

VERSUCHE ZUR PARAFFIN-IMPRÄGNATION VON GEHIRNPRÄPARATEN

A. GELLÉRT

(Eingegangen am 12. Juni, 1958)

Im Juni 1876 erschien in den Spalten des Bulletin de l'Académie Royale de Sciences des Beaux Arts et des Lettres de Belgique eine Mitteilung unter dem Titel »Communication préalable sur quelques procédés nouveaux de préparation des pièces anatomiques sèches«. Der Verfasser war LEON FRÉDÉRICQ [3, 4, 5, 6, 7, 8], der als erster die damals in der Mikrotechnik bereits allgemein benutzte Paraffineinbettung zur Herstellung von anatomischen Präparaten verwendet hatte. Er imprägnierte das Gehirn, die Leber und die Niere von Tieren (Hund, Katze, Kaninchen) mit Paraffin. 1878 wurden seine Präparate in Paris und im nächsten Jahre in Amsterdam und Berlin ausgestellt und ernteten grosse Anerkennung. Bis zum Jahre 1882 hat er sein Verfahren noch in mehreren Mitteilungen erörtert. Sein Arbeitsgang war folgender: Entwässern in Alkohol, Durchtränken mit Terpentin und anschliessende Paraffinimprägnation.

Mit dieser sinnvollen Methode hat FRÉDÉRICQ die Paraffinimprägnation in die Makrotechnik eingeführt und den Weg für die Umorganisation und Weiterentwicklung der anatomischen Museen gewiesen.

Obwohl das Verfahren FRÉDÉRICQs aussergewöhnliche Möglichkeiten für den Aufschwung der Makrotechnik bot, sind im Verlauf der letzten 80 Jahre — von wenigen unbedeutenden Unternehmungen abgesehen — nur von drei Autoren erfolgreiche Versuche zur Anwendung und zum weiteren Ausbau dieser Methode unternommen worden. SCHWALBE [21] hat — im wesentlichen nach der Vorschrift FRÉDÉRICQs — menschliche Gehirnhemisphären mit Erfolg in Paraffin imprägniert. HOCHSTETTER [15, 16] und SCHMEIDEL [18, 19, 20] erzielten bemerkenswerte Ergebnisse mit der Paraffinierung von Eingeweide- und Herzpräparaten sowie kleineren Tieren (Amphibien) und Blumen und ihr Verdienst ist es, nach 40 Jahren dieses Verfahren vor dem Vergessenwerden gerettet bzw. aufgefrischt zu haben. ARA [1, 2] benutzte die Paraffinmethode mit Erfolg zur Erhaltung der Gesichtszüge.

Diese zweifellos bedeutsamen Ergebnisse haben doch nicht zur allgemeinen Verbreitung der Paraffinmethode geführt und bis auf den heutigen Tag hat das Verfahren den ihm gebührenden Platz in der Makrotechnik noch nicht eingenommen.

Ich selbst habe zuerst im Jahre 1935 mein Verfahren und unsere ersten Ergebnisse mit der erfolgreichen Paraffinierung von Gelenks-, Muskel-, Gefäss-, Nerven- und Eingeweidepräparaten in ungarischer Sprache [11] veröffentlicht und 1936 liess ich ein kurzes Referat auch in der englischen Literatur erscheinen [12]. Seither habe ich nur in Vorlesungen und Demonstrationen über den Fortschritt unserer Arbeit und die weitere Entwicklung meiner Methode berichtet [13, 14], als deren Ergebnis die museale Sammlung des Szegediner Anatomischen Institutes heute schon grösstenteils aus paraffinimprägnierten

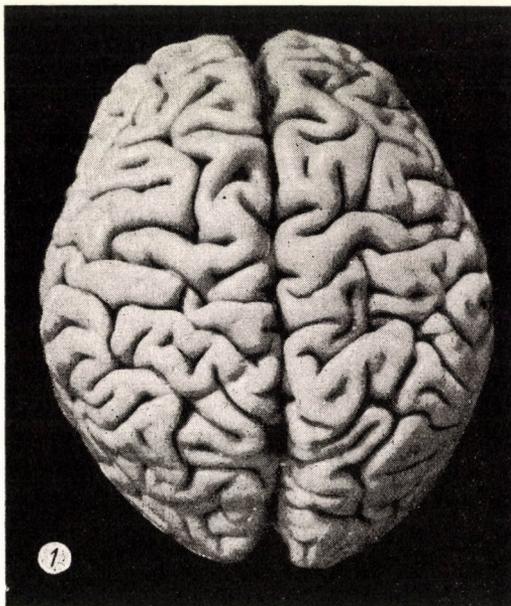


Abb. 1. Konvexe Oberfläche des Gehirns

Präparaten besteht. Die Möglichkeit einer Paraffinierung des zentralen Nervensystems hatte ich bis zum Jahre 1955 nicht in Erwägung gezogen.

In der vorliegenden Mitteilung möchte ich die Ergebnisse besprechen, die ich auf dem Gebiete der Paraffinimprägnation von Gehirnpräparaten bisher verzeichnen konnte.

Zunächst versuchte ich es mit dem FRÉDÉRICQschen Originalverfahren, mit dem auch ganze Gehirne gut imprägniert werden können.

Die Paraffinimprägnation der Gehirne, wie auch anderer Präparate, geschieht in einem nach meinem eigenen Entwurf konstruierten Vakuum-Thermostaten [14], in dem binnen Stunden auch ganze Gehirne mit Paraffin total durchtränkt werden.

Der einzige Fehler der FRÉDÉRICQschen Methode ist, dass das Terpentin den Präparaten einen gelblichen Farbton verleiht. Zur Umgehung dieses

Fehlers habe ich als Intermedium andere Chemikalien, wie Benzol, Tetrachlorkohlenstoff oder Benzin verwendet. Leider erhielten aber die Gehirnpräparate durch alle diese Mittel eine schmutziggraue Farbe, am ausgeprägtesten war diese bei Anwendung des Tetrachlorkohlenstoffs. Da in meinen

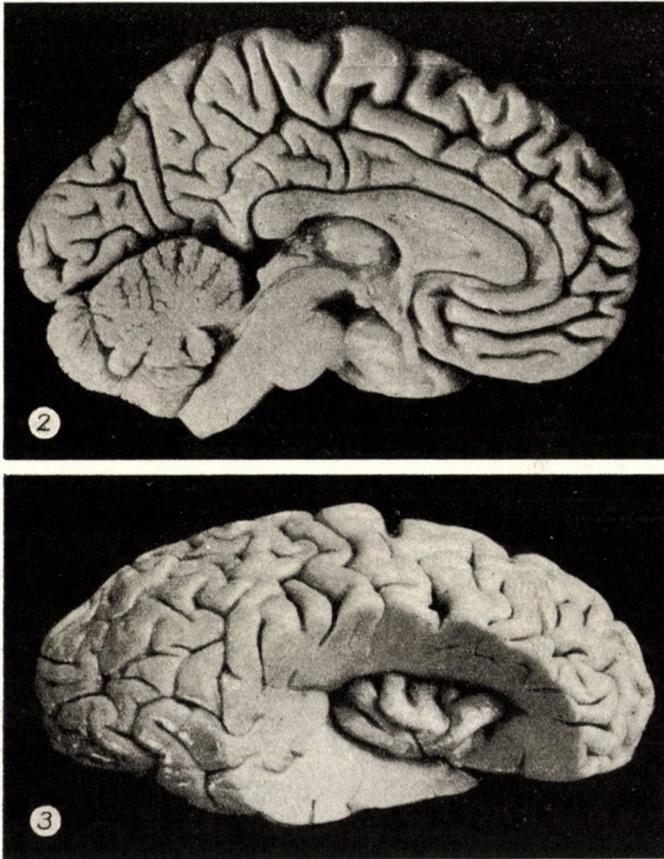


Abb. 2. Mediale Oberfläche der linken Hemisphäre mit einem Medianschnitt durch den Gehirnstamm und das Kleinhirn

Abb. 3. Insula

früheren Versuchen [14] die Muskelpräparate nach Entwässern in Aceton und anschließender Tetrachlorkohlenstoffbehandlung am hellsten und am wenigsten geschrumpft waren, habe ich die Wirkung der obigen Agenzien als Intermedium auch nach der Entwässerung mit Aceton bei Gehirnpräparaten versucht. Benzol und Tetrachlorkohlenstoff lieferten auch nach Acetonentwässerung keine besseren Resultate; die benzinbehandelten Präparate hatten sich dagegen unter Beibehaltung eines minimalen grauen Farbtones aufgehellt.

Neben dieser zweifellos vorteilhaften Wirkung des Benzins waren aber die Präparate — wahrscheinlich infolge der gesteigerten Auslösung der Lipide — sichtlich stärker geschrumpft als nach Terpentinbehandlung.

Um die bleichende Wirkung des Benzins und die weniger schrumpfende Wirkung des Terpentins gemeinsam zur Geltung zu bringen, habe ich als Intermedium eine Mischung aus gleichen Teilen dieser beiden Stoffe verwendet.

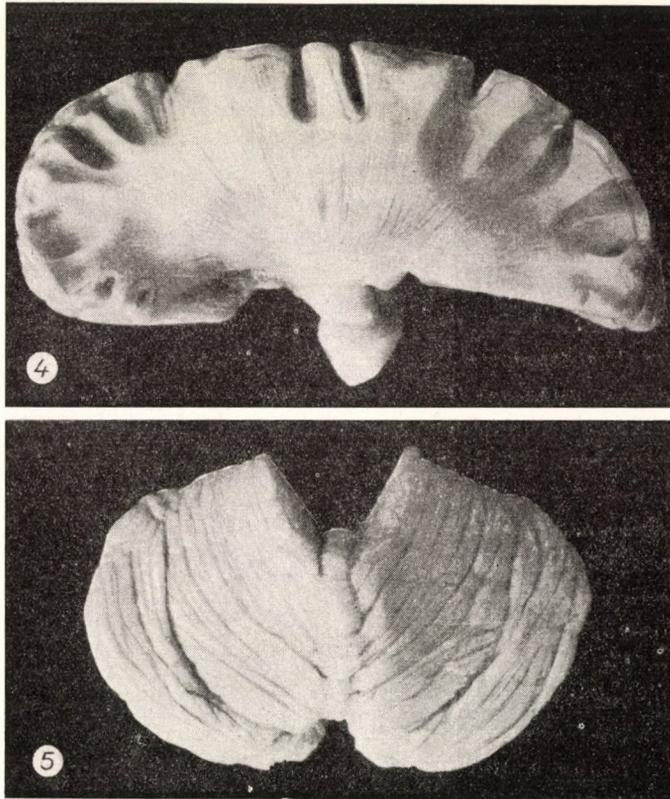


Abb. 4. Abfaserungspräparat (Corona radiata)

Abb. 5. Obere Oberfläche des Kleinhirns

Das Ergebnis war sowohl nach Alkohol- als auch nach Acetonwässerung sehr befriedigend. Die Schrumpfung der Präparate war geringer als nach reiner Benzinbehandlung und es wurde eine hellere Farbe mit einem nur schwach graugelblichen Stich erzielt.

Der helle, schwach gelblichgraue Farbton der mit Hilfe dieses Verfahrens hergestellten verschiedenen Gehirnpräparate (ganze Gehirne, Hemisphären, Kammern, Kleinhirne, Abfaserungspräparate usw., s. Abb. 1—5) verleiht

ihnen kein so unnatürliches Aussehen, wie es bei den nach der FRÉDÉRICQ-schen Methode hergestellten Präparaten der Fall ist.

Auf Grund meiner Untersuchungen hat sich das folgende Verfahren als am befriedigendsten erwiesen :

1. Fixieren in 4%igem Formol, wenigstens 1 Jahr lang.
2. Auswaschen in mehrmals gewechseltem Leitungswasser 5—7 Tage lang.
3. Entwässern in der Aceton- oder Alkoholreihe.
4. Durchtränken in einem $\bar{a}\bar{a}$ Benzin-Terpentingemisch, je nach der Grösse des Materials 2—6 Wochen lang unter mehrmaligen Auswechseln der Flüssigkeit.
5. Einbetten in geschmolzenem Paraffin (Schmp. 46—48° C) im Vakuum. Das Intermedium entweicht in Form von Blasen. Wenn die Blasenbildung aufhört, ist die Durchtränkung des Materials mit Paraffin vollendet.

Ich ging einen Schritt weiter und versuchte auch verschiedene Gehirnschnitte zur Darstellung der grauen Kerne und zum Nachweis ihrer topographischen Verhältnisse mit Paraffin zu imprägnieren. Während der Einbettung kommt es aber zur Entfärbung der grauen Substanz und so verschwindet ihr Farbunterschied von der nachbarlichen weissen Substanz. Bei meinen Bemühungen, auch diesen Fehler zu vermeiden, kam mir eine Beobachtung, die ich bei der Herstellung von Abfaserungspräparaten gemacht hatte, zur Hilfe. Allgemein bekannt ist das von KLINGLER [17] mitgeteilte Verfahren, nach dem bei formolfixierten Gehirnen nach dem Gefrieren die verschiedensten Gehirnbahnen präparativ freigelegt werden können.

Bei der Anfertigung derartiger Präparate werden nämlich die Rindensubstanz und die grauen Kerne des Gehirns wesentlich dunkler. Aus dieser auch unsererseits gemachten Beobachtung ergab sich unwillkürlich der Gedanke, die aus gefrorenen Gehirnen hergestellten Schnitte mit Paraffin zu imprägnieren und an ihnen im Laufe der Behandlung das Verhalten der weissen und der grauen Substanz zu verfolgen.

Obzwar bereits während der Entwässerung eine gewisse Verblässung der grauen Substanz zu beobachten ist, bleibt der Kontrast zwischen grauer und weisser Substanz auch nach der Paraffinimprägnation so weitgehend erhalten, dass an diesen Präparaten die topographischen Verhältnisse der beiden Substanzen (graue Kerne und umgebende weisse Substanz) sich gut demonstrieren lassen (Abb. 6—7).

Einziger Fehler der mittels Paraffinimprägnation hergestellten Gehirnpräparate ist, dass sie in bedeutend höherem Masse schrumpfen als andere mit Paraffin imprägnierte anatomische Präparate (z. B. Muskelpräparate). Da aber die Schrumpfung eine proportionale ist, bedeutet dies nur insofern einen Nachteil, als die Präparate von kleinerem Umfang sind als die in Formol gehärteten. Dagegen brauchen wir die zahlreichen Vorteile, die sich aus der

Handlichkeit, Übersichtlichkeit und Dauerhaftigkeit der Präparate ergeben, kaum zu betonen.

Zur Feststellung des Schrumpfungsgrades haben wir nach der Behandlung mit den einzelnen Chemikalien in einem selbstkonstruierten Voluminometer [9, 10] in jedem Falle das genaue Volumen von etwa 20–30 cm³ grossen

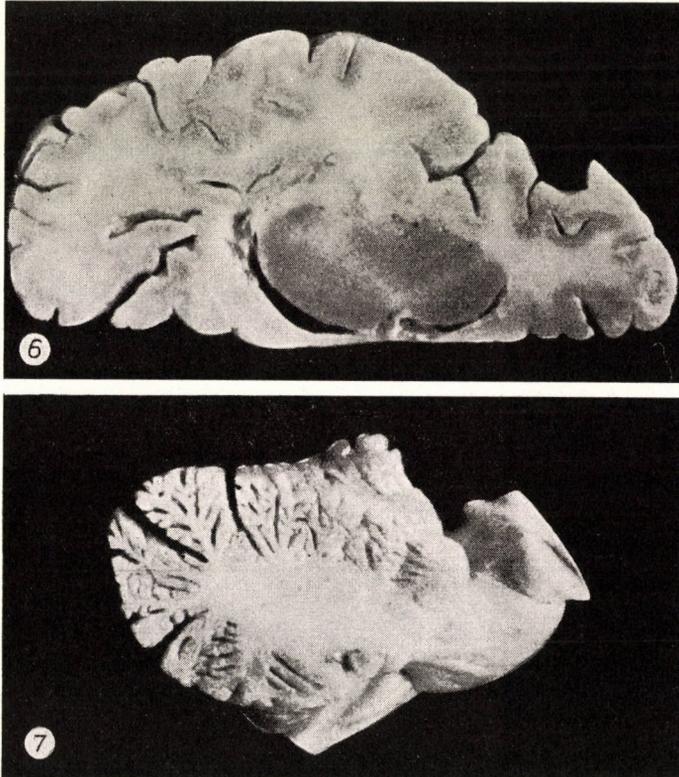


Abb. 6. Schnitt durch die Stammganglien

Abb. 7. Kleinhirn, Sagittalschnitt

Gehirnstückchen bestimmt. Die Mittelwerte der Volumprocente der einzelnen Gruppen sind tabellarisch zusammengefasst.*

Aus diesen Messungen ging hervor, dass die stärkste Schrumpfung bei der Acetonentwässerung und der Verwendung von Benzin als Intermedium entsteht (Endvolumen 42,4%). Am geringsten ist dagegen die Schrumpfung, wenn die Entwässerung mit Alkohol vorgenommen und als Intermedium Terpentin benutzt wird (Endvolumen 61,2%). Bei der Terpentin-Benzinbehand-

* Die Volumbestimmungen haben Frau M. Gajó—Bodrogeközy und Frau I. Tomity—Takács durchgeführt:

lung wird der schrumpfende Effekt des Benzins durch das Terpentin weitgehend aufgehoben (Endvolumen 59,6%).

Den Volumbestimmungen gemäss schrumpfen bei gleicher Behandlungsweise die Kleinhirne um 2–3% weniger als die Grosshirne. Bei der Acetonentwässerung kann der Unterschied sogar 6% ausmachen.

Tabelle

Prozentuelle Volumveränderung von Gehirnstücken während der Paraffineinbettung bei verschieden langer Fixierungsdauer und Anwendung verschiedener Chemikalien

		Kleinhirn		Grosshirn			
Fixiert in 4%-igen Formol (2 Monate)		100					
Fixiert in 4%-igen Formol (1 Jahr)		100					
Nach Alkoholentwässerung		72,7		67,5		83,1	
Nach Acetonentwässerung			62,9		50,3		72,8
Nach Benzin		68,5	67,2	65,8	59,7	79,0	78,1
Nach Terpentin		79,5	70,3	77,2	65,9	90,9	84,2
Nach Terpentin-Benzin		78,7	70,1	75,0	61,0	87,2	81,5
Nach der Paraffinierung	benzinbehandelte Präparate	51,6	50,0	49,6	42,4	61,0	59,7
	terpentinbehandelte Präparate	63,8	55,4	61,2	54,9	75,3	72,0
	terpentin-benzinbehandelte Präparate	62,0	55,0	59,6	49,1	69,5	68,5

Ferner weisen die Volumbestimmungen darauf hin, dass durch eine prolongierte Formolfixierung der schrumpfende Effekt der Paraffinimprägnation ausgeglichen wird. Nach einjähriger Fixierung ist die Schrumpfung um 10% geringer (Endvolumen 75,3% bzw. 69,5%) und auch der Schrumpfungunterschied zwischen in Alkohol und in Aceton entwässerten Gehirnen ist weniger ausgeprägt.

Mit Hilfe des geschilderten Verfahrens können – wenn entsprechendes Material zur Verfügung steht – binnen relativ kurzer Zeit zahlreiche Gehirnpäparate fertiggestellt und dadurch für den Unterricht bedeutende Hilfsmittel geschaffen werden, die eine wesentliche Erleichterung der Arbeit sowohl für das Lehrpersonal als auch für den Studenten bedeuten.

Zusammenfassung

Verfasser würdigt das Verdienst Leon FRÉDÉRICQs, der als erster die Paraffinimprägnation zur Herstellung anatomischer Präparate herangezogen hatte. Verfasser benutzt seit mehr als 20 Jahren erfolgreich diese Methode zur Anfertigung von Gelenks-, Muskel-, Gefäß-, Nerven- und Eingeweidepräparaten, seit 1955 befasst er sich auch mit der Paraffinimprägnation von Gehirnpräparaten.

Nach seinen Versuchen hat sich das folgende Verfahren am besten bewährt: 1. Fixieren in 4%igem Formol wenigstens ein Jahr lang. 2. Auswaschen in mehrmals gewechseltem Leitungswasser 5—7 Tage lang. 3. Entwässern in der Aceton- oder Alkoholreihe. 4. Durchtränken in ää Benzin-Terpentingemisch, je nach der Grösse des Materials 2—6 Wochen unter mehrmaligem Auswechseln der Flüssigkeit. 5. Paraffineinbettung (Schmp. 46—48 °C) im Vakuum.

An Gehirnschnitten wird der Kontrast zwischen weisser und grauer Substanz im Laufe der Imprägnation unentlich; dies konnte durch vorhergehendes Abkühlen der konservierten Gehirne auf —10 °C vermieden werden.

Die schrumpfende Wirkung der Paraffinimprägnation auf das Gehirngewebe wurde durch Volumbestimmung an Gehirnstücken untersucht. Am wenigsten waren die Präparate nach Alkoholentwässerung und Verwendung von Terpentin als Intermedium geschrumpft (das Endvolumen der ein Jahr in Formol fixierten Gehirnstücke betrug nach dieser Behandlung 75,3%). Das hinsichtlich des Farbtones der Präparate vorteilhaftere Terpentin-Benzin-Intermedium liefert ebenfalls gute Ergebnisse. Das Endvolumen der ein Jahr in Formol fixierten Gehirnstücke betrug nach dieser Behandlung 69,5%.

Bei der Verwendung gleicher Chemikalien schrumpfen Kleinhirne weniger als Grosshirne. Nach langfristiger (einjähriger) Formolfixierung ist die durch die Paraffinimprägnation bedingte Schrumpfung des Gehirngewebes um 10% geringer als nach kürzerer Formolfixierung.

LITERATUR

1. ARA, P. (1933): Un progrès dans l'embaumement. C. R. Ass. Anat. 32, 19. — 2. ARA, P. (1934): Zur Geschichte und den heutigen Ergebnissen der Paraffinierungsmethode. Anat. Anz. 78, 117. — 3. FRÉDÉRICQ, L. (1876): Communication préalable sur quelques procédés nouveaux de préparation des pièces anatomiques sèches. Bull. Acad. Royale Sci. Belg. 41, 1319. — 4. FRÉDÉRICQ, L. (1879): Sur la conservation des pièces anatomiques par la paraffine. Bull. Soc. Anthrop. Paris. 2, 18. — 5. FRÉDÉRICQ, L. (1879): Conservation à sec des tissus mous par la paraffine. Zit. Ara (2). — 6. FRÉDÉRICQ, L. (1879): Conservation à sec des tissus mous par la paraffine. Gaz. méd. Paris. Serie 6a I, 45. — 7. FRÉDÉRICQ, L. (1879): Paraffinpräparate. Zit. Ara (2). — 8. FRÉDÉRICQ, L. (1880): Emploi de la paraffine dans la préparation des pièces anatomiques sèches. C. R. Congr. Sci. Méd. Amsterdam. 540. (Séance Septembre 1879). — 9. GELLÉRT, A. (1930): Az emberi csontok térfogatarányai és porozitászviszonyai tíz egyén csontvázán. A csigolyák és a csontos gerincoszlop szakaszainak térfogatarányai. Magy. Orv. Arch. 31, 229. — 10. GELLÉRT, A. (1931): Die Volumenproportionen und Porositätsverhältnisse der Wirbel und einzelnen knöchernen Wirbelsäulenabschnitte an 10 Individuen. Morph. Jahrb. 68, 46. — 11. GELLÉRT, A. (1935): Paraffinozott anatómiai készítmények előállítása. A m. kir. Ferenc József Tudományegyetem Leíró- és Tájékoztató Intézetének közleménye. 20. füz. — 12. GELLÉRT, A., BACSICH, P. (1936): Museum specimens prepared by paraffin impregnation. J. Anat. 71, 1. — 13. GELLÉRT, A. (1944): Az arcvonások megőrzése paraffinbeágyazással. Orvostud. Közl. 15, 364. — 14. GELLÉRT, A. (1951): Paraffin Impregnation and Shrinkage of Tissues. Acta Morph. Hung. 1, 443. — 15. HOCHSTETTER, F. (1927): Über ein Verfahren zur Herstellung von Trockenpräparaten von Tieren und Pflanzen in natürlicher Form und Farbe. Zit. Ara (2). — 16. HOCHSTETTER, F. (1927): Die Paraffindurchtränkung zur Erhaltung von Tieren und Pflanzen in ihrem natürlichen Aussehen. Zit. Ara (2). — 17. KLINGLER, J. (1935): Erleichterung der makroskopischen Präparation des Gehirns durch den Gefrierprozess. Schweiz. Arch. Neurol. 36, 2. 247. — 18. SCHMEIDEL, G. (1925): Ein Präparationsverfahren zur Erhaltung natürlicher Form und Farbe. Zit. Ara (2). — 19. SCHMEIDEL, G. (1925): Wie Paraffinpräparate hergestellt werden. Anat. Anz. Ergb. 60, 282. — 20. SCHMEIDEL, G. (1938): Methoden zur Konservierung von Organen und ganzen Organismen. Abderhalden's Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. VII, B. II. Urban und Schwarzenberg. Berlin—Wien. — 21. SCHWALBE, G. (1886): Über Herstellung von trockenen Gehirnpräparaten für den anatomischen Unterricht. Anat. Anz. 1, 322.

ОПЫТ ПО ИМПРЕГНИРОВАНИЮ ПАРАФИНОМ ПРЕПАРАТОВ
ГОЛОВНОГО МОЗГА

А. ГЕЛЛЕРТ

Автор оценивает заслуги *Леона Фредерика*, впервые применявшего импрегнирование парафином для изготовления анатомических препаратов. Он сам уже свыше 20 лет с успехом применяет этот метод для изготовления препаратов суставов, мышц, сосудов, нервов и внутренностей, однако, только с 1955 года занимается импрегнированием препаратов головного мозга парафином.

Согласно результатам опытов он считает нижеследующий способ самым лучшим: 1. Фиксирование в 4%-ом формалине по крайней мере в течение года. 2. Многократное промывание в колодезной воде в течение 5—7 дней. 3. Обезвоживание в серии ацетона или спирта. 4. Пропитывание в равных частях смеси бензин-скинидара, в зависимости от величины материала, в течение 2—6 недель, при многократной смене жидкости. 5. Заливка препарата под вакуумом в расплавленный парафин с точкой плавления 46—48° С.

Расплывчатость контраста между белым и серым веществами на срезах головного мозга во время импрегнирования автору удалось предотвратить путем предварительного охлаждения консервированных мозгов до 10° С.

Путем определения объема мозговых кусочков автор исследовал также и сморщивающее действие парафинового импрегнирования на мозговую ткань. Наименьшее сморщивание мозговые кусочки показали в случае обезвоживания спиртом и применения скинидара в качестве промежуточной среды. (Их объем уменьшается после фиксации формалином в течение года до 75,3%.) С точки зрения цвета препаратов более подходящей промежуточной средой является скинидар-бензин, дающий также хорошие результаты. (Объем уменьшался после фиксации формалином в течение года до 69,5%.)

Мозжечок сморщивается в меньшей степени чем большой мозг, в случае применения тех же самых химических веществ. Продолжительная фиксация формалином (в течение года) снижает сморщивание мозговой ткани при импрегнировании парафином на приблизительно 10%.

PARAFFINE IMPREGNATION OF BRAIN PREPARATIONS

A. GELLÉRT

Tribute is paid to *LEON FRÉDÉRICQ*, who was the first to use paraffine impregnation for the preparation of anatomical specimens. The present author has been employing this technique for 20 years for making preparations of joints, muscle, blood vessels, nerves and viscera, but began to make brain preparations by the paraffine impregnation technique in 1955 only.

The following method has proved the most effective. 1. Fixation in 4 per cent formol for at least 1 year. 2. Repeated washing in tap water, for 5 to 7 days. 3. Dehydration in acetone or alcohol. 4. Impregnation with an equal mixture of petrol and turpentine, with several renewals, for 2 to 6 weeks, depending on the size of the specimen. 5. Embedding in paraffine (melting point 46 to 48 °C) in vacuum.

During impregnation of brain slices, the contrast between the white and gray matter tends to fade. This could be successfully prevented by pre-cooling the preserved brains to —10 °C.

Shrinking due to impregnation with paraffine has been studied by determining the volume of pieces of brain. Shrinkage was the least after dehydration with alcohol and the use of turpentine as intermedium. The volume of these specimens decreased to 75,3 per cent after one year of fixation in formol. Good results have been obtained from the use of a turpentine-petrol intermedium, which also preserves the colour of the preparations; their volume was reduced to 69,5 per cent after one year of fixation in formol.

Cerebella treated with the same chemicals shrink less than the cerebra. Prolonged fixation (for one year) in formol reduces by amount 10 per cent the shrinkage of brain tissue due to impregnation with paraffine.

Prof. Dr. Albert GELLÉRT, Szeged, Kossuth L. s. u. 40. Ungarn.