(Aus der Universitäts-Hautklinik zu Breslau
Direktor: Geh.-Rat Prof. Jadassohn[.])

Beiträge zur Paraffintechnik der Haut.

Von

Dr. Walter Freudenthal.

Assistent der Klinik.

(Eingegangen am 7. Dezember 1921.)

In der Dermatologie ist man durch die sog. Biopsie in der Lage, den Krankheitsverlauf in allen Stadien im mikroskopischen Bilde verfolgen zu können. Die Dermatohistologie nimmt daher insofern eine Sonderstellung im Gebiete der pathologischen Anatomie ein, als sie mit der Klinik noch viel inniger verwachsen ist, als bei den andern medizinischen Disziplinen. Die Voraussetzung für ein gewissenhaftes histologisches Arbeiten ist eine gute Technik. Bei der Haut ist dies doppelt notwendig. Einmal stellt die Haut eines der am schwierigsten zu verarbeitenden Gewebe dar, ferner aber geben bei vielen Hautkrankheiten nur genügend dünne, lückenlose Serienschnitte eine befriedigende Vorstellung von dem bei dem komplizierten Bau der Haut und den oft sehr geringen Dimensionen der pathologischen Veränderung oft von Schnitt zu Schnitt wechselnden Bild. Im Laboratorium der hiesigen, wie wohl der meisten dermatologischen Kliniken wird seit Jahren vorzugsweise die Paraffintechnik angewandt. Es scheint aber von vergleichenden Untersuchungen über die beste Ausführung dieser Methodik — zum mindesten was das hierbei zu wählende Intermedium betrifft — nichts veröffentlicht worden zu sein. Schreibt doch kürzlich P. Mayer: „Daß Lee oder sonst jemand ernstlich vergleichende Proben auf diesem Gebiete angestellt hätte, erscheint mir fraglich, wenigstens sind sie meines Wissens nirgend veröffentlicht worden. Leider fehlen mir dazu die Mittel, sonst täte ich es, um der Sache auf den Grund zu gehen. Man müßte dabei Objekte wählen, die als besonders schwierig gelten ...“

In der Dermatohistologie hat wohl jeder, der den Wunsch gehabt hat, regelmäßig oder auch nur öfter einmal mit Schnittserien zu arbeiten, vielfache Versuche gemacht und manche Enttäuschungen erlebt. Systematische Untersuchungen darüber habe ich nicht gefunden. Deswegen

erscheint es mir berechtigt, über eine solche Untersuchungsreihe zu berichten, die ich angestellt habe und die nach vieler Mühe günstige Resultate ergeben hat.

Das Material zu den vorliegenden Untersuchungen stammt aus dem hiesigen Pathologischen Institut¹⁾ von 22 möglichst frischen Leichen. Entnommen wurde ein kleineres oder — später — größeres Läppchen der Bauchhaut, die besonders schwierig zu bearbeiten ist. Diese Läppchen wurden in kleine Würfel — bis zu 30 Stück — zerteilt; im ganzen wurden 230 solche Würfel von etwa 4 mm Seitenfläche eingebettet. Alle Stückchen wurden in 70% Alkohol eingelegt. Es ist das diejenige Methode, welche — neben Fixierung in absolutem Alkohol und Sublimat — in der hiesigen Klinik viel gebraucht wird, weil Formalin für manche feinere Untersuchungsmethoden nicht gut verwendbar ist und die Spiritusvorbehandlung die meisten Färbungsmethoden, die wir benutzen, nicht ausschließt und für gewisse Färbungen gefordert wird.

Die Stücke verblieben in 70proz. Alkohol 24 Stunden bis mehrere Tage, solange, bis die aus einem Hautlappen gewonnenen Würfel aufgebraucht waren. Ein Unterschied zwischen früher und später verarbeitetem Material war nicht zu bemerken.

In 96proz. Alkohol kamen die Stückchen dann auf 4–12 Stunden. Auch wenn sie 48 Stunden darin belassen wurden, ergab sich bei gleicher nachfolgender Behandlung kein Unterschied.

Der absolute Alkohol, in den die Stückchen hernach gebracht wurden, wurde durch ausgeglühtes Kupfersulfat in mit Gummistopfen versehener Flasche peinlichst wasserfrei gehalten. In kleinen, $\frac{3}{4}$ gefüllten 10 ccm Fläschchen lagen die Objekte auf einer Schicht Glaswolle in etwa der 100fachen Menge Alkohol, der überdies einmal gewechselt wurde.

Die Angaben der Literatur über den Aufenthalt im absoluten Alkohol sind außerordentlich verschieden. In ihrer „Dermatohistologischen Technik“ empfehlen Joseph und Loewenbach bei möglichst kleinen Gewebstücken 48 Stunden; nach Romeis ist es wichtig, daß die Hautstückchen nicht lange im Alkohol bleiben, und Retterer läßt Haut nur $\frac{1}{2}$ Stunde im Alkohol abs., bevor er sie in Xylol bringt. Man könnte demnach annehmen, die Zeitdauer in absolutem Alkohol sei nebensächlich, und doch ergaben gerade die vorliegenden Untersuchungen, die ich auf die Suche nach dem geeignetsten Intermedium begonnen hatte, daß selbst dieses an Bedeutung gegenüber dem Verbleib im abs. Alkohol zurücktritt. Hier bereits entscheidet sich meistens die spätere Schneidefähigkeit des Stückes. Indem ich von 24 Stunden

¹⁾ Herrn Professor Henke sage ich meinen verbindlichsten Dank für die Erlaubnis, die Stücke entnehmen zu dürfen.

allmählich herunterging, gelangte ich schließlich zu einer „besten Zeit“, bei der es gelang, selbst sehnartig zähe Haut in lückenlose nicht deformierte Serienschritte zu zerlegen. Man brauchte diese Zeit aber nur um ein wenig zu verkürzen und man erhielt von den offenbar noch nicht ganz wasserfreien Stücken beim Schneiden ein krümelig-schmieriges Gemenge, das allen Bemühungen und Kunstgriffen (Bepinseln mit Collodium, Paraffin usw.) trotzte. Ein Überschreiten der „besten Zeit“ war weniger schlimm. Bei doppelter und selbst dreifacher Zeit wurde die Haut zwar härter und spröder, aber mit dem mehr längsgestellten Messer erzielte man schließlich Schnitte, die für die Praxis noch ganz gut zu gebrauchen waren.

Eine bestimmte Zeit für die Erzielung der besten Schneidefähigkeit läßt sich nicht angeben. Selbst bei meinem möglichst gleichgeartetem Material ergaben sich erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Hautläppchen der verschiedenen Leichen. Im Allgemeinen war die beste Zeitdauer für den Aufenthalt im abs. Alkohol 6–8 Stunden, bei manchen genügten 4, bei anderen waren bis 14 Stunden notwendig. Für die einzelnen Würfel desselben Läppchens bestand kein Unterschied. Wenn ich aber — in der Annahme, das Gewebe dieses Läppchens verträge allemal ohne Schaden den Aufenthalt von beispielsweise 8 Stunden — einen Würfel in 3, etwa millimeterdünne Scheibchen zerteilte und diese ebenfalls 8 Stunden im abs. Alkohol beließ, so ergab sich beim Schneiden, daß diese bereits hart und spröde geworden waren. So lange noch die letzten Wasserspuren durch das Gewebe hindurchdiffundieren, wirkt offenbar der abs. Alkohol nicht so schädlich ein, als von dem Zeitpunkt an, da das Gewebe wasserfrei geworden ist.

Das geeignetste Intermedium für die Haut zu finden schien mir, wie erwähnt, bei Beginn der vorliegenden Arbeit das Haupterfordernis. Apathy hat folgenden, soweit ich sehe, unwidersprochen gebliebenen Leitsatz hierfür aufgestellt: „Ein Antemedium (= Intermedium) für Paraffin ist um so besser, je mehr Paraffin es, auch kalt, löst, je niedriger sein Siedepunkt und je größer der Unterschied seines spez. Gewichts und desjenigen des Paraffins ist“.

Diesen Forderungen kommt unstreitig Heidenhains Schwefelkohlenstoff am nächsten, den Apathy wenige Zeilen vor dem eben genannten Satze als „zu gefährlich“ abgelehnt hat. In der Tat scheint es die Feuergefährlichkeit und daneben der schlechte Geruch zu sein, der der allgemeineren Einführung dieses Intermediums entgegensteht. Dort, wo er verwandt worden ist, scheint man gute Erfahrungen mit ihm gemacht zu haben, wenigstens ist mir kein einziges abfälliges Urteil aus der Literatur bekannt geworden. Von den gebräuchlicheren übrigen Intermedien hat fast jedes einen namhaften Befürworter, Apathy

kommt zu dem Ergebnis, daß „alles in allem Chloroform das beste Intermedium ist“. P. Mayer benutzt hauptsächlich das Benzol. Lee hat 1885 das Cedernöl empfohlen und rühmt es auch heute noch als das beste Intermedium. W. I. Schmidt bemerkt in seiner letzten Arbeit über die Reptilienhaut, „man vermeide Xylol, bediene sich vielmehr des Cedernöls oder Chloroforms“. Nun verwendet die Breslauer Dermatologische Klinik meistens und mit befriedigendem Erfolge das Xylol, das auch sonst in der Dermatologie das am häufigsten benutzte Intermedium zu sein scheint. Es war daher gegeben, zunächst dieses anzuwenden. Zum Vergleich zog ich das Cedernöl heran, das sich weniger leicht verändert als das Chloroform und wie dieses sich mit etwa 4% Wasser mischt. Verwandt wurde Xylol von Merck und das nicht eingedickte *Ol. ligni cedri rectif.* von Schimmel & Co., und zwar 8 ccm eines jeden Intermediums, das noch einmal gewechselt wurde.

In das Cedernöl gelangten die wasserfreien Stücke aus dem abs. Alkohol, verblieben darin bis sie durchsichtig geworden waren — etwa 2—3 Stunden — und wurden dann in Paraffin überführt. Die Schneidefähigkeit war gut. Das Resultat änderte sich nicht, wenn die Stücke länger, bis zu 24 Stunden, im Cedernöl blieben. Bei mehrtägigem Verweilen wurden die Stücke härter und spröder. Brachte man die Stückchen aus dem 96proz. Alkohol unmittelbar in das Cedernöl, so hellten sie sich viel langsamer auf, wurden auch bei 24stündigem Verbleiben, wie es schien, nicht ganz so durchsichtig wie wasserfreie, und ließen sich schließlich sehr schlecht, mitunter gar nicht schneiden.

Für das Xylol liegen in der Literatur bezüglich der Zeit sehr verschiedene Angaben vor. Retterer läßt Haut nur je 20 Minuten in Xylol und in einem Gemisch von Xylol und weichem Paraffin. Nach Joseph und Loewenbach kommen die Stückchen auf 24 Stunden bei 37° in eine Gemisch von Xylol und Paraffin zu gleichen Teilen. Auch hier könnte man, wie beim Alkohol, daraus schließen, daß die Aufenthaltsdauer im Xylol unwesentlich ist, aber es trifft hier ebenso wenig zu, wie dort. Die besten Resultate wurden dann erzielt, wenn das Material nur solange im Xylol blieb, bis es durchsichtig geworden war (1—1½—2 Stunden). Die rasche Durchdringung mit Xylol bildete übrigens ein Kriterium für die richtige Vorbehandlung im abs. Alkohol. War ein Stück zu kurz oder zu lange in letzterem gelassen worden, so beanspruchte es eine längere Zeit für die Durchdringung mit Xylol als ein anderes desselben Hautlappens, das die richtige Zeit im Alkohol geblieben war.

Aus dem Xylol kamen die Stücke in ein Gemisch von Xylol und Paraffin zu gleichen Teilen auf 3—6 Stunden bei 37° im Brutschrank. Ließ man das Xylolparaffin fort, so wurden die Schnitte weniger gleichmäßig. Beim Vergleich zwischen mit Xylol und mit Cedernöl behandelten Präparaten gaben anfangs die letzteren bessere Ergebnisse,

zumal da das Paraffin durch Spuren darin zurückgebliebenen Öls mit einem gelblich-glänzendem Farbton eine zum Schneiden vorzügliche Konsistenz angenommen hatte. Sehr bald aber ergaben sich mit Xylol ebensogut erhaltene, dünne und lückenlose Serienschritte. Die Ansicht, das Xylol stelle ein ungeeignetes Intermedium für die Haut dar, ist also nicht zutreffend und schlechte Resultate mit diesem Intermedium sind nicht auf dieses an sich, sondern auf zu kurzen oder zu langen Aufenthalt im Alkohol oder Xylol zurückzuführen. Für das Cedernöl bleibt der Vorzug bestehen, daß man weniger an die Zeit gebunden ist, da man das Stück nach dem Durchsichtigwerden ohne Schaden noch einige Stunden im Öl lassen kann. Der Versuch, mit Hilfe des Cedernöls den absoluten Alkohol auszuschalten war, wie erwähnt, mißlungen.

Die erzielte Schnittdicke betrug 8–10 μ . Anderes Hautmaterial, auch Kopfhaut, ließ sich leichter und zu dünneren Serienschritten verarbeiten als die Bauchhaut. Aber auch die erwähnte Schnittdicke genügt für die meisten Untersuchungen an Hautserien von pathologischen Objekten vollständig.

Das Paraffin wurde ausschließlich in einer Mischung von 5 Teilen Paraffin von 56° und 1 Teil Paraffin von 46° Schmelzpunkt verwandt; das vielfach benutzte weiche Paraffingemisch ließ ich fort, da mich Apathys Einwand, weiches Paraffin könne nicht wieder durch härteres verdrängt werden, überzeugte. Die Zeitangaben der Literatur sind auch für das Paraffin sehr verschieden. Während Brinkmann den Uterus, der als besonders schwer schneidbar gilt, 3–5 Tage lang in geschmolzenem Paraffin läßt und Joseph und Loewenbach immerhin noch einen 12stündigen Aufenthalt für die Haut empfehlen, soll nach Ansicht vieler anderer Autoren Haut möglichst kurz im geschmolzenen Paraffin verweilen, da sie darin hart und spröde wird. Die äußerste Grenze erreicht darin wohl Retterer, der Haut 15 Minuten im Vakuum bei 40° in Paraffin von 36°, und 10 Minuten in Paraffin von 54° Schmelzpunkt läßt.

Bei meinen Versuchen blieben die Stücke in 3 Blockschälchen je 2 Stunden bei 58° im Paraffinschränk. Versuchsweise ließ ich die Stückchen im letzten Schälchen weitere 24 und 36 Stunden. Die Schneidefähigkeit wurde dadurch nicht im mindesten beeinträchtigt. Voraussetzung war allerdings, daß die Objekte frei von Wasser und Alkohol waren, denn sonst verschlechterte sich ihre Schneidefähigkeit bei längerem Verweilen im Paraffin, bis sie schließlich steinhart wurden.

Für den Messerwinkel des Mikrotommessers lauten die Angaben im allgemeinen dahin, daß bei Celloidinschnitten das Längsmesser, bei Paraffinschnitten das Quermesser anzuwenden ist. Bei meinen schwierigen Objekten kam der Messerstellung eine besondere Bedeutung zu.

Man erzielte die besten Schnitte, bei einem bestimmten Messerwinkel, der für jedes Stück verschieden war, und von dem man nur um wenige Grade abweichen durfte, ohne daß sich die Schnittfähigkeit verschlechterte. Je dichter und härter ein Präparat war, um so mehr mußte man von der Querstellung abweichen und die härtesten Stücke ließen sich erst in Längs-(Celloidin)stellung des Messers und dann oft überraschend gut und gleichmäßig schneiden.

Bei der Längsstellung kann man allerdings die Serien nicht mehr in Bänderform erhalten, sondern muß Schnitt für Schnitt einzeln vom Messer übertragen. Dieser mühsamen Arbeit kann man manchmal noch entgehen, wenn das Messer nur halblängs in einer Mittelstellung steht: Man schräge die Vorder- und Hinterkante des Blocks parallel zur Messerstellung ab und schmelze an diese beiden abgeschrägten (zuerst bzw. zuletzt vom Messer getroffenem) Kanten etwas weiches Paraffin an.

Als einen andern kleinen Kunstgriff, der bei einer drehbaren Objektklammer mühelos anzuwenden ist, empfehle ich noch, den Block vor dem Schneiden immer so zu richten, daß die Epidermis-Cutisgrenze parallel zum Messer steht. Man schneidet auf diese Weise zuerst ausschließlich durch Epidermis und dann wieder nur durch Cutis, und vermeidet so, daß das Messer gleichzeitig Material von verschiedener Härte trifft.

Die so gewonnenen gleichmäßigen dicken Schnitte gelangten in eine Porzellanschale mit lauwarmen Wasser, worin sie sich ausbreiteten, wurden dann mit Eiweißglycerin auf den Objektträger aufgezogen und in den Trockenschrank gebracht. Im allgemeinen war zu bemerken, daß das Schneiden und Aufkleben keine ernstlichen Schwierigkeiten machte, sobald das Stück richtig eingebettet war; dieser Prozedur ist daher das Hauptaugenmerk zuzuwenden.

Die hier angegebene Methode gilt natürlich im Prinzip nur für Hautstücke von der Größe von 4cm, die zuerst in 70proz. Alkohol gebracht sind und für die normale Bauchhaut. Wie sich die beste Einbettung bei anders vorbehandeltem Material (Sublimat- usw. Fixierung) verhalten würde, das bedarf ebenso eingehender Untersuchungen, die allerdings außerordentlich mühsam und zeitraubend sind. Aber auch bei gleichmäßig vorbehandeltem pathologischem Material bedingt die Art des Prozesses, das Alter der Haut und selbstverständlich auch die Körpergegend, der das Stück entnommen ist, wesentliche Unterschiede, die zu einer individualisierenden Behandlung in jedem Falle zwingen. Es ist aber doch gut, zum mindesten für jede Art der Vorbehandlung, gleichsam eine Normalmethode zu besitzen und als solche glaube ich für den 70proz. Alkohol die oben angegebene warm empfehlen zu können.

Literatur.

- ¹⁾ Apathy, St. v., Neuere Beiträge zur Schneidetechnik. Zeitschr. wiss. Mikroskop. **29**, 450. 1913. — ²⁾ Brinkmann, A., Histologie, Histogenese und Bedeutung der mucosa uteri einiger viviparer Haie und Rochen. Mitt. Zool. Stat. Neapel **16**, 365. 1903. — ³⁾ Encyklopädie der ges. mikroskop. Technik, 2. Auflage 1910. — ⁴⁾ Heidenhain, M., Über eine Paraffineinbettung mit Schwefelkohlenstoff als Durchgangsmedium. Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. **18**, 166. 1901. — ⁵⁾ Joseph, M. und G. Loewenbach, Dermato-histologische Technik, 2. Auflage. Berlin 1905. — ⁶⁾ Mayer, P., Zoomikrotechnik 1920. — ⁷⁾ Mayer, P., Über die flüchtigen Öle und ihren Ersatz. Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. **36**, 219. 1919. — ⁸⁾ Retterer, E., Technique du tissu conjonctif dense et du derme en particulier. Journ. Anat. Phys. Paris 1903, 39. Annee, S. 196. — ⁹⁾ Romeis, B., Taschenbuch d. mikroskop. Technik (Böhm u. Oppel). 8. Auflage 1919. — ¹⁰⁾ Schmidt, W. J., Über die Methoden zur mikroskop. Untersuchung der Farbzellen und Pigmente in der Haut der Wirbeltiere. Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. **35**, 1. 1919.
-