

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Münster i. W.
[Direktor: Prof. Dr. W. Groß †].)

Beitrag zur Technik der Schnittveraschung. Eine Methode zur lokalisierten Darstellung von Mineralsalzen im veraschten Schnitt.

Von
Dr. med. et ing. Chr. Hackmann.

Mit 1 Abbildung im Text.

(Eingegangen am 12. August 1933.)

I.

Die noch verhältnismäßig neue und für die allgemeine Anwendung wenig ausgebauta Methode der Schnittveraschung läßt für das Arbeits gebiet der normalen und pathologischen Anatomie eine Reihe wichtiger Feststellungen über die Mineralsalzverteilung im Gewebe erhoffen, wenn es gelingt, die zur Zeit noch bestehenden Mängel und technischen Schwierigkeiten zu beseitigen.

Die vollkommene Erreichung des eigentlichen Ziels der Schnittveraschung, nämlich die Ermittlung von Menge und Art der mineralischen Stoffe unter Erhaltung der ursprünglichen Anordnung im Gewebe wird durch eine Reihe von Umständen erschwert. Vorbedingung für die Verwendbarkeit der Methode zu eingehenderen Untersuchungen ist zunächst die Möglichkeit, Gewebsschnitte unter Vermeidung von Verlusten an Mineralstoffen herzustellen. Bekanntlich hat *O. Schultz-Brauns* vor einiger Zeit ein Verfahren angegeben, nach welchem es durch Tiefkühlung des Mikrotommessers und Anwendung einer besonderen Technik gelingt, Schnitte von unfixiertem Material zum Zwecke der Veraschung ohne Anwendung irgendeiner Flüssigkeit unmittelbar auf den Objektträger zu übertragen. Es soll so erreicht werden, daß die Schnitte während des ganzen Arbeitsvorganges mit keiner Flüssigkeit, die etwa Aschebestandteile aus dem Schnitt herauslösen könnte, in Berührung kommen. Trotz dieses zunächst sehr einleuchtenden Vorgehens erscheint es nicht sicher, daß selbst bei guter Beherrschung der *Schultz-Braunsschen* Technik Verluste sich immer vermeiden lassen. Infolge der niedrigen Temperatur des gekühlten Messers beschlägt sich dieses und der erzielte Schnitt aus der wärmeren Umgebungsluft heraus mit Feuchtigkeit, es wird also doch ein noch dazu sehr wirksames Lösungsmittel an den Schnitt herangebracht,

welches der Menge nach bei den Größenordnungen, mit denen wir es zu tun haben, sicherlich ausreicht, Verluste oder doch zum mindesten Verlagerungen von Salzen herbeizuführen, da die meisten der hier in Frage kommenden Salze außerordentlich wasserlöslich sind. Als weitere Nachteile der Methode möchte ich den Umstand ansehen, daß man gezwungen ist das frische Material sofort zu verarbeiten, was sich häufig schon aus rein äußerlichen Gründen nicht ermöglichen läßt, sowie weiter, daß die veraschten Schnitte unfixiert, dagegen die als Vergleichspräparate dienenden Schnitte fixiert sind, so daß man keine völlig einheitlichen Bedingungen für die vergleichende Beurteilung hat.

Für den Vorgang der Veraschung selbst ist es nicht selten und ganz besonders bei sehr fettreichem Material ratsam bzw. nötig, eine Entfettung durchzuführen. Bei der Erhitzung des Gewebes tritt ein Stadium ein, wo das verkohlende Material beginnt, sich sehr stark aufzublähen und durch Bildung einer teerig-schaumigen Masse sein Volumen erheblich zu vermehren. Diese Erscheinung, welche darauf beruht, daß die aus der Masse aufsteigenden Gasblasen mit den ölig-teerigen Stoffen eine Art zähnen Schaum bilden, ist im wesentlichen dafür verantwortlich zu machen, daß die feinsten Gewebsstrukturen bei der Veraschung nicht vollkommen erhalten werden und man muß um gute Aschebilder zu erhalten sein größtes Augenmerk darauf richten diesen Vorgang möglichst zu unterdrücken. Ich habe die Angabe von *Schultz-Brauns*, daß man durch anfangs sehr langsame Steigerung der Temperatur das Aufblähen vermindern kann, stets bestätigt gefunden; es ist jedoch nicht möglich, den störenden Vorgang auf diese Weise ganz zu verhindern. Eine weitere Verbesserung erreicht man durch eine Entfettung der Schnitte, da die Fettsubstanzen wesentlich zur Bildung zähflüssiger Verkohlungsprodukte beitragen. Die Gefahr, durch das benützte Fettlösungsmittel einen Ascheverlust zu erleiden ist gering, wenn man das Lösungsmittel entsprechend auswählt.

O. Henkel, ferner *M. A. Polikard* und neuerdings *F. Herrmann* haben in Anbetracht der Schwierigkeiten der *Schultz-Braunsschen* Methode zur Herstellung von veraschten Schnitten die Fixierung des Materials in absolutem Alkohol mit nachfolgender Paraffineinbettung befürwortet. Dieses Verfahren ist wesentlich bequemer besonders hinsichtlich der Herstellung von aufeinanderfolgenden Schnitten. Die Aschebilder sind bei dieser Methode allerdings im allgemeinen ascheärmer und es muß mit einem Verlust von Mineralstoffen gerechnet werden. Die Löslichkeit der Salze ist in absolutem Alkohol zwar an sich sehr gering, man muß jedoch berücksichtigen, daß das frische Gewebe selbst sehr wasserhaltig ist und daß daher der Alkohol in der nächsten Umgebung des Gewebsstückchens zunächst nicht absolut bleibt, sondern durch das Gewebswasser erheblich verdünnt wird. Er wirkt dann grundsätzlich so wie ein wasserhaltiger Alkohol, dessen Lösungsvermögen für Alkalosalze recht erheblich ist.

F. Herrmann hat bei seinen Versuchen sich noch aus dem Grunde für die Alkoholfixierung entschieden, weil er annimmt, daß es durch den Gefrierprozeß zu einer Beeinflussung der Salzlagerung durch Bildung von „endogenem“ Eis kommt. Es soll nicht bestritten werden, daß derartige Einwirkungen der niedrigen Temperaturen im Bereich der Möglichkeit liegen, jedoch gilt auch hier meines Erachtens der Grundsatz, daß das Aschenbild seine wesentliche Auswertung nur im Vergleich mit dem gefärbten histologischen Präparat finden kann, für welches — soweit es sich um Gefrierschnitte handelt — in unserem Falle die gleichen Voraussetzungen Gültigkeit haben. Ich habe mich bei meinen eigenen Versuchen nicht davon überzeugen können, daß gegen das Gefrierschneiden ein ernstlicher Einwand aus dem obigen Gesichtspunkte heraus zu erheben ist.

Aus Vorstehendem wird deutlich, daß die Methodik zur Herstellung von veraschten Schnitten noch keineswegs in völlig befriedigender Weise entwickelt ist; es sind sowohl was den Verlust von Aschebestandteilen, wie auch was die Einfachheit des Verfahrens anbetrifft noch eine Reihe von Mängeln vorhanden, die dazu anregen, nach Verbesserungsmöglichkeiten zu suchen.

Was die Frage Fixierung oder Nichtfixierung des Materials angeht, so ist kaum zu bestreiten, daß die Fixierung große Vorteile bietet, vorausgesetzt, daß sie ohne Verlust an Salzen durchgeführt werden kann. Eine Möglichkeit, dieses Ziel in idealer Weise zu erreichen, gibt die schon früher von *W. Groß* angegebene Fixierung in Formaldehyddämpfen, welche ich bei meinen Versuchen mit gutem Erfolg verwendet habe. Das in Scheiben von etwa 5—6 mm Dicke geschnittene Material wird in einen Exsiccator gebracht, dessen unterer Teil mit 40%iger Formaldehydlösung gefüllt ist; außerdem enthält der Exsiccator ein Schälchen mit Chlorcalcium, welches verhindert, daß die Gewebsstücke feucht werden. Nach einigen Tagen ist das Material ausreichend gehärtet und zwar lassen sich nach meinen Erfahrungen von den Objekten dann am leichtesten gute Schnitte herstellen, wenn der Aufenthalt in Formaldampf wenigstens etwa 8 Tage gedauert hat. Man kann jedoch, wenn dies aus irgendeinem Grunde erwünscht ist, auch mit kürzeren Zeiten auskommen. Zu kurz gehärtetes bzw. zu feuchtes Material zeigt den Nachteil, daß die Schnitte etwas klebrig sind und sich nicht so leicht wie sonst glatt auf den Objektträger aufbringen lassen. Die Formoldampffixierung hat meines Erachtens für die Schnittveraschung außerordentliche Vorteile, vor allem ist man zeitlich unabhängig, d. h. man kann z. B. wertvolles Material, das aus äußeren Gründen nicht sofort in Arbeit genommen werden kann, fast beliebig lange Zeit aufbewahren.

Das Gewebe kommt mit keiner Flüssigkeit in direkte Berührung und es lassen sich in üblicher Weise Gefrierschnitte anfertigen, ohne daß eine besondere Kühlung des Mikrotommessers nötig wird. Die von dem fixierten Material hergestellten Schnitte können ohne weiteres auch

unverascht gefärbt werden und man hat so eine gute Vergleichsgrundlage, da die gefärbten und die veraschten Schnitte sich in Größe und Anordnung vollkommen entsprechen. Ist das Material genügend lange fixiert, so macht es in der Regel keine sehr großen Schwierigkeiten die Schnitte unmittelbar vom Messer auf die Objektträger zu bekommen. Ich habe mich jedoch durch Versuche überzeugen können, daß es, um einwandfreie Aschebilder zu bekommen keineswegs erforderlich ist, von der einfacheren Methode des Aufziehens aus einer Flüssigkeit abzugehen; man kann vielmehr die Schnitte, ohne einen Ascheverlust befürchten zu müssen, für kürzere Zeit in ein mit Wasser nicht mischbares Medium (Xylol, Petroleum, Paraffin usw.) bringen. Ich habe schließlich die Herstellung und Veraschung der Schnitte, nachdem einige Fragen durch Vorversuche geklärt worden waren, in folgender Weise vorgenommen: Nach erfolgter Fixierung in Formoldampf (8—10 Tage oder länger) wurden die etwa 5 mm dicken Gewebsscheiben auf dem Gefriermikrotom in üblicher Weise geschnitten. Da eine vorherige Wässerung natürlich nicht erfolgen darf, haften die Stückchen schlecht auf dem Mikrotomtisch und man muß diesem Mangel durch ein Klebemittel abhelfen, was am besten dadurch geschieht, daß man den Tisch mit etwas Klebstoff bestreicht (z. B. Pelikanol), dann den Klebstoff kurz festfrieren läßt und das Gewebsstück in die eben gefrierende Masse eindrückt. Auf diese Weise haftet das Stückchen unbedingt fest und ein Einfluß des Klebstoffs auf das Gewebe wird ebenfalls mit Sicherheit vermieden, da nur von dem oberen Teil des Stückchens, der mit dem Klebstoff nicht in Berührung gekommen ist, Schnitte entnommen werden. Zum Auffangen der Schnitte werden 2 Schalen bereitgestellt, eine mit destilliertem Wasser für die zur Färbung bestimmten Vergleichsschnitte, und eine mit Petroleum für die zur Veraschung bestimmten Schnitte. Es werden dann jeweils aufeinanderfolgende Schnitte abwechselnd in die eine und in die andere Schale gebracht. Zum Auffangen der zu veraschenden Schnitte habe ich Petroleum am geeignetsten gefunden, weil die an sich wasserhaltigen Schnitte sich darin eine gewisse Zeit lang nicht benetzen und weil ein Verlust von Salzen wegen des minimalen Lösungsvermögens nicht zu befürchten ist. Gegenüber Xylol oder sonstigen noch in Frage kommenden Flüssigkeiten ist die langsamere Verdunstung, dem Paraffinum liquidum gegenüber die Leichtflüssigkeit ein Vorteil. Nach dem Aufziehen auf den Objektträger, welches zweckmäßig sofort im Anschluß an das Schneiden vorgenommen wird, entfernt man das noch anhaftende Petroleum durch einen mehrfachen Streifen Filterpapier wie üblich und bewahrt dann die Schnitte staubfrei bis zur Veraschung auf.

Die Veraschung der Schnitte habe ich im elektrischen Ofen in der Weise vorgenommen, daß die Temperatur im Verlaufe von etwa $\frac{1}{2}$ Stunde von Zimmertemperatur bis auf 350° anstieg. Ich habe mich bemüht, Temperaturen von mehr als 350 bis höchstens 400° zu vermeiden und

konnte mit diesen verhältnismäßig niedrigen Temperaturen stets in kurzer Zeit eine vollkommene Veraschung erzielen. Die erforderliche Zeitdauer schwankte je nach Dicke der Schnitte und Art des Gewebes zwischen $\frac{1}{2}$ und 2 Stunden. Ich konnte bei mehrfachen zu diesem Zwecke angestellten Versuchen niemals Anhaltspunkte dafür gewinnen, daß bei der eingehaltenen Temperatur und Zeitdauer ein Verlust von Asche durch Verdampfen erfolgt. Es hat sich auch, wie nachstehend noch näher ausgeführt werden soll, stets gezeigt, daß in den fertig veraschten Schnitten — sofern durch entsprechende Vorsicht ein Verlust von wasserlöslichen Salzen vermieden wurde — Alkalosalze, bei denen allenfalls eine Verdampfung bei höherer Temperatur in Frage käme, reichlich vorhanden waren. Bringt man auf die Objektträger kleine Tröpfchen von Salzlösungen und erhitzt, dann finden sich die Salze unter den obenerwähnten Bedingungen nach der Veraschung des Schnittes völlig unvermindert wieder. Die für die Veraschung benützten Objektträger habe ich einer besonderen Vorbehandlung unterzogen. Die fixierten und in Petroleum aufgefangenen Schnitte haften beim Erhitzen nicht genügend am Glase. Aus diesem Grunde wurden die Objektträger nach Reinigung mit Alkohol mittels eines Pinsels mit einer sehr dünnen Schicht einer 2%igen Gelatinelösung bestrichen und durch Erwärmen an der Flamme getrocknet.

Die Gelatinelösung muß selbstverständlich soweit salzfrei sein, daß sie bei der angewendeten Dicke der Schicht keinen mikroskopisch sichtbaren Glührückstand ergibt. Ich verwendete holländische pulverisierte Gelatine (Hersteller Lijm en Gelatine fabriek Delft), deren 2%ige Lösung durch Dialyse in mit Kollodium ausgegossenen Diffusionshülsen noch weitgehend salzfrei gemacht wurde. Die präparierten Objektträger können beliebig lange aufbewahrt werden, so daß man zweckmäßig einen größeren Vorrat auf einmal herstellt. Die Verwendung dieser mit einer Gelatineschicht versehenen Objektträger erwies sich in mehrfacher Hinsicht als sehr vorteilhaft. Abgesehen davon, daß ein Ablösen der Schnitte nicht mehr erfolgt, zeigte es sich nämlich, daß diese „Einhbettung“ den Vorgang der Verbrennung wesentlich schonender gestaltet. Die dünne Gelatineschicht verkohlt gleichzeitig mit dem Schnitt, ohne daß eine nennenswerte Teerbildung auftritt. Die Schnitte ändern deshalb ihre Form und Größe so gut wie nicht, da offenbar die gleichzeitig verkohlende Gelatineschicht Lageverschiebungen hindert bzw. einschränkt. Man erzielt auf diese Weise Aschebilder, welche in der Anordnung den gefärbten histologischen Vergleichspräparaten außerordentlich gut entsprechen.

II.

Der veraschte Gewebsschnitt zeigt ohne weitere Behandlung die Verteilung der mineralischen Stoffe im Gewebe und läßt insbesondere erkennen, ob in gewissen Bezirken mehr, in anderen weniger Mineral-

bestandteile vorhanden sind. Dies gilt für die Beurteilung ein und desselben Schnittes bzw. ein und desselben Gewebsstückes, wenn die Schnitte von gleicher Dicke sind. Dagegen ergeben sich für den Vergleich von verschiedenartigen Schnitten miteinander wesentliche Einschränkungen. Man braucht sich nur zu vergegenwärtigen, daß die Aschedichtigkeit von der Dichtigkeit des Gewebes, von dem jeweiligen Quellungszustande abhängt und es ist von grundsätzlicher Bedeutung, daß (im Gegensatz zur Gewichtsanalyse) bei der Schnittveraschung die Beurteilung der Aschenmenge auf das Volumen des Gewebes bezogen wird, das seinerseits als nicht vollkommen konstant anzusehen ist. Man würde also, um ein Beispiel anzuführen, wenn man von ein und demselben Gewebestück gleich dicke Schnitte herstellt und verascht, völlig verschiedene Aschenmengen finden, sobald zwischen 2 Untersuchungen eine Volumänderung des Gewebes eine Schrumpfung oder Quellung stattgefunden hat. Selbstverständlich wird durch diesen Umstand der Wert der Veraschungsmethode für die Untersuchung von Geweben hinsichtlich der Mineralstoffverteilung nicht beeinträchtigt; immerhin aber wird wegen der gegebenen Einschränkung die Schnittveraschung vor allem da sich als nutzbringend erweisen, wo es sich um die topochemische Untersuchung lokalisierter pathologischer Veränderungen handelt. Der Hauptvorteil besteht demnach in der Möglichkeit des Vergleichs mit dem histologischen Präparat und in der Erhaltung der Gewebsstruktur, so daß auch Gewebelemente, die der chemischen Mikroanalyse bisher nicht zugänglich waren, näher untersucht werden können. Daraus ergibt sich zugleich eine weitere wichtige Aufgabe, nämlich die topochemische Identifizierung der einzelnen Aschebestandteile. Das Hauptgewicht ist auch hier auf den Nachweis unter möglichst vollkommener Erhaltung der Ascheanordnung zu legen; denn die Zusammensetzung der Asche in normalen und pathologisch veränderten Organen ist von zahlreichen makrochemischen Untersuchungen großenteils bekannt. So wissen wir hinsichtlich der Mengenverteilung, daß bei den meisten normalen Geweben die Phosphate der Alkalien und des Calciums den Hauptaschebestandteil ausmachen, in großem Abstande erst folgen dann die übrigen Salze. Es setzt sich die Asche von Leber, Milz und Niere — die übrigen Organe verhalten sich von einigen Ausnahmen abgesehen entsprechend — etwa wie folgt zusammen:

Natrium und Kalium	40	—60 %	der Asche
Phosphorsäure	20	—50 %	" "
Calcium	2	—8 %	" "
Chloride	0,5	—8 %	" "
Eisen	3	—8 %	" "

Die sonstigen Bestandteile wie Magnesium, Kieselsäure, Sulfate usw. finden sich gewöhnlich nur in Mengen von weniger als 1% der Asche¹.

¹ Vierordt, H.: Daten und Tabellen. 3. Aufl. Jena 1906.

Ebenfalls verhältnismäßig reichlich vorhanden sind ferner die Carbonate, welche bei der chemischen Aschenanalyse gewöhnlich nicht erfaßt werden, so daß sich nur wenig zahlenmäßige Angaben finden.

Es ist leicht erklärlich, daß das sehr starke Überwiegen der Alkaliphosphate und -carbonate in der Gewebsasche den topochemischen Nachweis der nur zu geringerem Anteil vorhandenen Stoffe außerordentlich erschwert bzw. in solchen Fällen, wo es sich nicht um lokalisierte Anreicherungen handelt, überhaupt unmöglich macht.

Das ungetrocknete Gewebe hat einen Aschengehalt von rund 1%. Darnach dürfen wir in dem gesamten Bildfeld des Mikroskopes (bei 100facher Vergrößerung zu etwa 3 qmm angenommen) von einem Schnitt der in ungetrocknetem Zustande $10\ \mu$ dick geschnitten ist, nur insgesamt etwa 0,0003 mg Gesamtasche erwarten. Von Stoffen, die zu weniger als 1% der Asche vorliegen, finden sich also im ganzen Bildfeld weniger als 0,000003 mg (= 0,003 γ). Es ist verständlich, daß bei diffuser Verteilung von so geringen Mengen wenig Aussicht für einen lokalisierten Nachweis besteht, da die einzelnen Partikelchen — soweit sie die Grenze der mikroskopischen Sichtbarkeit überhaupt erreichen — von der übergroßen Menge der übrigen Asche verdeckt werden. Aber auch bei einer etwaigen Anreicherung an einigen Punkten im mikroskopischen Bildfeld sind diese Mengen so klein, daß die topochemische Darstellung mit den wenigen für unsere Zwecke überhaupt zur Verfügung stehenden Färbungs- oder Fällungsreaktionen kaum Erfolg verspricht.

Von den Mineralsalzen bleiben nach der Veraschung einige in der Form erhalten, wie sie ursprünglich im Gewebe vorhanden waren, so die Alkalichloride, die Erdalkalichloride und die Alkali- und Erdalkalio-orthophosphate. Dagegen geben die Alkalibicarbonate bei der Erhitzung CO_2 ab und gehen in neutrale Carbonate (bei starkem Erhitzen zum Teil auch in Oxyde) über. Aus den Orthophosphaten entstehen zum Teil Pyrophosphate ($\text{Me}_4\text{P}_2\text{O}_7$), aus den Monophosphaten und bei höherer Temperatur auch aus den Pyrophosphaten entsteht Metaphosphat (MePO_3). Diese letzteren Umsetzungen werden jedoch durch den in der Gewebsasche vorhandenen Überschuß an Alkalioxyden (aus den organischen Verbindungen und zum Teil Carbonaten stammend) vermutlich zurückgedrängt, da die Metaphosphate sich mit Alkalioxyden zu Orthophosphaten umsetzen $\text{MePO}_3 + \text{Me}_2\text{O} = \text{Me}_3\text{PO}_4$, so daß wir die Phosphate im wesentlichen als Orthophosphate erwarten müssen.

Zur Identifizierung der einzelnen Aschebestandteile unter Erhaltung der Gewebsstruktur stehen uns bisher nur wenige und in vielfacher Hinsicht unzureichende Methoden zu Gebote. Zum topochemischen Nachweis des Calciums hat *Schultz-Brauns* eine einfache Methode angegeben, welche darin besteht, daß der veraschte Schnitt angehaucht (zwecks Überführung von Oxyden in Carbonate) und dann in destilliertes Wasser gebracht wird. Auf diese Weise bleiben nur die wasserunlöslichen

Anteile zurück. Die Methode ist also an sich kein Nachweis für Calcium, sondern genau genommen eine Darstellung der wasserunlöslichen Stoffe; denn einerseits geht sowohl ein Teil der Calciumsalze verloren, so z. B. das sehr leicht wasserlösliche CaCl_2 , andererseits bleiben aber auch noch andere Salze, so die des Magnesiums als unlöslich zurück. Ich habe ferner bei Modellversuchen gefunden, daß auch Alkalicarbonate, wenn man sie auf den Objekträger bringt und dann erhitzt, unlösliche Rückstände hinterlassen können, da sie (ebenso die Oxyde) das Glas des Objekträgers in der Hitze angreifen und das Calciumsilicat des Glases zu Calciumcarbonat aufschließen. Aus diesen Gründen erscheint es mir nicht angängig, den wasserunlöslichen Rückstand der Aschenbilder, wie dies bisher geschah, als Calciumbild zu bezeichnen.

Es sind dann weiter von verschiedenen Untersuchern Methoden der Mikrochemie mit entsprechenden Modifikationen zur Identifizierung der Aschenbestandteile angewendet worden und man hat versucht auf diese Weise Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Phosphorsäure als Ionen nachzuweisen.

Gegen alle diese Methoden ist der grundsätzliche Einwand zu erheben, daß die einzelnen Stoffe in der Gewebsasche nicht in ionisierter Form, sondern als feste Salze vorhanden sind. Um sie also als Ionen nachweisen zu können, müssen sie erst gelöst werden, eine Lösung aber ist mit der Erhaltung der ursprünglichen Gewebsstruktur ganz und gar unvereinbar. Die feinere Anordnung der Asche, deren Erhaltung ja den Hauptzweck der Schnittveraschung darstellt, muß bei allen Reaktionen, die eine vorherige Lösung der Substanzen zur unabänderlich notwendigen Voraussetzung haben, also bei allen Ionenreaktionen verlorengehen. Es kann sich bestenfalls darum handeln, daß durch besondere Maßnahmen erreicht wird, daß Fällungen wenigstens einigermaßen an den Stellen erfolgen, wo die nachzuweisenden Stoffe sich überwiegend befinden, doch bleibt die Lokalisation, wie nicht anders zu erwarten, stets höchst unzuverlässig. *F. Herrmann* hat Magnesium in der Weise nachzuweisen versucht, daß er die veraschten Schnitte mit einer wässerigen Lösung von Tetraoxyanthrachinon-Antipyrin-Chinin behandelte. Auch für diese Methode gelten die oben angeführten Gesichtspunkte, insbesondere verzichtet die Methode von vorneherein auf die Erfassung der löslichen Magnesiumsalze, die selbstverständlich von der wässerigen Lösung zunächst herausgelöst werden. An dem in der Arbeit von *Herrmann* gezeigten „Magnesiumbild“ der menschlichen Haut überrascht vor allem, daß das Magnesium sich so außerordentlich reichlich dargestellt findet; ein Unterschied gegenüber dem „Phosphatbild“ oder dem „Calciumbild“ des gleichen Schnittes tritt nur wenig hervor, während wir doch von den makrochemischen Analysen her wissen, daß das Magnesium im Gewebe nur etwa ein Fünfzigstel bis ein Hundertstel der Menge der Phosphate ausmacht. Es scheint mir deshalb wahrscheinlich, daß es

sich bei der von *Herrmann* angestellten Reaktion um eine adsorptive Anfärbung von wasserunlöslichen Aschebestandteilen mit dem aus den löslichen Magnesiumsalzen mit dem *Hahnschen* Reagens entstehenden blauen Farbstoff handelt, also nicht um einen lokalisierten Nachweis des Magnesiumkations.

Ich habe in Erkenntnis der fast unüberwindlichen Schwierigkeiten und der schweren grundsätzlichen Bedenken, die einer lokalisierten Darstellung der Aschebestandteile durch chemische Fällungs- oder Farbreaktionen entgegenstehen, bei meinen Versuchen einen grundsätzlich anderen Weg eingeschlagen, da ich glaubte, mehr Aussicht für die Erkennung der Mineralsalze an Ort und Stelle durch Ausnützung der physikalischen Unterschiede erwarten zu dürfen. Die überhaupt im Gewebsschnitt nach der Veraschung zu erwartenden Salze sind, wie schon erwähnt, im wesentlichen durch chemische Analysen bekannt, bzw. im Einzelfall feststellbar.

Wenn man nun auch durch die Rücksicht auf die Erhaltung der Anordnung der Ascheteilchen gezwungen ist, auf den Nachweis der einzelnen Kationen und Anionen als solche zu verzichten, so besteht doch die Möglichkeit, die einzelnen Salze auf Grund der ihnen eigenen physikalischen Besonderheiten der Erkennung zugänglich zu machen. Durch die verhältnismäßig geringe Zahl der zu erwartenden Mineralsalze wird uns diese Aufgabe noch wesentlich erleichtert; denn es sind nur etwa rund ein Dutzend verschiedener Salze, die in solchen Mengen im Aschebild vorkommen, daß Aussicht auf die lokalisierte Darstellung und direkte Beobachtung im Mikroskop überhaupt besteht.

Für seltener Stoffe, die nur ausnahmsweise und in sehr kleinen Mengen sich finden, kommt meines Erachtens vorläufig hauptsächlich die von *Wa. und We. Gerlach* angegebene spektrographische Analyse im Gewebsschnitt in Betracht. Der Vorzug dieser Methode liegt gerade in der Möglichkeit des Nachweises solcher Elemente, die in extrem geringen Mengen vorkommen. Auf eine präzise Lokalisation muß allerdings hierbei verzichtet werden, da eine Lokalisation bei der spektrographischen Untersuchung nach den Angaben von *A. Polikard* und *A. Morel* nur bis auf einen Bezirk von etwa 0,5 mm im Quadrat möglich ist (was etwa dem Gesamtbildfeld des Mikroskopes bei einer Vergrößerung von 1 : 400 entsprechen würde).

Nach der Veraschung und folgenden Abkühlung nehmen die Gewebsalze geringe Mengen Feuchtigkeit aus der Luft auf. Dieser Umstand bewirkt, daß die Asche sich mit wasserlöslichen Farbstoffen, die in indifferenten, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln gelöst sind, anfärbt, eine Eigenschaft, die schon früher von *E. Tschopp* dazu benutzt wurde, die Aschebilder durch Rotfärbung mit Jodeosin einer leichteren Beobachtung zugänglich zu machen. Da jedoch die einzelnen Salze sich nicht allein durch die Hygroskopizität, sondern auch durch

die Fähigkeit, Farbstoffe zu adsorbieren, durch das Lichtbrechungsvermögen und, was bei meinen Versuchen sich als besonders wesentlich erwies, durch den verschiedenen Aciditätsgrad der durch Hygroskopizität gebundenen Feuchtigkeit erheblich unterscheiden, ist es möglich durch Behandlung mit solchen Indicatorfarbstoffen, die den Farbton bei Änderung der p_H kontinuierlich ändern und in Wasser reichlich, in organischen Lösungsmitteln aber nur wenig löslich sind, eine deutliche Anfärbung der einzelnen Mineralstoffe in verschiedenen Farbtönen zu erzielen.

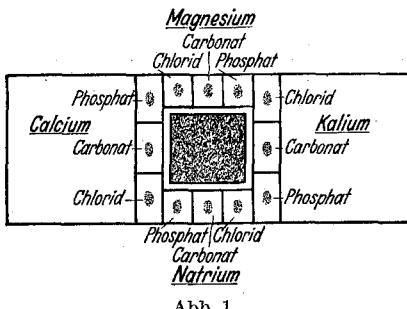
Als Farbstoffe, welche derart zur Identifizierung der Aschebestandteile verwendet werden können, kommen nach meinen Erfahrungen das Bromthymolblau, Bromkresolpurpur und das Bromphenolblau in erster Linie in Betracht.

Von dem betreffenden Farbstoff wurden 0,04 g in 100 ccm Benzol gelöst, die Lösung filtriert und über entwässertem Kupfersulfat aufbewahrt, um Wasserspuren zu entfernen. Der veraschte Schnitt wurde nun nach einem bestimmten und stets beibehaltenen Schema mit kleinen Tropfen von Salzlösungen umgeben, die als Vergleich für die Färbung und zum Nachweis der einzelnen Stoffe dienen. Ich habe zu diesem Zwecke mit Tinte eine Reihe von Fächern auf dem Objektträger vorgezeichnet und die Salze in der gleichen Reihenfolge jeweils aufgetragen, um so das jedesmalige Bezeichnen zu ersparen. Die Abb. 1 zeigt die hierbei getroffene Anordnung.

Abb. 1.

Diese Testlösungen stellt man sich zweckmäßig auf Vorrat her, wobei für jedes Salz die Konzentration, welche nötig ist, um aus einem kleinen Tröpfchen einen Rückstand von der annähernd gleichen Dichte wie das Aschenbild der Schnitte zu erzeugen, durch einige kleine Vorproben zu ermitteln ist. Diejenigen Salze, welche sich in Wasser nicht lösen, werden in Gestalt von feinen wässerigen Aufschwemmungen verwendet.

Der Objektträger mit dem veraschten Schnitt und den aufgebrachten Salzlösungströpfchen wird dann bis zum Eintrocknen der Tröpfchen im Trockenschrank oder über der Flamme erwärmt und kommt dann in eine Petrischale mit der Farblösung. Man beobachtet nun den Verlauf der Anfärbung; denn die einzelnen Salze färben sich verschieden schnell. So färben sich nach meinen Erfahrungen zuerst die Carbonate der Alkalien und man kann durch kurzes Färben auf diese Weise Bilder erzielen in welchen im wesentlichen die Carbonate der Alkalien allein sich darstellen.



Da die Testtröpfchen sich jeweils entsprechend in gleicher Weise mitfärben, ist die Entscheidung, um welche Salze es sich handelt, gewöhnlich zu treffen.

Ich habe jedoch in der Regel mich nicht mit einer einzigen Färbung begnügt, sondern von jedem Objekt mehrere Schnitte mit dem gleichen und mit verschiedenen Farbstoffen gefärbt; gewöhnlich habe ich mich an folgende Arbeitsweise gehalten:

1. Eine Reihe von Schnitten wurde verascht und ohne weitere Behandlung betrachtet.

2. Mit den 3 obenerwähnten Farbstofflösungen wurden je einige Schnitte kürzere oder längere Zeit gefärbt. Man hat so, da die verschiedenen Farbstoffe mit den einzelnen Salzen verschiedene Färbungen geben, gewöhnlich eine gute Kontrolle.

3. Von jedem Objekt wurden einige veraschte Schnitte kurze Zeit in ein Gefäß mit destilliertem Wasser gestellt und so alle wasserlöslichen Bestandteile entfernt. Die getrockneten Schnitte zeigen dann den wasserunlöslichen Rückstand und es zeigt sich häufig eine wesentlich andere Verteilung der unlöslichen Aschebestandteile, als die der Gesamtasche. Auch diese Schnitte können dann nach dem Trocknen noch gefärbt werden.

Wichtig ist die Wasserextraktion vor allem dann, wenn z. B. bei der Färbung der Gesamtasche sich wasserlösliche und wasserunlösliche Salze gleich gefärbt haben. In solchen Fällen dient die Wasserlöslichkeit zur entgültigen Unterscheidung. So färben sich mit den von mir verwendeten Farbstoffen die Phosphate der Alkalien und der Erdalkalien gewöhnlich gelb, durch Feststellung der Wasserlöslichkeit kann man dann die Unterscheidung einwandfrei treffen. Das nachfolgende Schema soll als Beispiel für den Gang der Identifizierung der einzelnen Salze dienen.

Gesamtasche

wasserunlöslich	wasserlöslich		
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	dunkelgelb ¹	CaCl_2	dunkelgelb
$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$		MgCl_2	dunkelviolett
CaCO_3	hellgelb	KCl	weiß ¹
MgCO_3	blaßblau	NaCl	
		K_2CO_3	violett ²
		Na_2CO_3	
		K_3PO_4	blaßgrün bis blau
		Na_3PO_4	hellegelb

Die angegebenen Farbtöne beziehen sich auf den Farbstoff Bromthymolblau. Die anderen Farbstoffe liefern selbstverständlich andere Färbungen, aber auch bei Verwendung ein und desselben Farbstoffes erhält man nicht immer vollkommen gleiche Farbtöne, insbesondere hängt der Farbton von der Dauer der Färbung ab. Es ist deshalb für eine sichere Beurteilung unbedingt nötig, daß man in jedem Einzelfall die Vergleichstropfen auf den gleichen Objektträger aufbringt und auf diese Weise unter genau gleichen Bedingungen die Vergleichssalze mitfärbt.

¹ Eine weitere Unterscheidung nicht möglich.

² Unterscheidung durch Oberflächenbeleuchtung gelegentlich möglich.

Eine Möglichkeit, unter Umständen eine weitere Unterscheidung zu treffen, wo dies sonst nicht erreicht werden kann, ergibt sich aus der Art der Beleuchtung der fertigen Schnitte. Es hat sich gezeigt, daß in manchen Fällen, wo bei Durchsicht keinerlei Unterschied in der Färbung bestimmter Salze zu erkennen war, dennoch eine deutliche Unterscheidung bei auffallendem Licht getroffen werden konnte etwa in der Weise, daß das eine Salz einen violetten Glanz zeigte, der bei dem anderen völlig fehlte.

Die Identifizierung der Salze gründet sich also bei der vorstehend angegebenen Methode zusammenfassend auf folgende Einzelumstände unter jedesmaliger Berücksichtigung des Verhaltens von genau gleich behandelten Salzen bekannter Art: Wasserlöslichkeit, Färbung bei Behandlung mit verschiedenen Indicatorfarbstoffen, Schnelligkeit des Anfärbens bzw. Färbung bei verschieden langer Färbedauer, Farbe bei durchfallendem und auffallendem Licht.

Die Durchführung dieses Analysenganges ermöglicht es, eine Reihe von Mineralsalzen im veraschten Schnitt lokalisiert zu erkennen und darzustellen. Insbesondere lassen sich die Alkali- und Erdalkaliphosphate und Carbonate, welche den Hauptbestandteil der Asche ausmachen, in ihrer Verteilung ermitteln. Die Anordnung der Ascheteilchen leidet durch die Behandlung mit den Farblösungen in keiner Weise, die Struktur bleibt vollkommen so erhalten, wie sie auch in den ungefärbten Aschebildern sich vorfindet. Ich möchte gerade in diesem Umstande den Hauptvorzug des Verfahrens sehen. Es werden insbesondere dann sehr klare und unveränderte Färbungen erzielt, wenn man die Färbung unmittelbar nach dem Herausnehmen der Schnitte aus dem Ofen, sobald sie nur eben abgekühlt und die Testtröpfchen, wie oben beschrieben, aufgebracht sind, vornimmt. Läßt man die Schnitte einige Zeit an der Luft abgekühlt liegen, so zieht die Asche zu viel Feuchtigkeit an und man bekommt dann nicht selten bei der Färbung um jedes Mineralteilchen einen kleinen gefärbten Hof, während bei sofortiger Färbung nur die einzelnen Aschstäubchen sich färben und die Zwischenräume vollkommen klar bleiben. Selbstverständlich kann die Methode mit großem Nutzen durch mikrochemische Ionenreaktionen ergänzt werden, wobei dann auf die Erhaltung der Struktur keine Rücksicht genommen werden muß. Man kann so z. B. in Fällen, wo die Färbung eine Anhäufung eines bestimmten Salzes ergeben hat und farberisch nur zu ermitteln war, daß es sich um ein Carbonat oder Phosphat usw. handelt, dann durch mikrochemische Reaktionen festzustellen versuchen, ob ein Natrium- oder Kaliumsalz usw. vorliegt.

Nach der Fertigstellung werden die Aschebilder sofort mit einem Deckglas bedeckt, welches man durch Umrändern mit Paraffin luftdicht aufkittet. Ein Einbettungsmedium habe ich nicht verwendet. Die Schnitte lassen sich einige Zeit aufbewahren, jedoch habe ich beobachtet,

daß gelegentlich Veränderungen im Sinne von Kristallisationen nachträglich aufgetreten waren. Aus diesem Grunde ist es zweckmäßig, die Beurteilung der Ergebnisse, das Photographieren usw. unmittelbar im Anschluß an die Herstellung der Präparate vorzunehmen.

Zusammenfassung.

1. Es gelingt durch Fixierung des Materials in Formoldampf und nachfolgendes Gefrierschneiden ohne Messertiefkühlung unter Auffangen der Schnitte in Petroleum Schnittveraschungen ohne Verlust von Aschebestandteilen durchzuführen. Hierbei erweist sich die Verwendung von Objektträgern, die mit einer dünnen Gelatineschicht überzogen sind, als vorteilhaft, weil auf diese Weise die Anordnung der Ascheteilchen sehr gut erhalten bleibt. Zur Veraschung ist unter diesen Umständen eine Temperatur von nicht mehr als 400° C ausreichend.

2. Es wird eine Methode zur Identifizierung der Mineralstoffe im veraschten Schnitt angegeben, welche darauf beruht, daß die verschiedenen in der Asche vorkommenden Mineralsalze sich mit den Farbstoffen Bromthymolblau, Bromkresolpurpur und Bromphenolblau auf Grund ihrer physikalischen Verschiedenheiten in verschiedenen Farbtönen anfärbten lassen. Ein Vergleich mit bekannten Salzen, die in gleicher Weise behandelt werden, läßt die Art der Aschebestandteile erkennen. Die Struktur und die Anordnung der Ascheteilchen bleibt bei dieser Behandlung völlig unverändert erhalten.

Schrifttum.

Gerlach, W. u. We.: Virchows Arch. 282, 208 (1931). — Groß, W.: Beitr. path. Anat. 51, 528 (1911). — Henkel, K. O.: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. V, 2, H. 13, S. 1471. — Herrmann, F.: Z. Mikrosk. 49, H. 3, 313 (1932). — Polikard, A.: C. r. Acad. Sci. Paris 176, 1187 (1923). — Polikard, A. u. H. Okkels: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. V, 2, H. 16, S. 1815. — Poliard, A. u. A. Morel: C. r. Acad. Sci. Paris 194, 491 (1932). — Schultz-Brauns, O.: Virchows Arch. 273, 1, (1929); Verh. dtsch. path. Ges. 26, 153 (1931); Z. Mikrosk. 48, H. 2 (1931). — Tschopp, E.: Möllendorfs Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. 1, S. 569. 1929.
