

testicular hyaluronidase, while other sections, which served as controls, were incubated with saline solution and with filtered saliva. This procedure being followed, the identity of the results of the chemical and those of the histochemical methods was complete; a deeper metachromatic staining was found in the derms of skins which, by chemical means, proved to be richer in acid mucopolysaccharides and *vice versa*. On the other hand, the staining was not altered by ptyaline and it disappeared completely after treatment with hyaluronidase, which made it possible to ascribe it to the hyaluronic and chondroitinsulphuric acids, both being hydrolyzed by this enzyme⁴.

Further study of successive sections of the same material by other histochemical methods widely used for polysaccharides, such as those of McMANUS⁵ with periodic acid-SCHIFF and HALE'S⁶, improved by RINEHART and ABUL-HAJ⁷, with colloidal iron, have enabled us to demonstrate, in the light of such chemical data as we possess, their relative efficiency for the demonstration of acid mucopolysaccharides. A mild staining was obtained with both methods in the derms of the various skins, while no significant change was appreciated corresponding to the varying concentration of the studied substances. No change in the degree of staining which could be attributed to the hyaluronic or chondroitinsulphuric acids was likewise noticed after treatment with ptyaline and hyaluronidase under the above-mentioned conditions; by contrast, the response to colloidal iron appeared to be more intense in some cases.

These results confirm that, despite its well-known affinity to various polysaccharides, McMANUS' method does not stain the acid mucopolysaccharides⁸ and that HALE'S method, which was specifically suggested for these substances, is not more valuable for this purpose⁹. The metachromatic reaction, however, notwithstanding some objections¹⁰, is quite simple and, if duly carried out with adequate precautions and supported by incubation with hyaluronidase, retains an undeniable practical value in the demonstration of acid mucopolysaccharides¹¹.

E. DEL CONTE and M. STUX

Laboratorios Experimentales, Lavalle 332, Buenos Aires, March 12, 1956.

Résumé

L'efficacité relative de certaines méthodes histo-chimiques utilisées habituellement pour la mise en évidence des mucopolysaccharides acides a été étudiée sur des peaux de rats soumises à des conditions expérimentales diverses. Les différentes concentrations des subs-

tances en étude étaient connues, ayant été quantitativement déterminées par la méthode chimique de PEARCE et WATSON. La réaction métachromatique, réalisée avec les précautions nécessaires et avec le concours de la digestion par l'hyaluronidase, nous a fourni une image fidèle de la concentration de mucopolysaccharides acides. Ce n'est pas le cas lorsqu'on emploie l'acide périodique-SCHIFF ou le fer colloïdal qui ne semblent pas être très utiles pour la mise en évidence des substances étudiées.

PRO LABORATORIO

Ultramikrotom mit mechanischem Vorschub

Durch die grundlegenden Arbeiten der Schulen von PORTER und SJÖSTRAND ist gezeigt worden, dass hochauflösende Elektronenmikroskopie von Dünnschnitten nur möglich ist, wenn die Schnittdicke unter 300 Å liegt. Das beste erreichbare Auflösungsvermögen beträgt ungefähr $\frac{1}{10}$ der Dicke des Objektes¹. Auf verschiedener Grundlage wurden mehrere brauchbare Mikrotome entwickelt. Diese unterscheiden sich im wesentlichen nach der Art des Vorschubs und der Bewegung, die der Objektkebel beschreibt. Allen erfolgreichen Instrumenten ist gemeinsam, dass der Block nie hinter dem Messer zurückgeführt wird. Bei diesem Zurückführen wird der soeben abgehobene Schnitt auf den Block zurückgezogen; dadurch wird dieser benetzt, was ein weiteres Schneiden verunmöglicht. Thermischen Vorschub benutzen die Mikrotome von SJÖSTRAND², HODGE, HUXLEY und SPIRO³, v. BORRIES⁴ und GAUTIER⁵. In allen diesen Mikrotomen wird der Block in einer zum Messer parallelen Ebene rotiert. Im Mikrotom von FERNANDEZ-MORAN⁶ hingegen wird er in einer zum Messer senkrechten Ebene bewegt. Im einzigen Mikrotom mit mechanischem Vorschub (PORTER und BLUM⁷) wird ein langer Objektkebel mit Hilfe einer Führung seitlich am Messer vorbei zurückgeführt. Ein minimaler mechanischer Vorschub von 200 Å kann eingestellt werden.

In dem hier zu beschreibenden Mikrotom (vgl. Abb. 1) verwenden wir ebenfalls einen mechanischen Vorschub, jedoch eine rotierende Bewegung des Blocks in einer zum Messer senkrechten Ebene⁸. Das Mikrotom ist für Handantrieb vorgesehen.

Der Vorschubmechanismus wurde unverändert übernommen aus dem früher mit DANON⁹ entwickelten und von Trüb, Täuber & Cie. fabrizierten Mikrotom: er ist zusammengesetzt aus der Bewegung einer Mikrometer-

⁴ M. B. MATHEWS, S. ROSEMAN, and A. DORFMAN, *J. biol. Chem.* 188, 327 (1951).

⁵ J. F. A. McMANUS, *Nature* 158, 202 (1946).

⁶ C. W. HALE, *Nature* 157, 802 (1946).

⁷ J. F. RINEHART and S. K. ABUL HAJ, *Arch. Path.* 52, 189 (1951).

⁸ D. V. DAVIES, *Stain Techn.* 27, 65 (1952). – A. G. E. PEARSE, *Histochemistry; theoretical and applied* (J. & A. Churchill Ltd., London 1953). – G. GOMORI, *Microscopic histochemistry; principles and practice* (The University of Chicago Press, Chicago 1952).

⁹ D. V. DAVIES, *Stain Techn.* 27, 65 (1952). – G. GOMORI, *Microscopic histochemistry; principles and practice* (The University of Chicago Press, Chicago 1952).

¹⁰ B. SYLVÉN and H. MALMGREN, *Labor. Invest.* 1, 413 (1952).

¹¹ A. G. E. PEARSE, *Histochemistry; theoretical and applied* (J. & A. Churchill Ltd., London 1953). – R. E. MANCINI (personal communication).

¹ V. E. COSSLETT in: *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. 1 (Acad. Press Inc., 1955).

² F. S. SJÖSTRAND, *Exper.* 9, 114 (1953).

³ A. J. HODGE, H. E. HUXLEY und D. SPIRO, *J. Histochem. Cytochem.* 2, 54 (1954).

⁴ B. v. BORRIES, *Exposition Intern. Conference on Electron Microscope*, London 1954.

⁵ A. GAUTIER, *Bull. Micr. appl.* 5, 20 (1955).

⁶ H. FERNANDEZ-MORAN, *Conference latinamer. neurocir.* VI, Montevideo 1955.

⁷ K. R. PORTER und J. BLUM, *Anat. Rec.* 117, 685 (1953).

⁸ E. KELLENBERGER und A. RYTER, *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.* 18, 1122 (1955).

⁹ D. DANON und E. KELLENBERGER, *Arch. Sci. Genève* 3, 169 (1950).

schraube, die eine geneigte Ebene vorschiebt; von dieser Ebene aus wird eine Hebeluntersetzung betätigt, gemäss dem klassischen Prinzip des Rocking-Mikrotoms. Die Mikrometerschraube wird durch ein Zahnrad bewegt. Ein Vorschub von 1–20 Zähnen kann durch einen einfachen Stellhebel am Handrad vorgewählt werden. Die Neigung der Glasebene ist regulierbar, so dass je Zahn ein Vorschub von 50 bis 500 Å eingestellt werden kann. Der Block wird in einen speziellen kleinen Halter eingeschraubt, der dann im Objektkebel festgeklemmt wird. Dieser Hebel wird in eine rotierende Bewegung

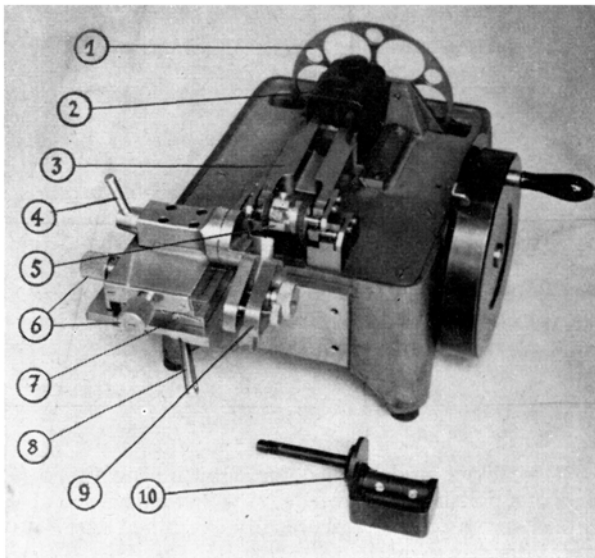


Abb. 1. Prototyp des Mikrotoms. 1 Zahnrad, das die Mikrometerschraube dreht; 2 geneigte Ebene mit regulierbarem Winkel; 3 Vorschubhebel; 4 Bajonettverschluss des Messerhalters; 5 rotierender Objektkebel mit der Blockpatrone; 6 Feintriebe zum Verschieben des Messers; 7 Blockierung der Feintriebe; 8 Blockierung der Grobeinstellung; 9 Glasmesserhalter; 10 Metallmesserhalter.

versetzt um eine Achse, die auf dem Vorschubhebel gelagert ist. Der eingestellte Vorschub wird dadurch dieser Achse mitgeteilt. Die Bewegung des Objekthebels wird erzeugt vom gemeinsamen Handrad, mit dem auch der Vorschub betätigt wird. Sie wird übertragen durch einen doppelten Flach- oder Keilriemenantrieb und durch eine Friktionskupplung. Besonders wichtig ist die Lagerung: Bei den allgemein üblichen sehr grossen Lagerflächen und infolgedessen sehr geringen Lagerdrücken ist die Stabilität sehr gering. Kleine von aussen wirkende Kräfte vermögen leicht die Lage der Achse zu verändern. Da die elastische Deformation der Lager nicht linear ist, sondern Funktion einer höheren Potenz, haben wir sehr grosse Lagerdrücke angewendet⁹. Im vorliegenden Prototyp haben wir die schon früher im Trib-Täuber-Mikrotom eingeführte Lagerung einer Stahlachse auf zwei festen Stahlkugeln beibehalten. Andere, auf dem gleichen Prinzip beruhende Lösungen sind noch im Studium. Es zeigte sich, dass diese hohen Lagerdrücke eine sehr stabile Lage der Achse ermöglichen, die unempfindlich für äussere Einflüsse ist und bei der der Ölfilm konstante Dicke zu haben scheint. Der hohe Druck wird mit einer regulierbaren Spannvorrichtung durch die beiden Riemen erreicht. Je Kugel arbeiten wir mit einer Kraft von 1 bis 3 kg. Die Resultierende ist so gerichtet, dass eine wesentliche Komponente in Richtung des Vorschubs

besteht. Diese Komponente allein ist massgebend für die Stabilität in dieser Richtung und die dadurch bedingte Gleichmässigkeit der Schnittdicke.

Eine neue Messerhaltereinrichtung gestattet, auf einfache Weise die verschiedenen Messerhalter gegeneinander auszutauschen, so dass klassische Glasmesser¹⁰ oder Rasierklagen¹¹ angewendet werden können. Eine Grobeinstellung gestattet Bewegungen in einer horizontalen Ebene sowie Veränderung des Winkels zwischen Messerschneide und Block. Die Feineinstellung in zwei zueinander senkrechten Richtungen gestattet das Messer an den Block anzunähern und die guten Messerstellen aufzusuchen. Selbstverständlich ist auch der Schneidewinkel mit Hilfe einer Gradeinteilung einstellbar. Die Wanne, wie sie HILLIER und GETTNER¹² zum Auffangen der Schnitte eingeführt haben, ist im Falle des Stahlklagenhalters so ausgeführt, dass die Klinge von innen her befestigt wird. Dadurch fällt das Abdichten weg. In Messing ausgeführt, ist sie schwarz vernickelt oder chemisch geschwärzt, was die Beobachtung der freischwimmenden Schnitte wesentlich erleichtert. Schwarz eloxierte Aluminiumwannen bzw. parkerisierte Stahlwannen sind vorgesehen, um die elektrolytische Korrosion zwischen Messerstahl und Messing einzuschränken.

Die praktischen Versuche wurden zusammen mit A. RYTER ausgeführt. Verschiedene Gewebe in Plexiglas-einbettung¹³ wurden untersucht. Sowohl Glasmesser als auch geschärfte Rasierklagen wurden angewendet. Alle Schnitte wurden auf Wasser mit 10–12% Alkoholzusatz aufgefangen. Zur Verminderung der Elektrokorrosion wurde Ammoniak oder Morpholin zugegeben. Folgende Eigenschaften wurden festgestellt:

Das Mikrotom ist thermisch unempfindlich. Dies rührt davon her, dass der Objektkebel sehr kurz ist. Auf mechanische Einflüsse, wie sie ein Gebrauch im Laboratorium ohne Spezialtische mit sich bringt, sprach das Mikrotom nicht an. Regelmässige Schnittserien mit 100 Å Vorschub konnten bei guten Messern und kleinen Pyramiden leicht erhalten werden. Bei jedem Durchgang wurde ein Schnitt erzeugt. Das erhaltene Band enthielt allerdings von Zeit zu Zeit auch dünnere oder dickere Schnitte als 100 Å. Ist das Messer schlecht, so weicht der Block elastisch aus, so dass nur noch bei jedem zweiten oder dritten Durchgang geschnitten wird. Schnittflächen bis zu 0,1 mm Seitenlänge konnten mit Glasmessern und einem Vorschub von 200 Å erreicht werden. Vibrationen, die zu Wellen im Schnitte führen, wurden bei Metacrylateinbettungen nicht beobachtet.

Vorrichtung zur Kontrolle der Schneide von geschärften Metallklagen

Nach der Technik von SJÖSTRAND geschliffene Rasierklagen¹¹ werden im Dunkelfeld-Auflichtmikroskop bei 900facher Vergrösserung auf die Qualität kontrolliert. Auf beiden Seiten werden die guten Stellen ausgemessen und nachher durch Rechnung festgestellt, wo eine beidseitig gute Schneide vorhanden ist. Um diese Rechnung abzukürzen, haben wir ein kleines Gerät konstruiert, das

¹⁰ H. LATTA und J. F. HARTMANN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 74, 436 (1950).

¹¹ F. S. SJÖSTRAND, Z. wiss. Mikrosk. 62, 65 (1954).

¹² J. HILLIER und M. E. GETTNER, Science 112, 520 (1950).

¹³ S. B. NEWMANN, E. BORYSKO und M. SVERDLOW, J. Res. nat. Bur. Stand. 43, 183 (1949).