



Kurze Inhaltsangaben der Vorträge
gehalten anlässlich eines
KURSUS FÜR MIKROTOMIE
der
SARTORIUS-WERKE A. G. GÖTTINGEN

1. "Die Mikrotomie in Biologie und Technik"
Vortragender: Prof. Dr. J. Kisser

Die mikroskopischen Untersuchungen können im durchfallenden oder im auffallenden Licht erfolgen. Dadurch wird die Vorbereitungsart des Objektes bestimmt. Mit Ausnahme von einzelligen und wenigzelligen Organismen gibt es nur wenig Materialien, die genügend lichtdurchlässig sind, um der Untersuchung mit durchfallendem Licht zugänglich zu sein. Einfachste Verfahren, auch stärkere Objekte lichtdurchlässig zu machen, bestehen aus einem Zerquetschen, Zerpuffen, Zerfasern bzw. dem Zerlegen durch Mazeration. Sie sind jedoch nur anwendbar, wenn die Orientierung der einzelnen Partikel im Gesamtverband des Objektes nicht erhalten bleiben muß. In diesem Fall hilft oft eine Aufhellung durch Flüssigkeiten höherer Lichtbrechung oder durch Bleichmittel, z. B. Eau d'Javelle oder Dichloressigsäure. Reichen diese Methoden nicht aus, ist man gezwungen, Dünnschnitte herzustellen, die oft, wie z. B. beim Holz, durch drei verschiedene Ebenen gelegt werden müssen, damit man einen vollständigen Einblick in die Struktur erhält. Die Schnittrichtungen sind dann:

- a) quer zum Faserverlauf (Hirnschnitt)
- b) parallel zum Faserverlauf durch das Zentrum (radialer Längsschnitt)
- c) tangential zu den Jahresringen (tangentialer Längsschnitt)

Schnitte mit aus freier Hand geführtem Messer wurden erstmalig 1667 von dem englischen Botaniker Robert Hook durchgeführt. Solche Schnitte sind jedoch nur von Materialien geeigneter Konsistenz möglich. Kleine Objekte müssen gefaßt bzw. eingebettet werden. Auf die verschiedenen Einbettungsarten wird später eingegangen. Es ist einleuchtend, daß von Materialien, die sehr hart und spröde sind, keine zusammenhängenden Schnitte abgetragen werden können. Hier muß man sich mit einer Anschnittfläche begnügen, die im auffallenden Licht untersucht wird.

Um die Bedeutung der Mikrotomie unter Beweis zu stellen, genügt ein Hinweis auf die unzähligen mikroskopischen Untersuchungsergebnisse, die ohne vorangehende Herstellung von Dünnschnitten nie möglich gewesen wären. Vergleicht man die Leistungen eines Mikroskops mit denen eines Mikrotoms, so muß gesagt werden, daß das Mikroskop je nach verwendeter Optik die gewünschte Vergrößerung liefert. Dem gegenüber ist die erreichbare geringste Schnittstärke, die mit einem Mikrotom erzielt werden kann, nicht allein eine Frage der feinmechanischen Präzision dieses Gerätes, sondern sie hängt von einer Reihe weiterer Faktoren ab, wie z. B. der Konsistenz des Objektes, der Größe der zu schneidenden Fläche, der Güte der Messerschneide und nicht zuletzt der manuellen Geschicklichkeit des Bediennenden. Diesen Unterschied der Geräte sollte sich derjenige vor Augen halten, dem die Herstellung gleichmäßiger Schnitte einer gewünschten Stärke nicht auf Anhieb gelingt.

Dem Hinweis auf die vielen Kleinigkeiten, die alle wesentlich zum Gelingen guter Mikrotomschnitte beitragen, dienen die folgenden Ausführungen.

2. "Die Mikrotom-Messer, Typen, Wirkungsweise, Pflege"
Vortragender: Prof. Dr. J. Kisser

Bei der Herstellung von Mikrotomschnitten müssen zweierlei Arten der Abtragung der Schnitte unterschieden werden: die tatsächliche Schnittwirkung des Messers und die Keilwirkung desselben. Die erste Art wird bei elastischem Material angewendet und der Erfolg hängt im wesentlichen von der Schärfe des Messers ab. Die zweite Methode wird bei zähem, sprödem Material angewandt, das gewissermaßen abgesprengt werden muß. Je nach Material, also z. B. Holz, tierisches Gewebe, Celloidinmaterial einerseits oder in Paraffin eingebettetes bzw. gefrorenes Material andererseits, wird mit schräggestelltem oder quergestelltem Messer geschnitten. Es ist einleuchtend, daß der wirksame Keilwinkel des Messers umso kleiner wird, je kleiner der Schnittwinkel ist; das ist die Abweichung der Richtung der Messerschneide von der Schnittrichtung.

Um zu möglichst undeformierten Schnitten zu kommen, ist man bestrebt, den Keilwinkel des Mikrotom-Messers möglichst klein zu halten. Es sind deshalb ursprünglich 3 Typen von Messern entwickelt worden, die mit den Buchstaben "a", "b" und "c" bezeichnet wurden. Dabei zeichnet sich die Type "a" durch einen starken Hohlschliff aus und hat deshalb einen sehr geringen Keilwinkel. Eine derartige Schneide ist jedoch nur wenig widerstandsfähig, auch federt sie leicht, so daß dieser Messertyp nur für sehr weiche Materialien verwendbar ist. Deshalb sind die am meisten gebräuchlichsten Typen die Schliffarten "b" und "c". "b" hat einen schwachen Hohlschliff, während "c" keilförmig ist. Das Messer "b" hat den Vorzug, daß in dem Hohlschliff die Flüssigkeit, mit der das Messer befeuchtet werden muß, besser haftet; denn die Dünnschnitte sollen ja auf der Messeroberfläche schwimmen, damit sie nicht kleben und zerreißen.

Normalerweise haben die Messer einen Keilwinkel von ca. 13° . Dazu kommt ein beidseitiger Facettenwinkel von oben 3 bis 6° und unten 6° , so daß der tatsächliche Keilwinkel hinter der Schneide 22 bis 25° beträgt. Diese Facetten werden angeschliffen, damit beim Abziehen und Schleifen eine möglichst kleine Fläche zu bearbeiten ist und der Verlust am gehärteten Material gering bleibt. Den richtigen Winkel der Facette erhält man durch Erhöhen des Messerwinkels mittels einer sog. aufsteckbaren Abziehröhre. Vor dem Abziehen wird das Messer in einem Griff befestigt, so daß es absolut fest sitzt. Für dasselbe Messer soll stets dieselbe Abziehröhre verwandt werden. Die Abziehröhre hat auch ein "vorn" und "hinten" (teilweise gekennzeichnet), das nicht vertauscht werden darf. Beim Abziehen, das ohne Druckanwendung geschehen soll, müssen Abziehröhre und Schneide gleichmäßig auf dem Riemen aufliegen, über den sie, den Rücken voran, von einem bis zum anderen Ende gezogen werden. Am Ende angelangt, muß das Messer über den Rücken umgedreht werden. Durch das Abziehen werden Unebenheiten der Schneide geglättet, wozu der bloße Lederriemen ausreicht. Enthält die Schneide jedoch Unschärfen, so verwendet man eine Riemenpaste, z. B. rote, ein präpariertes Eisenoxyd, das den Vorteil hat, das seine kleinen Körnchen, wenn sie gedrückt werden, in noch kleinere Partikeln zerfallen. Dadurch geht die im Anfang etwas gröbere Schleifwirkung in eine polierende über. Der Riemen muß unbedingt staubfrei aufbewahrt werden. 30 bis 50 Züge nach jeder Richtung sind beim Abziehen nötig und es ist ratsam, nach dem Schneidevorgang das Messer aus dem Mikrotom zu nehmen und erneut abzuziehen und nicht solange zu warten, bis es stumpf ist. Diese kleine Mühe erhöht die Schnittleistung des

Messers ganz erheblich. Hat die Schneide jedoch größere Ausbrüche, so muß das Messer geschliffen werden. Dieses geschieht auf einem feinkörnigen gelben Abziehstein bzw. Arcansasstein, der auf jeden Fall befeuchtet sein muß. Je nach der Zähigkeit der verwendeten Flüssigkeit kann man mit ein und demselben Stein einen gröberen oder feineren Schliff erhalten. In Frage kommen Wasser, Alkohol, Seifenlösungen oder Öl. Beim Schleifen wird das Messer mit der Schneide vorangeführt. Im übrigen verfährt man wie beim Abziehen, das dem Schleifen folgen muß. Es ist jedoch wichtig, jetzt vor dem Abziehen Abziehröhre und Messer gründlich vom Schleifstaub des Steines zu reinigen. Die Qualität der Schneide prüft man normalerweise bei 100-facher Vergrößerung unter einem Mikroskop.

Zur Schonung des Messers sollte man nie vergessen, es sofort nach dem Gebrauch trocken zu wischen. Es empfiehlt sich auch, das Messer einzufetten, wenn man es längere Zeit nicht benutzt.

Eine andere ebenfalls zu beachtende Winkelstellung ist der sog. Anstellwinkel. Man bezeichnet damit die Neigung des Messerkeils zur Schnittrichtung. Ganz allgemein kann gesagt werden, daß bei weichen Materialien der kleinste Winkel 6° , entsprechend dem Winkel der unteren Facette betragen kann. Er muß jedoch umso steiler werden, je härter das zu schneidende Material ist, und man kann hier zu Winkeln bis zu 30 bis 35° kommen.

3. "Das Schneiden von Pflanzenmaterial, Hölzern, Leder und Papier"
Vortragender: Prof. Dr. J. Kisser

Vor Herstellung eines Schnittes sollte man sich zunächst fragen: "Was will ich in diesem Schnitt sehen?" - Seine Dicke richtet sich nach dem angestrebten Zweck. Man sollte nie dünner schneiden, als es dieser erfordert; denn ein Schnitt von 20 μ Stärke ist leichter herzustellen, als z. B. einer von 4 μ ; ganz abgesehen davon, daß der Dünnschnitt oft eine komplizierte Vorbereitungsmethode verlangt. Das pflanzliche Objekt hat gegenüber dem tierischen den Vorteil, daß die einzelnen Zellen von Membranen aus Zellulose umgeben sind, die der Substanz für die Herstellung stärkerer Schnitte genügend Halt geben, so daß oft die Arbeit des Fixierens, Einbettens und dergl. erspart bleibt.

Sollen die Zellen möglichst ihren natürlichen Zustand beibehalten, so darf das Messer beim Schneiden nicht mit Wasser befeuchtet werden, weil dieses die verschiedenen Bestandteile der Zellen zum Quellen bringt. Man verwendet in solchen Fällen Zuckerlösungen, die mit dem Zellsaft nahezu isotonisch sind.

Das gebräuchlichste Fixierungsmittel bei pflanzlichem Material ist der Alkohol. Er entzieht den Membranen das Wasser, wodurch sie wesentlich härter, ja sogar spröde werden. Um letzteres zu vermeiden, nimmt man 50 bis 70% - igen Alkohol und überträgt das Material zur Aufbewahrung in das sog. Strasburger-Flemmingsche Gemisch, das aus je einem Teil Alkohol, Wasser und Glycerin besteht. Das Mischungsverhältnis 1 : 1 : 1 kann variiert werden. Wird das Material zu weich, erhöht man den Alkoholzusatz; wird es zu hart, so nimmt man mehr Glycerin.

Um dieses pflanzliche Material in der Objektklammer des Mikrotoms befestigen zu können und ihm den nötigen Halt zu geben, klemmt man es je nach Härte zwischen Holundermark, holzfreien Kork oder Lindenholz und dann wird mit einem möglichst schräggestellten Messer unter Befeuchtung mit jener Flüssigkeit, in der das Material konserviert wurde, geschnitten. - Holz läßt sich am besten im grünen Zustand schneiden. Durch das Austrocknen erfährt es Veränderungen durch Verdichtung der Membranen, die durch nachträglichen Quellen nicht mehr rückgängig gemacht werden können. Dennoch gelingt es, trockenes Holz durch Einweichen bzw. Auskochen in Wasser mit etwas Glycerinzusatz oder durch Einweichen in Terpinol genügend zu erweichen, um es in einen gut schneidbaren Zustand zu versetzen. Bei sehr harten Hölzern (Kokosschale) kommt man auch noch zu guten Ergebnissen, wenn man das Objekt während der Schnittanfertigung mit Dämpfen behandelt oder mindestens mit heißem Wasser berieselt. Doch ist hierbei an einen genügenden Schutz des Mikrotoms zu denken. Alle Metallteile sind mit Plastik oder ähnlichem abzudecken, außerdem hat man heute die Silikonöle als gutes wasserabweisendes Material zur Verfügung. Für derartig spezielle Fälle sind außerdem auch Spezialmesser aus nichtrostendem Stahl zu verwenden.

Bei der Orientierung der Hölzer in der Objektklammer sollen diese stets so eingespannt werden, daß die Jahresringe senkrecht zur Messerbahn stehen, weil das Spätholz meist erheblich härter ist, als das im Frühjahr gewachsene. Es ist der Sinn dieser Orientierung, daß das Messer gleichzeitig in das harte und weiche Holz eintritt.

Lederuntersuchungen sind relativ einfach. Dickere Sorten, wie Sohlenleder, lassen sich ohne Einbettung recht gut schneiden. Sind sie zu spröde, so bringt

man sie einige Zeit in eine feuchte Atmosphäre. Dünnere Leder, die beim Schneiden ein Widerlager benötigen, erhalten dieses - wie eingangs erwähnt - durch Kork oder Lindenholz. Auch das Leder hat auf der Haarseite dichtere Schichten, während es im Innern lockerer ist. Es muß also in der Objektklammer ebenfalls so orientiert werden, daß das Messer gleichzeitig in beide Schichten eintritt. Sollte diese Orientierung aus irgendwelchen Gründen nicht möglich sein, so muß darauf geachtet werden, daß das Messer von dem weicheren Teil in den harten vordringen kann. Muß das Leder eingebettet werden, so ist Paraffin für diesen Zweck denkbar ungeeignet, denn durch die vollkommene Entwässerung wird das Leder spröde, auch treten unerwünschte Schrumpfungen auf. Hier ist Celloidin das am besten geeignete Einbettungsmaterial. - Rohhäute, die noch nicht gehärtet sind, lassen sich sehr gut nach der Gefriermethode schneiden, nachdem sie mit Formol gehärtet wurden.

4. "Schwierigkeiten und Fehler beim Schneiden mit Mikrotomen"

Vortragende: Frl. Marthen

Der Einbettung in Paraffin als auch in Celloidin muß eine sorgfältige Entwässerung vorausgehen. Für eine schnelle Diagnose kann die Entwässerung durch hochprozentigen Alkohol rasch erfolgen. Dieses Verfahren führt jedoch zu Schrumpfungen des Materials. Deshalb muß bei Objekten, die für Forschungszwecke dienen sollen, eine schonende Behandlung durch allmähliche Steigerung des Alkoholgehaltes der Entwässerungsbäder durchgeführt werden. Ist die Entwässerung nicht restlos gelungen, so zeigen sich beim Schneiden weiße Flecken und der Schnitt splittert. Nach kurzer Zeit schrumpft das Material innerhalb des Paraffins bzw. Celloidins und wird hart und spröde. Zur Beseitigung dieses Fehlers muß nochmals entparaffiniert werden, was am zweckmäßigsten mit Methylbenzoat geschieht. Ist der Paraffinblock nicht von gleichmäßiger Beschaffenheit, das zeigen die weißen Flecken und einige Blasen, so daß beim Schneiden das Paraffin abbröckelt, so war das Paraffin beim Gießen nicht warm genug. Es fehlt die innige Verbindung zwischen dem Material und dem Gießparaffin. Bröckeln des Schnittes kann aber auch ein Zeichen dafür sein, daß noch Reste des Intermediums, wie Benzol, Chloroform oder ähnliches, im Paraffin enthalten sind. Der Block muß nochmals aufgelöst werden. Die Reste des Intermediums können durch starkes Erhitzen aus dem Paraffin entfernt werden. Größere Luftblasen innerhalb des Objektes lassen sich nachträglich durch heißes Paraffin evtl. unter Zuhilfenahme einer erwärmten Nadel leicht ausfüllen.

Wichtig ist die Wahl des Paraffins. Für Teile aus dem zentralen Nervensystem genügt ein weiches Paraffin als es für die bindegewebsreichen Organe benötigt wird.

Schwieriger und langwieriger ist die Einbettung in Celloidin, da man darauf achten muß, daß man einen Celloidinblock von durchgehend gleichmäßiger Festigkeit bekommt. Zweckmäßig ist es, das Objekt nur soweit mit Celloidin zu überschichten, daß es gerade bedeckt ist. Von Zeit zu Zeit wird etwas dickeres Celloidin nachgegossen. Dadurch wird erreicht, daß die oberste Schicht nicht schon erhärtet ist, während die Mitte noch weich ist. Der größte Feind des Celloidins ist die Feuchtigkeit. Ist diese im Celloidin, so erscheint es trübe oder milchig, und ein solcher Block bekommt nie die richtige Festigkeit. Das Celloidin muß wieder abgeschnitten werden, der Rest mittels Aetheralkohol gelöst und anschließend in absolutem Alkohol nochmals gründlich entwässert werden. Ist das Celloidin zu hart geworden und fängt es an, sich zu krümmen, so kann man dieses durch Übergießen mit etwas Celloidin rückgängig machen.

Das eingebettete Objekt muß nun auf einem Objektisch befestigt werden. Es ist empfehlenswert, Kunststoffische, wie sie von den Mikrotom-Herstellern geliefert werden, zu verwenden. Aus Billigkeitsgründen behilft man sich oft mit Holzklötzchen. Diese haben jedoch den Nachteil, daß sie einmal, wenn sie zum Kühlen des Paraffinblockes in Wasser gelegt werden, quellen, andererseits in der Objektklammer zusammengedrückt werden. Der Block sitzt dann nicht richtig fest und falls man ihn bei einem dickeren Schnitt nicht ganz ablöst, so werden doch die Schnitte meist ungleichmäßig.

Von großer Bedeutung ist es, daß man für die vorliegenden Arbeiten den jeweils am besten geeigneten Mikrotomtyp auswählt und vor jedem Schneiden

die Gleitflächen ölt. Den Objektblock schneidet man auf das unbedingt erforderliche Maß, um das Messer nicht stärker als nötig zu beanspruchen. Sollen Serienschnitte oder Schnittbänder hergestellt werden, ist darauf zu achten, daß die beiden parallel zum Messer verlaufenden Blockkanten wirklich parallel sind. Erhält man keine gleichmäßigen Schnitte, so ist zu prüfen, ob alle Schrauben auch wirklich fest angezogen sind. Ferner ist darauf zu achten, daß das Messer den optimalen Anstellwinkel zum Objekt hat. Ist dies nicht der Fall, so kann der Schnitt entweder splintern oder er wird zusammengedrückt. - Jedoch auch die Konsistenz des Paraffinblockes kann die Ursache dieser Erscheinung sein. Ist er zu weich, schieben sich die Schnitte zusammen. Meist versucht man, durch Kühlen Abhilfe zu schaffen, ehe man in ein hartes Paraffin umbettet. Ist der Block zu hart, splintern die Schnitte. Abhilfe kann durch Anhauchen, Erwärmen mit dem Handballen oder Erhöhung der Raumtemperatur durch Aufstellen einer Lampe oder einer Heizsonne geschaffen werden. Je nach Konsistenz läßt sich durch schnelles oder langsames Durchziehen des Messers die Qualität der Schnitte verbessern. Ein sich zusammenschiebender Schnitt kann oft durch zartes Pusten gestreckt werden. Längsstreifen im Schnitt treten entweder auf bei Verunreinigung der Messerschneide, durch Paraffinreste, die mittels Xylol entfernt werden können, oder durch Scharfen im Messer, die durch Abziehen beseitigt werden müssen. Es können aber auch kalkhaltige Partikel noch im Block vorhanden sein, die durch ein Calciumlösungsmittel entfernt werden müssen. Sehr hinderlich können elektrostatische Aufladungen sein, die bewirken, daß der Schnitt am Messer klebt. Es ist dann empfehlenswert, einen möglichst großen Wassertropfen auf das Messer aufzubringen, auf dem der Schnitt dann schwimmt. Auch das Überziehen des Messers mit einer Paraffinschicht, indem man es mit einem Stück harten Paraffins bestreicht, hat sich bewährt.

Beim Herstellen von Celloidinschnitten muß grundsätzlich nicht nur das Messer, sondern vor allem auch der Block stark mit Alkohol befeuchtet werden, und man muß darauf achten, den Block gleich nach dem Schnitt wieder zu befeuchten, damit er nicht einen Augenblick trocken ist. Erst dann kann man sich der Weiterbehandlung des Schnittes zuwenden. Will man über lange Zeit ein zuverlässiges Mikrotom haben, dann vergesse man nicht, nach jeder Benutzung dasselbe zu reinigen.

5. "Die klassischen Einbettungsverfahren in der Mikrotomie mit Paraffin, Celloidin u.a.m."

Vortragender: Prof. Dr. J. Kisser

Bei der Einbettung wird eine vollkommene Durchtränkung und Homogenisierung des Materials angestrebt, wobei gleichzeitig eine gute Schneidkonsistenz erreicht werden soll. Hier hat sich die Paraffin-Methode seit langem ausgezeichnet bewährt. Es gibt Paraffin mit verschiedenen Schmelzpunkten zwischen 45° bis 70° , und je niedriger der Schmelzpunkt ist, desto weicher ist das Paraffin. Dadurch ist man in der Lage, die Paraffinsorte nach der Härte des Objektes zu wählen. Außerdem hat man die Möglichkeit, die Schneidetemperatur zu ändern und damit die Härte des Paraffins zu regulieren. Paraffin gestattet auch die Herstellung von lückenlosen Serienschnitten, bei denen die Vorderkante des folgenden Schnittes mit der rückwärtigen Kante des jeweils voraufgegangenen fest zusammenklebt. Ein weiterer Vorteil der Paraffineinbettungen ist darin zu sehen, daß bei entsprechend richtiger Anwendung das Objekt nicht nachteilig deformiert wird.

Das lebende Objekt muß zunächst abgetötet, d.h. fixiert werden, damit sein Strukturaufbau erhalten bleibt. Das Fixierungsmittel muß gründlich mit Wasser und zuletzt mit dest. Wasser ausgewaschen werden. Anschließend wird das Objekt entwässert. Dieses geschieht durch Alkohol. Bei unempfindlicheren Objekten kann gleich ein höherprozentiger Alkohol verwendet werden. Ist jedoch eine schonende Behandlung erforderlich, so passiert das Objekt eine Reihe von Bädern mit steigendem Alkoholgehalt und gelangt zuletzt in 96%igen. Dieser muß auf alle Fälle zweimal gewechselt werden. Anschließend wird ein Intermedium, das sowohl mit Wasser als auch mit einem Lösungsmittel für Paraffin mischbar ist, genommen. Da der Äthylalkohol einerseits mit Wasser, andererseits mit einem Lösungsmittel für Paraffin mischbar ist, kann man jetzt das Objekt in ein derartiges Lösungsmittel übertragen. In Frage kommen Chloroform (Siedepunkt $61,2^{\circ}\text{C}$), Benzol (Siedepunkt $80,4^{\circ}\text{C}$), Xylol (Siedepunkt 140°C), in neuerer Zeit Butylalkohol, Methylbenzoat oder für sehr empfindliche Objekte Cedernholzöl. Am besten geeignet ist Chloroform, am ungeeignetsten Xylol, das wegen des hohen Siedepunktes zu langsam verdampft und viele Objekte spröde macht. Am meisten wird im allgemeinen das Benzol verwendet; man überträgt jedoch aus dem 96%igen Alkohol nicht direkt in Benzol, sondern zunächst in eine Mischung von 3 Teilen Alkohol und 1 Teil Benzol, dann in eine aus gleichen Teilen Alkohol und Benzol und zum Schluß in ein Gemisch aus 1 Teil Alkohol und 3 Teilen Benzol. Das Material wird in jeder Mischung solange belassen, bis beim Schütteln keine Schlieren mehr bemerkbar sind, ein Zeichen dafür, daß die Diffusion des 96%igen Alkohols in das Alkohol-Benzol-Gemisch restlos vor sich gegangen ist. Anschließend kommt das Material in reines Benzol, das ebenfalls zweimal gewechselt werden muß. Infolge seiner hohen Lichtbrechung macht das Benzol das Material durchsichtig und man erkennt sofort, ob in ihm eine fehlerhafte trübe Stelle vorhanden ist.

Man setzt jetzt bei Zimmertemperatur von Zeit zu Zeit etwas Paraffin zu. Meist kommt man mit den Sorten der Schmelzpunkte $54 - 56^{\circ}\text{C}$ bzw. $60 - 62^{\circ}\text{C}$ aus. Das Paraffin muß rein und frei von flüchtigen Kohlenwasserstoffen sein. Am besten läßt man es deshalb vor Gebrauch längere Zeit im geschmolzenen Zustand stehen; dabei gehen die flüchtigen Bestandteile heraus und Verunreinigungen setzen sich zu Boden. Ist das Benzol bei Zimmertemperatur mit Paraffin gesättigt, so bringt man es in einen Thermostaten bei 30 bis 35°C und setzt von Zeit zu Zeit wieder etwas Paraffin zu. Dann sorgt man durch Erhöhung der Temperatur für die Verdunstung des Benzols.

Um aber alle Spuren des Lösungsmittels zu entfernen, wird das Paraffin abgossen und durch reines, benzolfreies ersetzt. Soweit die Durchtränkung des Materials.

Zum eigentlichen Einbetten gießt man in ein geeignetes Gefäß reines Paraffin. Ist dieses Gefäß z. B. ein Porzellanschälchen, so müssen die Wände mit Glycerin eingerieben werden, damit der Block sich später herauslöst. Mit einer angewärmten Nadel werden die Objekte im Paraffin orientiert und dann läßt man dieses erstarren. Sobald sich eine entsprechend starke oberflächliche Paraffinhaut gebildet hat, kommt das Gefäß mit dem Paraffin zum raschen Erstarren in kaltes Wasser. Läßt man Paraffin langsam erstarren, so kristallisiert es; es wird weiß und brüchig und ist dann nicht gut schneidbar.

Der so gewonnene Block wird entsprechend der in ihm enthaltenen Objekte in einzelne Klötzchen zerteilt, die mit der notwendigen Orientierung auf den Objektischen des Mikrotoms mit Paraffin aufgeklebt werden. Wenn man Paraffinschnitte in eine Farbstofflösung bringt, so erkennt man, daß sich trotz der Umhüllung mit Paraffin der Schnitt anfärben läßt. Das ist ein Zeichen dafür, daß das Paraffin wohl im Zelleninnern, aber nicht in den submikroskopischen Räumen der Membrane ist. Daher vermag man auch ein in Paraffin eingebettetes Material zur nachträglichen Erweichung zu quellen, wenn man einen Anschnitt herstellt und diesen über längere Zeit in Wasser oder besser in einen sehr verdünnten Alkohol (20 bis 30 %) einlegt. Ein Antiseptikum sollte nicht vergessen werden.

Die Schnitte werden auf dem Objektträger mittels Eiweißglyzerin aufgeklebt, das man sich aus einer Mischung von gleichen Teilen Hühnereiweiß und Glycerin unter Zusatz von 1 g Natriumsilizylat oder 1 % Karbolsäure-Phenol als Antiseptikum herstellt. Das Ganze wird kräftig geschüttelt und filtriert und ist lange Zeit haltbar. - Der Objektträger muß völlig fettfrei sein, ehe er mit einer Spur Eiweißglyzerin hauchdünn eingerieben wird.

Die Schnitte werden entweder in einer Wasserschale mit temperiertem Wasser oder direkt auf den Objektträgern gestreckt, indem man auf diese reichlich Wasser bringt, den Schnitt darauf schwimmen läßt und vorsichtig auf ungefähr 40 bis 45° C erwärmt. Das überschüssige Wasser wird abgesaugt und dann läßt man den Objektträger vollkommen trocken werden. Dann schmilzt man das Paraffin über einer Flamme kurz auf und kann es mit Benzol herauslösen, während der Schnitt auf dem Objektträger kleben bleibt.

Die Celloidin-Methode

Das Celloidin ist in einem Gemisch aus gleichen Teilen Alkohol und Aether gelöst. Bei höchsten Ansprüchen, wenn sehr dünne Schnitte gemacht werden müssen, muß absoluter Alkohol und wasserfreier Aether verwandt werden. In normalen Fällen reicht jedoch 96%iger Alkohol und gewöhnlicher Aether. Man stellt sich 2-, 4- und 8%ige Celloidin-Lösungen her und überträgt das nach obigem Verfahren entwässerte Material zunächst in ein Gemisch aus Alkohol-Aether und aus diesem zunächst in die 2%ige Celloidin-Lösung. Die Einwirkungsdauer beträgt je nach Material Stunden bis Tage. Dann wird die 2%ige Celloidin-Lösung durch eine 4%ige und nach entsprechender Einwirkungsdauer durch eine 8%ige Lösung ersetzt. Ist die Durchtränkung beendet, so muß das Lösungsmaterial zum Verdunsten gebracht und das Celloidin eingedickt werden. Dieses geschieht in einem Exsikkator, damit der Alkohol kein Wasser aus der Luft anziehen kann. Die Verdunstung muß so reguliert werden, daß sich nicht oberflächlich eine Kruste bildet, während im Innern das Celloidin noch weich ist (vergl. Vortrag von Frl. Marthen).

Fühlt sich das Celloidin nicht mehr plastisch an, so kann es gehärtet werden. Dieses geschieht, indem man in den Exsikkator entweder ein Schälchen mit Chloroform oder mit 70%igem Alkohol hineinstellt, so daß die Chloroform- bzw. Alkohldämpfe ihre härtende Wirkung ausüben können. Nach 24 Stunden schneidet man dieses Celloidin in einzelne Blöcke, die zur weiteren Härtung in 70%igen Alkohol kommen. Je länger dieser einwirkt, umso günstiger ist die Schneidekonsistenz. Zum Schneiden werden die Blöcke entweder zwischen Kork, Hohlundermark oder Lindenholz eingespannt oder auf den Objektisch mit einer 8%igen Celloidinlösung aufgeklebt. Dazu muß die untere Fläche des Celloidin-klötzchens mit einer Nadel aufgerauht und durch einen Tropfen Alkohol-Aether aufgeweicht werden. Dann drückt man ihn auf die 8%ige Celloidin-Lösung und umschmiert noch rundherum mit derselben. Eine Viertelstunde muß er zur Verfestigung stehen bleiben; jedoch darf in dieser Zeit der Block selber nicht austrocknen. Er muß deshalb von Zeit zu Zeit mit 70%igem Alkohol befeuchtet werden. Nach einer Viertelstunde kommt das ganze in 70%igen Alkohol, wodurch auch das zum Aufkitten verwendete Celloidin gehärtet wird. Geschnitten wird unter reichlicher Befeuchtung mit 70%igem Alkohol mit schräggestelltem Messer bei möglichst kleinem Schnittwinkel.

Die Celloidin-Paraffin-Methode wird in der Weise durchgeführt, daß das Material nach Einbettung in Celloidin mittels Chloroformdämpfe und anschließend durch Chloroform selbst gehärtet wird. Um nun alle Wasserspuren aus dem Celloidinblock zu entfernen, kommt er in das apáthysche Ölgemisch. Dieses besteht aus 4 Gewichtsteilen Chloroform, 2 Teilen Origanumöl, 4 Teilen Cedernholzöl, 1 Teil absolutem Alkohol und 1 Teil kristallisiertem Phenol. Die Blöcke bleiben in diesem Gemisch bis sie vollkommen durchsichtig sind. Dann kommen sie in mehrfach gewechseltes Benzol und dann werden sie in normaler Weise in Paraffin eingebettet. Man erhält dann eine Masse von hornartiger Konsistenz, die mit schräggestelltem Messer Schnitte bis zu $2\ \mu$ ohne Schwierigkeit zuläßt.

Hat man Material zu schneiden, wie Papier oder Karton, von dem die Schnitte leicht zerfasern, so hat man die Möglichkeit, diese mittels eines Klebefilms (Tesafilm), der vor dem Schneiden auf die Anschnittfläche gedrückt wird, sehr dünne Schnitte herzustellen, ohne daß sie auseinanderfallen können. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem sog. Celloidonageverfahren, das darauf beruht, daß man auf die Objektoberfläche eine verdünnte 1- bis 2%ige Celloidinlösung auftröpft, einige Minuten wartet, bis der Alkohol-Aether verdunstet ist, dann zur Härtung einen Tropfen 70%igen Alkohol aufbringt und auch unter Befeuchtung mit diesem schneidet. Es ist dies eine Schnelleinbettung der obersten Schicht in Celloidin, die deshalb möglich ist, weil ja in diesem Fall nicht die Bestandteile des Objektes, z. B. die Fasern, sondern nur die Hohlräume zwischen ihnen durchdrungen werden sollen.

Eine andere Einbettungsmöglichkeit für Papier besteht in einem Versteifen desselben durch beidseitiges Aufkleben von Tesafilm. Geschnitten wird dann zwischen Kork. Ein weiteres Verfahren wurde von Jayme und Harders-Steinhäuser angegeben, die das Papier zwischen zwei starken Polyäthylenfolien klemmen, das ganze in einem Trockenschrank auf 110°C erwärmen, so daß die das Papier rundherum überragenden Polyäthylenfolien mit ihren Rändern verschmelzen. Hier wird also das Papier zusammen mit dem Polyäthylen geschnitten. - Auf andere Kunstharzeinbettungen wird in einem anderen Vortrag eingegangen.

6. "Die Gefriermethode und typische Objekte dafür"
Vortragende: Frl. Röttcher

Nach der Gefriermethode wird Gewebegut geschnitten, von dem in möglichst kurzer Zeit eine Diagnose benötigt wird. Es sollte stets in einer 5%igen Formalin-Lösung fixiert werden, wobei man eine halbe bis eine Stunde in einem Wasserbad gut erwärmt. Die Schneidbarkeit hängt nicht von der Größe, sondern von der Konsistenz des Gewebes ab, d.h. ob es fest oder lose und zerfallen ist. Die Gefriermethode wird anderen auch deshalb gern vorgezogen, da bei ihr das Gewebe am besten erhalten bleibt, während die verschiedenen Einbettungsverfahren stets zu Schrumpfungen des Materials führen.

Das abgespülte Gewebestück wird auf ein angefeuchtetes Filterpapier und bei- des gemeinsam auf den Gefriertisch des Mikrotoms gelegt. Dabei ist darauf zu achten, daß äußere Kapseln oder Häute an der dem Messer zugewandten Seite liegen, damit sie beim Schneiden nicht abgerissen werden. Muskelfasern orientiert man am günstigsten quer zum Messer.

Indem man in kurzen Abständen etwas Kohlensäure in den Gefriertisch einläßt, läßt man das Gewebestück von unten her etwa 3 bis 4 mm hoch gefrieren. Der weiche ungefrorene Teil wird nun vorsichtig geschnitten, wobei man darauf achtet, daß das Mikrotommesser nicht in die härtere gefrorene Zone gerät. Niemals darf man von gefrorenen Objekten dicke Schnitte abschneiden, wenn man nicht die Schneide des Messers stark gefährden will. Die übliche Schnittstärke bewegt sich zwischen 10 und 20 μ . Mit einem Pinsel oder auch der Fingerkuppe überträgt man den Schnitt in eine Schale mit Wasser. Wenn man den Pinsel vorher mit 50%igem Alkohol benetzt, streckt er sich besonders gut auf der Wasseroberfläche. Von hier wird er mit einem Objektträger aufgenommen und mit einer feinen Nadel auseinandergezogen. Fettreiches Gewebe macht Schwierigkeiten, weil es leicht am Messer kleben bleibt. Hier hilft stets Alkohol oder Aether. Beides darf man jedoch nur nehmen, wenn kein Fettnachweis erbracht werden muß, da Alkohol und Aether das Fett zerstören. Sind Fettnachweise erforderlich, so wählt man eine Gelatine-Einbettung. Die Gelatineblöckchen werden in 20%igem Formalin gehärtet und dann im Gefrierzustand geschnitten. Das Aufkleben der Schnitte erfolgt mit Eiweißglyzerin. Hat man einen Gefrierapparat mit einer Messerkühlvorrichtung, so ist man auch in der Lage, völlig unfixiertes Material zu schneiden.

Sollen Diagnosen in wenigen Minuten, d.h. noch während der Operation gestellt werden, so wird das entnommene Gewebe in einer 5%igen Formalinlösung stark erhitzt, und die Schnitte werden in eine angewärmte Farbe gebracht, da durch das Erwärmen der Arbeitsgang erheblich abgekürzt wird. Er kann in 5 bis 10 Minuten beendet sein.

Auch in der Botanik ist die Gefriermethode sehr gut anwendbar, wenn es sich darum handelt, sehr saftige und großzellige Gewebe zu schneiden. Sind diese jedoch sehr locker, so ist es zweckmäßiger, sie mit Gelatine zu durchtränken. Dazu bringt man sie zunächst in eine 12,5%ige Gelatinelösung in 10%igem Karbolwasser, die im Thermostaten bei 37°C stehen muß. Nach etwa 24 Stunden wird diese Gelatinelösung durch eine 25%ige ersetzt.

Auch die Anfertigung von Papierschnitten ist sehr gut nach der Gefriermethode möglich, wie von Jayme und Harders-Steinhäuser angegeben wurde. Dabei wird ein schmaler Papierstreifen, der nur 3 bis 4 mm hoch sein kann, mit der Pinzette aufrecht in etwas Wasser gehalten, das man auf den Gefriertisch gebracht

hat. Dann läßt man Kohlensäure einströmen, damit der Papierstreifen anfriert und aufrecht steht. Nun wird nach und nach soviel Wasser dazugegeben, bis er völlig in Eis eingeschlossen ist. Statt in Wasser, kann man Papier auch gut in Gummi-Arabicum-Lösung oder Gelatine einfrieren. Liegen weiche Papiersorten vor, die keine Benetzung vertragen, so taucht man sie kurz in Paraffin, damit sich eine oberflächliche dünne Paraffinhaut bildet. Dieses von einem Paraffinmantel umgebene Papier wird nach der oben geschilderten Methode eingefroren.

7. "Erfahrungen über Einbettungen in Kunstharze für Textilien und andere Materialien"

Vortragender: Prof. Dr. J. Kisser

Bei der Untersuchung, z. B. von Textilien, muß man sich zuerst die Frage vorlegen, was mit dieser Untersuchung bezweckt werden soll; ist sie rein diagnostisch oder sollen bestimmte Teilstrukturen oder chemische Veränderungen zu erkennen sein. Danach richtet es sich, ob man mit einer einfachen Methodik auskommt oder eine kompliziertere anwenden muß. Ein einfaches Verfahren besteht im Umhüllen dieser Fasermaterialien mit Gummi-Glyzerin. Gummi-Glyzerin ist eine dünne Lösung von Gummi-Arabicum mit etwas Glyzerin. Man läßt die Umhüllung eintrocknen und kann die verklebten Fasern zwischen Kork einklemmen und schneiden. Oft genügt es auch, mit Hilfe einer Nadel und eines Zwirnfadens ein Faserbündel in ein Stück Kork hineinzuziehen, den Kork anzuschneiden und die Anschnittfläche im auffallenden Licht zu untersuchen.

Fasern sind trotz ihrer Geschmeidigkeit im trockenen Zustand von ziemlicher Härte, so daß Einbettungen in Paraffin und Celloidin zu weich sind. Sehr gut hat sich jedoch die Celloidin-Paraffin-Methode bewährt, die nur den Nachteil hat, daß sie sehr lange dauert. Diese Einbettungsmethode wurde bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben. Die Schnittanfertigung erfolgt mit schräggestelltem Messer. In neuerer Zeit werden Textilien viel in Gießharze eingebettet. Dazu werden sie in einem Papprahmen montiert und in ein geeignetes Gefäß gebracht und mit dem mit 2 % eines Härters versetzten Gießharz übergossen. Bei 65°C im Trockenschrank polymerisiert das Harz zu einer harten, gut schneidbaren Masse. Sehr gut geeignet ist Plexiglas, ein Polymerisationsprodukt der Methacrylsäureester. Man unterscheidet hier das Butyl-Methacrylat und das Methyl-Methacrylat. Während das erstere die Härte eines Paraffins hat, ist das letztere erheblich härter. Durch Zugaben von 5 bis 20 % Methyl-Methacrylat zu Butyl-Methacrylat kann man die Härte des Plexiglasses der des einzubettenden Objektes anpassen. Die Methacrylate liefert Röhm & Haas als Monomere, die mit einem Stabilisator versetzt sind, damit sie länger haltbar bleiben. Vor Gebrauch muß der Stabilisator entfernt werden. Man kann auch eine gebrauchsfertige Lösung, das sog. Plexigum beziehen, das jedoch im Eisschrank aufbewahrt werden muß, damit es einige Zeit haltbar bleibt. Die Objekte müssen durch Alkohol entwässert werden. Dabei muß auf jeden Fall zum Schluß absoluter Alkohol verwendet werden, damit kein Wasser in das Methacrylat gelangt. Das Durchtränken mit Methacrylat geschieht am besten stufenweise, indem man zunächst ein Gemisch von 3 Teilen absolutem Alkohol und 1 Teil Methacrylat, später ein Gemisch von gleichen Teilen und darauf ein Gemisch aus 1 Teil Alkohol und 3 Teilen Methacrylat verwendet. Erst dann überträgt man in reines Methacrylat, das dann jedoch noch zweimal gewechselt werden muß. Dem letzten Methacrylat wird als Polymerisations-Katalysator eine Menge von 2 % Dichlorbenzol-Peroxyd zugesetzt. Luftblasen werden entfernt, indem man das Einbettgefäß etwa 10 Minuten im evakuierten Exsikkator beläßt. Als Polymerisations-Gefäß verwendet man Gelatine-Kapseln, die möglichst bis zum Rand gefüllt und durch einen kleinen Deckel so verschlossen werden, daß möglichst wenig Luft mit dem Methacrylat in Berührung kommt. Die Polymerisation erfolgt innerhalb von 12 bis 24 Stunden in einem Thermostaten bei etwa 47°C.

Als weitere Umschließungsmittel wären zu nennen: das Celluloseacetat und das Leguval. Dabei handelt es sich um ziemlich zähe honigartige Flüssigkeiten, die ähnlich wie das Methacrylat nach Zusatz eines Härters bei erhöhter Temperatur polymerisieren.

8. "Das Schneiden von Kunststoffen, Gummi und ähnlichen Materialien"

Vortragender: Prof. Dr. J. Kisser

Manche Kunststoffe, wie z. B. das Plexiglas, sind ausgezeichnet schneidbar. Auch verschiedene andere können entweder unmittelbar oder mit einer Umhüllung oder Befestigung zwischen Kork oder Holz geschnitten werden. Vielfach handelt es sich dabei um PVC-Produkte, die als Folien oder Kunstleder Verwendung finden. Auch die Untersuchung von Film-Material aus Nitrocellulose oder Acetat besitzt besonders dann Bedeutung, wenn es sich um Mehrschichtfilme handelt. Das Filmmaterial ist im vorliegenden Zustand von guter Schneidbarkeit. Bei der Untersuchung fotografischer Platten muß natürlich die Filmschicht vom Glas getrennt werden. Durch Einlegen in Wasser, dem etwas Alkohol oder Soda beigegeben ist, kann dieses leicht geschehen. Kleine Stücke der Gelatine-Folie werden in Formol gehärtet und dann in beliebiger Weise eingebettet. Wichtig ist auch die mikroskopische Untersuchung von Lackanstrichen auf Holz, wobei einmal die Wirkung der Oberflächenbehandlung mit verschiedenen Polituren, der Porenfüller, die Verbindung mit aufgetragenen Nitro- oder Mattlacken interessiert und andererseits die Frage, wie diese Oberflächenanstriche mit dem Holz, also dem Untergrund, verbunden sind. Ein weiteres Aufgabengebiet betrifft das Schneiden von Verleimungen, besonders in der Holzindustrie, in der heute die sog. Verbundplatten, das sind Kombinationen von Holz mit Papier oder anderen Stoffen, eine wesentliche Rolle spielen. Um das Verhalten eines Leimes studieren zu können, muß man Schnitte durch diese Leimfugen herstellen. Die Verleimungen sind oft außerordentlich hart und stellen hohe Anforderungen an das Messer. Es wird deshalb häufig nicht möglich sein, einen Dünnschnitt zu erhalten, sondern man wird sich damit begnügen müssen, ein derartiges Material zu überschneiden und dann im Auflicht evtl. im Fluoreszenzmikroskop die Struktur zu untersuchen.

Gummi, in erster Linie ist dabei an Naturgummi gedacht, ist im allgemeinen viel zu weich und elastisch, um gut schneidbar zu sein. Wenn er jedoch entsprechend gekühlt wird, so erlangt er eine größere Härte und damit eine bessere Schneidkonsistenz. Die Abkühlung muß bis auf eine Temperatur von -50 bis -60°C erfolgen. Silikon-Kautschuke zeichnen sich jedoch durch eine außergewöhnliche Temperaturbeständigkeit aus und verlangen deshalb eine wesentlich tiefere Abkühlung, die nur durch Verwendung von flüssiger Luft oder flüssigem Stickstoff zu erreichen ist.

Für Objekte, die eine Entwässerung nicht vertragen, gibt es verschiedene in Wasser lösliche Einbettungsmedien, wie z. B. das Kollidon 30 von der BASF. Es handelt sich hier um das Polyvinyl-Pyrolidon. Als Lösungsmittel wird Polyvinyl-Alkohol verwendet. Das Material kommt zunächst in eine 5%ige wässrige Lösung desselben und wird dann in eine 10%ige übertragen. In längeren Zeitabständen gibt man Kollidon zu bis zu einer Konzentration von 90 %. Die darin noch enthaltenen 10 % Polyvinyl-Alkohol entfernt man entweder durch Aufbewahren über mehrere Tage in einem Exsikkator oder durch mehrstündiges Bestrahlen mit einer Infrarotlampe. Die Flüssigkeit verdunstet und das Material erhält die gewünschte Schneidefestigkeit.

Hier sind auch die wasserlöslichen Wachse zu nennen, bei denen es sich um Polyäthylenglykole oder Polyäthylenglykolester handelt. Sie führen verschiedene Handelsbezeichnungen, wie "Karbowax" oder "Syntherwachse" (Bayerwerke). Sie sind löslich in Wasser, Alkohol und allen aromatischen Kohlenwasserstoffen, wie Benzol usw.. Die niedrigen Molekularverbindungen sind flüssig und die höher

polymerisierten fest. Je höher polymerisiert sie sind, desto höher liegt ihr Schmelzpunkt und desto fester sind sie. Die Durchtränkung der Objekte erfolgt ebenfalls stufenweise durch allmähliche Steigerung der Konzentration. Zum Schluß wird dem reinen Monomer ein Zusatz von 2 % Benzoyl-Peroxyd als Polymerisationskatalysator beigegeben. Im Thermostaten bei etwa 60°C tritt innerhalb von 24 Stunden die Polymerisation ein. Geschnitten wird bei 10 bis 15°C. Am zweckmäßigsten ist es, mit etwas Trockeneis zu kühlen. Es ist ein Nachteil der synthetischen Wachse, daß sie stark hydoskopisch sind. Man kann diesen Nachteil jedoch beheben, indem man die Einbettung in diese mit der Paraffineinbettung kombiniert, indem man das eingebettete Material im Thermostaten bei 60°C völlig trocknet, dann 10 Minuten in Xylol und 30 Minuten in geschmolzenes Paraffin legt. Dann wird es wie Paraffin-Material eingebettet und weiter behandelt. Dadurch ist es von einem wasserundurchlässigen Paraffinmantel umgeben. Man braucht also eine Wasseraufnahme aus der Luft nicht mehr zu befürchten.

In diese Gruppe gehören auch die Cremolane der BASF. Es sind dies Äthylenoxydpolykondensations- bzw. -Polymerisationsprodukte. Diese sind in den gleichen Flüssigkeiten löslich wie die Syntherwachse. Die Einbettung in dieses Material ist recht einfach: Das Objekt wird leicht abgetrocknet und in reines Cremolan 60 gebracht, das man bei einer Temperatur von 55°C stehen läßt, bis das Objekt untersinkt, also durchtränkt ist. Das Cremolan wird mehrfach gewechselt und zum Schluß in den Eisschrank gestellt, wo es erstarrt. Die Schnitte werden auf entspanntem Wasser gestreckt. Dabei löst sich das Cremolan und die Schnitte sinken unter. Sie werden dann in der üblichen Weise weiter behandelt.

9. "Färbung und Differenzierung von histologischen Objekten"
Vortragender: Prof. Dr. J. Kisser

Die Färbetechniken wurden in erster Linie für das menschliche und tierische Material entwickelt. Wenn man einen Schnitt unter dem Mikroskop betrachtet, erkennt man meist nicht all zu viele Einzelheiten. Werden jedoch die Zellkerne mit dem blauen Hämatoxylin und ihre Umgebung mit Eosin rot gefärbt, so treten die einzelnen Bestandteile deutlich hervor.

Die Frage, warum dieser Farbstoff dieses Detail und ein anderer Farbstoff jenes Detail anfärbt, ist nicht in allen Punkten restlos geklärt. Es sind eine ganze Reihe von physikalisch-chemischen Erläuterungsversuchen gemacht worden. Eine wesentliche Rolle spielen die elektrischen Faktoren, und zwar sowohl die der Farbstoffe als auch die des Substrates. Dadurch gelingt es, Strukturen, die eine bestimmte H-Ionen-Konzentration aufweisen, durch entsprechende Farbstoffe elektiv anzufärben.

Wir unterscheiden aber auch saure und basische Farbstoffe, also solche, die eine Säure-Gruppe enthalten oder das Salz einer Säure darstellen und solche, die eine Base oder das Salz einer Base darstellen. Richtiger wäre es wohl, von positiv oder negativ geladenen Farbstoffen zu sprechen. Natürlich gibt es auch neutrale Farbstoffe, die weder basische noch saure Gruppen besitzen, wie das z. B. bei den Fettfarbstoffen der Fall ist. Als amphotere Farbstoffe bezeichnet man solche, in denen eine Farbsäure mit einer Farbbase zu einer Salzbildung geführt haben.

Unter Methachromasie versteht man die Tatsache, daß man mit einem Farbstoff verschiedene Gewebe- oder Zellelemente mit unterschiedlicher Farbe anfärben kann. Jedoch muß man hier zwischen der echten und der falschen Methachromasie unterscheiden, da bei der falschen Methachromasie ein Zusatz bzw. eine Verunreinigung mit einem anderen Farbstoff zu methachromatischen Erscheinungen führt.

Die Färbungen können hinsichtlich der Art der Bindung des Farbstoffes an einzelne Strukturelemente recht unterschiedlich sein. Man unterscheidet in dieser Hinsicht die progressiven und die degressiven Färbungen. Bei der progressiven Färbung werden nur ganz bestimmte Zellstrukturen angefärbt. Wenn sie mit dem Farbstoff vollgeladen sind, können sie keinen weiteren aufnehmen, d. h. es tritt eine gewisse Sättigung ein. Bei der degressiven Färbung jedoch wird zunächst alles angefärbt, und man muß jetzt rückwärts gehen, da manche Zellstrukturen den Farbstoff stärker festhalten als andere. Man erhält also eine Differenzierung durch Herauslösen des lockergebundenen Farbstoffes.

Man muß auch zwischen den sog. substantiellen oder direkten Färbungen oder adjektivischen oder indirekten Färbungen unterscheiden. Bei den ersteren läßt man, gleichgültig, ob die Färbung progressiv oder degressiv ist, den Farbstoff auf das Objekt einwirken. Bei den adjektivischen oder indirekten Färbungen wird der Farbstoff von dem betreffenden Strukturelement nicht oder nur sehr schwach festgehalten. In diesem Fall wird das Gewebe zunächst gebeizt, z. B. mit Eisenalaun, Zinkchlorid etc. Die Beizflüssigkeit wird von bestimmten Strukturen festgehalten, und wenn man jetzt färbt, so verbindet sich die Beize mit dem Farbstoff zu einem sog. Farblack.

Man kann Schnitte mit einem einzigen Farbstoff färben oder auch mit zwei oder drei. Man spricht dann von einer Mehrfachfärbung. Diese ist sehr wichtig, wenn in einem Objekt mehrere Strukturen durch unterschiedliche Färbung zur Darstellung gebracht werden sollen. Man erhält für diesen Zweck oft Farbstoffgemische mit zwei oder drei Komponenten und spricht bei Verwendung derselben von einer simultanen Mehrfachfärbung. Farbstoffe sind aber oft nicht gegenseitig verträglich. Dann muß man sie nacheinander verwenden. Man spricht dann von einer sukzessiven Mehrfachfärbung.

Man unterscheidet auch zwischen der Schnittfärbung und der Stückfärbung. Es ist einleuchtend, daß es bequemer ist, wenn man im Stück vor der Einbettung in Paraffin oder Celloidin färben kann, da man dann gleich fertig gefärbte Schnitte erhält. Viele Farbstoffe haben jedoch so große Moleküle, daß sie ein größeres Gewebestück nur schwer durchdringen können. Aus diesem Grund sind die Stückfärbungen sehr beschränkt anwendbar. Wir sind in den meisten Fällen gezwungen, den fertigen Schnitt, der ja relativ dünn und durchlässig ist, zu färben.

Die Färbung selbst wird auch von verschiedenen Außenfaktoren wesentlich beeinflusst, so durch die Art der Fixierung, wie der Struktur des Materials. Man kann daher anhand eines unterschiedlichen färberischen Verhaltens Strukturveränderungen nachweisen.

Die Farbstoffe sind teils wasserlöslich, teils alkohollöslich, und sie werden meist mit Angabe des pH-Wertes der Lösung, d. h. der Angabe ihrer H-Ionenkonzentration geliefert. Man sollte stets bedenken, daß nicht alle Farbstofflösungen unbegrenzt haltbar sind, und auf jeden Fall sollten die Farbstofflösungen vor Licht geschützt werden.

Eine besondere Art der Färbung gewinnt auch bei manchen technischen Produkten Bedeutung, und zwar die Färbung mit fluoreszierenden Farbstoffen. Eine Reihe von Objekten besitzt schon eine natürliche Fluoreszenz, z. B. Pflanzenstengel, die es erlaubt, im Fluoreszenz-Mikroskop verschiedene Strukturelemente nachzuweisen. Dann gibt es aber die sog. Sekundär-Fluoreszenz. Das ist ein Einfärben mit stark verdünnten fluoreszierenden Lösungen. Die fluoreszierenden Farbstoffe werden nur von bestimmten Zellelementen festgehalten, die nun in allen möglichen Farben unter dem Fluoreszenz-Mikroskop aufleuchten. Gerade bei der Untersuchung von verschiedenen Verleimungen oder verschiedenen Oberflächenbehandlungen spielt diese Methode heute eine wesentliche Rolle.