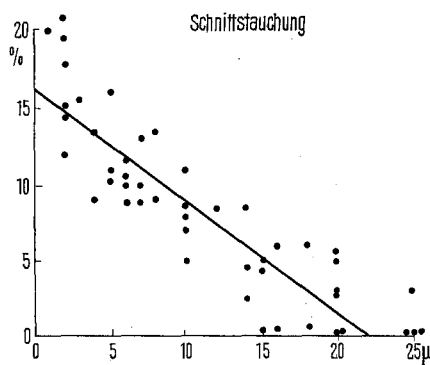


Fehlerkorrekturen bei stereologischen Messungen an menschlichen Plazenten: 2. Die Schnittstauchung

An Paraffinschnitten von menschlichen Geburtsplazenten wurde mit Hilfe des Integrationsokulares Zottenvolumen und -oberfläche bestimmt. Paraffinschnitte können aber trotz dem Strecken auf der Heizplatte um einen gewissen Prozentsatz in Richtung der Messerführung gestaucht bleiben¹. Es galt daher festzustellen, wie gross das Ausmass dieser Stauchung ist und inwiefern das Messergebnis durch die Stauchung beeinflusst wird.

Untersuchungsmaterial und Ausmass der Stauchung. Aus verschiedenen Regionen von menschlichen Geburtsplazenten wurden Stücke in Carnoy'schem Gemisch fixiert und über Benzylbenzoat und Benzol in Paraffin von 56°C Schmelzpunkt eingebettet. Von diesen Blöcken wurden auf einem Reichert-Mikrotom Serienschritte angefertigt und auf einer Heizplatte bei 45°C gestreckt. Von jedem Block wurden Schnittdicken von 2, 4, 6 ... bis 20 μ hergestellt und zwar in unregelmässiger Reihenfolge der verschiedenen Schnittdicken, um den Einfluss eines allfällig vorhandenen Gradienten im Gewebe auszuschalten. Gefärbt wurden die Schnitte teils mit Azan, teils mit Hämalun-Benzopurpurin.

An jedem Schnitt wurde die Höhe des Gewebstückes in der Schnitttrichtung vor dem Schneiden und nach dem Schneiden und Strecken gemessen. Wie die Figur zeigt, beträgt für Schnitte von 2 μ bei den untersuchten Plazenten die verbleibende Stauchung bis 20%, mit zunehmender Schnittdicke wird sie geringer und sinkt bei Schnitten von 25 μ Dicke praktisch auf Null. Im Unterschied zur Gewebsschrumpfung erfolgt die Stauchung nur in einer Richtung. Die Zotten werden dadurch in einer Richtung linear verkleinert. Eine kompensatorische Ausdehnung nach der Seite wurde nicht beobachtet.



Ausmass der Schnittstauchung in Abhängigkeit von der Schnittdicke, bei Paraffinschnitten menschlicher Plazenten. Ausgehend von 20% bei dünnen Schnitten wird die Stauchung mit zunehmender Schnittdicke geringer.

Einfluss der Stauchung. Der Einfluss der Stauchung auf das Messergebnis wurde durch Ausmessen von gezeichneten Testfeldern untersucht, bei denen der Grad der Stauchung genau bestimmt und nach Belieben variiert werden kann. Es ist dies – unter Verwendung von anderen Testfeldern – das entsprechende Verfahren, wie es zur Bestimmung des Einflusses der Schrumpfung angewendet wurde².

Wie die Ausmessung der Testfelder ergab, hat die Stauchung auf die Messung des Volumens der Zotten pro Raumeinheit keinen Einfluss, da, im gleichen Masse wie die Zotten verkleinert werden, auch mehr solcher Zotten ins Bildfeld rücken. Die Oberfläche pro Raumeinheit jedoch, die man durch Ausmessen dieser grösseren Anzahl von verkleinerten Zotten erhält, ist zu gross und muss durch Multiplikation mit dem Faktor $1/(1+q/2)$ korrigiert werden, wobei q den als Dezimalbruch ausgedrückten Prozentsatz der Stauchung bezeichnet. Bei einer Stauchung von beispielsweise 10% beträgt also der Korrekturfaktor, mit dem die gemessene Oberfläche multipliziert werden muss, $1/(1+0,05) = 0,953$. Um der tatsächlichen Oberfläche noch näher zu kommen, muss zusätzlich noch der Einfluss der Schrumpfung korrigiert werden³. Diese an den Testfeldern erhobenen Befunde gelten unter der Voraussetzung, dass die Zotten im gleichen Verhältnis wie das Paraffin im intervillösen Raum gestaucht werden. Soweit die bisherigen Messungen gezeigt haben, scheinen unsere Präparate dieser Voraussetzung zu genügen.

Summary. Irreversible compression of the sections, due to cutting on the microtome, which may attain up to 20% in thin paraffin sections, does not influence stereological measurements of volume per cm^3 of human placental villi. The measured villous surface, however, must be corrected by multiplication with $1/(1+q/2)$, where q means the percentage of compression, expressed as decimal fraction.

R. BAUR³

Abteilung Anatomie der Rhein.-Westf.
Technischen Hochschule Aachen,
D-51 Aachen (Deutschland), 3. September 1969.

¹ H. SITTE, in *Quantitative Methods in Morphology* (Ed. E. R. WEIBEL und H. ELIAS; Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1967), p. 190. – S. M. BLINKOV und I. I. GLEZER, *Das Zentralnervensystem in Zahlen und Tabellen* (Fischer, Jena 1968), p. 26. – R. BAUR, *Acta anat.* 66, 631 (1967).

² R. BAUR, *Experientia* 25, im Druck (1969).

³ Arbeit mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Electron Microscopy of Formation of Statoconia

From the material for a mainly light microscopic and microradiographic study concerning the formation of statoconia in utricle and saccule in the embryonic mouse labyrinth, the result of which will be published elsewhere¹, some 15 days old embryos were fixed for electron microscopic investigation. The 15th day after conception is crucial in the development of statoconia, in that it is the first period in which crystalline calcium

salts bound to light microscopically discernible separate elements can be found in the statoconial membranes^{1,2}. Although it is well established now that the 'hearing

¹ V. B. VEENHOF, *Verh. K. Akad. Wet.* II, 58, 4 (1969).

² M. F. LYON, *J. Embryol. exp. Morph.* 3, 213 (1955).

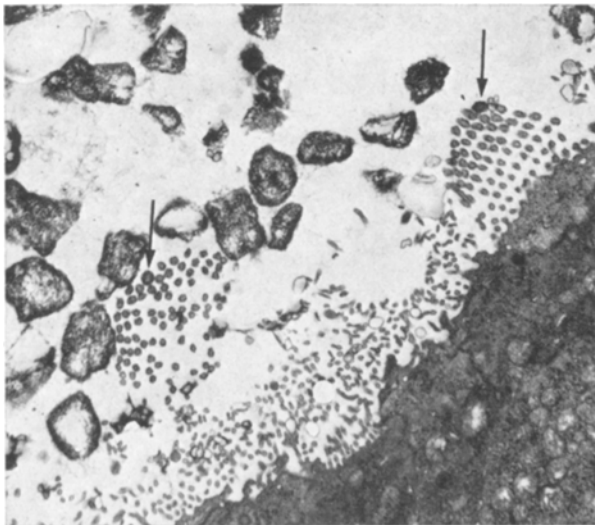


Fig. 1. Electron micrograph of the apical border region of the utricular macula from a 15-day-old mouse embryo. Tufts of stereocilia with a single kinocilium (arrows) mark the sensory cells. $\times 7000$.

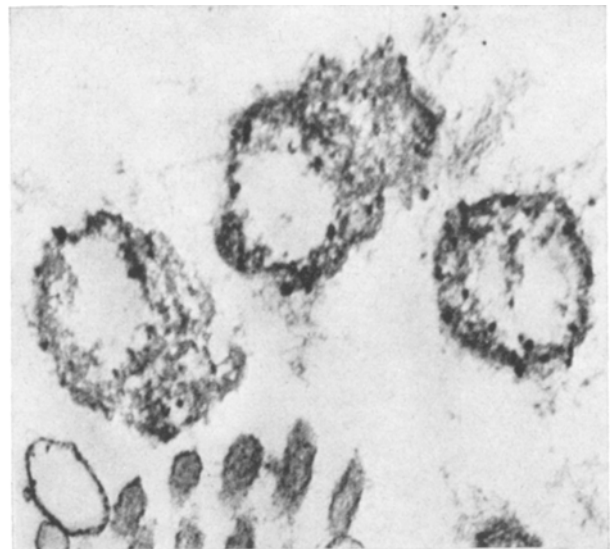


Fig. 2. Higher magnification ($\times 40,000$) of 3 primitive statoconia in a similar specimen; the dark spots seen throughout these masses represent the presumptive calcite nucleation centres.

stones' in mammals are composed mainly of calcite^{3,4}, controversies exist about the way in which these minute elements are formed^{2,5,6}.

Immediately after decapitation, the skulls of 15-day-old embryos of RQ hybrid brown mice were cut into 2 halves and the brains were taken out. After fixation in 4% glutaraldehyde in a 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, followed by 1% osmium tetroxide in a 0.1M phosphate buffer, pH 7.2, the skull fragments were dehydrated and embedded in epon. During embedding, the orientation of the petrosal bone was made with a fine needle in such a way that the knife of the ultramicrotome would cut through the temporal bone in a transversal plane with regard to the skull base and with a forward inclination of 30°. This way of sectioning ensures a good over-all view of the labyrinth (necessary for the difficult orientation in the primitive inner ear), in which utriculus and sacculus appear beneath each other in the same section⁷. After having followed the topography of the labyrinth with the light microscope in 1 μ thick serial sections in an occipito-rostral direction, cutting of ultrathin sections was started at the presumptive region of the utricular macula.

The apical region of the macula appeared to show already the well-known^{8,10} characteristics of the adult macula, i.e. a tuft of closely packed stereocilia over the sensory cells with a single kinocilium (Figure 1, arrows). The thinner cellular protrusions could stem from the supporting cells, or sensory cells in a more primitive stage. Over the macular epithelium rounded or more irregularly shaped condensations were found, with a diameter of between 0.5 and 2.5 μ . In these masses, which have a rather loose, irregular electron density and often an 'empty' centre, a varying number of very dense granules are found (Figure 2). These granules, which have a diameter of between 20 and 60 nm, are irregularly dispersed through the masses; they can be found in numbers up to 30 in each of these corpuscles.

In view of light microscopic correlates, it seems that these dark granules can only represent the first nucleation centres of calcite into corpuscles composed of some organic matrix, the empty centre of which might represent an artefact. We have been unable to find published reports concerning these primitive statoconia in mammals.

In the water-snail *Limnea stagnalis*¹¹, the (entirely intracellular) new formation of otoconia in the primitive otocyst starts with masses which show a striking similarity with the corpuscles over the maculae of the 15-day-old mouse labyrinth. Although this should be confirmed by the study of earlier phases of development, it seems very probable that these loosely woven masses are a cellular product. The dense granules could then have been precipitated into this organic matrix from the endolymph, pointing to a biphasic genesis of the statoconia in mammals.

Zusammenfassung. Erstmaliger Nachweis der Kristallisationszentren in den Statolithen des Innenohrs 15 Tage alter Mäuseembryonen. Die primären Statokonien sind aus lockerer Grundsubstanz aufgebaut mit elektronendichten Körnchen von 20–60 Å, die als erste Kalzitpräzipitate aufgefasst werden.

J. JAMES, J. P. M. SCHELLENS
and V. B. VEENHOF

*Histological Laboratory,
University of Amsterdam, 1e Const. Huygensstraat 20,
Amsterdam (The Netherlands), 9 June 1969.*

³ D. CARLSTRÖM, H. ENGSTRÖM and S. HJÖRT, *Laryngoscope* 63, 1052 (1953).

⁴ J. PARSONS and R. R. CARDELL, *Trans. Am. microsc. Soc.* 84, 415 (1965).

⁵ W. KOLMER, in *Handbuch der mikroskopische Anatomie des Menschen* (Ed. W. von Möllendorf; Springer, Berlin 1927), vol. III/I, p. 250.

⁶ L. F. BÉLANGER, in *Calcification in Biological Tissues* (Symposium AAAS; Ed. R. F. SOGNAES, AAAS Washington 1960), p. 161.

⁷ J. JAMES, *Practica oto-rhino-lar.* 24, 348 (1962).

⁸ J. WERSÄLL, *Acta oto-lar., Suppl.* 126, 1 (1956).

⁹ H. ENGSTRÖM and J. WERSÄLL, *Expl. Cell Res. Suppl.* 5, 460 (1958).

¹⁰ J. WERSÄLL and A. FLOCK, *Acta oto-lar. Suppl.* 192, 85 (1964).

¹¹ J. J. GEUZE, *J. Zool.* 78, 155 (1968).