

Aus der Universitäts-Frauenklinik Köln (Direktor: Prof. Dr. C. KAUFMANN)

Morphologie des Gewebes im Frischgefrier- und Paraffinschnitt an gynäkologischem Material

Von

E. KERN-BONTKE und M. WÄCHTER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. März 1962)

Seit 4 Jahren benutzen wir vorwiegend für histochemische Zwecke den Kryostaten von Dittes-Duspiva, der es gestattet, jedes unfixierte Gewebe in beliebiger Dicke zu schneiden. Die Frischgefrierschnitte zeigen morphologisch einige Abweichungen vom gewohnten Bild des Paraffinschnittes. Wir haben versucht, diesen Eindruck zu objektivieren.

Material und Methodik

Vergleich von Endometrien mit der Frischgefrier- und Paraffineinbettungsmethode¹. Es wurden 38 Endometrien aus Uteri, welche bei Operationen gewonnen wurden, untersucht, sowie 9 Endometrien, die bei der Curettage aus dem Uterus entfernt worden waren.

Das Material wurde lebenswarm verarbeitet. Um die histologischen Schnitte gut vergleichen zu können, präparierten wir gleiche Gewebsblöcke aus den Uteri. Dafür wurde der Uterusfundus medial zwischen beiden Tubenwinkeln in sagittaler Richtung bis zum Cavum uteri eingeschnitten. Eine 0,5—1 cm dicke Scheibe wurde so aus dem Uterusfundus herausgeschnitten, daß 1—2 cm des Uteruscavums mit Schleimhaut getroffen war. Aus dieser Gewebsscheibe präparierten wir ein etwa 2 mal 1 cm großes Gewebsstück, welches in der Mitte Endometrium enthielt. Das Gewebsstück bestand also aus der Umschlagstelle des Endometriums am Fundus uteri mit umgebender Muskulatur und war in senkrechter Richtung geschnitten. In allen Fällen zeigten die Schnitte die ganze Ausdehnung des Endometriums vom Deckepithel bis zur Basalis und in das Myometrium hinein.

Schleimhautstreifen einer Curettage wurden vorsichtig unter Vermeidung jeglicher Quetschung auf dem Objektisch des Kryostaten dicht aneinandergelegt.

Das lebenswarme Gewebe wurde auf dem zimmerwarmen Objektisch des Kryostaten basal mit einigen Tropfen Wasser umgeben und so schnell wie möglich mit CO₂-Schnee durchgefroren. Die Wasserbenetzung ist zu empfehlen, damit der Gewebblock beim Schneiden nicht vom Objektisch abfällt. Nach dem Einfrieren wurde das Präparat im Kälteraum des Kryostaten von Dittes-Duspiva bis zum Schnitt aufbewahrt (einige Minuten bis zu 2 Tagen). Eine Beeinflussung des Schnittmaterials durch eine längere Aufbewahrungszeit im Kälteraum bei —21° C konnte nicht beobachtet werden. Die Gewebsblöcke befanden sich, wenn sie nicht sofort geschnitten wurden, im Kälteraum in einem verschlossenen Gefäß mit Eis, so daß eine Trocknung des Blockchens durch Sublimation vermieden wurde. Diese tritt andernfalls im Kryostaten von Dittes-Duspiva rasch ein, da ein Ventilator den Kälteraum trockenhält und damit das Mikrotom vor Eisbildung und Korrosion schützt.

Schnittgewinnung. Das Gewebsblöckchen wird bei —21° C 4—6 μ dick geschnitten. Während des Schneidens gleitet der Gewebsschnitt auf das Mikrotommesser (Mikrotom der Firma Jung). Man nähert dann in planparalleler Haltung zum Messer dem Gewebsschnitt einen zimmerwarmen, entfetteten Objektträger. Das gefrorene Gewebe wird durch den Temperaturunterschied von dem Objektträger angezogen und schmilzt sofort. Der Schnitt wird aus dem Kühlraum entnommen und trocknet bei Zimmertemperatur rasch. Durch das

¹ Die Untersuchung der Endometrien war Gegenstand einer Dissertation von M. WÄCHTER.

plötzliche Auftauen und die Gewebstrocknung erfolgt eine gewisse Denaturierung der Gewebsproteine, so daß der Schnitt fest auf dem entfetteten Glas haftet und wie ein aufgeklebter Paraffinschnitt aufbewahrt und verwendet werden kann. Die Färbung kann sofort nach Trocknung des Schnittes auf dem Objektträger angeschlossen werden, aber auch beliebig später, wenn man die Nativschnitte in staubfreien Kästen aufbewahrt. Endometrien mit umgebendem Myometrium ließen sich trotz unterschiedlicher Konsistenz der Medien ohne Schwierigkeiten schneiden. Für Currettagematerial ist diese Schnitttechnik besonders vorteilhaft, da die einzelnen Schleimhautstreifen zu einem Block zusammenfrieren und beim Schnitt nicht auseinanderfallen.

Nach der serienmäßigen Anfertigung von etwa zehn gleichmäßig dünnen Gewebsschnitten wurde das gefrorene Gewebsblöckchen aus dem Kryostaten entnommen und in zimmerwarmes Formalin (40% Formaldehyd 150 ml, 1% CaCl_2 850 ml) gebracht. Hier taute es auf und fixierte gleichzeitig. Der Anschnitt des Kryostatblöckchens wurde markiert, so daß möglichst dieselbe Schnittfläche des Kryostatblöckchens für das Paraffinblöckchen wieder in Frage kam, um bei den zu vergleichenden Schnitten zwischen Kryostat- und Paraffinschnitt die gleiche Gewebsstelle wiederzufinden. Allerdings muß mit einer Differenz bis zu 1 mm gerechnet werden, da bei der Fixierung das Gewebe etwas wellig wird und außerdem beim Anschnitt des Paraffinblöckchens einiges Material verlorengeht. Die Einbettung des fixierten Gewebes erfolgte nach folgendem Schema: 1. neutrales Formalin bis zu 24 Std, 2. Spülen in Wasser 1 Std, 3. Alkohol 70% 12 Std, 4. Alkohol 96% 6 Std, 5. abs. Alkohol I 3 Std, 6. abs. Alkohol II 3 Std, 7. Methylbenzoat 12 Std, 8. Paraffin I (Schmelzpunkt 56°C) 3 Std, 9. Paraffin II bis zu 12 Std. Die Paraffinblöckchen wurden auf einem Schlittenmikrotom in 6μ Dicke geschnitten, auf mit Eiweißglycerin bestrichene Objektträger aufgeklebt und im Paraffinofen bei 56°C etwa 2 Std getrocknet.

Kontrollversuch. Im bisherigen Versuchsgang wurde lebensfrisches Gewebe mit CO_2 -Schnee durchfrozen, Frischgefrierschnitte hergestellt und das gefrorene Blöckchen in neutralem Formalin aufgetaut und fixiert. In einem Parallelversuch wurde an zwei Gewebsblöckchen überprüft, ob die Frierung des Gewebes einen Einfluß auf das Gewebe hat im Vergleich zu Gewebe, welches lebensfrisch in Formalin fixiert wurde. Zu diesem Zwecke präparierten wir aus dem Uterusfundus von zwei operativ gewonnenen Uteri zwei planparallele Gewebsscheiben, fixierten die eine unmittelbar in Formalin, während die andere den oben geschilderten Gang über den durchfrozenen Block ins Formalin nahm.

Färbung. Alle Schnitte wurden gleichartig mit Hämatoxylin-Eosin in üblicher Weise gefärbt. Die lufttrockenen Kryostatschnitte wurden direkt in das Hämatoxylin eingesetzt, die Paraffinschnitte nach einer Passage durch Xylol und die absteigende Alkoholreihe.

Vergleichende Messungen am Gewebsschnitt. Um einen genauen Anhalt über die Art der Veränderung während Fixierung und Einbettung bzw. Gefrierung des Schnittes zu erhalten, haben wir vergleichende Messungen zwischen Kryostat- und Paraffinschnitt angestellt.

1. *Höhe des Endometriums in Millimeter.* Mit einer auf das Präparat aufgesetzten Meßlupe, die mit einer 0,1 mm-Skala ausgerüstet war, wurde die Höhe des Endometriums von der Grenze Myometrium-Basis bis zum Deckepithel gemessen. An jedem Schnitt wurden 10 Messungen vorgenommen und der Mittelwert errechnet.

Alle folgenden Messungen wurden mit einem Meßokular 10fach bei 45fachem Objektiv vorgenommen. Die Eichung erfolgte mit einem Objektmikrometer (ein Teilstrich entsprach $1,82\mu$).

2. *Drüsendurchmesser in μ .* Bei einer für den jeweiligen Funktionsgrad charakteristischen Drüse, welche in der Längsrichtung getroffen war, wurde der Abstand von Basalmembran zu Basalmembran gemessen. Es wurden je zehn Werte ermittelt und daraus die Mittelwerte errechnet, wobei eventuelle Höhen und Tiefen gleichmäßig berücksichtigt wurden. Lediglich bei einigen Curettageendometrien waren die Drüsen nur quer getroffen. Es wurde der Durchmesser von zehn verschiedenen Drüsen ausgemessen.

Die folgenden Werte wurden an der gleichen Drüse wie Punkt 2 ermittelt.

3. *Drüsenlumen in μ .* Abstand der lumenwärts gerichteten Epithelgrenzen, Mittelwert aus zehn Meßwerten.

4. *Epithelhöhe in μ .* Messung zwischen Basalmembran und lumenwärts gerichtetem Epithelsaum. Mittelwert aus zehn Meßwerten.

Von den ovalen *Kernen des Drüsenepithels* und des *Stromas* wurde der *Längs- und Querdurchmesser* ebenfalls in je zehn Werten mit Mittelwert errechnet.

Vergleich von Kryostatfrischgefrierschnitt und Paraffinschnitt an sonstigem gynäkologischem Material. Neben dieser systematischen Untersuchung verfügen wir über eine große Zahl von vergleichbaren Schnitten desselben Materials, die bei sog. Schnell Diagnosen gewonnen wurden. Es handelt sich um Material, welches bei Operationen makroskopisch einen unklaren Eindruck machte, so daß eine histologische Sicherung erwünscht war. Wir haben zu diesem Zweck Schnell Diagnosen bei 70 Mammae, zwei Tumoren des Ovars, zehn Tumoren des Uterus, 17 unklarem Curettagematerial, zwölf Bröckelentnahmen aus der Cervix, zwei Beckenlymphknoten, eine Tube und eine Probeexcision der Vagina gestellt.

Die Herstellung der Kryostatschnitte an diesem Material ist die gleiche wie oben beschrieben, die Fixierung erfolgte nach Herstellung des Frischgefrierschnittes, jedoch nicht in neutralem Formalin, sondern in Stievescher Fixationslösung. Die Einbettung und Aufarbeitung erfolgte in unserem histologischen Laboratorium nach üblichen Gesichtspunkten.

Ergebnisse

Endometrium. Vergleicht man die morphologischen Bilder des Endometriums im Paraffinschnitt mit denen des Kryostatschnittes, so findet man zunächst die

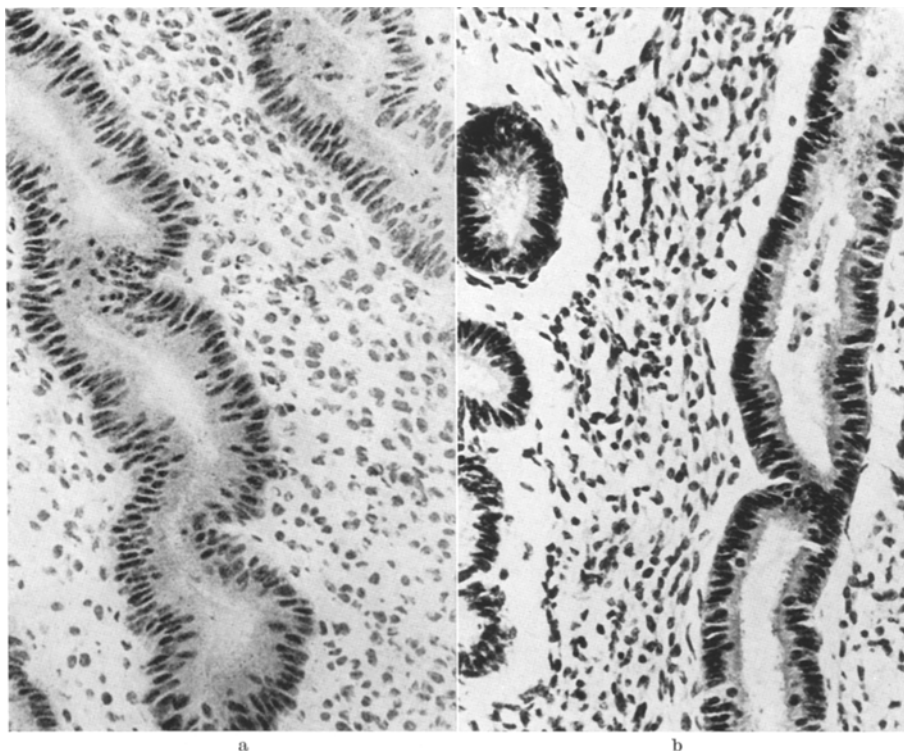


Abb. 1a u. b. Proliferierendes Endometrium, Hämatoxylin-Eosin-Färbung. a Frischgefrierschnitt, b Paraffinschnitt. Vergr. 224 ×

bekannten Strukturen nicht. Ganz allgemein fällt auf, daß im Kryostatschnitt keine Gewebslücken vorhanden sind. Die Lumina der Endometriumdrüsen sind mit Sekret gefüllt. Auch alle anderen im Paraffinschnitt als optisch leer erscheinenden Gewebslücken sind mit einer teils blaß eosinophilen, teils blaß-bläulichen

Substanz angefärbt. Die Übergänge von einem Gewebeelement zum anderen, z. B. Stroma zum Epithel, Epithel zum Sekret, erscheinen fugenlos und dadurch weniger scharf abgesetzt als im Paraffinschnitt. Man vermißt z. B. im Kryostatschnitt die charakteristische Glykogenvacuolenbildung unterhalb des Kernes nach Einsetzen der Progesteronwirkung. Das Cytoplasma aller Zellen ist stärker eosinophil angefärbt als im Paraffinschnitt. Das Kernchromatin ist weniger stark angefärbt als im Paraffinschnitt. Abb. 1 zeigt ein Beispiel des morphologischen

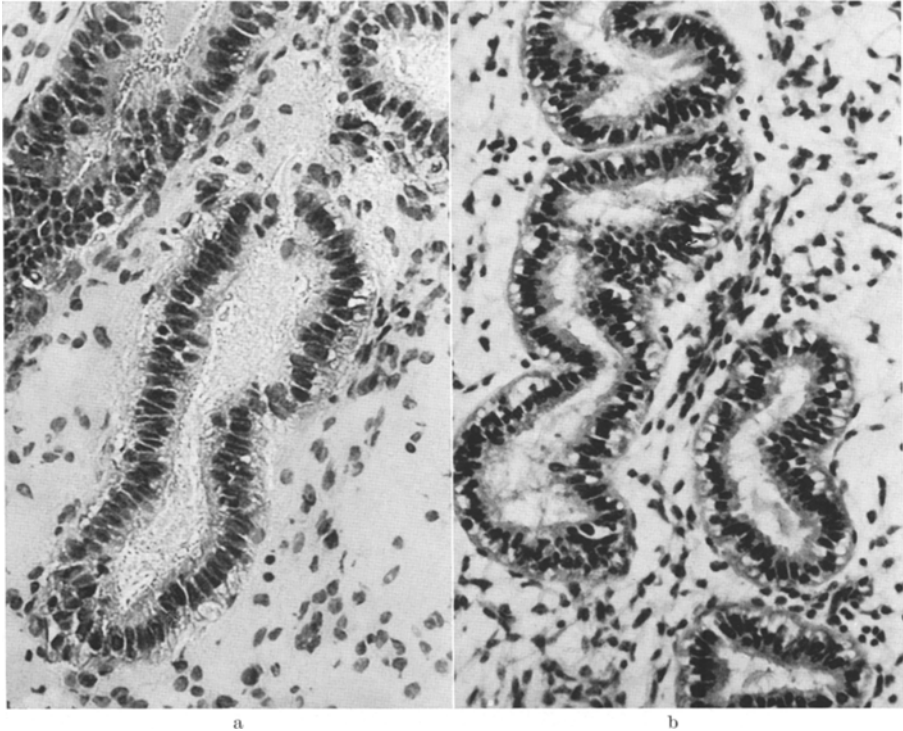


Abb. 2a u. b. Endometrium kurz nach der Ovulation. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. a Frischgefrierschnitt, b Paraffinschnitt. Vergr. 224 ×

Bildes beim Vergleich beider Schnittverfahren im Kryostat- und Paraffinschnitt aus einem proliferierenden Endometrium und Abb. 2 ein gleiches Bildpaar von einem Endometrium kurz nach der Ovulation.

Die Schrumpfung des Gewebes nach Paraffineinbettung ist im Vergleich zum Kryostatschnitt bereits makroskopisch erkennbar. Abb. 3 zeigt eine Übersicht eines Endometriums von der Basalis bis zum Deckepithel mit beiden Methoden. Im Bildausschnitt ist das Lumen des Uteruscavum getroffen. Während es im Kryostatschnitt nur als feiner Spalt imponiert, klafft es im Paraffinschnitt weit auseinander. Das Endometrium hat durch die Schrumpfung des Gewebes wesentlich an Höhe verloren. Die stärkere Anfärbbarkeit der Drüsenkerne ist auch in der Übersichtsvergrößerung erkennbar. Die Ergebnisse der vergleichenden Messungen mit der Meßlupe über die Höhe des Endometriums in Millimetern zeigt Abb. 4. In dieser Abbildung wurden 27 nach Funktionszuständen geordnete Endometrien verwandt. Im Kryostatschnitt ist das Endometrium stets höher

als im Paraffinschnitt. Die Differenz ist nicht immer gleichmäßig, sondern steigt mit dem Wassergehalt des Endometriums. Je wasserreicher das Gewebe ist, um so mehr wirkt sich die dehydrierende Prozedur der Paraffineinbettung mit einer stärkeren Schrumpfung aus. Die enorme Volumenschwankung des Endometriums während eines Cyclus wird in Abb. 4 besonders deutlich. Um den Zeitpunkt der

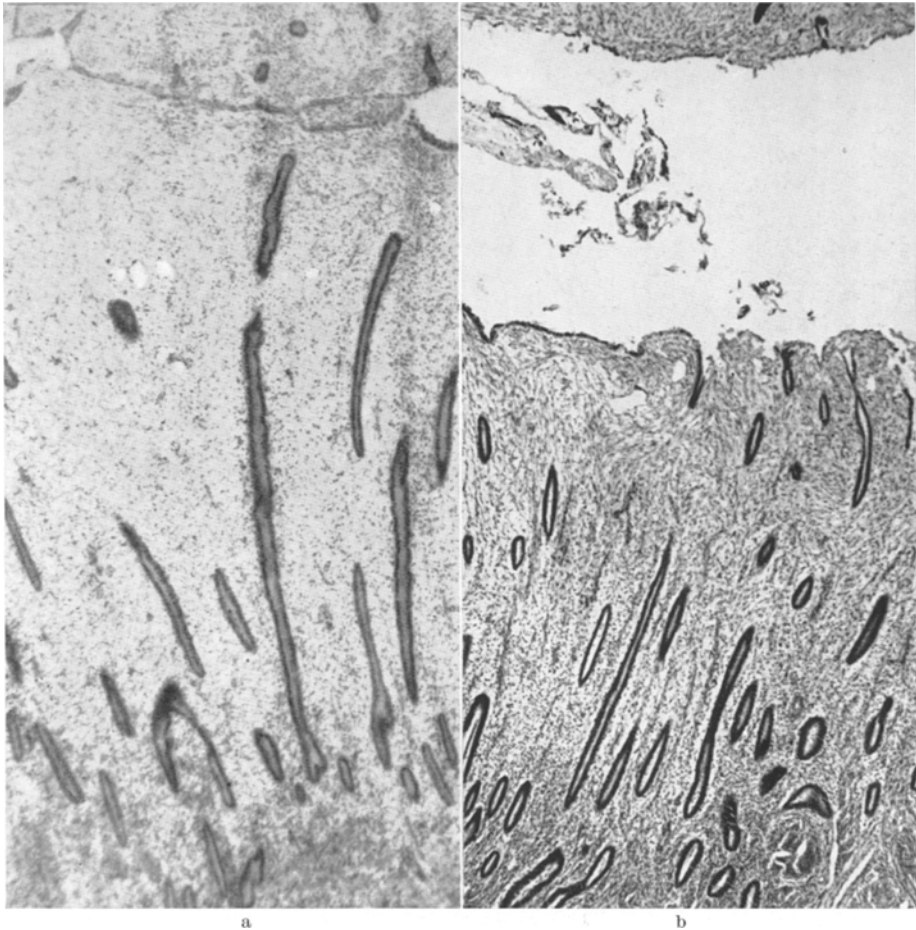


Abb. 3a u. b. Proliferierendes Endometrium, Hämatoxylin-Eosin-Färbung. a Frischgefrierschnitt, b Paraffinschnitt. — Am oberen Bildrand ist das Cavum uteri angeschnitten. Die Erweiterung ist infolge der Schrumpfung im Paraffinschnitt deutlich sichtbar. Vergr. 35 ×

Ovulation ist die Höhe des Endometriums um mehr als das Zehnfache gegenüber der postmenstruellen Phase angestiegen. Diese Volumenschwankung kommt im Kryostatschnitt sehr deutlich zum Ausdruck. Sie ist bei Betrachtung des morphologischen Bildes zu einem wesentlichen Teil — neben dem Gewebswachstum — auf eine Zunahme des Flüssigkeitsgehaltes im Endometrium zurückzuführen.

Abb. 5 zeigt die Ausmessungen der Drüsendurchmesser, Drüsenlumina und Höhe der Drüsenepithelien. Der Drüsendurchmesser ist bei beiden Präparationsarten praktisch gleich. Die gemessenen Differenzen liegen im Fehlerbereich der Methode. Dagegen ist das Drüsenlumen im Paraffinschnitt immer weiter als

im Kryostatschnitt. Dies ist besonders auffällig im ersten Drittel des Cyclus. Entsprechend dieser Veränderung ist bei gleichbleibendem Drüsendurchmesser die Höhe der Epithelzellen verschieden. Auch hier scheint ein besonderer Wasserreichtum der Epithelzellen während der Proliferation vorzuliegen.

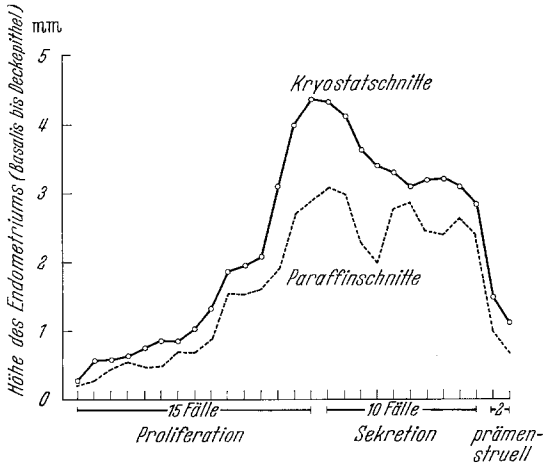


Abb. 4. Vergleichende Messung über die Höhe des Endometriums in Millimetern am Frischgefrier- und Paraffinschnitt

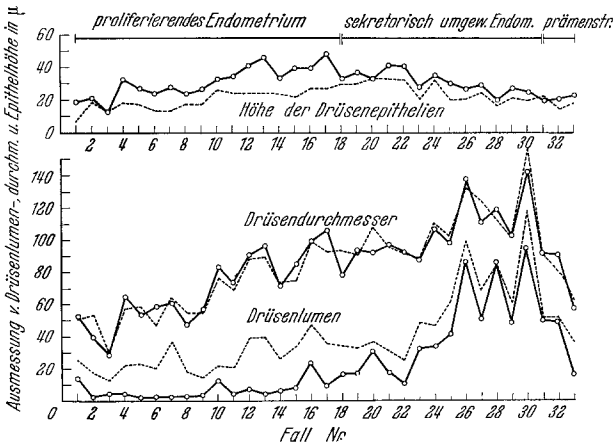


Abb. 5. Vergleichende Messung des Drüsenumens, des Drüsendurchmessers und der Höhe der Drüseneptithelien in μ am Frischgefrier- und Paraffinschnitt

Die Ausmessungen des Längs- und Querdurchmessers an den Zellkernen der Drüseneptithelien und Stromazellen zeigen im Kryostatschnitt in allen Fällen einen größeren Durchmesser als im Paraffinschnitt.

Kontrollversuch. Die Schrumpfung des Gewebes war in den Gewebsblöcken noch stärker, die ohne vorherige Einfrierung mit CO_2 -Schnee in Formalin fixiert wurden. Dies ist leicht verständlich, da das gleichzeitige Auftauen und Fixieren in Formalin den Gewebsblock mehr in der starren gefrorenen Form hielt. Wird lebenswarmes Gewebe in Formalin gegeben, ist dessen Kontraktilität größer als bei dem durchgefrorenen Block.

Ergebnisse an anderem gynäkologischem Material

Wird im klinischen Sektor eine histologische Schnelldiagnose gewünscht, so ist der Kryostatschnellschnitt zweifellos sehr geeignet. Innerhalb von 5 min wird ein Schnitt hergestellt, der einem Paraffinschnitt in nichts

nachsteht. Wenn im lebensfrisch gewonnenen Material keine Verknöcherungen oder Verkalkungen vorliegen, gelingt die Schnitttechnik in jedem Falle. Stark fetthaltiges Gewebe (z. B. Mammaexcisionen) hat sich nicht als Hindernis erwiesen. Auch besonders hartes Gewebe, wie Cervixwand oder derbe Fibrome, konnten ohne Mühe geschnitten werden. Für die Schnelldiagnose haben wir eine verkürzte Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewählt (2 min Kernfärbung in MAYERS Hämalaun, Bläuen in fließendem Wasser, kurz in Eosin eintauchen und dehydrieren). Eine gewisse Schwierigkeit sehen wir für die Schnelldiagnostik mit

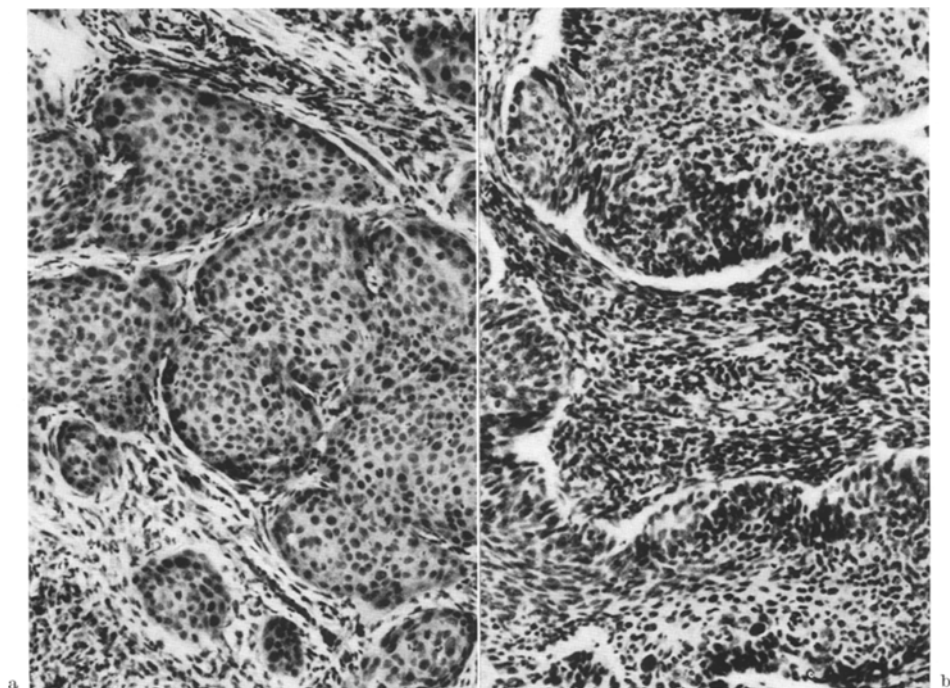


Abb. 6a u. b. Bröckelentnahme aus dem Cervicalkanal. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Plattenepithelcarcinom. a Frischgefrierschnitt, b Paraffinschnitt. Vergr. 140 ×

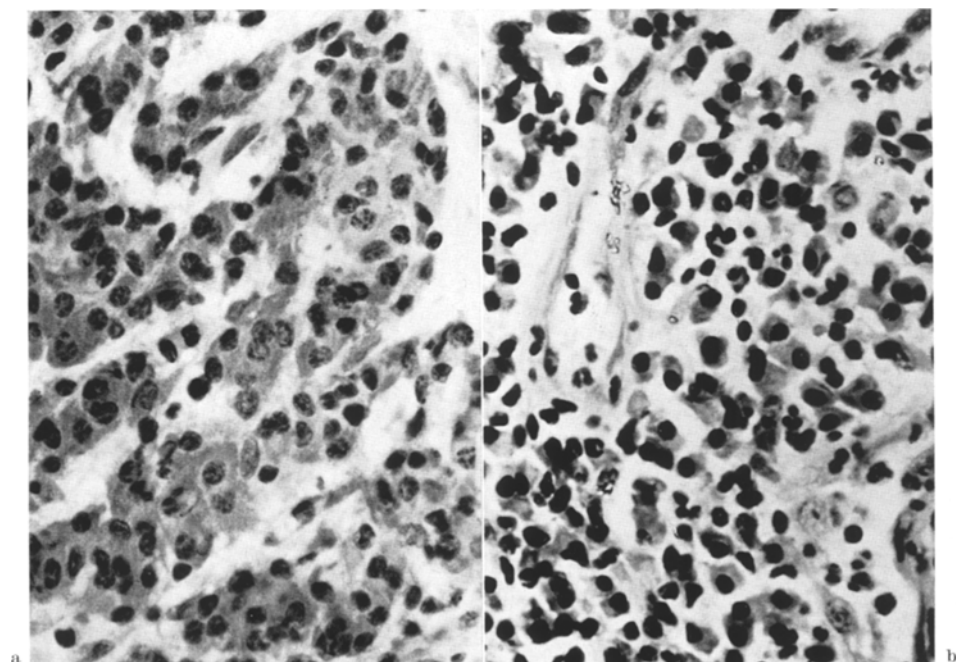


Abb. 7a u. b. Probeexcision aus der hinteren Scheidenwand. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Plasmacelluläres Infiltrat. a Frischgefrierschnitt, b Paraffinschnitt. Vergr. 560 ×

dem Kryostatschnitt in der ungewohnten Morphologie des Gewebes. In den meisten Fällen macht die Diagnostik aber keine Schwierigkeiten. Zwei Beispiele sollen dies erläutern: Abb. 6 stellt eine Bröckelentnahme aus dem Cervicalkanal dar bei einem klinisch nicht sicheren Carcinom. Die Tumordiagnose ist in beiden Verfahren völlig klar, im Kryostatschnitt besteht die fugenlose Gewebsstruktur, die Tumorzapfen liegen den Verhältnissen in vivo entsprechend ohne Spalt-raum im Tumorstroma, während im Paraffinschnitt große Spalträume entstanden sind.

Gelegentlich macht jedoch die Diagnostik im Kryostatschnitt Schwierigkeiten. Abb. 7 zeigt ein Beispiel: Es handelte sich um eine makroskopisch suspekta Stelle an der hinteren Vaginalwand einer älteren Patientin. Es wurde eine Probeexzision durchgeführt und eine Schnelldiagnose gewünscht. Im Kryostatschnitt hatte man den Eindruck einer ausgedehnten zelligen Infiltration unter dem intakten Plattenepithel der Vagina. Die Zellen schienen in Strängen zusammenzuliegen, so daß histologisch der Eindruck eines epithelialen Tumors entstand. Da das histologische Bild ungewöhnlich war, wurde vor einer weiteren therapeutischen Intervention der Paraffinschnitt abgewartet. Die Dehydrierung und Schrumpfung des Gewebes führte zu einem bekannten Bild. Es handelte sich um eine stark plasmacelluläre Infiltration unter dem Vaginalepithel. Die Dehydrierung rundete die Plasmazellen ab und isolierte sie, so daß das Infiltrat von Einzelzellen deutlich zu erkennen war.

Diskussion

Wir haben Endometrien und andere Gewebe mit verschiedenen Verfahren histologisch verarbeitet und sind zu unterschiedlichen morphologischen Bildern gekommen. Bei welchen Verfahren kann man damit rechnen, ein Abbild zu bekommen, welches den Verhältnissen in vivo näherkommt?

Betrachten wir zunächst die Verarbeitung des Gewebes im Frischgefrierschnitt. Das lebensfrisch gewonnene Material wird noch warm in wenigen Sekunden mit CO_2 -Schnee eingefroren. Kohlensäure hat eine Sublimationstemperatur von $-78,5^\circ\text{C}$. Durch das rasche Überführen aller Gewebsflüssigkeiten in den festen Zustand bei derart tiefen Temperaturen wird eine Eiskristallbildung verhindert. Danach wird das Gewebsblöckchen in einen Luftraum von -21°C überführt und hier bis zu dieser Temperatur „aufgewärmt“. Sowohl die Einfrierungs- wie Aufbewahrungstemperatur ist niedrig genug, um alle fermentativen und katalytischen Vorgänge im unfixierten Gewebe zu stoppen, ohne diese zunächst irreversibel zu schädigen. Der Schnitt des Gewebes erfolgt bei -21°C , ohne Verzerrung desselben. Bei der Abnahme des etwa $4-6\mu$ dünnen, -21°C kalten Gewebsscheibchens durch den zimmerwarmen Objektträger schmilzt dieses sofort, klebt fest und faltenlos auf dem Objektträger an und verschiebt sich auch bei der anschließenden raschen Trocknung durch Verdunstung des Gewebswassers nicht mehr. Das Gewebe ist also einer zweimaligen raschen Temperaturschwankung (von $+37^\circ$ auf $-78,5^\circ$ und von -21° auf Zimmertemperatur) sowie einer anschließenden Trocknung unterworfen, Vorgänge, die auf physikalischem Wege eine chemische Beeinflussung (Denaturierung) der Gewebsproteine bedingen. Mit der Trocknung kommt es ähnlich wie beim „freeze-drying“ zu einer Fixierung, ohne deren Schrumpfungerscheinungen. Der

Frischgefrierschnitt ist bis zu seiner Zuführung in eine Färbereihe von jeglichen Chemikalien unberührt geblieben.

Dagegen ist der Entwicklungsweg eines zur Färbung bereitstehenden Paraffinschnittes sehr viel langwieriger, komplizierter und mit irreversiblen Eingriffen in die Gewebsstrukturen verbunden. Wir haben lediglich die Formalinfixierung und die mitgeteilte Einbettungsmethode vergleichend herangezogen, ohne auf das weite Gebiet andersartiger Fixationsmittel und Einbettungsarten eingehen zu können. Die Formalinfixierung ist ein irreversibler Vorgang, bei dem es zu chemischen und physikochemischen Umsetzungen im Gewebe kommt, z. B. die Methylierung von Aminogruppen, eine starke Verschiebung des isoelektrischen Punktes zum Basischen, ausgedehnte Polymerisations- und Kondensationsvorgänge im Gewebe, die Lösung bestimmter Eiweißsubstanzen, eine völlige Entfernung der Gewebssalze und anderes mehr (HAUG 1959). Mit der Veränderung der Gewebsstrukturen geht die Stabilisierung dieser Strukturen einher. Bei der nachfolgenden Entwässerung in verschiedenen konzentrierten Alkoholen kommt es zu einer starken Schrumpfung des Gewebblockes. Über den Chemismus der Härtung und nachfolgenden Behandlung in Methylbenzoat und Paraffin ist nur wenig bekannt. Wir stehen also im Paraffinschnitt einer veränderten Materie gegenüber. Durch Variationen der Fixations- und Entwässerungslösungen kann man zweifellos auch am Paraffinmaterial die eine oder andere Gewebssubstanz schonen. Wir sind uns dessen bewußt, daß besonders die Formalinfixierung eine für das Endometrium nicht optimale Fixierungsmöglichkeit darstellt. Die Schonung des Gewebes während der Fixation und Einbettung und die mögliche Veränderung derselben bei Variationen der Methodik war Gegenstand zahlreicher Arbeiten (BERG 1907, HERTWIG 1931, KAISERLING und GERMER 1893, PATTEN und PHILPOTT 1920/21, SCHILLER 1930, TELLYESNICZKY 1898, 1901, WERNER 1934, 1936 u. a.). Man muß hervorheben, daß alle bisherigen Kenntnisse der Histologie auf der Möglichkeit der Fixierung und Einbettung tierischen und menschlichen Materials beruhen. Daher haben sich mit der Betrachtung histologischer Präparate bestimmte Eindrücke eingeprägt, so daß veränderte Bilder als ungewohnt und fremd erscheinen. Ähnliches widerfährt dem Betrachter des unfixierten, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Kryostatschnittes. Man vermißt die scharf konturierende Trennung verschiedener Gewebelemente, die gut durchzeichnete Chromatinstruktur des Kernes mit dem profilierten Nucleolus und der Kernmembran. Durch die ungewohnte, fast völlige Erhaltung des Glykogens im Gewebe entstehen z. B. Schwierigkeiten bei der Endometriumdiagnostik. Übersieht man jedoch die Anamnese beider Schnittverfahren, betrachtet Abbildungen und Meßergebnisse, so muß man zu dem Ergebnis kommen, daß der unfixierte Frischgefrierschnitt ein lebensreueres Abbild wiedergibt als der fixierte Paraffinschnitt. Besonders die Volumenschwankung des Endometriums während eines Cycles wird mit dem Frischgefrierverfahren den Verhältnissen in vivo entsprechend dargestellt (Abb. 3 und 4). Morphologisch konnte bisher das Ausmaß der Volumenschwankung nicht derart nachgewiesen werden.

Wie LANGREDER und STRAUSS 1957 bereits mitteilten, eignet sich das Kryostatverfahren ausgezeichnet zur Herstellung sog. Schnellschnitte. Bei der Diagnostik muß allerdings berücksichtigt werden, daß es einer gewissen Erfahrung für das sich morphologisch anders darbietende Gewebe bedarf.

Die zentralste Rolle spielt der unfixierte Kryostatschnitt auf dem Gebiet der Histochemie. Für den Nachweis einer Reihe empfindlicher Fermentsysteme ist die Herstellung eines unfixierten Schnittes Vorbedingung, für viele andere Substanzen brachte der unfixierte Schnitt eine bessere Erhaltung der Substanz und eine lebenschtere Lokalisation derselben.

Keine ausreichende Erfahrung besteht zur Zeit über die Konservierung unfixierter Gewebsblöcke in der Kälte. Wir betten unser Restmaterial stets in Paraffin ein, so daß wir über die Haltbarkeit des Gewebsblockes in der Kältekammer keine Aussage machen können. Für größeres Material scheint die Aufbewahrung als Paraffinblock sicher einfacher, da dieser keines Kälteraumes bedarf. Die Aufbewahrung von unfixierten, lufttrockenen, ungefärbten Frischgefrierschnitten in staubfreien Kästen bei Zimmertemperatur kann genauso vonstatten gehen wie die von Paraffinschnitten. Wir haben Erfahrungen mit 4 Jahre altem Schnittmaterial, welches mit Hämatoxylin und anderen Färbungen noch völlig normal behandelt werden kann.

Zusammenfassung

Von Endometrien und anderem gynäkologischem Material wurden unfixierte Frischgefrierschnitte mit dem Kryostaten von Dittes-Duspiva hergestellt und das gleiche Material fixiert, eingebettet und Paraffinschnitte angefertigt. Von beiden Schnittherstellungen wurden gleichartige Hämatoxylin-Eosin-Färbungen hergestellt. Die Gewebsschnitte wurden vergleichend auf morphologische und färberische Unterschiede untersucht. An den Endometrien wurden vergleichende Messungen zur Größe der einzelnen Gewebs Elemente im Frischgefrier- und Paraffinschnitt angestellt. Der Vergleich beider Methoden ergab, daß im Frischgefrierschnitt die Verhältnisse mehr denen *in vivo* entsprechen. Der Frischgefrierschnitt eignet sich gut für das Gebiet der histologischen Schnelldiagnostik und nimmt eine zentrale Stellung im Bereich der Histochemie ein.

The morphology of tissues in fresh frozen sections and after fixation and embedding in paraffin

Summary

Fresh frozen sections and paraffin sections, both stained with haematoxylin and eosin, have been compared in the same tissue (endometrium and other gynaecological specimens) and differences in the morphology and staining results have been described.

In the endometrium, exact measurements of certain tissue elements were performed in both types of section (mucosal thickness; glandular diameter; luminal diameter; length of the epithelial cells and two diameters of the nuclei of the epithelial and stromal cells). A comparison of both techniques by these means suggests that the histological picture in fresh frozen sections is more similar to the conditions *in vivo* than the appearances seen in paraffin sections.

Fresh frozen sections are highly suitable for rapid diagnosis in histology and are of particular value in the field of histochemistry.

Literatur

- BERG, W.: Die Veränderungen des Volumens und Gewichtes des Gewebes bei der histologischen Fixation, dem Auswässern, der Härtung und der Paraffineinbettung. *Anat. Anz.* **31**, 252—268 (1907).
- HAUG, H.: Leitfaden der mikroskopischen Technik. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- HERTWIG, G.: Der Einfluß der Fixierung auf das Kern- und Zellvolumen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **23**, 484—504 (1931).
- KAISERLING, K., u. G. GERMER: Über den Einfluß der gebräuchlichen Konservierung und Fixationsmethoden auf das Größenverhältnis tierischer Zellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **133**, 79—104 (1893).
- LANGREDER, W., u. G. STRAUSS: Beschleunigung und Verbesserung der gynäkologisch-histologischen Diagnostik durch den Schnellschnitt im Kryostaten. *Zbl. Gynäk.* **79**, 889—903 (1957).
- PATTEN, B. M., and R. PHILPOTT: The shrinkage of embryos in the processes preparatory to sectioning. *Anat. Rec.* **20**, 393—413 (1920/21).
- SCHILLER, W.: Gewebsfixierung unter Erhaltung der basischen Kernfärbung. *Z. Zellforsch.* **11**, 63—178 (1930).
- TELLYESNICZKY, K.: Über die Fixierungs(Härtungs)flüssigkeiten. *Arch. mikr. Anat.* **52**, 202—247 (1898).
- Fixation im Lichte neuerer Forschung. In: *Ergebnisse der Anatomie*, Bd. II, S. 3—35. 1901.
- WÄCHTER, M.: Vergleich zwischen Frischgefrier- und Paraffinschnitten am Endometrium. Diss. Med. Univ. Köln 1962.
- WERNER, CL. F.: Über den Einfluß von Temperatur und Druck auf das Ergebnis der histologischen Fixation. *Z. Zellforsch.* **20**, 747—753 (1934).
- Die Dauer der Fixation. *Z. wiss. Mikr.* **53**, 440—442 (1936).

Dr. ERIKA KERN-BONTKE, Köln-Lindenthal, Universitäts-Frauenklinik.