	20	0,1	5,8
Gefrierschn. . . .	2,76	25	0,1	5,8	3,2	11	0,5	5,8	2,44	14	0,1	3,8

n = Anzahl der Fixiermittel; a = niedrigster Einzelwert; b = höchster Einzelwert.

Obgleich die Durchschnittswerte mit Ausnahme der Gefrier- und Celloidin-Schnitte bei den ein gutes Resultat ergebenden Fixiermitteln wesentlich niedriger sind, scheint doch kein konsequenter Zusammenhang zu bestehen, da ja auch unter den besten Fixiermitteln solche mit verhältnismässig hohem pH (APÁTHY) und unter den weniger guten welche mit niedrigem pH vorkommen (ROMEIS, LANG, HNO_3 -Dampf). Infolgedessen erlauben wir uns, die Arbeitshypothese aufzustellen, dass zwischen dem pH und der quantitativen Wirkung der Fixiermittel ebenfalls ein Zusammenhang vorliege.

Die Art dieser Korrelation soll durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Zwischen der chemischen Zusammensetzung und quantitativen Wirkung der Fixiermittel fanden wir folgende Zusammenhänge: 1. Die HNO_3 -haltigen Fixiermittel ergaben sämtlich gute Resultate (MAYER, PETRUNKEVITCH, GILSON). 2. Bei den sublimathaltigen Fixiermitteln war zwischen Sublimatgehalt und Schrumpfungsausmass eine Korrelation nicht festzustellen. 3. Unter den pikrinsäurehaltigen Fixierlösungen zeigten nur diejenigen gute Ergebnisse, in denen die Pikrinsäure den Hauptbestandteil bildet (MAYER, BOUIN), das mit Chromsäure und Urea kombinierte ALLENSCHE Fixiermittel und das etwa 8% Sublimat enthaltende Supiformeis wirkten schwächer. 4. Unter den Formollösungen erbrachte die 8%ige das beste Resultat, im Gegensatz zu den 4%igen und 40%igen, welche letztere laut LASSEK [18] auf Grund subjektiver Beurteilung weniger schrumpfend wirken soll als die 4%ige Lösung. Bei Gefrierschnitten gab auch die 4%ige ein günstiges Ergebnis. 5. Von den Alkoholen ergaben absoluter und 80%iger gute Resultate; unter den ein noch besseres Resultat zeigenden Fixiermitteln gibt es zwei, in denen Alkohol in 50—60%iger Konzentration in Kombination mit anderen Substanzen enthalten ist (APÁTHY, PETRUNKEVITCH).

Zusammenfassung

Die Wirkung von 26 verschiedenen Fixierlösungen und 4 verschiedenen Einbettungsmethoden auf die Volumenveränderung der Leberzellkerne von Ratten wurde untersucht. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, ist die Kernvolumengrösse von der gemeinsamen Wirkung des Fixiermittels und der Einbettung abhängig. Die nicht eingebetteten Gefrierschnitte enthalten Kerne mit durchschnittlich um 12% grösserem Volumen. Von den Einbettungsverfahren erwies sich quantitativ die Methylbenzoat-Paraffineinbettung als die beste; die Celloidineinbettung ergibt ein schwächeres und die Celloidin-Paraffineinbettung das schwächste Resultat. Die Paraffineinbettung ohne Methylbenzoat wirkt quantitativ unvorteilhafter als die Methylbenzoat-Paraffin- und Celloidineinbettung. Mit den Gefrierschnitten übereinstimmende Ergebnisse zeigt die Gelatineeinbettung. Unter den verschiedenen Fixiermitteln zeigten bei sämtlichen Einbettungsverfahren die besten Resultate MAYER, PETRUNKEVITCH, BOUIN, 8%iges Formol, SUSA, APÁTHY, ZENKER und GILSON. Die Schrumpfwirkung der Fixiermittel ist bei den einzelnen Einbettungen verschieden. In bezug auf ihre Schrumpfwirkung kann man die Fixierlösungen je nach dem Einbettungsverfahren in eine Reihenfolge bringen, die sich mit gewisser Willkür in vier Gruppen einteilen lässt. Die Schrumpfwirkung der in diese Gruppen aufgenommenen Fixierflüssigkeiten zeigt keine wesentlichen Abweichungen. Die über die Schrumpfwirkung der Fixiermittel in der Literatur anzutreffenden Angaben lassen sich in Ermangelung der mathematischen Auswertung kaum bewerten. Die Zusammenhänge zwischen der chemischen Zusammensetzung und dem Wirkungsmechanismus sowie zwischen dem pH und Wirkungsmechanismus der Fixierflüssigkeiten werden eingehend erörtert.

Für die Zwecke der Kernvariationsstatistik werden die oben angeführten Fixiermittel unter Anwendung der Methylbenzoat-Paraffineinbettung empfohlen. Falls die Untersuchungen unterschiedliche Fixierung der Gewebe erfordern, so kann man unter Berücksichtigung der mitgeteilten Daten diese Ergebnisse ebenfalls vergleichen.

LITERATUR

1. ALFERT, M., BERN, H., KAHN, R.: (1955) Hormonal influence on nuclear synthesis IV. Karyometric and microspectrophotometric studies of rat thyroid nuclei in different functional states. *Acta Anat.*, 23, 185—205. — 2. ARNOLD, A.: (1951) Beitrag zur quantitativen Histologie des Alloxandiabetes der Albinoratte; die Kerngrößen der Inselzellen. *Acta Anat.*, 12, 396—428. — 3. BRÜGGER, W.: (1949) Funktionsbedingter Unterschied der Kerngröße im Schmelzorgan. *Acta Anat.*, 7, 345—365. — 4. CASPERSON, T., HOLMGREN, H.J.: (1934—35) Variationen der Kerngröße während der verschiedenen Phasen der Leberarbeit. *Anat. Anz.*, 79, 53—58. — 5. DIEFENBACH, H., FEDERLIN, K.: (1955) Vergleichende Kernmessungen an lebensfrischen und verschieden fixierten Leberzellen. *Frankf. Z. Path.*, 66, 16—23. — 6. EULING, H., MOND, W.: (1952) Der Einfluss der Fixierung auf das Kernvolumen. *Z. wiss. Mikr.*, 61, 201—209. — 7. FEDERLIN, K., KÖSTER, E.: (1954) Der Einfluss verschiedener Fixierungsmittel auf die Kerngröße. *Frankf. Z. Path.*, 65, 493—502. — 8. FISCHER, J., INKE, G.: (1956) Nomogramme zur Berechnung des Kernvolumens. *Acta morph. Acad. Sci. Hung.*, 7, 141—165. — 9. GÁTI, É., INKE, G., PALKOVITS, M.: (1957) Changes in cell and nuclear volume in ascites carcinoma upon the effect of colchicine and podophyllin. *Acta morph. Acad. Sci. Hung.*, 7, 335—341. — 10. GÁTI, É., INKE, G., BAJTAI, A., GYÁRFÁS, I.: (1957) Cytological changes in ascites carcinoma cells on the effect of nitrogen mustard: TEM or BCM, with special reference to changes in nuclear volume. *Acta morph. Acad. Sci. Hung.*, 7, 343—350. — 11. HERTWIG, G.: (1931) Der Einfluss der Fixierung auf das Kern- und Zellvolumen. *Z. mikr. anat. Forsch.*, 23, 484—504. — 12. HINTZSCHE, E., TANNER, E.: (1937) Über die Beziehungen zwischen Nahrungsaufnahme und Kerngröße des Darmepithels. *Z. mikr. anat. Forsch.*, 42, 165—192. — 13. INKE, G.: (1956) Verbesserte Messerkühlvorrichtung. *Mikroskopie*, 11, 335—337. — 14. INKE, G., PALKOVITS, M.: (1958) Über methodische Fragen der Kernvariationsstatistik. I. Die Volumenveränderung des Zellkerns in der zentralen und peripheren Schnittzone auf Wirkung der histologischen Verfahren. *Acta biol. Acad. Sci. Hung.* 8., 305—310. — 15. KAISERLING, K., GERMER, R.: Über den Einfluss der gebräuchlichen Konservierungs- und Fixationsmethoden auf das Größenverhältnis tierischer Zellen. *Virchow's Arch.*, 133, 79—104. — 16. LASSEK, A. M.: (1957) An experimental study on the general utility of concentrated (commercial) formalin as a fixative. *Anat. Rec.* 109, 757—759. — 17. NEUMANN, K. H.: (1954) Zur Anwendung der Gefriertrocknung. Methodologische Vorarbeiten für die Untersuchungen an der ruhenden, stimulierten und gehemmten Schilddrüse. *Verh. Anat. Ges.*, 52. Vers. *Anat. Anz.* 101, Erg. H. 169—180. — 18. PATTEN, M. B., PHILPOTT, R.: (1921) The shrinkage of embryos in the processes preparatory to sectioning. *Anat. Rec.* 20, 393—413. — 19. ROMEIS, B.: (1948) Mikroskopische Technik. 15. Aufl. Leibniz, München. — 20. SANDRITTER, W., HÜBOTTER, F.: Über die Bedeutung des Nucleolus in der Nebennierenrinde. *Frankf. Z. Path.*, 65, 219.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ЯДЕРНО-ВАРИАЦИОННОГО СТАТИСТИЧЕСКОГО СПОСОБА IV. ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФИКСАТОРОВ И СПОСОБОВ ЗАДЕЛКИ НА ОБЪЕМ ЯДРА

Г. ИНКЕ, М. ПАЛКОВИЧ, И. ДЪАРФАШ и А. БАЙТАИ

Авторы исследовали у крыс действие 26 различных фиксаторов и четырех различных способов заделки на изменения объема клеточных ядер печени. На основе полученных результатов величина объема ядер является функцией совместного действия фиксатора и способа заделки. Замороженные срезы, которые не были заделаны, содержали ядра, которые оказались в среднем на 12% больше. Из способов заделки метилбензоат-парафиновый метод является количественно лучшим способом. Более слабые результаты получаются при заделке в целлоидин, а самые слабые при заделке в целлоидин-парафин. Заливка в парафин без метилбензоата количественно хуже, чем заделка в метилбензоат-

парафин и целлоидин. Равноценные с замороженными срезами результаты дает заливка в желатину. Среди отдельных фиксаторов лучшие результаты дали способы заделки с фиксаторами Майера, Петрункевича, Буэна, 8%-го формола, Суза, Апати, Ценкера и Жильсона. В случае различных способов заделки сморщивающее действие отдельных фиксаторов не одинаковое. В отношении сморщивающего действия отдельные фиксаторы — в зависимости от способа заделки — можно отнести в непрерывный ряд, причем при известной произвольности они разделены на четыре группы. Отдельные, относящиеся к различным группам фиксаторы, в отношении сморщивающего действия не отличаются существенно друг от друга. Имеющихся в литературе данных о сморщивающем действии отдельных фиксаторов нельзя применять, так как они приводятся без математической оценки. Подробно излагается химический состав и механизм действия отдельных фиксаторов, также как и связь между их pH и механизмом действия.

При применении ядерновариационного статистического способа на практике авторы рекомендуют вышеприведенные фиксаторы с заделкой в метилбензоат-парафин. Поскольку характер исследований требует различного закрепления отдельных объектов, можно провести сравнение, принимая во внимание также вышеприведенные данные авторов.

METHODICAL PROBLEMS OF KARYOMETRY. IV. THE EFFECT OF DIFFERENT FIXATIVES AND EMBEDDING METHODS UPON THE NUCLEAR VOLUME

G. INKE, M. PALKOVITS, I. GYÁRFÁS and A. BAJTAI,

The effect of 26 different fixatives and 4 embedding methods upon the change of the nuclear volume of liver cells has been studied. It has been found that nuclear volume is the function of the joint action of fixative and embedding. The nuclei in non-embedded frozen sections were 12% larger. From among the embedding materials, methylbenzoate-paraffin was quantitatively the best, celloidine less good and celloidine-paraffin the worst. Paraffin without methylbenzoate was quantitatively inferior to methylbenzoate-paraffin and celloidine embedding. Gelatine embedding ensures the same result as frozen sections. As regards fixing, the best results, whatever the embedding method were obtained by the *Mayer*, *Petrunkevitch*, *Bouin*, 8% formol, *Susa*, *Apáthy*, *Zenker* and *Gilson* fixatives. On the basis of their shrinking effect, which is not identical with every embedding method, the fixatives can be ranged into a series which may be divided into four arbitrary groups. The shrinking effect of the fixatives ranged into the same group does not essentially differ from one another. The data in the literature concerning the shrinking effect of the different fixatives are, for want of mathematical evaluation, scarcely appreciable.

Chemical composition and the effect of the fixatives, as well as the correlation of their pH and their effect is treated in detail. For Karyometrical research, the use of these fixatives and methylbenzoate-paraffin embedding are recommended. Should the character of some examination necessitate a fixation by different substances, their results can be also compared by the above mentioned dates.

Dr. Gábor INKE	} Budapest, IX., Tűzoltó u. 58. Ungarn
Dr. Miklós PALKOVITS	
Dr. Iván GYÁRFÁS	
Dr. Attila BAJTAI	