

DAS ASCHENBILD
TIERISCHER GEWEBE UND ORGANE

METHODIK · ERGEBNISSE UND BIBLIOGRAPHIE

VON

ERICH HINTZSCHE

DR. MED., O. PROFESSOR DER ANATOMIE
DIREKTOR DES ANATOMISCHEN INSTITUTES DER UNIVERSITÄT BERN

13.84
H376

DAS ASCHENBILD TIERISCHER GEWEBE UND ORGANE

METHODIK · ERGEBNISSE UND BIBLIOGRAPHIE

VON

ERICH HINTZSCHE

DR. MED., O. PROFESSOR DER ANATOMIE
DIREKTOR DES ANATOMISCHEN INSTITUTES DER UNIVERSITÄT BERN

MIT 80 ~~ABBILDUNGEN~~



19127

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1956

Vorwort

Die Anregung zu einem Bericht über Methodik und Ergebnisse der Veraschung mikroskopischer Präparate stammt von W. BARGMANN, dem Herausgeber des Handbuches der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Er schlug mir im Jahre 1948 vor, den im 1. Bande dieses Werkes enthaltenen Abschnitt „Spodographie“ von TSCHOPP weiterzuführen. Leider sind andere für denselben Nachtragsband des Handbuches bestimmt gewesene Beiträge nicht rechtzeitig abgeliefert worden, so daß auch mein Ende 1949 eingereichtes Manuskript unveröffentlicht blieb. Das verständnisvolle Entgegenkommen des Springer-Verlages ermöglichte mir, diese frühere Niederschrift zu der hier vorliegenden Monographie zu ergänzen. Sie umfaßt das gesamte Gebiet der Veraschung normaler tierischer Gewebe und Organe und hat ihrer Entwicklung entsprechend in Form und Aufbau den Charakter eines Handbuchbeitrages behalten. Ein solches Hilfs- und Nachschlagewerk dürfte den Histophysiologen gerade in einer Zeit willkommen sein, in der es der ständig wachsende Umfang der histochemischen Literatur schwierig macht, sich über alle Teilgebiete dieses ausgedehnten Arbeitsfeldes auf dem laufenden zu halten.

Beim Abschluß des Werkes gilt mein Dank allen Autoren, die mich durch die Überlassung von Bildvorlagen unterstützt haben; in den Legenden zu den Bildern ist deren Herkunft jeweils belegt. Abbildungen ohne besondere Bezeichnung werden hier erstmals publiziert. Besonderen Dank schulde ich meinem Kollegen und Freunde W. BARGMANN (Kiel), dessen stete Anteilnahme meiner Arbeit den Weg zur Veröffentlichung ebnete, sowie Herrn Dr. FERDINAND SPRINGER und seinen Mitarbeitern, die auch dieser kleinen Monographie alle Aufmerksamkeit in Druck und bildlicher Ausstattung zuteil werden ließen.

Bern, den 9. Juli 1956

E. HINTZSCHE

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Definition der Mikroveraschung	1
Historischer Rückblick	1
Anwendungsbereich der Schnittveraschung	4
Technik der Schnittveraschung	5
a) Vorbehandlung des Materiales	5
b) Der Veraschungsvorgang	10
Mikroskopische Untersuchung der veraschten Präparate	15
a) Das Spodogramm	15
b) Die optischen Untersuchungsmethoden	15
c) Physikalische Methoden der Aschenanalyse	21
d) Chemische Methoden der Aschenanalyse	25
Ergebnisse der Veraschungsforschung	28
1. Das Aschenbild von Protozoen und Avertebraten	28
2. Das Aschenbild der tierischen Zelle	30
3. Das Aschenbild des Epithelgewebes und der Drüsenzellen	35
4. Das Aschenbild der Binde- und Stützgewebe	43
5. Das Aschenbild des Muskelgewebes	48
6. Das Aschenbild des Nervengewebes und der nervösen Zentralorgane	52
7. Das Aschenbild des Blutes und der Zirkulationsorgane	63
8. Das Aschenbild der Atmungsorgane	74
9. Das Aschenbild der Verdauungsorgane	76
10. Das Aschenbild der Harnorgane	89
11. Das Aschenbild der männlichen Geschlechtsorgane	95
12. Das Aschenbild der weiblichen Geschlechtsorgane	97
13. Das Aschenbild der Haut und ihrer Anhangsorgane	103
14. Das Aschenbild der inkretorischen Organe	109
15. Das Aschenbild der Sinnesorgane	113
16. Embryologische Aschenbilder	116
Bedeutung der Spodographie	123
Literatur	125
Namenverzeichnis	137
Sachverzeichnis	139

Definition der Mikroveraschung

Grundsätzliches Ziel jeder für die mikroskopische Untersuchung bestimmten Mikroveraschung ist, alle organische Substanz in Zellen und Geweben zu zerstören, ohne daß sich dabei die Lage und die Menge der anorganischen Bestandteile ändert. Erhitzt man dünne Totalpräparate, Ausstriche oder Schnitte vorsichtig auf dem Objektträger, so bleibt eine Art Mineralskelet des Materiales erhalten, das als Aschenbild (spodogramme, ash-pattern, quadro spodografico, espodograma) bezeichnet wird. Dieses muß in Form und Struktur mit den nach der üblichen histologischen Technik angefertigten Präparaten desselben Gewebs- oder Organstückes völlig übereinstimmen. TSCHOFF (1929) schlug für die Beschreibung von Aschenbildern den Namen Spodographie vor, der aber POLICARD (1929b) noch zu weit gefaßt schien; er empfahl daher, von Mikro- oder Histospodographie zu sprechen. Der zur Herstellung von Aschenbildern führende Arbeitsgang wird gewöhnlich Mikroveraschung (microincinération, microincineration, microincinerimento, microincineración) genannt. Diese Bezeichnung hat indessen schon gelegentlich, z. B. in Bibliographien, zu Mißverständnissen geführt, weil sie auch bei Chemikern für die Calcination kleinster Materialmengen gebraucht wird. Ihrer Definition entsprechend ist das Studium von Aschenbildern ein Teilgebiet der Histotopchemie.

Historischer Rückblick

Zu allen Zeiten haben sich in der mikroskopisch-anatomischen Forschung Bestrebungen geltend gemacht, die rein morphologischen Befunde mit den Ergebnissen physiologischer Untersuchungen zu verknüpfen. Ein solches Bindeglied ist auch die Mikroveraschung, die erstmals 1833 von dem französischen Arzt F. V. RASPAIL (Abb. 1) an pflanzlichem Material angewandt wurde. Seine Beschreibung ist so charakteristisch, daß sie hier wörtlich angeführt sein mag: «On prend une lanière d'épiderme dont les réticulations cellulaires soient bien distinctes et dont on a préalablement enlevé tous les sels incrustés, au moyen de l'acide hydrochlorique étendu et de lavages répétés. On l'étend sur une lame de verre mince, et on examine ou on en mesure même les compartiments cellulaires au microscope. On place ensuite avec précaution sur le feu cette petite lame que l'on fait chauffer au rouge pendant quelque temps. On la retire en l'éloignant peu à peu et graduellement de la chaleur. En l'observant alors au microscope, on croirait que ce tissu n'a nullement été altéré et que son organisation est restée intacte. Mais une seule goutte d'acide très étendu suffit pour détruire cette illusion, et ces réticulations disparaissent avec rapidité.»

Auf eine frühe — wenn nicht die erste — Anwendung der Mikroveraschung an tierischem Material bin ich bei bio- und bibliographischen Studien über den Berner Physiologen und Mikroskopiker G. G. VALENTIN (Abb. 2) gestoßen (HINTZSCHE 1953). Er schreibt in einer sonst nicht eben gelungenen Untersuchung „Über die Spermatozoen des Bären“ (1839): „Durch Glühen der auf eine kleine Glasplatte aufgestrichenen Spermatozoen erhält man Kohle und zum Teil eine Asche, in welcher die Form der Spermatozoen vollständig erhalten ist. Man muß nur im Glühen doppelt vorsichtig sein und die Samenmasse so dünn

als möglich aufstreichen, weil einerseits bei rascher Entwicklung der Hitze die Kohle sich aufbläht und andererseits die Asche bei etwas zu hoher Temperatur zusammenschmilzt.“

Diese frühen technischen Anweisungen von RASPAIL und VALENTIN sind in allen Teilen richtig. Sie gelten auch heute noch als unumgängliche Voraussetzung, um brauchbare Aschenbilder zu erzielen. Die weitere Anwendung der Mikroveraschung an biologischem Material systematisch zu verfolgen, würde die



Abb. 1. FRANÇOIS-VINCENT RASPAIL (1794—1878), Lithographie aus dem Jahre 1848

dieser Monographie gesetzten Grenzen überschreiten. Es sei deshalb nur erwähnt, daß z. B. in allen Auflagen von KÖLLIKERS Handbuch der Gewebelehre (1852—1899) der Befund VALENTINS angeführt wird. P. HARTING hat in seinem Werk „Das Mikroskop“ (1859) die Veraschungsmethode gleichfalls genannt und empfohlen, die Erhitzung auf einem Platinblech vorzunehmen, „denn die Aschenbestandteile mancher, zumal animalischer, Substanzen schmelzen mit dem Glase zusammen und lassen sich schwer davon wegbringen“ (S. 431). Endlich sei noch auf die 5. Auflage des Handbuches der Histologie und Histochemie des Menschen von FREY (1876) hingewiesen, in der die Veraschung zwar nicht mehr als besondere Untersuchungsmethode genannt, aber der alte Befund VALENTINS, wenn auch ohne Nennung seines Namens, angeführt wird, heißt es doch

S. 607 von den Spermien der Säugetiere: „Der Reichthum an Mineralbestandteilen (5,21% FRERICHS) gestattet ein Glühen des Samenfadens mit Bewahrung der Form.“

Der zunehmenden Verbreitung histologischer Färbemethoden dürfte es zuzuschreiben sein, daß die Veraschung tierischer Gewebe in der Folgezeit ganz in Vergessenheit geriet. Erst LIESEGANG (1910) hat sie bei seinen Studien über die Verteilung anorganischer Gewebsbestandteile wieder angewandt. Seinen systematischen Versuchen verdanken wir eine große Zahl richtiger Beobachtungen über den Veraschungsvorgang, deren Einzelheiten in den betreffenden Abschnitten angeführt sind. Als wesentlich sei hier aus dem Schlußsatz seiner Mitteilung nur hervorgehoben, daß „die Asche zweifellos an der richtigen Stelle liegt“. Diese Feststellung eines sehr kritischen Untersuchers ist von besonderem Wert, weil nur eine sichere Topochemie gegenüber der gewöhnlichen mikrochemischen Methodik einen wirklichen Fortschritt bedeutet. Etwa um dieselbe Zeit wie LIESEGANG und unabhängig von ihm hat HERRERA (1912, 1914) Schnittver-

aschungen zum Nachweis von Silicium ausgeführt, doch haben auch seine Mitteilungen trotz der erzielten klaren Untersuchungsergebnisse nicht zur Verbreitung der Methode beigetragen. Gleichfalls ohne generelle Nachwirkung blieb der Bericht von PRENANT (1919) über die Lösung zoologischer Fragestellungen durch Mikroveraschung. Der Grund, warum sich diese Arbeitsweise nicht damals schon allgemeiner durchsetzte, dürfte darin zu suchen sein, daß alle genannten Forscher die Veraschung als Vorbereitung zum Nachweis bestimmter anorganischer Elemente anwandten; so mußte der Eindruck entstehen, daß es sich um eine nur für das Studium von Spezialfragen geeignete Methode handle.

Wie POLICARD (1942) berichtete, ist auch er ursprünglich durch ein chemisches Problem auf den Gedanken gekommen, mikroskopische Präparate zu veraschen. Er studierte 1918 die Vorgänge bei der Knochenbruchheilung und suchte sich in diesem Zusammenhang über die Ablagerung der Calciumsalze zu unterrichten. Sehr schnell erkannte er aber den Nutzen des Studiums von Aschenbildern für die Klärung ganz verschiedenartiger Fragen; erst durch seine unablässigen Bemühungen ist die Mikroveraschung zu einer allgemeinen histologischen Methode und damit zu einem gesicherten Teil der mikroskopischen Untersuchungstechnik geworden.

Auch nach der Wiedereinführung der Spodographie durch POLICARD (1921) wurde deren morphologische Bedeutung anfänglich nur von wenigen Forschern erkannt. Ursache dafür war wohl vor allem, daß zunächst noch manche grundlegende Frage technischer Art abgeklärt werden mußte. Ungenügend bekannt war z. B. die Anwendungsmöglichkeit von Fixationsmitteln verschiedener Art, ferner fehlten Studien über die dabei etwa vorkommenden Verluste an anorganischer Substanz, auch über die mögliche Verdampfung von Salzen wußte man nichts Genaues; endlich mußten die speziell für die Untersuchung von Spodogrammen geeigneten physikalischen und chemischen Methoden erst noch erprobt werden.

Mit der Vergrößerung des interessierten Forscherkreises entwickelte sich indessen die neue Arbeitsweise schnell weiter, dementsprechend häuften sich die Einzelbefunde. Eine erste Zusammenfassung gab TSCHOPP (1929) in seinem Handbuchbeitrag, wobei er sich allerdings der Tatsache bewußt war, daß die Zeit für einen solchen Überblick damals eigentlich noch nicht gekommen war. Bald folgten weitere Berichte von SCOTT (1933c) und von HINTZSCHE (1938);



Abb. 2. GUSTAV GABRIEL VALENTIN (1810—1883), Silberstiftzeichnung aus dem Jahre 1842 von J. F. DIETLER

beide behandelten auch die Technik der Methode, die außerdem von HENCKEL (1929 b), POLICARD und OKKELS (1932), von POLICARD (1938) sowie von SANCHEZ-CALVO (1940) beschrieben wurde. Schon damals ließ sich erkennen, daß der Ausbau der Untersuchungsweise durch besser gesicherte Grundlagen wesentliche Förderung erfahren hatte. Die Schnittveraschung war zu einer Spezialmethode histologischer Forschung geworden, deren Anwendung zunächst der systematischen Sammlung neuer Befunde galt. In einzelnen Fällen diente sie auch weiterhin der Durchführung oder wenigstens der Vorbereitung histochemischer Untersuchungen. Über die grundsätzlichen Ergebnisse dieser Entwicklungsphase berichtete ich in meiner oben erwähnten Zusammenfassung von 1938. Seither ist die Mikroveraschung nicht mehr in gleichem Maße als selbständige Untersuchungsart gebraucht worden. Sie dient heute neben und zusammen mit anderen Methoden vorwiegend zur Abklärung cyto- und histologischer Probleme, z. B. des Ablaufes normaler und krankhaft veränderter Funktionen. Damit dürfte sie die Stellung gefunden haben, die ihr im Rahmen der mikroskopischen Technik zukommt. Zwei neuere Berichte lassen das erkennen. Einen Rückblick auf 20 Jahre Mikroveraschungsforschung gab POLICARD (1942) anlässlich des hundertjährigen Bestehens der Royal Microscopical Society in London; er behandelte darin speziell die cytologischen Ergebnisse. Über andere Teilgebiete der Spodographie, besonders ihre Anwendung auf die Gewebelehre und auf Probleme der Pathologie, schrieb HORNING (1951). Obwohl diese beiden sehr lesenswerten Abhandlungen den Stoff bei weitem nicht vollständig erfassen, sind sie doch zu einer schnellen Orientierung über die Möglichkeiten der Mikroveraschungstechnik recht gut geeignet.

Anwendungsbereich der Schnittveraschung

Die Untersuchung von Spodogrammen kann nicht Selbstzweck sein; Studien an veraschten Präparaten dienen vielmehr in erster Linie der Klärung allgemeiner biologischer und histophysiologischer Fragen. Mit POLICARD (1931 a) sehe ich die Hauptbedeutung der Mikrospodographie zunächst in dem Nachweis der Lage aller anorganischen Substanzen; außer der normalen Verteilung werden aber auch die funktionellen Schwankungen des Salzgehaltes einer Untersuchung zugänglich. Ferner wird es möglich, manche der durch die Veraschung demaskierten Ionen topochemisch nachzuweisen.

Nicht erkennbar ist im Aschenbild, ob die anorganischen Bestandteile vor der Verbrennung ionisiert oder gebunden vorhanden waren. Diese Frage kann zwar gelegentlich durch vergleichende Untersuchungen unter Beiziehung anderer histochemischer Methoden geklärt werden, doch sind wir von einer wirklich umfassenden Kenntnis dafür geeigneter Arbeitsweisen noch weit entfernt. Einige gesicherte Methoden dieser Art sind in den bekannten Büchern über die histologische Untersuchungstechnik sowie in den Spezialwerken von LISON (1936, 1953), COWDRY (1948) und GLICK (1949) zu finden. Umgekehrt sind die Ergebnisse der Schnittveraschung auch als Kontrolle für andere histochemische Reaktionen bedeutsam.

Nicht zum wenigsten darf endlich die Histopathologie neue Kenntnisse von der Spodographie erwarten, wofür im Schrifttum schon eine ganze Reihe von Beweisen vorliegt. POLICARD (1931 a) nannte als derartige wichtige Studiengebiete: die Heilungsvorgänge bei der Tuberkulose, Ossifikationsanomalien, Siderose, Silikose, arteriosklerotische Veränderungen, Schwermetallvergiftungen, Pigmentuntersuchungen und die Geschwulstforschung. Mit der Zusammenstellung der Befunde über die Aschenverteilung in normalen Geweben und Organen, die im

folgenden auf Grund des Schrifttumes und eigener Untersuchungen gegeben wird, ist also nicht nur eine Sammlung histophysiologischer Beobachtungen beabsichtigt, sie soll vielmehr auch histopathologischen Studien als Grundlage dienen.

Technik der Schnittveraschung

a) Vorbehandlung des Materiales

Eine sichere Beurteilung von Aschenbildern ist nur bei genauer Kenntnis der angewandten Methodik möglich. Vor der Beschreibung von Ergebnissen muß daher auch kurz über den heutigen Stand der Untersuchungstechnik referiert werden. Als ideal ist die *Veraschung nativen Untersuchungsmateriales* zu bezeichnen (POLICARD 1924), weil dabei die Möglichkeit von Verlust oder Verlagerung anorganischer Bestandteile so gut wie ausgeschlossen ist. Ausstriche, Häutchen und Zupfpräparate lassen sich, sofern sie dünn genug gewonnen werden können, in dieser Form direkt veraschen.

Freihandschnitte unfixierter Organe können kaum in der nötigen Feinheit hergestellt werden. Es lag daher nahe, zu ihrer Anfertigung die *Gefriermethode* heranzuziehen (TSCHOPP 1929); hervorragend geeignet ist dazu die von SCHULTZ-BRAUNS (1931 a, b) entwickelte Messertiefkühlvorrichtung, die auch sehr wenig zusammenhängendes Material, wie etwa Placentarzotten, unfixiert zu schneiden ermöglicht. Die der Gefriermethode anhaftenden Nachteile wurden häufig übertrieben; ungleiche Schnittdicke und Faltenbildung (HENCKEL 1929 b) oder überhaupt zu große Schnittdicke (SCOTT 1933 b) sind bei guter Übung zu vermeiden. RODDY (1941) empfahl deshalb erneut, native Gefrierschnitte zu veraschen, wenn die Lage diffusibler oder löslicher Salze zu bestimmen ist. Natürlich darf man nicht wahllos für jede Fragestellung Gefrierschnitte verwenden wollen, insbesondere nicht für feinste cytologische Beobachtungen. Bedeutsamer sind die Bedenken über mögliche Verlagerung anorganischer Substanzen durch das Gefrieren und Wiederauftauen der Schnitte sowie durch die unvermeidliche Wasserkondensation (HENCKEL 1931). Diese Fehlerquellen können indessen durch das *Gefrier-Trockenverfahren* von GERSH (1932) als überwunden gelten. GERSH (1947) betonte jedenfalls als besonderen Vorteil seiner Methode, daß sie die Bildung von Artefakten vermeide, sofern die Evaporation bei genügend tiefer Temperatur vorgenommen wird. Über zufriedenstellende Ergebnisse mit dieser Behandlungsweise bei Veraschungsarbeiten berichteten unter anderen SCOTT (1935, 1940 a), ENGSTRÖM (1943) und HYDÉN (1943 a, b).

Zweifellos ist die Trocknung der gefrorenen Organstücke im Vakuum jeder anderen Fixationsart überlegen. Trotzdem wird man gelegentlich, wenn äußere Gründe eine sofortige Untersuchung der Gewebstücke unmöglich machen, oder wenn feinere cytologische Einzelheiten im Aschenbild studiert werden sollen, nicht ohne *Fixation* auskommen. POLICARD und OKKELS (1930) empfahlen die Verwendung fixierten Materiales sogar als Gewohnheitsmethode. Zweifellos sind bei jeder Art von chemischer Fixation mehr Fehlerquellen vorhanden, als sie native Präparate bieten. Da alle Flüssigkeiten, die Salze enthalten oder solche lösen, von vornherein ausscheiden (POLICARD 1923 a), gelten besonders Alkohole verschiedener Art als empfehlenswert, ihre Eignung wurde durch RIVELLONI (1938) bestätigt. GAGE (1938) nennt neben Äthyl- auch Butyl- und Propylalkohol sowie Dioxan. Völlig einwandfrei ist aber auch deren Verwendung nicht. Der von POLICARD (1923 a) empfohlene absolute Äthylalkohol kann z. B. gewisse Salze lösen (SCHEID 1930, HENCKEL 1931); selbst wenn deren Menge nur äußerst gering zu veranschlagen ist (HERRMANN 1932, SCOTT 1933 c, MARZA 1938), so ergibt sich doch aus der Möglichkeit von Salzverlusten während der Fixation die

Notwendigkeit, vergleichende Untersuchungen nur an identisch behandelten Spodogrammen auszuführen.

Als weiterer Nachteil der Fixation in absolutem Alkohol muß die *Salzverlagerung* angeführt werden, auf die zuerst BETHE (Diskussionsbemerkung zu GANS 1932) hingewiesen hat. Wenn HERRMANN (1932) demgegenüber die Auffassung von BECHHOLD zitiert, wonach die Grenzflächen zwischen den Gewebselementen größere Verschiebungen verhindern, so lassen sich doch im Schrifttum manche Bilder finden, die gleich der Alkoholfucht des Glykogens eine Verlagerung der anorganischen Substanzen erkennen lassen (vgl. Abb. 3).

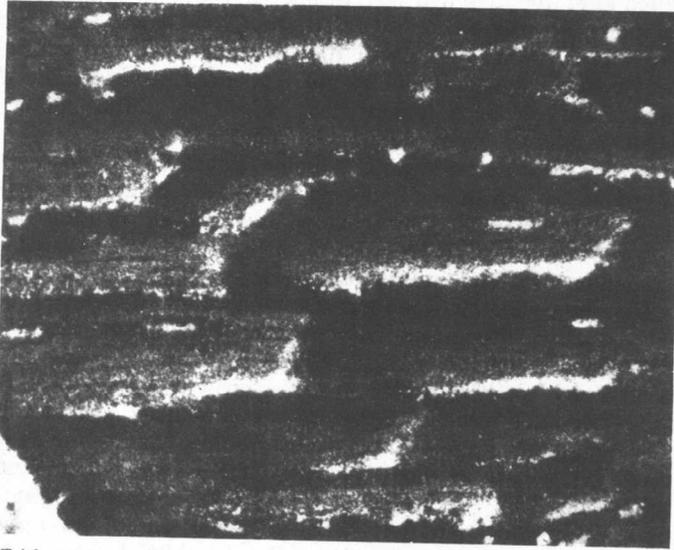


Abb. 3. Herz, Triebmuskulatur längs, Ratte. Absoluter Alkohol, Paraffinschnitt $2\frac{1}{2}$ μ , verascht in Luft bei 520°C , Vergr. $570\times$, Cardioid-Kondensator. Ein Teil der anorganischen Substanzen ist durch den eindringenden Alkohol gegen die Faseroberfläche bzw. gegen die Glanzstreifen verlagert. Aus DEUCHER 1941

Endlich ist bei alkoholfixierten Objekten auch die an manchen Geweben recht beträchtliche *Schrumpfung* zu beachten. Sie ist die Hauptursache für die im Schrifttum mehrfach angeführte „deutlichere Strukturierung“ der Aschenbilder nach Alkoholfixation (vgl. Abb. 4). Bei Paralleluntersuchungen erwies sich die Asche in den Spodogrammen nativer Gefrierschnitte stets diffus und mehr homogen verteilt, auch war die Dichte des Gesamtaschen- und des Kalkaschenbildes (vgl. S. 24) bei den Gefrierschnitten höher (ELIASSOW 1933).

Durch die von SCOTT (1933b) für Aschenbilder empfohlene und seither von vielen Untersuchern gebrauchte Fixation in Formol-Alkohol 1:9 wird zweifellos die Schrumpfwirkung bedeutend verringert; andererseits kann sich aber durch Herabsetzung der Konzentration des Alkohols auf 90% die Löslichkeit von Salzen erhöhen. HUEPER (1934), dessen Arbeit ich nicht habe einsehen können, soll nach KOOYMAN (1935) Differenzen in Vorkommen und Menge der Kernasche bei Fixation in Formol-Alkohol und bei Anwendung der Gefriermethode gefunden haben. Im ganzen wird jedoch wahrscheinlich die Gefahr des Salzverlustes beim Gebrauch wäßriger Fixationslösungen überschätzt, haben doch GODLEWSKI (1937) und KRUSZYŃSKI (1939) sogar BOUVINSche Lösung mit bestem Erfolg für Veraschungsuntersuchungen angewandt; auch SANCHEZ-CALVO (1940) nennt Pikrinsäure als geeignete Fixationsflüssigkeit. POLICARD und OKKELS

(1932) berichteten, daß in 10%igem Formol gehärtete Präparate gegenüber alkoholfixierten kaum geringere Resultate geben, und UOTILA und JÄÄSKELÄINEN (1937) fanden sogar Aschenbilder nach Formolfixation wegen des besseren Erhaltungszustandes den in Alkohol fixierten Präparaten überlegen. RODDY (1941) empfahl gleichfalls 10%iges Formol, speziell wenn nichtlösliche Salze nachzuweisen sind. Formol-Kochsalzlösung, die POLICARD und DOUBROW (1924) gebrauchten, ist als Fixationsmittel für zur Veraschung bestimmte Gewebstücke

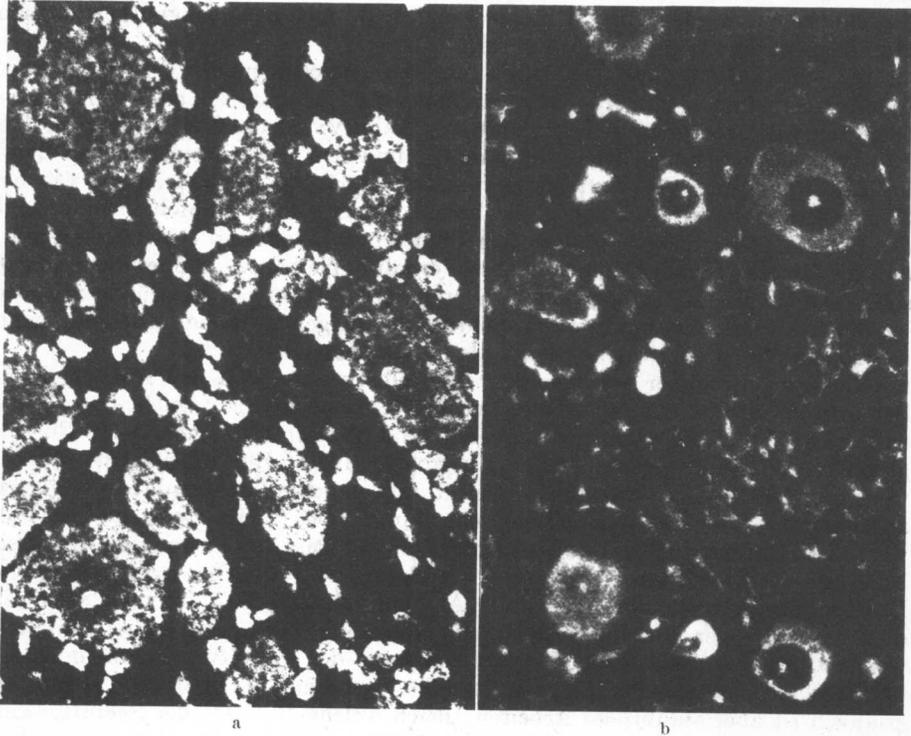


Abb. 4a u. b. Ganglion n. trigemini, Meerschweinchen. Verascht im Stickstoffstrom bei 520° C, Vergr. 450×, Cardioid-Kondensor. a Nativer Gefrierschnitt 5 μ, entfettet in Äther-Chloroform; b absoluter Alkohol, Paraffinschnitt 5 μ. Der Alkohol bewirkt starke Schrumpfung der Ganglienzellen. Aus HINTZSCHE 1939b

allerdings ihres Salzgehaltes wegen abzulehnen (ANGELINI 1931), trotzdem wurde sie noch neuerdings von CHIARA (1950) benutzt.

Ein noch wenig angewandter Vorteil des Formaldehyds liegt in der Möglichkeit, die Fixation im Dampf vorzunehmen (OSTERTAG 1927). In der Literatur wurde mehrfach über gute Ergebnisse dieser Fixationsart berichtet (HACKMANN 1933, WEPLER 1935). KRUSZYŃSKI (1939) benutzte außer Formol- auch Osmiumdämpfe, um zur Veraschung bestimmte Paramecien zu fixieren.

Ob und welche Art der *Einbettung* derart gehärteten Materiales vorzunehmen ist, hängt vom Ziel der Untersuchung ab. Gefrierschnitte wird man entgegen der Angabe von POLICARD (1924) besser nicht in Wasser, sondern wegen der geringeren Benetzbarkeit der Schnitte in Petrol (HACKMANN 1933) oder Xylol (RODDY 1941) auffangen und aus diesem direkt auf die Objektträger aufziehen.

Celloidineinbettung kommt wohl nur für die seltene serienweise Veraschung größerer Gewebstücke in Betracht (OSTERTAG 1927). Vor der Veraschung ist das Celloidin durch Methylalkohol herauszulösen, da sonst bei Erhitzung der

Präparate durch Verpuffen beträchtliche Zerstörungen eintreten können (LIESEGANG 1910).

Weitaus am häufigsten findet man im Schrifttum Veraschungen von Paraffinschnitten beschrieben. Die Einbettung erfordert außer Verwendung reiner Substanzen keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen. Als Intermedium empfiehlt HENCKEL (1929b) Xylol, in dem die in Betracht kommenden Salze praktisch unlöslich sind. KRUSZYŃSKI (1934) verwandte für den gleichen Zweck Chloroform. Ein besonderer Vorteil der Paraffineinbettung ist nach GANS (1930), daß die Blöcke zu wiederholter Untersuchung z. B. mit neu bekanntgewordenen Methoden aufbewahrt werden können.

Die *Schnittdicke* muß sich nach den zu entscheidenden Fragen richten. TSCHOPP (1929) hat mit 10–30 μ zweifellos für die meisten histo- und cytochemischen Probleme zu dick geschnitten. KRUSZYŃSKI (1938) konstatierte, daß 10–15 μ dicke Schnitte leicht schrumpfen und daß die einzelnen Zellen dann im Dunkelfeld nur als unstrukturierte Ascheanhäufungen erscheinen, was bei 3–5 μ dicken Paraffinschnitten, die bereits SCOTT (1933) empfohlen hat, nicht der Fall sei. Als allgemein gültige Regel hat schon LIESEGANG (1910) festgestellt, daß die feineren Strukturen um so besser erhalten bleiben, je dünner die Schnitte sind. Die Ursache dafür liegt unter anderem in der Tatsache, daß dünne Schnitte bei der Erhitzung viel weniger zum Schrumpfen neigen als dicke. Auch HORNING (1951) empfahl wieder, nicht dicker als 5 μ zu schneiden.

Nur ganz nebenher sei bemerkt, daß selbstverständlich das Aufziehen der Schnitte auf die Objektträger bzw. Deckgläser, wenn man auf solchen veraschen will, nicht mit Hilfe von Eiweißglycerin und Wasser geschehen darf: Eiweißglycerin hinterläßt eigene Asche (LIESEGANG 1910) und destilliertes Wasser vermag nach KRUSZYŃSKI (1934) selbst aus paraffindurchtränkten Schnitten anorganische Substanzen zu lösen, was immer noch nicht genügend beachtet wird (z. B. CHIARA 1950). Das Mittel der Wahl ist Paraffinum liquidum (OKKELS 1930), dessen Überschuß abgesaugt werden kann, wenn die Objekte durch leichte Erwärmung gestreckt sind. Absoluter Alkohol, oder wie BAGIŃSKI (1938) wegen dessen zu geringer Oberflächenspannung vorschlug, 80%iger Alkohol sind weit weniger gut geeignet. Eine Entparaffinierung der Schnitte vorzunehmen ist überflüssig, da reines Paraffin rückstandlos verbrennt (LIESEGANG 1910). Un-erläßlich ist aber staubfreies Arbeiten, gleich welche Methode der Schnittgewinnung angewandt wird. Die von HERRERA (1925) empfohlene Veraschung zwischen Objektträger und Deckglas wird wohl kaum noch geübt.

Eine besondere Behandlung können *Gefrierschnitte lipoidreicher Organe* (Nervengewebe, Nebenniere) erfordern. TSCHOPP (1929) hatte deren Extraktion mit Äther-Chloroform empfohlen, da die Anwesenheit größerer Lipoidmengen die Veraschung stört, eine Erscheinung, die SCHEID (1930) auch in Modellversuchen mit Lecithin und Cholesterin beobachtet hat. SCHEID entfettete die nativen Gefrierschnitte vom zentralen Nervensystem 3–5 Std lang, war sich jedoch dabei der Tatsache bewußt, daß mit der Lipoidextraktion auch eine Verringerung der Aschenmenge einhergeht. Nach ALLARA (1937b) kann man bei genauer Beachtung der richtigen Temperaturhöhe und Veraschungsdauer die Vorbehandlung der Schnitte lipoidreicher Organe mit fettlösenden Mitteln vermeiden und damit die Vorteile der nativen Gefrierschnitte unverändert erhalten, was mit meinen Erfahrungen übereinstimmt (vgl. Abb. 16). Bei Formol-Alkoholfixation und Paraffineinbettung ist eine besondere Entfettung naturgemäß überflüssig. Systematische Untersuchungen über die Wirkung verschiedener fettlösender Mittel stellte KOOYMAN (1935) an. Sie sind besonders wichtig für die nach der Gefriertrockenmethode in Paraffin eingeschlossenen Gewebstücke; zum Ver-

gleich dienten Gesamtaschenbilder von Schnitten ohne jegliche Vorbehandlung mit Extraktionsmitteln. Durch kaltes und warmes Wasser werden nach KOOYMAN beträchtliche Mengen anorganischen Materiales aus dem Gewebe entfernt, so daß z. B. die ursprünglich ziemlich aschereiche Epidermis dann nur noch 8—10% der Lichtreflexion von unbehandelten Präparaten gibt (gemessen mit der photoelektrischen Zelle von SCOTT nach der auf S. 20 erwähnten Methode). Trotz dieser Abnahme der Salze bleibt auch in den mit Wasser extrahierten Schnitten noch so viel anorganisches Material erhalten, daß die Präparate gleichmäßig verteilte bläuliche Asche zeigen. Nach Extraktion von Schnitten mit fettlösenden Mitteln (Alkohol, Äther, Chloroform, Aceton) entstehen ziemlich gleichartige Spodogramme, alle diffusen, bläulich erscheinenden Salze fehlen aber jetzt im Gesamtaschenbild. Alkohol und Aceton verursachen außerdem beträchtliche Schrumpfung. Wird ein entparaffinierter Schnitt zuerst in Alkohol und dann noch in Wasser ausgezogen und nach Trocknung verascht, so findet sich auffälligerweise wieder ein diffus verteilter bläulicher Aschenrückstand. Diese Versuche geben vielleicht einen Hinweis auf die Faktoren, durch die einige Unstimmigkeiten in den Ergebnissen der Mikroveraschung von in Formol-Alkohol fixierten oder mit der Gefrierschneidetechnik gewonnenen Präparate zustande gekommen sein können.

Eine recht interessante Vorbehandlung zu veraschender Schnitte haben POLICARD und PILLET (1928 b) angegeben. Um

das verhältnismäßig leicht flüchtige Natrium- und Kaliumchlorid im Gewebe zu erhalten, suchten sie durch Einwirkung von Schwefelsäureanhydrid-Dämpfen die entsprechenden schwer flüchtigen Sulfate zu erzeugen. Da die Reaktion nur an den völlig getrockneten Schnitten vorgenommen werden darf, ist ihr Erfolg etwas fraglich, doch liegen empfehlende Hinweise im Schrifttum vor.

Die behelfsmäßige Veraschung von Schnitten, wie sie noch JACOBI und KEUSCHER (1927) sowie OSTERTAG (1927) ausführten, kommt wohl bei den heute an die Präparate gestellten Anforderungen nicht mehr in Betracht. Immerhin sei wenigstens auf die von WEPLER (1935) beschriebene einfache *Veraschungseinrichtung* verwiesen, die staubfrei arbeitet, Temperaturmessungen gestattet und regulierbar ist, also die grundsätzlich an einen Veraschungsapparat zu stellenden Anforderungen erfüllt. Persönlich benutze ich für meine Untersuchungen seit vielen Jahren den nach den Angaben von SCHULTZ-BRAUNS

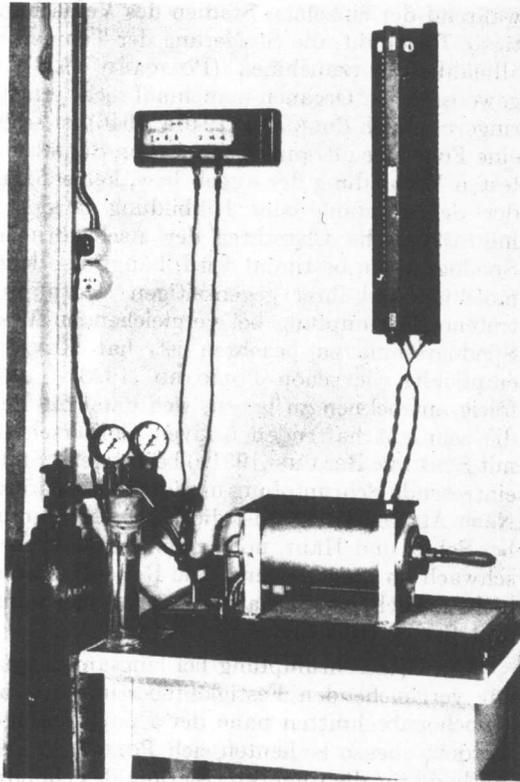


Abb. 5. Veraschungsapparat nach SCHULTZ-BRAUNS. Temperatur direkt am Galvanometer ablesbar; angeschlossen ist die Einrichtung zum Durchleiten von Stickstoff

(1931 b) durch die Firma C. Gerhardt, Bonn a. Rh. konstruierten Veraschungs-
ofen (vgl. Abb. 5), der sich bestens bewährte. Andere Konstruktionen sind von
POLICARD (1924) und von SCOTT (1944) angegeben (erhältlich bei P. Couprie,
Lyon bzw. der A. S. Aloe Comp. St. Louis USA).

b) Der Veraschungsvorgang

Für eine sichere Beurteilung der Präparate ist notwendig, auch das Geschehen
während der einzelnen Stadien des Veraschungsvorganges zu kennen. Als wich-
tigste Regel gilt, die Steigerung der Temperatur bis zur erforderlichen Höhe nur
allmählich vorzunehmen (POLICARD 1923 b, d), um die besonders bei binde-
gewebsreichen Organen manchmal recht erhebliche Schrumpfungstendenz zu ver-
ringern. Nach POLICARD (1940 a, 1946) ist wahrscheinlich, daß die *Hitzerrektion*
eine Folge der ultramikroskopischen Struktur ist. Je nach der mehr oder weniger
festen Verbindung der kugel- bzw. kettenförmigen Makromoleküle wird das Maß
der Schrumpfung oder Reißbildung in den Präparaten verschieden sein; der
mikroskopische Charakter der Aschekörnchen, durch den das Aussehen der
Spodogramme bestimmt wird, hängt also letzten Endes von der Art der Makro-
moleküle und ihrer gegenseitigen Verknüpfung ab. Daß die eventuell einge-
tretene Schrumpfung bei vergleichenden Messungen an Kontrollpräparaten der
Spodogramme zu beachten ist, hat RAVAUULT (1928 a) besonders betont. Er
empfiehlt, wie schon POLICARD (1923 b), die Schnitte auf dem Tragglass sorg-
fältig antrocknen zu lassen, weil dann die Schrumpfung am geringsten sei. Für
die sehr gut haftenden nativen Gefrierschnitte kann ich das übereinstimmend
mit SCHULTZ-BRAUNS (1931 c) bestätigen. Stets ist übrigens die bei etwa 60—70° C
eintretende Schrumpfung in dünnen Präparaten geringer als bei dicken Schnitten.
Nach ALLARA (1937 a) ist die Hitzeschrumpfung nativer Gefrierschnitte erheblich
bei Sehne und Haut, noch ziemlich stark im kollagenen Stroma der Organe und
schwach im Mesenterium. Die Reticulumfasern schrumpfen angeblich überhaupt
nicht. Auch embryonales Material schrumpft kaum oder gar nicht (HORNING
und SCOTT (1932 a)).

Die Hitzeschrumpfung bei langsam ansteigender Temperatur ist als Methode
zur vergleichenden Festigkeitsbestimmung in den verschiedenen Knorpel- und
Knochenabschnitten nahe der Epiphysenfuge von POLICARD (1928 c) gebraucht
worden, ebenso bedienten sich POLICARD, PÉHU und BOUCOMONT (1932 a) dieser
Methode für die Charakterisierung des chondroiden Gewebes bei Rachitisstudien.

Bei weiterer langsamer Steigerung der Temperatur bis auf etwa 150° C be-
ginnen die Präparate, sich zu bräunen und schließlich zu schwärzen, da die *Ver-
kohlung* der organischen Substanz einsetzt. In dieser Phase des Veraschungs-
vorganges können teerartige Substanzen in Form feiner Tropfen auftreten, die
besonders bei weiterer beschleunigter Erwärmung zusammenfließen und dadurch
sogar Artefakte im Präparat verursachen. Eine Unterbrechung des Verbrennungs-
vorganges zur Vornahme mikroskopischer Untersuchungen ist im Stadium der
Verkohlung durchaus möglich, wenn nur die Traggeläser vorsichtig abgekühlt
werden. Fortlaufende Beobachtungen während der Verkohlungsphase haben
gezeigt, daß die Struktur der Gewebe und Organe bei der Verbrennung erhalten
bleibt, daß aber die einzelnen Zell- und Gewebsbestandteile verschieden schnell
verkohlen und ungleich lange Zeit zur Veraschung brauchen (LIESGANG 1910,
POLICARD 1924). Während der Verkohlungsphase und besonders nahe ihrem
Ende ergeben sich daher sehr fein differenzierte Präparate, die im durchfallenden
Licht betrachtet alle Einzelheiten des geweblichen Aufbaues genau hervortreten
lassen (vgl. Abb. 6).

Um den Verbrennungsvorgang auch im Mikroskop ständig beobachten zu können, hat POLICARD (1936b) die Veraschung des auf einem dünnen Pyrexglas liegenden Schnittes mit Hilfe eines darüber gehaltenen Thermokauters vorgenommen. UBER und GOODSPEED (1936) bedienten sich einer kleinen heizbaren Aluminiumkammer mit einem Thermolement und eingebauter Optik, die Vergrößerungen bis 200fach ermöglichte, um die Verbrennung zu verfolgen. GODLEWSKI (1937, 1938) baute zum gleichen Zweck eine kleine Heizkammer, die auf dem Tisch des Mikroskopes angebracht werden kann. SCOTT (1943) gelang es, an quergestreifter Muskulatur und an Vorderhornzellen durch Fiinaufnahmen bei 700—800facher Vergrößerung nachzuweisen, daß während der Veraschung keinerlei Lageänderung der Partikelchen eintritt.

Als besondere Methode ist die Untersuchung verkohlter Schnitte durch JOHN (1929, 1930) sowie durch TERNI und DE LUCCHI (1937) und neuerdings von CHIARA (1950) angewandt worden; auch BARIGOZZI (1938b) bediente sich ihrer mit Nutzen. Andere Autoren haben mehrfach verkohlte Präparate abgebildet, um Unterschiede in der Verbrennungsgeschwindigkeit der einzelnen Gewebs- und Zellbestandteile darzutun (JACOBI und KEUSCHER 1927, POLICARD 1933c, SCUDERI 1948). SCHULTZ-BRAUNS (1929) sah zuerst die bindegewebigen Anteile im Schnitt verkohlen, bei länger dauerndem und etwas stärkerem Erhitzen werden dann auch die epithelialen und die muskulären Partien im Schnitt dunkel. Der Eintritt der Verkohlung ist jedoch nicht nur von der Art des Gewebes, sondern auch von dessen Menge abhängig. SCUDERI (1948) hat z. B. angegeben, daß dichtes kollagenes Gewebe schneller verkohlt als lockeres Bindegewebe. Weniger deutlich als zu Beginn heben sich Einzelheiten im Stadium der völlig gleichmäßigen Verkohlung ab; erst gegen ihr Ende hin wird wieder eine Differenzierung deutlich, da auch die Veraschung — kenntlich an der hellen Färbung der betreffenden Stellen — nicht in allen Geweben gleichzeitig eintritt. SCHULTZ-BRAUNS (1929) sah sie zuerst im Epithel und in der Muskulatur beendet, was ich bestätigen kann; SCUDERI (1948) gibt dagegen an, daß dichtes kollagenes Bindegewebe, z. B. des Periostes, vor dem Epithel und den Drüsen der oberen Luftwege verascht sei. Möglicherweise ist verschiedene Vorbehandlung der Präparate die Ursache solcher gegensätzlichen Befunde. Besonders schön ist nach SCHULTZ-BRAUNS (1929) zu Anfang des Veraschungsstadiums die Querstreifung in der Skelettmuskulatur erkennbar, da die isotrope und die anisotrope Substanz nicht gleich schnell verbrennen; dunkle, noch kohlehaltige und hellgelbliche, fast kohlefreie Querbänder wechseln dann miteinander ab. Das Bindegewebe und die Blutgefäße sind zur selben Zeit noch gleichmäßig geschwärzt, sie veraschen besonders bei hohem Gehalt an elastischen Fasern erst, wenn das Präparat einige Zeit bei 500° C gehalten wurde (EICKEN 1932). Im allgemeinen

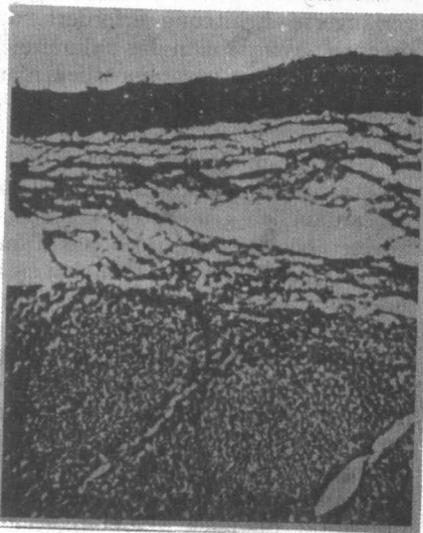


Abb. 6. Anthrakogramm (Verkohlungsbild) einer menschlichen Tonsilla palatina nach Erhitzung auf 300° C. Der breite dunkle Streifen am oberen Bildrand entspricht dem Epithel, dessen oberflächlichste Zellschicht besonders stark verkohlt ist; in lockerer Anordnung darunter das Bindegewebe der Tonsilla propria und in der unteren Bildhälfte die kugelig-lymphfollikuläre Präp. Zorzoli

geben Gebiete mit reichlich verkohlter Substanz wie Epithelien, Gefäßwände, Züge straffen Bindegewebes und Muskelfasern auch viel anorganischen Rückstand (CHIARA 1950). LIESEGANG (1910) fand, daß der Kohlenstoff besonders aus phosphorreichen Verbindungen erst sehr spät verschwindet; Modellversuche mit Nucleinpulver bestätigten diese Beobachtung. Phosphorreichum dürfte wohl auch der Grund für die oft recht langsame Veraschung der Zellkerne sein, die POLICARD (1923d) dem Vorhandensein von Substanzen der aromatischen Reihe zuschrieb. Durch Versuche mit Fleischpulver haben POLICARD und OKKELS (1930) festgestellt, daß sich calcium- und natriumreiche Präparate leicht veraschen lassen, während vermehrter Kaliumgehalt eine weniger hohe aber verlängerte Erhitzung erfordert, um auch die letzten Kohleteilchen zu verbrennen. Würde man das kaliumreiche Material sofort stark erhitzen, so könnten die Kaliumsalze zusammenfließen und dabei sogar noch kohlehaltige Teilchen einschließen, wodurch eine völlige Veraschung des Präparates äußerst erschwert würde.

Um eine möglichst gleichmäßige Veraschung zu erzielen, empfahl POLICARD (1923a), einen schwachen Luftstrom durch den Verbrennungssofen zu leiten; von anfänglich gemachten Versuchen mit angefeuchtetem Sauerstoff ist er bald wieder abgekommen, doch hat TSCHOPP (1929) diese Arbeitsweise erneut empfohlen, auch RICHARDS (1956) hat sie an besonders schwierigem Material wieder angewandt. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß bei diesem Vorgehen die gesamte Aschenmenge eher vermindert wird, weil dann besonders bei höherer Temperatur anscheinend Kaliumsalze abdampfen. Dagegen erzielte SCHULTZ-BRAUNS (1931b) bei Verbrennung der Schnitte im Stickstoffstrom wesentlich bessere Spodogramme (keine Schrumpfung, keine Teerbildung). Die Stickstoffdurchleitung kann dabei entweder während der ganzen Veraschungsdauer erfolgen oder aber nach Erreichung von etwa 500° C eingestellt werden. Die höchsten Mengen anorganischer Substanz geben native Gefrierschnitte bei Verbrennung im Stickstoffstrom. Präparate, die nach Alkoholfixation unter Durchleitung von Stickstoff verascht werden, hinterlassen schon etwas weniger Salze und die geringsten Mengen anorganischer Substanz erhält man bei Verbrennung nativer Gefrierschnitte im Sauerstoffstrom. Ausgedehnte Vergleichsuntersuchungen von SCHULTZ-BRAUNS (1931c) zeigen außerdem, daß die Mengenunterschiede der Aschen nach Verbrennung im Sauerstoff- oder Stickstoffstrom bei den verschiedenen Gewebsarten erheblich differieren. Sie sind gering in Bindegewebe und Knorpel, bedeutend dagegen im Epithel der Haut, der Schleimhäute und von Drüsen. Im Sauerstoffstrom veraschte Schnitte verdienen deshalb den Namen „Gesamtaschenbild“ nicht. Eine interessante Kombination verschiedener Methoden stammt von WULF (1934), der im Stickstoffstrom veraschte, diesen aber vorher durch konzentrierte Schwefelsäure leitete; er erhielt damit die besten Spodogramme.

Über die Veraschungsdauer und die zur völligen Verbrennung erforderliche Maximaltemperatur finden sich in der Literatur recht verschiedene Angaben. Die Art des Untersuchungsmateriales, seine Vorbehandlung und die Schnittdicke sind die wichtigsten Faktoren, die verhindern, eine allgemein gültige Regel über die Veraschungsdauer und die günstigste Höchsttemperatur aufzustellen. Immerhin ist festzuhalten, daß alle Autoren, unter anderen z. B. TSCHOPP (1929) und neuerdings noch HORNING (1951), die von kurzer Veraschungsdauer berichten, ziemlich hohe Maximaltemperaturen (bis 650° C) angewandt haben. Da aber nach TSCHOPP (1929) die Oxyde der Alkalien bei 600° schon flüchtig sind, hat man in solchen Fällen mit Salzverlusten zu rechnen. Als weiterer Nachteil starker Erhitzung ist — wenigstens bei Verwendung gewöhnlicher Objektträger —

das mögliche Einschmelzen von Ascheteilchen in das Glas zu erwähnen (POLICARD 1923 b); sie können mit diesem auch Verbindungen eingehen und so zu weiterer Aschenverminderung beitragen, entziehen sich diese Teilchen doch völlig einer eventuellen späteren chemischen Aschenanalyse. Erhitzt man sehr schnell, so besteht sogar die Gefahr, daß sich noch kohlehaltige Partikel ins Glas einschmelzen, wodurch ihre weitere Verbrennung völlig verhindert wird. TURCHINI (1924) hat, um alle diese Möglichkeiten auszuschließen, auf Platinplättchen verascht, was schon HARTING (1859) empfohlen hatte. Da solche Präparate aber nur Auflichtuntersuchung bei schwacher Vergrößerung zulassen, hat sich diese Methode nicht durchgesetzt.

Vorsichtige Untersucher halten sich an die Regel, mit möglichst geringer Höchsttemperatur bei etwas längerer Veraschungsdauer auszukommen. Man braucht sie deshalb nicht gleich auf mehrere Tage auszudehnen, wie das HERRERA (1925) angibt. Nützlich ist, durch langsame Steigerung der Wärme die Schrumpfung und Teerbildung einzuschränken, zumal dadurch auch zugleich für kaliumreiches Gewebe ein Schutz gegen das Zusammenfließen der Salze gegeben ist. SCHULTZ-BRAUNS (1929, 1931 b), der dieses Vorgehen systematisch erprobte, empfiehlt für 10 μ dicke Gefrierschnitte langsame Verkohlung bei 150° C und Abschluß der Veraschung bei 510—530° C. EICKEN (1932) nahm die Steigerung der Temperatur jenseits 150° C in Schritten von 50° C vor, die je 10 min beibehalten wurden. HERRMANN (1932) will die gleiche stufenweise Temperaturerhöhung sogar in Schritten von je 30 min Dauer durchgeführt wissen. RICHARDS (1956) hielt seine Präparate 6—10 Std bei 300—400° C und erhitzte erst dann kurz auf 600—650° C, weil die spröde Cuticula der Arthropoden sonst leicht kräuselt und in Stücke zerbricht.

Um die Veraschung unter stets gleichen Bedingungen vorzunehmen, hat SCOTT (1944) als Verbrennungsofen ein Quarzrohr von etwa $\frac{1}{2}$ m Länge empfohlen, das drei aufeinanderfolgende Hitzestufen aufweist. Im ersten Abschnitt mit 80° Wärme verdampfen das Wasser und die leicht flüchtigen Substanzen; im zweiten, auf 300° erhitzten Teil erfolgt die Verkohlung der organischen Gewebsbestandteile; im dritten wird bei 600° die eigentliche Veraschung vorgenommen. Durch eine besondere Vorrichtung gleiten die Objektträger in ungefähr 35 min durch die ganze Länge des Apparates; als ein weiterer Vorteil dieser Anordnung wird erwähnt, daß fortlaufend neue Präparate eingeführt werden können, ohne den Arbeitsgang zu unterbrechen. Dieser lange Quarzofen bietet außerdem Sicherheit, daß die Temperatur im zentralen Teil besser auf gleicher Höhe gehalten wird, was nach RICHARDSON (1935) bei den kurzen, beidseitig offenen Quarzröhren, die z. B. POLICARD verwandte, nicht der Fall ist. HORNING (1934 a) hatte deshalb schon einen Mikroincinerator mit längerer und engerer Quarzröhre empfohlen.

Von besonders niedrigen Höchsttemperaturen berichtete HACKMANN (1933), der seine Präparate in $\frac{1}{2}$ Std auf 350° C erhitzte, und der bei Temperaturen von 350 bis höchstens 400° C in $\frac{1}{2}$ —2 Std stets völlige Veraschung erzielt haben will. 30—45 min lange Erhitzung auf 400 bis höchstens 500° C nennt KRUSZYŃSKI (1938) als Regel. Ich selbst habe übereinstimmend mit HENCKEL (1931) bei Temperaturen unter 500° C kaum befriedigende Aschenbilder erhalten und finde, daß eine schrittweise Steigerung von 50 zu 50°, die je 20 min beibehalten werden, bis auf 520° C nötig ist, die mindestens 40—60 min beizubehalten sind. Zu den gleichen Ergebnissen kam auch ENGSTRÖM (1943, 1944), der insbesondere noch die mögliche Verdampfung der Phosphate bei dieser Temperatur studierte, jedoch fand, daß der größte Teil derselben bei der Mikroveraschung erhalten bleibt.