

Aus der Prosektur der Heil- und Pflegeanstalt der Stadt Wien, „Am Steinhof“
(Vorstand: Prim. Dr. B. UIBERRAK)

Eine einfache Methode zur Herstellung von sterilem Gewebsbrei

Von
H. HACKL

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 14. Juli 1958)

Bei verschiedenen pathologisch-anatomischen und bakteriologischen Untersuchungen im Laboratorium und bei der wissenschaftlichen Forschungsarbeit ist es oft notwendig, organisches Material zu zerkleinern oder gar zu homogenisieren. Meist stellt man an die Zerkleinerungsmethode folgende Ansprüche: Die Materialaufschwemmung soll homogen sein, d. h., das Organ soll zu möglichst kleinen Teilchen zerrieben werden; die chemische Struktur der Organe aber soll nicht geschädigt werden, und schließlich soll der Gewebsbrei vor jeder Verunreinigung bewahrt bleiben.

Die einfachste Methode ist die Zerkleinerung im Mörser oder in der Achatschale eventuell mit Beimischung von Quarzsand. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einfrieren des Gewebes vor dem Zerreiben in eigenen Reibschalen, die einen Mantel für die Kühlflüssigkeit besitzen, wie z. B. die Porzellanmühle nach LAUTENSCHLÄGER, die Lymphmühle nach CSOKOR sowie die Zerreibkapseln nach KOCH und MACFADYAN. Der Nachteil dieser Vorrichtungen liegt in der starken Unterkühlung des Untersuchungsmaterials, weil dazu meist flüssige Luft verwendet wird. Manche Gewebsarten und fast alle Krankheitserreger gehen dabei zugrunde. Die bisher genannten offenen Systeme setzen das Untersuchungsmaterial den Einwirkungen der Umwelt aus, d. h., Verunreinigungen mit Sporen oder Bakterien sind kaum zu vermeiden. Deshalb hat man schon immer wieder versucht, das Zerkleinern im „geschlossenen System durchzuführen, z. B. im Mörser nach HERZBERG.

Dieser Apparat leistet sehr gute Dienste; steht aber nur wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung, muß man mit viel Mühe die in der ganzen Schalenhöhle klebende Substanz zusammenkratzen. Für geringere Mengen ist der sog. Homogeniser recht praktisch (dickwandige Epruvette mit Innenschliff und aufgerauhtem Kolben).

Beide Systeme, Mörser und Homogeniser, machen ein mindestens zweimaliges, bei Zusatz von Aufschwemmungsmittel noch häufigeres Öffnen notwendig. Das Entleeren des Gewebsbreies ist außerdem recht umständlich.

Die im folgenden beschriebene Vorrichtung stellt von den bisher bei uns erprobten Apparaten die derzeit empfehlenswerteste Lösung dar.

Notwendiges Material. Eine 10 cm³-Injektionsspritze (bei uns: Ultra-sept); zwei in die Spritze passende Gummimanschetten; Stahlnadeln, Kanülen, Gummischlauch, Laborzentrifuge.

Herstellungsanleitung. (Den einzelnen Punkten des Textes entsprechen auch die Bezeichnungen in der Skizze.)

1. Man läßt den konischen Teil des Spritzenkolbens abfeilen und in die so entstandene plane Kolbenoberfläche 2—3 Löcher bohren, in die

2. kurze Stahlstifte mit einem hitzebeständigen Klebstoff eingekittet werden.

3. Eine in die Spritze passende Gummischeibe wird genau in der Mitte mit einer dicken Kanüle durchstoßen. Nachher werden deren beide vorstehenden Teile abgeschnitten, worauf das sich in der Scheibe befindliche Kanülenstück einen Kanal durch den Gummi offenhält. Dieser Kanal genügt, wenn man nur weiche Organe (z. B. Gehirn) untersucht. Bei Muskeln und Parenchyman bringt man eventuell mehrere Kanülenlöcher an, oder man schneidet parallel zu den Nadeln 2 Segmente des Gummizylinders ab (3a).

4. Auf der einen Seite dieser Gummischeibe zeichnet man einen Kreisdurchmesser ein, und teilt diese Strecke in 6 Teile. In den rechts und links vom Mittelkanal liegenden je 2 Punkten werden genau senkrecht 4 Stahlnadeln ganz durch die Gummischeibe gesteckt, so daß das stumpfe Nadelende in der Scheibenebene liegt. Nachher führt man die nadeltragende Gummiplatte in der aus der Zeichnung ersichtlichen Weise in die Spritze ein und fixiert sie durch einige Tropfen Klebstoff an der Glaswand.

5. Eine zweite, locker in die Spritze passende Gummischeibe wird konzentrisch auf die Haltenadeln des Kolbens (Punkt 2) gesteckt. Dann führt man Kolben samt Gummischeibe in den Spritzenzylinder ein und schiebt bis zum Anschlag der Nadelspitzen vor. Bei vorsichtigem Drehen ritzen diese auf der Gummiplatte konzentrische Kreise ein. Nun wird der Kolben wieder herausgezogen und die Scheibe von den Haltestiften gehoben.

6. Man steckt entlang eines hier gezeichneten Durchmessers zwischen den von den Spitzen markierten Kreisen genau senkrecht 6 Nadeln in den Gummi und schiebt sie ganz durch. Bei zähem Zerreibgut kann man die Spitzen der Nadeln ähnlich wie Häkelnadeln in der Drehrichtung des Kolbens umbiegen. Auf diese

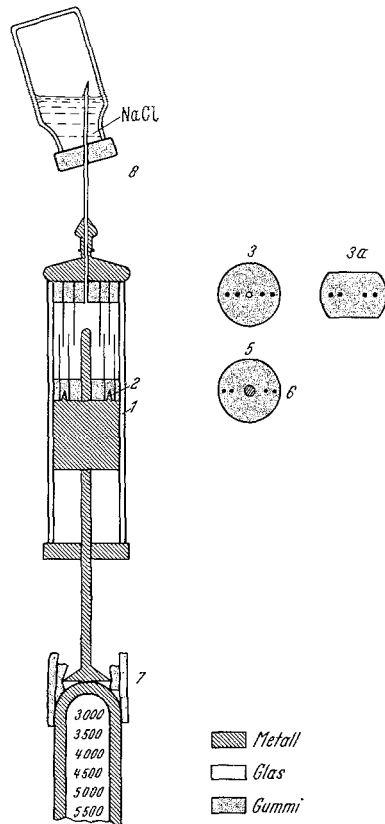


Abb. 1. Umgebaute Injektionsspritze zur Herstellung von sterilem Gewebsbrei

Weise wird das Abgleiten des Materials von den rotierenden Spitzen erschwert. Durch den Mittelpunkt der Gummipatte steckt man einen dicken, stumpfen Metallstift (z. B. einen abgesägten Nagel), der das Niveau der Nadeln etwas überragt. Dann wird der Gummizylinder auf die Kolbenstifte wieder aufgesetzt und auf der planen Kolbenfläche festgeklebt. Beim Drehen des Kolbens müssen die Nadeln genau in die Zwischenräume der vier oberen passen. Der Stift im Zentrum muß an die Kanülenmündung der oberen Gummipatte anstoßen und die Nadelspitzen daran hindern, an der gegenüberliegenden Scheibe zu reiben. Außerdem hat der Stift eine zweite Aufgabe: Er schleift während der Rotation am Rande des Kanülenstückes der oberen Platte und schneidet dadurch Gewebstücke, die ansonsten den Kanaleingang verstopfen könnten, ab, so daß der Gewebsbrei jederzeit in das aufgesteckte Fläschchen befördert werden kann.

7. Die Druckplatte der Injektionsspritze wird eventuell unter Zuhilfenahme von kleinen Gummiringen in ein kurzes Schlauchstück gesteckt, welches sich leicht auf das Tourenglas einer Laborzentrifuge stülpen läßt.

8. Die Kanüle einer Spritze wird durch den Gummipropfen eines Fläschchens (z. B. vom Penicillin) gesteckt, das zur Hälfte mit Verdünnungsflüssigkeit angefüllt ist.

Der Apparat kann im ganzen sterilisiert werden; wegen der eingebauten Gummitheile ist aber zu große trockene Hitze zu vermeiden. Chemisch kann ebenfalls entkeimt werden, weil die meisten Desinfektionsmittel Gummi nicht angreifen. Das Einlegen des Materials erfolgt nach kurzem Herausziehen des Kolbens. Es ist günstig, die Organteile vorher etwas zu zerquetschen, damit im Zylinder die Arbeit schneller vonstatten geht. Dann wird der Kolben endgültig eingeführt und die Spritze geschlossen. Nun steckt man die Kanüle in das Fläschchen mit Kochsalzlösung. Es ist ratsam, gleich vor Beginn der Zerkleinerung einige Tropfen der Flüssigkeit in die Spritze zu ziehen. Erstens geht dadurch die Zerreibung rascher vor sich, zweitens läßt sich die Spritze leichter auf- und abschieben (s. später), und drittens verhindert die kalte Flüssigkeit ein Heißlaufen des Systems.

Damit ist es so weit, daß der eigentliche Zerreibungsvorgang beginnen kann. Man steckt, wie in der Zeichnung angegeben, die Gummimanschette auf das Tourenglas einer Zentrifuge und hält den Spritzenzylinder und mit ihm den oberen Nadelsatz, die Kanüle und das Fläschchen *fest* in der rechten Hand. Dann bringt man die Zentrifuge langsam auf Touren, wobei der Kolben noch am äußeren Ende der Spritze zu liegen kommt. Nachdem etwa 1000 U/min erreicht sind, zieht man die Spritze ganz leicht nach unten, d. h., die Nadelspitzen nähern sich und beginnen mit dem Zerreißen der Organteile. Dabei soll die Spritze dauernd auf und ab bewegt werden, damit der Brei durchmischt wird und die Spritze nicht heißläuft. Sobald sich die Nadeln leicht ineinanderschieben lassen, bringt man auf Hochtouren und wartet bis zur völligen Homogenisierung. Der ganze Arbeitsvorgang dauert bei weichem Gewebe eine, bei härterem einige Minuten. Dabei spielen die Flüssigkeitsmenge, die Umdrehungszahl und die Dichte der Nadeln eine Rolle.

Das Fläschchen mit der Kochsalzlösung hat 3 Aufgaben: Zunächst kann man durch Hochziehen an der Kanüle und nachfolgendem Ansaugen Lösungsmittel in den Zerreibraum befördern. Dann ist der freie Raum ein Druckausgleich für die Luft in der Spritze beim Auf- und Abziehen während der Rotation. Schließlich kann man während oder nach Abschluß des Zerkleinerungsprozesses das homogenisierte Material in das Fläschchen befördern, indem man den Rest der notwendigen Verdünnungsflüssigkeit aufzieht und dann den Apparat, mit der Kanüle nach unten gehalten, ausspritzt.

Diese Methode mit den in den Gummischeiden elastisch gelagerten Spitzen zeigt bessere Erfolge, als starre Nadeln oder Messer.

Man kann selbstverständlich den Fassungsraum der Apparatur variieren. Einerseits ist das durch Verwendung verschieden langer Nadeln möglich, andererseits durch die Wahl großer oder kleiner Injektionsspritzen.

Die Größe der Gewebsteilchen in der Suspension ist von folgenden Faktoren abhängig:

1. Von der Art des Gewebes: weiche und brüchige Organe werden rascher, bindegewebige und zähe langsamer zerkleinert.

2. Von der Menge der zugesetzten Flüssigkeit: zu wenig oder zu viel verlangsamt den Vorgang. Bei fettreichem Material ist folgendes zu überlegen: Infolge ihrer Leichtigkeit schwimmen die Teilchen obenauf. Es kann daher vorkommen, daß noch große Stücke nach oben steigen und die Kanüle verstopfen. Deshalb soll man Fett erst trocken verreiben und dann NaCl zusetzen.

3. Von der Zahl der Nadeln: Steckt man diese in doppelter Anzahl (kreuzweise entlang zweier senkrechter Durchmesser angeordnet), dann geht die Zerkleinerung noch rascher vor sich.

4. Von der Dichte der Nadeln: Je kleiner die Zwischenräume zwischen dem oberen und unteren Nadelsatz sind, desto rascher arbeitet der Apparat.

5. Von der Tourenzahl und

6. von der Dauer der Zerkleinerung.

Die Kontrolle der Teilchengröße erfolgt am besten durch mikroskopische Untersuchung eines gefärbten Ausstriches.

Bei bindegewebsreichen Parenchymen kommt es mitunter vor, daß sich das zähe faserige Gewebe um die Nadeln wickelt und so der Zerkleinerung entgeht. Das ist wohl ein Mangel, doch liegt es meist in der Absicht des Experimentes, das Parenchym und nicht die faserigen Anteile zu verimpfen.

Sicherheitsmaßnahmen. Wir haben noch keinerlei Zwischenfälle erlebt, doch ist es denkbar, daß der Zerreibvorgang plötzlich unterbrochen werden müßte, weil ein schadhafter Glaszylinder während der

Drehung platzt oder weil sich z. B. die Kanüle mit dem Fläschchen lockert.

Im allgemeinen genügt ein ruckartiges Hochziehen des mit der rechten Hand festgehaltenen Zylinders, wodurch der Kolben durch den Spritzenverschluß hochgehoben und die Gummimanschette von der Zentrifuge abgestreift wird. Damit ist aber auch der Zerreibungsvorgang sofort beendet.

Das eventuelle Platzen des Glaszylinders würde 2 Gefahren bringen: 1. Verletzungen der haltenden Hand und 2. Versprühung infektiösen Untersuchungsmaterials in den Raum. Wir helfen uns so, daß wir den ganzen Apparat mit dem Fläschchen voran in einen schmalen Plastikschlauch stecken. Dadurch verhindert man ein Abschleudern der aufgesteckten Kanüle, schützt die Hand und macht ein Versprühen unmöglich. Der transparente Kunststoff ermöglicht aber trotzdem eine Kontrolle sämtlicher Vorgänge. Für den ständigen Gebrauch kann man auch ein kurzes Glasrohr als Mantel anbringen lassen.

Abschließend sei noch betont, daß sich die geschilderte Vorrichtung recht gut zum gelegentlichen Gebrauch eignet. Für Laboratorien, die sich mit der routinemäßigen Herstellung von Gewebsbrei beschäftigen (z. B. für Frischzellentherapie usw.), dürften wohl stabile Vorrichtungen nach dem Mixersystem bessere Dienste leisten.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache Methode geschildert, mit der man Injektionspritzen zum sterilen Homogenisieren von organischem Material verwenden kann.

Summary

The author describes a simple method how to use ordinary syringes for homogenization of tissues under sterile conditions.

Literatur

CsOKOR: Zit. bei L. HAENDEL. — HAENDEL, L.: Einrichtung von Instituten und Laboratorien, in Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, von W. KOLLE, R. KRAUS, P. UHLENHUTH, Bd. X, S. 713 ff. Jena-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1930. — HERZBERGER: Zit. bei L. HAENDEL. — KOCH: Zit. bei L. HAENDEL. — LAUTENSCHLÄGER: Zit. bei L. HAENDEL. — MACFADYAN: Zit. bei L. HAENDEL.

Dr. med. et Dr. phil. HANS HACKL, Wien XIV, Baumgartnerhöhe 1