

Vergleich von Intermedien bei der Paraffineinbettung

Anton Losert und Gabriele Hrauda

Zur Herstellung von Dünnschnitten wird als häufigstes Einbettungsmittel Paraffin verwendet (Klebs, 1869). Bei der Paraffineinbettung ist die Verwendung von Intermedien für den Präparationsgang – um das fixierte Objekt von der Entwässerung im Alkohol in das Einbettungsmedium Paraffin zu überführen – unumgänglich notwendig. Vielen Mikroskopikern stehen für ihre Arbeiten keine Laborräume zur Verfügung, sodass sie mit zum Teil bedenklichen Chemikalien in der Wohnung hantieren müssen. Die damit verbundenen Gefahren und Belästigungen für den Bearbeiter selbst aber auch für seine Mitbewohner sollten sich daher im Interesse eines gedeihlichen Zusammenlebens in Grenzen halten.

Der nachfolgende Vergleich von Intermedien für die Paraffineinbettung richtet sich vor allem an den Amateur. Abgesehen von den präparatorischen Vor- und Nachteilen soll auch die möglichst gefahrlose Handhabung der verwendeten Substanzen in Betracht gezogen werden.

Paraffineinbettung

Paraffin eignet sich als Einbettungsmittel sowohl für tierisches als auch für pflanzliches Material. Es besitzt zahlreiche, für diesen Anwendungsbereich positive Eigenschaften. So ist es chemisch inaktiv, bei Zimmertemperatur homogen und leicht schmelzbar (zwischen 45 °C und 60 °C) (Burck, 1982). Zusätze, welche die Schneidbarkeit von Paraffin verbessern, sind zum Beispiel Bienenwachs, Ceresin, Asphalt, Carnaubawachs, Candelillawachs oder Rohgummi. Reines Paraffin findet heute zumeist keine Anwendung, sondern es wird auf Paraffingemische mit verschiedensten Zusätzen zurückgegriffen; davon sind zum Beispiel am Markt: Histocomp (Fa. Vogel), Histoplast (Fa. Serva), Histosec (Fa. Merck), Histowax (Fa. Jung) oder Paraplast plus (Fa. Shandon) (diese Aufzählung stellt keinen Anspruch auf Vollständigkeit).

Nach der Entwässerung des Proben ist die Entfernung des Alkohols der nächste wichtige Schritt. Dafür wird die Probe durch ein oder

mehrere Intermedien geführt, die sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin mischbar sind. Von besonderem Vorteil können Intermedien sein, die selbst Wasser aufnehmen können (Romeis, 1989). Darin können Wasserreste, die über Entwässerung in der letzten Alkoholstufe noch verschleppt wurden, schließlich doch noch entfernt werden. Schlechte Schneidbarkeit und Schrumpfungen können oft auf Reste von Alkohol oder Wasser im Paraffin zurückgeführt werden (von Apathy, 1912).

Darüber hinaus treten beim Herstellen von Paraffinschnitten manchmal noch andere Schwierigkeiten auf. Die wichtigsten Ursachen für die schlechte Schneidbarkeit von Paraffinblöcken sind:

- Das Objekt ist zu hart, es enthält Kalk, Knochen, Chitin, Kieselsäure, Holz, Fremdkörper.
- Das Objekt wurde zu lange in höherprozentigem Alkohol, Xylol, Benzol u.ä. aufbewahrt.
- Reste von Wasser, Alkohol oder vom Intermedium befinden sich noch im Block.
- Das Objekt ist unvollständig mit Paraffin durchtränkt.
- Es hat eine unvollständige Durchmischung von Paraffinsorten unterschiedlicher Schmelzpunkte und somit unterschiedlicher Härte stattgefunden.
- Es wurden ungeeignete Paraffinsorten verwendet – die Härte des Paraffins muss an die Konsistenz der Probe angepasst sein.

- Die Probe wurde zu langsam abgekühlt.
- Beim Schneiden herrscht eine zu hohe Raumtemperatur.

Einige dieser Probleme können durch die Wahl eines passenden Intermediums minimiert, wenn nicht sogar ausgeschaltet werden. Die wünschenswerten Eigenschaften eines Intermediums sind:

- Mischbarkeit mit Alkohol und Wasser.
- Gute Löslichkeit von Paraffin.
- Ausreichende Flüchtigkeit.
- Gutes Eindringen in die Probe.
- Struktur und Konsistenz der Probe dürfen möglichst wenig beeinflusst werden.
- Geringe Feuergefährlichkeit.
- Geringe Toxizität.
- Geringe Geruchsbelästigung (nach individuellem Empfinden).
- Erwerb ohne Giftbezugslizenz.

Gerade die letzt genannte Anforderung soll hier näher betrachtet werden, immer auch unter dem Aspekt, dass mit diesen Substanzen in Wohnräumen hantiert wird. Als Vergleichsgröße wurden die Schweizer Giftklassen (CH-Giftklassen) gewählt, wie sie auch beispielsweise auf den Produkten der Fa. Merck angegeben werden. Bei den Schweizer Giftklassen werden fünf Kategorien unterschieden:

- 1 = sehr starke Gifte (cancerogen, mutagen, teratogen)
- 1–2 = sehr starke Gifte
- 3 = starke Gifte
- 4 = nicht unbedenkliche Stoffe
- 5 = Stoffe und Erzeugnisse geringster Gefährlichkeit

Die Einstufung im deutschen und österreichischen Chemikaliengesetz nach giftigen, mindergiftigen und gesundheitsgefährdenden Stoffen kann natürlich ebenfalls als Informationshilfe herangezogen werden.

Methodenvergleich

Nachfolgend werden sechs verschiedene Methoden der Paraffineinbettung nach ihren präparatorischen Vor- und Nachteilen, ihrer Beeinflussung der Schneidbarkeit und eben auch der Giftigkeit der verwendeten Stoffe vorgestellt (Tab. 1–6) und in einer Übersichtsdarstellung miteinander verglichen (Tab. 7).

Xylol (Dimethylbenzol) (Tab. 1)

Diese in der Vorgehensweise an sich einfache Methode bringt eigentlich nur Nachteile. Xylol ist nicht mit Wasser mischbar, es ist weniger flüchtig, das heißt, es verbleibt unnötig lang in der Probe. Dadurch können die Objekte spröde und hart werden. Darüberhinaus verursacht Xylol eine starke Geruchsbelästigung, es ist brennbar und steht im Verdacht, Stoffwechselerkrankungen hervorzurufen.

Tabelle 1. Xylol.

Alkoholreihe
⇕
Xylol
⇕
Xylol-Paraffin bei ca. 40 °C
⇕
Paraffin

Methylbenzoat (Benzoessäuremethylester) und Benzol (Tab. 2)

Die klassische Methode der Histologie liefert gute Resultate hinsichtlich der Schneidbarkeit von Proben, bedingt durch die rasche Durchtränkung der Objekte. Zumindest im Methylbenzoat ist der längere Aufenthalt für die Proben unschädlich, ganz im Gegenteil zu Benzol, bei dem zu lange Einwirkdauer eine zumeist unerwünschte Härtung der Proben hervorruft. Benzol ist ein besonders gefährliches Gift, äußerst feuergefährlich, und daher auch nicht frei erhältlich.

Tabelle 2. Methylbenzoat.

Alkoholreihe
⇕
Methylbenzoat
⇕
Benzol
⇕
Benzol-Paraffin bei ca. 40 °C
⇕
Paraffin

Chloroform (Trichlormethan) (Tab. 3)

Die Chloroform Methode wird häufig in Kliniken und Labors verwendet. Sie wird in der Literatur als besonders schonend für die zu bearbeitenden Objekte dargestellt. Dementspre-

Tabelle 3. Chloroform.

Alkoholreihe
↓
Chloroform
↓
Chloroform-Paraffin bei ca. 40 °C
↓
Paraffin

chend liefert sie sehr gute Schneideergebnisse, die Proben werden kaum gehärtet. Dagegen zu halten ist, dass Chloroform ebenso wie Benzol extrem giftig ist, es nicht sehr beständig ist und sich in Phosgen und Chlorwasserstoff (!) zersetzt. Dementsprechend ist auch Chloroform nicht frei erhältlich. Chloroform hat außerdem den Nachteil, nur langsam in die Proben einzudringen.

Isopropylalkohol (n/1 Propanol) (Tab. 4)

Diese Methode erscheint für den Amateur wegen ihres einfachen Vorgehens sehr gut geeignet. Die Vorteile liegen in der unbegrenzten Mischbarkeit mit Wasser, wobei Isopropanol leichter wasserfrei zu halten ist als zum Beispiel Äthanol. Auch bei längerer Verweildauer härten die Proben kaum. Gegen diese Methode spricht, dass Isopropanol langsamer eindringt als Benzol – es braucht ungefähr die dreifache Zeit – und dass es aus Gewebsspalten und Hohlräumen rascher verdunstet als Paraffin eindringt, dadurch können Schrumpfungen entstehen können. Als weiterer Nachteil für die Arbeit in der Wohnung muss die leichte Entzündlichkeit genannt werden.

Tabelle 4. Isopropylalkohol.

Isopropylalkoholreihe
↓
Isopropylalkohol-Paraffin bei ca. 60 °C
↓
Paraffin

Tertiärer Butylalkohol (Tertiäres Butanol) (Tab. 5)

Tertiäres Butanol wäre ein sehr gut geeignetes Intermedium, weil es unbegrenzt mit Wasser mischbar ist, die Proben kaum härtet und zu guten Schneideresultaten führt. Wie aus Tabelle 5 jedoch ersichtlich, verläuft der Präpara-

Tabelle 5. Tertiärer Butylalkohol.

	Alkoholreihe bis 50%			
	↓			
	Butanolreihe			
	I	II	III	IV
Wasser	50	30	15	
Äthanol 92%	40	50	50	45
tertiäres Butanol	10	20	35	55

	↓
	reines Butanol 3x
	↓
Butanol	Paraffinöl = 1 1
	↓
Butanol	Paraffinöl = 1 1 über Paraffin
	bei ca. 60 °C
	↓
	Paraffin

tionsgang eher umständlich. Tertiäres Butanol ist feuergefährlich und erstarrt bei 25 °C. Diese Eigenschaft bedeutet, dass es stets leicht erwärmt zu halten ist und daher ein Wärmeschrank benötigt wird, der besonders in den unteren Temperaturbereich genau zu regulieren ist; gerade diese Geräte sind kostspielig.

n-Butylalkohol (1-Butanol) (Tab. 6)

Die Anwendung von n-Butanol als Intermedium für die Paraffineinbettung wurde erstmals von Larbaud (1921) publiziert. Gegenüber dem tertiären Butanol ist n-Butanol zwar in geringerem Maße mit Wasser mischbar, es löst etwas weniger Paraffin, dringt langsamer

Tabelle 6. n-Butylalkohol.

	Butanolreihe						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Wasser	70	60	45	30	20	10	
Äthanol 92%	20	25	30	30	25	20	15
n-Butanol	10	15	25	40	55	70	85

	↓
	reines Butanol 3x
	↓
Butanol	Paraffin bei ca. 55 °C
	↓
	Paraffin

Tabelle 7. Gegenüberstellung verschiedener Intermedien zur Paraffineinbettung.

	Benzol	n-Butanol	tertiäres Butanol	Chloroform	Iso-propanol	Methylbenzoat	Xylol
CH-Giftklasse	1*	4	4	1*	4	4	4
Schneidbarkeit	gut	gut	gut	gut	gut	gut	schlecht
härtet Proben	ja	kaum	kaum	kaum	kaum	nein	ja
einfache Handhabung	nein	ja	nein	ja	ja	nein	ja
Mischbarkeit mit Paraffin	ja	ja	ja	ja	ja	nein	ja
Mischbarkeit mit Wasser	nein	begrenzt (77g/l)	unbegrenzt	kaum (8g/l)	unbegrenzt	nein	nein
starke Geruchsbelästigung	ja	wenig	ja	ja	wenig	ja	ja
feuergefährlich	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja

ein, gleichzeitig liefert es aber sehr gute Schneidresultate und härtet bei längerem Verweilen die Proben nicht. Zudem bleibt es bei Raumtemperatur flüssig und ist kaum feuergefährlich. Diese beiden letztgenannten Eigenschaften machen diese Methode zu einer, die gerade dem Amateur als eine probate Möglichkeit vorgeschlagen werden kann.

Fazit

Natürlich steht bei der Wahl des jeweiligen Präparationsganges das zu untersuchende Objekt im Vordergrund, nach dessen Beschaffenheit und möglichen besonderen Inhaltsstoffen (z. B. Kalk oder Chitin) wird das jeweils beste Verfahren zu wählen sein. Gleichzeitig sollten jedoch die Sicherheit am Arbeitsplatz und die Gesundheit des Bearbeiters nicht außer Acht gelassen werden. Die Histologie kann damit ihr „Hexenküchenimage“ ablegen und beispielsweise auch für Jugendliche interessant werden, denen man oftmals den Umgang mit den bedenkenlichen Stoffen nicht zumuten wollte. Und – um den Kreis zu Einleitung zu schließen – eine Tätigkeit, die ohne allzu große Belästigung der häuslichen Mitbewohner statt-

findet, weckt oftmals eher Akzeptanz und Interesse und lässt so neue Freunde an den kleinen Dingen des Lebens entstehen.

Literaturhinweise

- Apathy v. S.: Neue Beiträge zur Schneidetechnik. Z. wiss. Mikr. 449–515 (1912).
 Burck, H.-C.: Histologische Technik. 5. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1982.
 Gerlach D.: Botanische Mikrotechnik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969.
 Kisser J.: Die botanisch-mikrotechnische Schneidemethode. In: Abderhalden, E. (Hrsg.): Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Verlag Urban und Schwarzenberg, Berlin 1932.
 Klebs, H.: Die Einschnelzungsmethode. Archiv. f. mikroskopische Anatomie 5, 164ff (1869).
 Larbaud, M.: Nouvelle technique pour les inclusions et les préparations microscopiques des tissus végétaux et animaux. Com. Rend. Acad. Sciences Paris 162, 1317 (1921).
 Romeis, B.: Mikroskopische Technik, 16. Auflage. Verlag R. Oldenbourg, München 1968.
 Romeis, B., Böck, P. (Hrsg.): Mikroskopische Technik, 17. Auflage. Urban und Schwarzenberg, München 1989.

Verfasser: Anton Losert, Märzstraße 124/24, A-1140 Wien, Österreich, und
 Dr. Gabriele Hrauda, Phorugasse 16/10, A-1040 Wien, Österreich