

## **Teil I**

### **Histologie**



# 1

## Praxis- und Laborwissen Histologie

### 1.1 Aufgaben

Ein Bereich, an dem medizinisch-technische Assistenten eingesetzt werden, ist das histologische Labor. Die dortigen Mitarbeiter nennen es gerne auch kurz und knapp „Histo“. Ob in einem privatwirtschaftlichen oder im Kliniklabor mit angrenzender Pathologie, es gibt eine Vielzahl von Herausforderungen, die man im Arbeitsalltag zu bewältigen hat.

Die Hauptaufgaben für medizinisch-technische Assistenten im histologischen Labor sind u.a.:

- Gewebe aufarbeiten
- Gewebe schneiden
- Gewebeschnitte färben

Grundsätzlich durchläuft ein Gewebestück von der Entnahme bis hin zum gefärbten Schnitt in der „Routine“ immer eine bestimmte Abfolge von Vorgängen:

- 
- Entnahme und Zuschnitt des Gewebes
  - Fixierung des Gewebes (Stoppen der autolytischen Vorgänge)
  - Einbettung
  - Schneiden
  - Färben und Eindecken zum Dauerpräparat
  - Mikroskopieren
- 

### 1.2 Gewebearten

Folgende Gewebearten werden in der Histologie typischerweise verarbeitet:

- Biopsie-Gewebe

Das häufigste Gewebe ist sog. Biopsie-Gewebe. Es wurde vom lebenden Organismus entnommen, und wird entsprechend nach dem Organ bzw. der Entnahmetechnik benannt. Meist als Haut- oder Muskelexzision oder typischerweise als Operationsgewebe. Es können auch komplette Organe sein, z.B. bei einer Prostata- oder Appendixresektion.

- Autopsie/Sektionsgewebe

Autopsie/Sektionsgewebe wird im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen, zur Abklärung unklarer Todesursachen oder zur Diagnose- und Therapiebestätigung verarbeitet.

- Tierisches oder sogar pflanzliches Gewebe

Tierisches oder sogar pflanzliches Gewebe ist in der Routine selten zu finden, sondern eher in wissenschaftlichen Laboratorien.

## 1.3 Gewebeverarbeitung

In diesem Abschnitt wird der Weg des Gewebes im Einzelnen beschrieben. Dabei wird alles berücksichtigt, was für den Ablauf wichtig ist oder eventuell zur Herstellung der Gewebeschnitte eingesetzt werden könnte.

### 1.3.1 Entnahme und Zuschnitt

Da die Entnahme und der Zuschnitt von Gewebe fast ausschließlich im ärztlichen Verantwortungsbereich liegen, soll hier nur kurz darauf eingegangen werden. Der Zuschnitt findet in der Pathologie statt. Typisches Gewebe stammt z.B. vom Magen-Darm-Trakt, Brust, Leber oder Prostata. In der Regel ist das Gewebe schon mit Formalin fixiert. Eine Ausnahme stellt hier der Schnellschnitt dar. Aus dem Gewebe werden nach Relevanz unterschiedliche Stücke herausgeschnitten, wobei größere Zuschnitte meist durch Ärzte und kleine Zuschnitte auch durch MTA erfolgen. Das Präparat als auch der Zuschnitt müssen gut beschriftet werden. Mit Bändern oder Farbe wird das Gewebe markiert, so dass der Zuschnitt nach dem Wandaufbau des Organs möglich ist. Nach dem Zuschneiden wird das Gewebe in Einbettkassetten eingebracht. Die Kassetten gibt es in unterschiedlichen Farben und Perforierungen. Kleine Gewebe-Stanzen werden zusätzlich mit Filterpapier gesichert.

### 1.3.2 Fixierung

Um autolytische Vorgänge zu verhindern und um eine möglichst natürliche Zellstruktur zu erhalten, sollte nach der Probeentnahme schnell fixiert werden. Dies erfolgt mit speziellen Fixierlösungen. Damit die optimale Wirkungsdauer der Fixationslösungen eingehalten werden kann, sind kleine Gewebestücke von Vorteil. Große Organe werden lamelliert, Hohlorgane an der Seite aufgeschnitten und aufgeklappt. Wichtig sind die komplette Abdeckung des Gewebes mit der Fixationslösung und die regelmäßige Auswechslung der Fixationslösung, da sie sich verbraucht. Man unterscheidet folgender Fixationsarten:

- Immersionsfixation (Standard)
- Perfusionsfixation
- Infusionsfixation

Die meisten Gewebeproben werden fixiert. Einige Untersuchungen erfordern aber ein natives, also unfixiertes Material. Dazu gehört z.B. die Schnellschnittdiagnostik oder die

Durchführung spezieller immunhistologischer Nachweise. Je nach Vitalzustand der Zellen oder des Gewebes spricht man von:

- Vitaluntersuchung: Untersuchung von Bakterien im „hängenden Tropfen“ oder von Zellen in einer Nährlösung (Zellkultur)
- Supravitaluntersuchung: Untersuchung am gerade entnommenen Gewebe. Erste Zellen sterben bereits ab.
- Postvitaluntersuchung: Zellen bereits abgestorben, aber noch im natürlichen Zustand.

### 1.3.2.1 Fixative

Im Folgenden soll ein Überblick über die verschiedenen Fixationsmittel und -lösungen geschaffen werden, die sich nach ihrem Wirkungsmechanismus einteilen lassen.

#### 1.3.2.1.1 Fixation durch Vernetzung

Hierbei ist vor allem die Vernetzung von Proteinen gemeint. Das Fixationsmittel setzt sich zwischen freie Aminogruppen und bildet Brücken, sogenannte Methylenbrücken. Dabei verbraucht sich das Fixationsmittel.

#### • Formalin/Formol

Formalin ist das gebräuchlichste Fixationsmittel. Formalin ist die wässrige Lösung des Gases Formaldehyd (HCOH) und im Handel als 37 % Stammlösung zu erhalten. Vorteile sind geringe Kosten, einfache Handhabung und geringe Gewebeschrumpfung. Da durch Lichteinwirkung Ameisensäure entstehen kann, werden dunkle Flaschen verwendet, die evtl. einen Bodensatz aus Kalk enthalten. Anwendungskonzentrationen sind 4 % für die Routinefixation und 10 % für die Schnellfixation. Die Gebrauchslösungen werden mit Leitungswasser hergestellt, da die darin enthaltenen Carbonate die evtl. entstandene Ameisensäure binden und neutralisieren. Es ist ein proteinvernetzendes Fixativ und obwohl Formol relativ schnell ins Gewebe eindringt, ist die Protein-Vernetzungs-Reaktion meist erst nach 24 Stunden abgeschlossen.

#### • Glutaraldehyd

Glutaraldehyd ist im Handel als 25 % wässrige Lösung zu erhalten. Es dringt sehr langsam ein, aber die Vernetzung ist dann relativ schnell abgeschlossen. Es ist ein proteinvernetzendes Fixativ mit feinmaschiger Vernetzung und findet daher häufig in der Elektronenmikroskopie Anwendung, meist als Kunststoffeinfbettung in Verbindung mit Osmiumsäure.

#### • Osmiumsäure

Es handelt sich um goldgelbe, wasserlösliche und flüchtige Kristalle, die in kleinen Ampullen geliefert werden. Es ist sehr teuer und stark toxisch. Osmiumsäure fixiert Lipide und Proteine und wird in der Elektronenmikroskopie verwendet.

Merke: Für eine natürliche Zellstruktur muss nach der Probenentnahme schnell fixiert werden, um autolytische Prozesse zu stoppen!

Merke: Formalin ist das gebräuchlichste Fixativ. Es fixiert durch Vernetzung von Proteinen und findet in einer 4 % Gebrauchslösung Anwendung.

#### **1.3.2.1.2 Fixation durch Wasserentzug**

Das Fixationsmittel entzieht dem Gewebe Wasser.

- **Alkohol**

Alkohol ist für Gewebe eher ungeeignet. Grundsätzlich wird das Gewebe rasch spröde und brüchig mit der Folge schlechter Weiterverarbeitung. Es wird bei Ausstrichen verwendet. 96 % Ethanol oder evtl. Methanol sind am gebräuchlichsten.

- **Aceton**

Aceton findet ebenfalls bei Ausstrichen oder Abstrichen den Einsatz oder bei nativen Gefrierschnitten für histochemische Untersuchungen. Am Gewebestück führt es zu starken Schrumpfungen und ist daher nur in Gemischen mit anderen Fixationsmitteln zu verwenden.

#### **1.3.2.1.3 Fixation durch Salzbildung**

Das Fixationsmittel reagiert mit Eiweißmolekülen. Es bilden sich Komplexsalze.

- **Pikrinsäure**

Pikrinsäure wird eigentlich nur in Gemischen verwendet. Es führt zu starker Gewebeschrumpfung und dringt sehr langsam ein. Bei langanhaltender Fixierung nimmt die Anfärbarkeit ab.

- **Sublimat/Quecksilberchlorid**

Sublimat ist sehr giftig. Es wirkt eiweißfällend und verursacht eine starke Schrumpfung des Gewebes, daher wird es eher in Gemischen angewendet. Sublimatniederschlag wird durch Jod-Jodkali-Lösung oder Jod-Ethanol-Lösung entfernt. Anschließend muss die Jodfärbung mittels Natriumthiosulfat entfernt werden.

#### **1.3.2.1.4 Fixation durch Veränderung des Quellungszustandes**

Das Fixationsmittel verändert den Quellungszustand der Eiweißmoleküle. Es kommt zur Ausfällung.

- **Essigsäure**

Essigsäure wird häufig in Gemischen verwendet. Es sorgt für eine gute Fixierung der Nucleoproteine, was sich als gute Anfärbarkeit der Kernstruktur darstellt. 100 % Essigsäure wird Eisessig genannt.

#### **1.3.2.1.5 Weitere Fixationsmethoden**

Es gibt noch eine Reihe weiterer Fixationsmethoden, die hier allerdings nur am Rande erwähnt werden sollten, da sie in der „Routine“ selten durchgeführt werden oder ihre Anwendung sogar fraglich ist:

Fixation durch:

- Trocknen
- Gefrieren (z.B. beim Schnellschnitt)

- Gefriertrocknen (Schockfrieren bei  $-196\text{ °C}$ )
- Gefriersubstitution (Gewebewasser wird durch wasserentziehende tiefgekühlte Substanz ersetzt)
- Mikrowellen

### 1.3.2.2 Fixiergemische

Durch die Kombination verschiedener Fixationsmittel sollen die jeweiligen Nachteile minimiert werden. Da es eine ganz Reihe von Fixiergemischen gibt, werden hier drei bekannteste Gemische genannt.

- Bouin'sches Gemisch

Es zählt zu den häufigsten verwendeten Fixiergemischen und eignet sich besonders für weiches und empfindliches Material, da das Gewebe nur geringfügig schrumpft. Die Fixationsdauer beträgt 2–24 h. Bei längerer Lagerung sollte die eintretende Entkalkung beachtet werden. Wichtige Bestandteile: Pikrinsäure, Formol und Eisessig.

- Alkohol-Formol nach Schaffer

Ist besonders für Knochengewebe geeignet. Die Fixierdauer beträgt 24–48 h. Wichtige Bestandteile: Formol und Ethanol

- Flemming'sche Gemisch

Findet in der Elektronenmikroskopie Anwendung. Die Fixierdauer beträgt 1 bis mehrere Tage und ist für kleine Gewebestücke geeignet, da es sehr langsam eindringt. Wichtige Bestandteile: Chromsäure, Osmiumtetroxydlösung und Eisessig.

### 1.3.3 Einbettung

Im Anschluss an die Gewebefixierung erfolgt der Einbettungsprozess. Dazu wird das Gewebe mit einem Einbettungsmittel getränkt, welches über mehrere Zwischenschritte die Fixierflüssigkeit verdrängt und ersetzt. Erst dann kann das Gewebe in ein Gießförmchen gelegt werden. Durch Abkühlung oder Polymerisation erstarrt das Einbettungsmedium mit dem Gewebe. Es kommt zu einer homogenen Stabilität und Härte, so dass von diesem Gewebblock dünne und gleichmäßige Schnitte hergestellt werden können.

Im nachfolgenden werden kurz die bekanntesten Einbettungsmedien vorgestellt.

- Paraffin

Paraffin ist das wichtigste Einbettungsmittel. Es gehört zu der Gruppe der Alkane. Der Schmelzpunkt liegt zwischen  $45\text{--}60\text{ °C}$ . Bei Raumtemperatur liegt es in fester Form vor. Es ist wasser- und alkoholunlöslich, aber xylollöslich. Folglich muss das Wasser im Gewebe erst einmal durch Xylol ersetzt werden. Dies geschieht in zwei Schritten: 1. Entwässern durch Alkohol. 2. Alkohol entziehen (sog. Entspritzen) und durch ein Intermedium ersetzen z.B. Xylol. Jetzt kann das Intermedium durch das

Merke: In der „Routine“ hat sich die Formalinfixierung mit anschließender Paraffineinbettung durchgesetzt. Man kürzt diesen Vorgang mit „FFPE“ ab (Formalinfixiert und Paraffineingebettet).

heiße und flüssige Paraffinwachs ersetzt werden. Die mit Paraffin durchtränkten Gewebestückchen werden anschließend in sogenannte Gießschälchen mit Paraffin überdeckt. Nach Erkalten des Paraffins ergibt sich so ein Block aus der Gießform, der jetzt geschnitten werden kann. Dieser Vorgang wird Ausblocken genannt. Vorteil: Paraffin ist chemisch inaktiv und besitzt eine homogene Festigkeit bei Raumtemperatur. Nachteil: Die Erwärmung auf den Schmelzpunkt des Paraffins ist für das Gewebe ungünstig.

#### **Exkurs: Xylol**

Xylol gehört zu den Kohlenwasserstoffen. Es steht in Verdacht kanzerogen zu sein. Es ist gut mit Alkohol und Paraffin mischbar und wird deshalb als Intermedium verwendet.

- Celloidin

Celloidin wird aus mit verdünnter Salpetersäure behandelter Zellulose gewonnen. Es erlaubt eine schonendere Einbettung bei Raumtemperatur für empfindlicheres Gewebe, wie Gehirn und Augen. Nachteil sind zeitaufwendigere Einbettung und umständlichere Schneidetechnik als bei Paraffin. Celloidinpräparate sind im trockenen Zustand feuergefährlich und werden in Alkohol aufbewahrt.

- Kunststoff

Kunststoff ist im Gegensatz zu Paraffin ein härteres Einbettungsmedium. Deshalb ist es gut geeignet für Semi- oder Ultradünnschnitte, aber auch für die Verarbeitung von nicht entkalktem Knochengewebe.

- Gelatine

Gelatine wird aus dem Kollagen von Knochen und Schweineschwarten gewonnen. Es ist ein wasserlösliches Einbettungsmedium und eignet sich dadurch für den Nachweis von Stoffen, die durch das oben beschriebene Procedere herausgelöst würden. Die Blöcke sind weich, werden luftgetrocknet und kurz mit Formalin stabilisiert.

### **1.3.4 Schneiden**

Das zentrale Gerät zur Herstellung von mikroskopierfähigen Gewebeschnitten aus dem ausgeblockten Paraffingewebeblock ist das Mikrotom. Es besteht grundsätzlich aus einem stabilen Hauptkörper, einer Präparathalterung und einer Messerhalterung. Je nach Gerätetyp wird nun entweder das Messer auf das Präparat bzw. das Präparat auf das Messer zu bewegt. Dies erfolgt durch einen Vorschubmechanismus, an dem die gewünschte Schnittdicke eingestellt ist. Mit Hilfe des Mikrotoms ist die MTA in der Lage eine Schnittdicke zwischen 0,5 und 100  $\mu\text{m}$  herzustellen für die Beurteilung mit dem Lichtmikroskop und 0,01 bis 0,5  $\mu\text{m}$  für die Beurteilung mit dem Elektronenmikroskop. Die Wahl des Mikrotoms richtet sich nach mehreren Faktoren:

- wie groß ist das Gewebe?
- wie hart ist das Gewebe?
- welches Einbettmedium wurde verwendet?
- welche Schnittdicke soll erreicht werden?

### 1.3.4.1 Mikrotom

Im Nachfolgenden wird ein Überblick über die verschiedenen Mikrotomvarianten gegeben, wobei auf die in der Routine verwendeten Geräte näher eingegangen wird.

#### 1.3.4.1.1 Schlittenmikrotom

Das Schlittenmikrotom ist in der Routine zahlreich vertreten. Hier besteht der stabile Hauptkörper aus einer Gleitbahn über die die Messerhalterung („Schlitten“) gezogen wird. Dabei passiert das Messer die fixierte Präparathalterung und trägt einen dünnen Schnitt des Blocks ab. Die Schneidbewegung ist horizontal. Gut geeignet für härteres Gewebe. Vorteil: Verstellbare Messerwinkel. Typische Schnittdicke: 2–15  $\mu\text{m}$ .

#### 1.3.4.1.2 Rotationsmikrotom

Das Rotationsmikrotom ist ebenfalls ein Gerät, welches in der Routine zu finden ist. Hier ist die Messerhalterung fixiert und das Präparat wird in einer senkrechten Bewegung über das Messer gezogen. Da Messerkante und Gewebeblock parallel zueinander verlaufen sind sog. Serienschnitte möglich, das heißt die einzelnen Schnitte hängen aneinander. Vorteil: Semi-dünnschnitte sind möglich. Typische Schnittdicke: 2–15  $\mu\text{m}$ .

- **Kryostat**

Beim Kryostaten wurde ein Rotationsmikrotom in einer Kühleinheit verbaut. Dadurch ist die Herstellung sog. Gefrierschnitte möglich. Eingesetzt wird der Kryostat in der Schnellschnittdiagnostik oder in der Immunhistochemie beim Verarbeiten von nativem Gewebe. Typische Schnittdicke: 7–15  $\mu\text{m}$ .

- **Ultramikrotom**

Das Ultramikrotom hat verschiedene automatische Funktionen, die ein präziseres Arbeiten ermöglichen. Mit dem Ultramikrotom werden Semi- und Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie hergestellt. Eine Kunststoffeinbettung ist dafür unabdingbar. Typische Schnittdicke: 0,1–1  $\mu\text{m}$ .

#### 1.3.4.1.3 Vibratom

Das Vibratom ist für empfindliches Material geeignet z.B. Hirn oder Nerven. Häufig wird auch natives oder leicht fixiertes Gewebe verwendet oder die Gelatineeinbettung. Der Name stammt von der horizontal schwingenden (vibrierenden) Klinge. Typische Schnittdicke: 30–400  $\mu\text{m}$ .

#### 1.3.4.1.4 Tetrander-Mikrotom

Ein Tetrander-Mikrotom ist ein Schlittenmikrotom in abgeänderte Form. Es ist geeignet für sehr hartes Material und für ganze Organe.

#### **Exkurs: der Schnellschnitt**

Der Schnellschnitt stellt eine besondere Situation dar. Das klassische, oben genannte Verfahren, wie es zur Herstellung eines FFPE-Gewebes angewendet wird, ist hier nicht gültig. Es handelt sich um ein Verfahren, dass statt der Routinediagnostik in 2 Tagen, innerhalb von 30 min zu einem Ergebnis gelangt. Typischerweise liegt folgende Situation vor:

Bei einem Patienten ist ein Knoten in der Schilddrüse festgestellt worden. Während einer OP wird das fremdartige Gewebe entnommen und so schnell, wie möglich in die Pathologie gebracht. Dort soll geklärt werden, ob sich um malignes oder benignes Gewebe handelt und ob die Resektion vollständig ist. Der Patient bleibt währenddessen in Narkose. Bei dem Gewebe handelt es sich um eine native Probe, die nicht fixiert wird. Stattdessen wird das Gewebe gefroren und es werden Gefrierschnitte am Kryostaten abgenommen. Anschließend wird eine Schnelfärbung mit der Übersichtsfärbung H.E. durchgeführt. Nun folgt die mikroskopische Betrachtung und der Befund wird dem Operateur telefonisch mitgeteilt. Eine gesicherte Diagnose wird allerdings erst am nächsten Tag mit Hilfe des FFPE-Gewebes herausgegeben. Dieses Verfahren läuft immer parallel ab und ist methodenbedingt qualitativ hochwertiger als der Schnellschnitt.

#### 1.3.4.2 Mikrotommesser

Eine wichtige Komponente des Mikrotoms gilt es genauer zu betrachten. Es ist das Mikrotommesser. Die restliche Ausstattung kann noch so fortschrittlich sein, aber das Messer bestimmt im Wesentlichen die Qualität der Schnitte.

##### 1.3.4.2.1 Messermaterial

Mikrotommesser gibt es in verschiedenen Variationen. Sie unterscheiden sich in Form und Material. Je nach Probengewebe und Einbettmedium wird das passende Messer ausgewählt. So gibt es:

- Stahlmesser
- Wolframcarbidmesser
- Glasmesser
- Saphirmesser
- Diamantmesser

Im Routinelabor werden häufig Einmalklingen aus Karbonstahl eingesetzt.

##### 1.3.4.2.2 Messerprofil (Abb. 1.1)

Neben der Materialhärte spielt auch das Messerprofil, die Messergeometrie eine Rolle. Der Messerkörper ist dreiseitig. Am Messerrücken ist der Messertyp eingraviert. Die Messerobenseite und die -unterseite werden durch die scharfzulaufende Schneide/Facette begrenzt. Je nach Schliffart unterscheidet man folgende Profile:

- **A:** stark plankonkaver Schliff; für Celloidinschnitte; ungeeignet für hartes Gewebe
- **B:** plankonkav; für Celloidinschnitte und weiches Paraffin
- **C:** biplan; keilförmig; Klinge härter als beim A- und B-Profil; für Paraffineinbettung, Gefrierschnitte, weicher Kunststoff; gebräuchlichstes Messer
- **D:** biplan, hobelförmig mit Facette; hat die geringste Schärfe, sehr stabil; für hartes Material im Paraffin, Kunststoff; Einmalklingen liegen in ihrem Profil zwischen C und D.

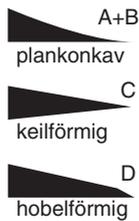


Abb. 1.1 Messerprofile. (Salino01 / Wikimedia Commons / CC BY 3.0).

#### 1.3.4.2.3 Messerwinkel

Neben der Grundform hat jedes Messer eine Schneide. Sie wird hergestellt, indem man eine Facette beiderseits an die Klinge schleift. Dadurch ergeben sich am Klingenschnitt genormten Winkelbezeichnungen (Abb. 1.2). Für die Qualität der Schnitte ist es wichtig, die Winkel Inklination und Deklination richtig einzusetzen.

##### • Inklination

Inklination wird auch Neigungswinkel Gamma genannt. Er entspricht der Neigung der Messerachse zur Blockoberfläche und bestimmt den Freiwinkel Alpha zwischen Facette und Blockoberfläche. Die Messer sind so geschliffen, dass ein Freiwinkel von  $0^\circ$  einem Neigungswinkel von  $10^\circ$  entspricht. Der optimale Freiwinkel liegt zwischen  $0-5^\circ$ , bedeutet einen Neigungswinkel zwischen  $10-15^\circ$ . Er wird am Messerhalter eingestellt.

---

Beachte: Bei einer Inklination von kleiner  $10^\circ$  ist der Freiwinkel negativ. Der Facettenboden würde das Gewebe vor sich herschieben. Bei einer Inklination von größer  $15^\circ$  hingegen ist der Freiwinkel größer  $5^\circ$ . Der Winkel ist sehr steil und das Messer springt (engl. chattering) (Abb. 1.2).

Der optimale Neigungswinkel von  $10-15^\circ$  wird am Messerhalter eingestellt.

---

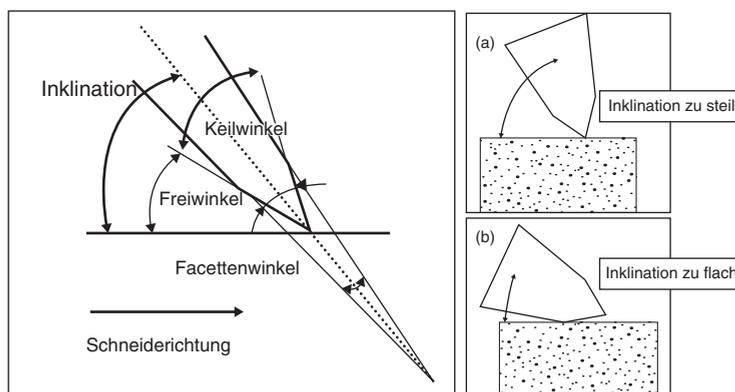
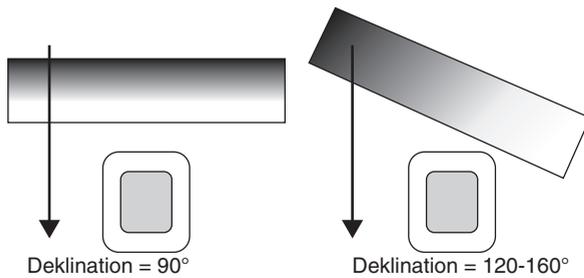


Abb. 1.2 Messerwinkel und Auswirkung der Inklination. Links: Darstellung der verschiedenen Messerwinkel. Rechts oben (a): Die Inklination ist zu steil, das Messer springt (chattering). Rechts unten (b): Die Inklination ist zu flach, das Messer schiebt. (Gudrun Lang, 2013 / mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature).



**Abb. 1.3 Deklination**, links: Schnittwinkel  $90^\circ$  für Serienschritte; rechts: Schnittwinkel  $120\text{--}160^\circ$  für härteres Material. (Gudrun Lang, 2013 / mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature).

### • Deklination

Deklination wird auch Schnittwinkel genannt. Er liegt zwischen Messerschneide und der Schnittrichtung. Ein quergestelltes Messer entspricht  $90^\circ$  (Abb. 1.3). Damit wären Serienschritte möglich. Härteres Material wird eher bei  $120\text{--}160^\circ$  geschnitten.

#### 1.3.4.3 Fehler beim Schneiden

Das Arbeiten am Mikrotom ist nicht einfach. Besonders Anfänger neigen zum Verzweifeln, wenn sie ihre routinierten Kollegen im rasenden Tempo hauchdünne Schnitte schneiden sehen. Als erstes sollte man an der Schnitttechnik arbeiten, so dass sich ein sicherer Umgang mit dem Mikrotom einstellt. Dann kann man die Schnittdicke reduzieren, um letztendlich die Geschwindigkeit zu erhöhen.

Wenn ein Schnitt partout nicht gelingen will, dann gibt es häufig Hinweise auf die Fehlerursache. Ein Blick auf die folgende Tabelle kann den Start in den Schneidealltag erleichtern.

### 1.3.5 Färben

Nach der Fixierung, der Einbettung und dem Schneiden des Gewebes liegen nun Objektträger vor, die alle einen ca.  $2\text{--}5\ \mu\text{m}$  hauchdünnen Schnitt tragen. Eine mikroskopische Analyse ist jetzt jedoch noch nicht möglich, da das auf dem Objektträger befindliche Gewebe zu kontrastarm ist. Dieser Kontrast wird mit Hilfe von Farbstoffen eingebracht. Dafür sind verschiedene Vorbehandlungsschritte notwendig, um das Gewebe auf den Farbstoff vorzubereiten.

Im Folgenden werden die Vor- und Nachbehandlungsschritte der fertigen Gewebeschnitte erläutert. Es wird das wichtigste Färbevokabular erklärt, sowie die Prinzipien und die Färbeergebnisse der Basisroutinefärbungen

#### 1.3.5.1 Vorbehandlung für FFPE-Schnitte

Viele Farbstoffe sind in einer wässrigen oder alkoholischen Lösung gelöst. Das Paraffin vom Gewebeschnitt ist, wie bereits oben beschrieben, wasser- und alkoholunlöslich und verhindert damit das Eindringen des Farbstoffs, deshalb muss es entfernt werden. Erst danach kann die Färbung der Schnitte erfolgen.

1. Die Schnitte werden gesammelt und in den Brutschrank gestellt, bei einer Temperatur zwischen  $56^\circ$  und  $60^\circ$ . Das Paraffin wird flüssig und läuft ab.

2. Die Schnitte werden entparaffiniert durch das Intermedium Xylol.
3. Durch eine absteigende Alkoholreihe wird das Xylol entfernt und dem Gewebe wird schonend Wasser hinzugefügt
4. Folgt eine wässrige Färbelösung werden die Schnitte noch in Aqua dest. eingestellt. Folgt eine alkoholische Färbelösung entfällt dieser Schritt.

### 1.3.5.2 Nachbehandlung für FFPE-Schnitte

Ziel ist es, aus dem gefärbten Gewebeschnitt, ein Dauerpräparat herzustellen. Der Schnitt soll gegen äußere Einwirkungen jedweder Art geschützt sein. Dafür wird das Präparat mit einem Eindeckmedium und einem Deckglas luftdicht verschlossen. Bei der Nachbehandlung wird der Gewebeschnitt auf das Eindecken mit einem wasserfreien Eindeckmittel z.B. Entellan vorbereitet. In der Regel werden xylollösliche Eindeckmittel auf einer Kunststoffbasis verwendet. Sie besitzen einen annähernd identischen Brechungsindex wie Glas.

Mögliche Fehler, die beim Schneiden mit dem Mikrotom auftreten können

Fehler	Ursache	Behebung
Das Messer „springt“	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zu hartes Material, z.B. Knochen, Knorpel</li> <li>• Neigungswinkel zu steil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messer oder größeren Schnittwinkel benutzen</li> <li>• Neigungswinkel abflachen</li> </ul>
Der Schnitt wird zerdrückt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zu hohe Zimmertemperatur, Paraffin zu weich</li> <li>• stumpfes Messer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Block kühlen oder Eisspray</li> <li>• Messer weiterschieben oder austauschen</li> </ul>
Nur jeder zweite Schnitt kommt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neigungswinkel zu flach</li> <li>• Messer nicht fest eingespannt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messer steiler stellen</li> <li>• Schrauben nachstellen</li> </ul>
Schnitt spaltet sich	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messerscharte</li> <li>• Kalk</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messer weiterschieben oder austauschen</li> <li>• Entkalken</li> </ul>
Schnitt ist streifig	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schartiges Messer</li> <li>• Paraffinreste kleben unten am Messer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messer weiterschieben oder austauschen</li> <li>• Vorsichtig mit Zellstoff reinigen</li> </ul>
Paraffin bröckelt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paraffin zu langsam gekühlt</li> <li>• Paraffin zu kalt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neu ausgießen</li> <li>• Anhauchen</li> </ul>
Material löst sich vom Paraffin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zu kalte Einbettung</li> <li>• Material alkoholhaltig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neu ausgießen</li> <li>• Zurück bis zum Intermedium z.B. Xylol</li> </ul>
Schnittfläche rissig weiß	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schlecht entwässert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zurück bis zum Alkohol</li> </ul>
Objekt schieb sich zusammen, Schnitt aber nicht	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schlechte Paraffindurchträngung</li> <li>• Schlechte Entwässerung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neu Einbetten</li> <li>• Zurück bis zum Alkohol</li> </ul>
Schmierige, unschneidbare Stellen im Block	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intermedium im Block</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paraffin länger eindringen lassen</li> </ul>

1. Hierfür wird der Gewebeschnitt nach dem Färben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert
2. Danach mit dem Intermedium Xylol behandeln. Es verleiht dem Präparat eine gleichmäßige Lichtbrechung/Aufhellung.

#### 1.3.5.3 Sonderbehandlung Fettfärbung

Sollen Färbeprodukte dargestellt werden, die sich durch die oben genannten Lösungsmittel aus dem Gewebeschnitt herauslösen, wie dies z.B. bei der Darstellung von Gewebefett der Fall ist, so erfolgt ein anderer Ablauf als bei den FFPE Schnitten. Hier sollten unfixierte, oder kurz fixierte Gefrierschnitte verwendet werden. Damit entfallen die Schritte der Vor- und Nachbehandlung. Eingedeckt wird dann z.B. mit der wasserlöslichen Glycerin-Gelatine.

#### 1.3.5.4 Färbekabular

Bevor die einzelnen Färbeprozesse beschrieben werden, müssen einige Begriffe zur Erläuterung vorweggeschickt werden.

- ▶ **Schnittfärbung:** Nach dem Einbetten und Schneiden werden die einzelnen Schnitte gefärbt. (Routine)
- ▶ **Einschlussfärbung:** Der aufgezogene Schnitt wird mit einer Farblösung betropft und mit einem Deckglas bedeckt (Schnellschnitt)
- ▶ **Vitalfärbung:** Farbstoff wird dem lebenden Gewebe injiziert (Forschung)
- ▶ **Progressive Färbung:** Der Schnitt bleibt so lange in der Farblösung bis die optimale Farbintensität erreicht ist.
- ▶ **Regressive Färbung:** Der Schnitt wird in der Farblösung überfärbt. Der Farbüberschuss wird anschließend durch eine Differenzierungsflüssigkeit herausgelöst.
- ▶ **Endpunktfärbung:** Zeit unabhängige Färbung von Teilstrukturen. Auch bei Überschreitung der vorgeschriebenen Färbezeit, kommt es nicht zur Überfärbung
- ▶ **Imprägnation:** Sonderform der Färbung unter Verwendung von Metallsalzen mit Bildung eines Metallniederschlags an den Strukturen.
- ▶ **Succedanfärbung:** mehrere Farbstoffe werden nacheinander angeboten
- ▶ **Simultanfärbung:** Farblösung enthält mehrere Farbstoffe. Sie werden also gleichzeitig angeboten
- ▶ **Direkte Färbung:** Schnitt wird mit einer Farblösung gefärbt, die keine Beize enthält
- ▶ **Indirekte Färbung:** Farbstoff färbt nicht alleine. Erst mit Zusätzen, z.B. durch eine Beizung kann der Farbstoff binden
- ▶ **Einzeitig indirekte Färbung:** Farbstoff und Beize werden gemeinsam angeboten
- ▶ **Zweizeitig indirekte Färbung:** Farbstoff und Beize werden getrennt angeboten
- ▶ **Übersichtfärbung:** verschafft einen Überblick über das Gewebe und besteht aus einer Kern- und Plasmafärbung
- ▶ **Spezialfärbung:** stellt gewünschte Strukturen dar und besteht aus einer Substratfärbung und einer Gegenfärbung
- ▶ **Grob dispers Farbstoff:** Farbstoff mit größeren Farbstoffmolekülen, dringt zuerst in die groben Strukturen ein und verdrängt dort den fein dispers Farbstoff, wenn vorhanden

- **Fein dispers Farbstoff:** Farbstoff mit kleinen Farbstoffmolekülen, dringt schnell in die feinen Strukturen ein

### 1.3.5.5 Färbungen

Jede Färbung kann in verschiedenen Variationen ausgeführt werden. Die Modifikationen richten sich u.a. nach dem Reagenzienhersteller oder nach persönlichen Vorlieben. Jeder Anwender, der häufiger Gewebeschnitte färbt, sollte sich seine eigene Arbeitsanweisung der hier aufgeführten Färbungen erstellen, die seinen diagnostischen Zielsetzungen entspricht. Die hier beschriebenen Durchführungen sind daher als Anreiz zur Auseinandersetzung mit den jeweiligen Färbungen zu verstehen.

#### 1.3.5.5.1 Übersichtsfärbungen

**1.3.5.5.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)** Die H.E.-Färbung hat sich als Übersichtsfärbung durchgesetzt, vor allem in Zusammenhang mit den FFPE-Gewebeproben. Die Durchführung ist relativ einfach und lässt sich gut automatisieren.

*Kernfärbung mit Hämatoxylin* Das Hämatoxylin ist ein natürlicher Pflanzenfarbstoff, der durch Etherextraktion aus Blauholz gewonnen wird. Es ist farblos oder leicht gelblich. Damit das Hämatoxylin seine färbenden Eigenschaften entwickelt, bedarf es mehrere Schritte. Durch Oxidation mit Sauerstoff aus der Luft in einem natürlichen Reifungsprozess entsteht das leicht saure Hämatein. Da dieser Vorgang mehrere Wochen andauert wird er mit chemischen Oxidationsmittel in einer künstlichen Reifung beschleunigt. Hierfür wird z.B. Natriumjodat verwendet. Somit müsste der korrekte Name Hämatein-Färbung heißen, dies hat sich aber nicht durchgesetzt. In einem zweiten Schritt wird das leicht saure Hämatein durch die Zugabe von Kalialaun, einer Beize, umgeladen. Es entsteht ein positiv geladener Farblack, das Hämalaun. Das Hämalaun ist ein Metallionen-Farbstoffkomplex mit Indikatoreigenschaften. Im stark sauren Milieu bei einem pH-Wert kleiner 3 ist es rot und bei höheren pH-Werten ist es typischerweise blau. Die Farblösung enthält des weiteren Zitronensäure für eine leicht sauren pH-Wert und Chloralhydrat als Konservierungsmittel und Stabilisator.

Merke: Weit verbreitet ist die Farblösung Hämalaun nach Mayer. Sie enthält:  
 Hämatoxylin  
 Na-Jodat (Oxidationsmittel)  
 Kalialaun (Beize)  
 Chloralhydrat (Stabilisator)  
 Zitronensäure (senkt den pH-Wert)

Mit dem Hämalaun nach Mayer (einzeitig, indirekter Farbstoff; progressive Färbung) liegt ein basischer Kernfarbstoff vor, der alle basophilen Strukturen färbt, vor allem die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS im Zellkern. Im sauren Milieu erhält man zunächst eine rötliche, instabile Kernfärbung, die durch Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich stabilisiert wird. Dies erfolgt mittels Leitungswasser. Die Färbung wird blau. Deshalb spricht man auch von „Bläuen“. Falls das Leitungswasser nicht alkalisch genug ist, kann auch Natriumhydrogencarbonat als Zusatz verwendet werden.

*Eosin für die Plasma- und Faserfärbung (regressive Färbung)* Häufig wird das Eosin Y (Y steht für yellow) verwendet. Es ist ein roter, synthetischer Farbstoff aus der Gruppe der Xanthenfarbstoffe. Die negativ geladenen Anionen des Farbstoffs binden sich an die positiv geladenen Kationen des Plasmas und der Fasern. Hier werden also alle acidophilen Strukturen gefärbt. Der Zusatz von Eisessig erhöht die Farbkraft.

### **Durchführung der H.E.-Färbung nach Mayer mit ausführlicher Vor- und Nachbehandlung**

#### **Vorbehandlung**

1. Schnitte in den Brutschrank bei 56–60 °C für 20 min
2. Entparaffinieren mit
  - a. Xylol I
  - b. Xylol II je 5 min
3. Xylol entfernen mit
  - a. absoluten Alkohol I
  - b. abs. Alkohol II je 45 sec
4. Schonend Wasser zuführen mit absteigender Alkoholreihe
  - a. 96 % Ethanol
  - b. 96 % Ethanol
  - c. 80 % Ethanol
  - d. 70 % Ethanol je 45 sec
5. Da wässrige Farblösung in Aqua dest. einstellen 1 min

#### **Färbung**

6. Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer 5 min
7. Bläuen mit Leitungswasser 10 min
8. Plasma- und Faserfärbung mit Eosin, angesäuert mit Eisessig 2 min
9. Kurz mit Leitungswasser spülen

#### **Nachbehandlung**

10. Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe
  - a. 70 % Ethanol
  - b. 80 % Ethanol
  - c. 96 % Ethanol
  - d. 96 % Ethanol
  - e. abs Alkohol
  - f. abs Alkohol je 45 sec
11. mit Xylol aufhellen
  - a. Xylol I
  - b. Xylol II je 5 min
12. Eindecken mit Entellan

**Färbeergebnis**

Zellkerne:	blau bis violett
Kalk und Schleim:	blau
Zellplasma- und Fasern:	rosa-rot in verschiedenen Tönungen
Erythrozyten:	leuchtend orange

**1.3.5.5.1.2 Giemsa-Färbung**

Die Färbung wird auch Giemsa-Romanowsky-Färbung genannt. Sie ist auch als Übersichtsfärbung geeignet. Sie bietet eine gute Unterscheidung von Zellen, der hämatopoetischen Reihe, von Chromatinformationen und eignet sich auch zur Darstellung von *Helicobacter pylori*. Die Giemsa-Lösung enthält vier Farbstoffe: Methylenblau, Azurblau, Eosin und Azurrot. Sie gehören zu den basischen Teerfarbstoffen und sind in der Lage mit Eosin ein Salz zu bilden. Je nach pH-Wert werden das Cytoplasma und die Zellkerne entsprechend gefärbt. Für FFPE-Gewebeschnitte hat sich ein pH-Wert um 4 als gut erwiesen. Die Färbung ist regressiv. Die roten Farbstoffe werden durch 1 % Essigsäure und die blauen Farbstoffe durch 96 % Ethanol differenziert. Die Differenzierung wird durch 99 % Isopropanol gestoppt. Es gibt zahlreiche Variationen in der Durchführung.

**Durchführung der Giemsa-Färbung**

1. Vorbehandlung
2. Giemsa-Lösung 10 min
3. Spülen Aqua dest.
4. Differenzieren in 1 % Essigsäure
5. Differenzieren in 96 % Ethanol
6. Stoppen der Differenzierung und Entwässerung mit 99 % Isopropanol
7. Xylol, Eindecken

**Färbeergebnis**

Zellkerne:	blau-violett
basophile Granula:	violett-blau
eosinophile Granula:	rot
neutrophile Granula:	rosa
Plasma der Lymphozyten:	blau
Plasma der Monozyten:	blau
Plasma der Granulozyten:	rötlich
Thrombozyten:	blau mit violetterm Innenkörper
Erythrozyten:	blass-rötlich
Bakterien:	blau
Bindegewebe:	zart-rosa

### 1.3.5.5.2 Bindegewebsfärbungen

**1.3.5.5.2.1 van Gieson-Färbung** Die van Gieson-Färbung ist eine trichrome Bindegewebsfärbung. Hier werden selektiv die kollagenen Fasern dargestellt.

**Kernfärbung** Begonnen wird mit der Kerndarstellung durch das Eisenhämatoxylin nach Weigert. Es entsteht aus einer alkoholischen Hämatoxylinlösung und einer sauren Eisen(III)salz-Lösung. Weigerts's Hämatoxylin ist relativ unempfindlich gegen das Entfärben durch nachfolgende saure Farblösungen. Er ist liegt ein basischer Kernfarbstoff vor, der alle basophilen Strukturen färbt, vor allem die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS im Zellkern

**van Gieson-Gemisch** Die Färbung erfolgt nach dem Prinzip der Dispersität, das heißt nach der Größe der Farbstoffmoleküle. Es werden zwei unterschiedlich disperse Farbstoffe simultan eingesetzt. Die feindisperse Pikrinsäure und das grobdisperse Säurefuchsin. Man macht sich die Geschwindigkeitsdifferenz des Farbstoff Eindringens zu nutze. Die Pikrinsäure dringt schnell in alle Gewebestrukturen ein, das Säurefuchsin diffundiert langsamer und zuerst in die groben Strukturen, wie die kollagenen Fasern. Zu diesem Zeitpunkt muss der Vorgang abgebrochen werden, da sonst auch die Feinstruktur durch das Säurefuchsin gefärbt wird.

#### Durchführung der van Gieson-Färbung

1. Vorbehandlung
2. Eisenhämatoxylin nach Weigert 5 min
3. Mit Leitungswasser „Bläuen“ 10 min
4. Abspülen in Aqua dest.
5. van Gieson-Gemisch 1–3 min
6. kurz in 70 % Alkohol abspülen
7. Nachbehandlung ab 80 % Alkohol

#### Färbeergebnis

Zellkerne:	grau-blau, braun
Erythrozyten	bräunlich-gelb
Zellplasma	gelb
Kollagene Fasern	leuchtend rot

#### Exkurs: Trichromfärbungen

Bei den sogenannten Trichromfärbungen werden mindestens drei unterschiedliche Farbstoffe eingesetzt. Durch die Kombination kann man nicht nur kollagenes Bindegewebe selektiv darstellen, sondern auch Muskelfasern, Erythrozyten und Fibrin.

Begonnen wird meist mit der Kernfärbung. Da viele der nachfolgenden Farblösungen einen pH-Wert im sauren Milieu besitzen, würden sich die Kerne beim Hämalan nach Mayer wieder entfärben. Hier empfiehlt sich die Verwendung des säureresistenten Eisenhämatoxylyns nach Weigert. Anschließend werden Bindegewebe und andere Strukturen, wie z.B. Muskel gefärbt. Durch Differenzierungsschritte wird das Bindegewebe wieder entfärbt und steht für einen neuen Farbstoff zu Verfügung. Der Färbemechanismus ist noch nicht gänzlich geklärt. Häufig ist es eine Kombination aus dem Prinzip der Dispersität und elektrostatischen Farbstoffbindungen. Fixiergemische wie Bouin verstärken die Färbung.

**1.3.5.5.2.2 Elastin-Färbung nach Weigert** Es ist eine Bindegewebsfärbung. Hier werden die elastischen Fasern dargestellt. Die Färbung wird auch Elastika Färbung genannt

Das Resorcinfuchsin entsteht durch Aufkochen von basischen Fuchsin mit Resorcin und Eisenchlorid. Es ist positiv geladen und lagert sich irreversibel an das negativ geladene Elastomucin der elastischen Fasern an. Dabei handelt es sich um eine regressive Färbung. Der Schnitt wird überfärbt und mit der Differenzierungsflüssigkeit 1 % Salzsäurealkohol wird der Farbüberschuss wieder herausgelöst.

Die Kerndarstellung erfolgt mittels Kernechtrot in einer progressiven Färbung. Die färbenden Anteile des sauren Kernfarbstoffs sind Anionen. Sie lagern sich an die positiv geladenen Histone der DNS im Zellkern.

Resorcinfuchsin und Kernechtrot sind einzzeitig indirekte Farbstoffe.

#### Durchführung der Elastin-Färbung nach Weigert

1. Vorbehandlung
2. Schnitte aus dem 80 % Alkohol in Resorcinfuchsin nach Weigert einstellen bei 56 °C 30 min
3. Abspülen in Aqua dest.
4. Differenzieren in HCl-Alkohol
5. Abspülen Aqua dest.
6. Mikroskopische Kontrolle
7. Kernechtrot 5 min
8. Nachbehandlung

#### Färbeergebnis

Zellkerne:	rosa-rot
Zellplasma:	rosa
Kollagene Fasern:	rosa
Elastische Fasern:	braun bis violett

**1.3.5.5.2.3 Kombinierte Elastin – van Gieson Färbung (EvG)** Durch die Kombination der beiden Färbungen erhält man eine Darstellung der kollagenen sowie der elastischen Fasern. Dabei erfolgt die Färbung der elastischen Fasern mittels Resorcinfuchsin, die Kernfärbung durch säurefestes Eisenhämatoxylin und die Gegenfärbung durch das van Gieson-Gemisch.

#### Durchführung der EvG Färbung

1. Vorbehandlung
2. Schnitte aus dem 80 % Alkohol in Resorcinfuchsin nach Weigert einstellen bei 56 °C 30 min
3. Abspülen in Aqua dest.
4. Differenzieren in HCl-Alkohol
5. Abspülen Aqua dest.
6. Mikroskopische Kontrolle
7. Eisenhämatoxylin nach Weigert 5 min
8. Mit Leitungswasser „Bläuen“ 10 min
9. Abspülen in Aqua dest.
10. van Gieson-Gemisch 1–3 min
11. kurz in 70 % Alkohol abspülen
12. Nachbehandlung ab 80 % Alkohol

#### Färbeergebnis

Zellkerne:	braun
Erythrozyten:	gelb-bräunlich
Zytoplasma:	gelb
Kollagen Fasern:	leuchtend rot
Elastische Fasern:	braun bis violett

**1.3.5.5.2.4 Masson-Goldner-Färbung** Hierbei handelt sich um eine trichrome succedane Färbung, die mit der Kerndarstellung durch das säurefeste Eisenhämatoxylin beginnt. In der dann folgenden Goldner I Lösung sind mehrere unterschiedlich disperse Farbstoffe vorhanden. Mit der Goldner II Lösung wird das Bindegewebe entfärbt und gleichzeitig werden die kollagenen Fasern gebeizt. Anschließend werden u.a. die kollagenen Fasern mit Lichtgrün gefärbt.

#### Durchführung der Masson-Goldner-Färbung

1. Vorbehandlung
2. Eisenhämatoxylin nach Weigert 5 min

3. Kurz im HCl-Alkohol differenzieren und Entfernen der grauen Niederschläge
4. Mit Leitungswasser „Bläuen“ 10 min
5. Goldner I Lösung 15 min
6. Goldner II Lösung 5 min
7. Abspülen 1 % Essigsäure
8. Lichtgrün 5 min
9. Abspülen 1 % Essigsäure
10. Nachbehandlung

#### **Färbeergebnis**

Zellkerne:	braun-schwarz
Zytoplasma:	braun-orange bis rot
Erythrozyten:	leuchtend rot
Fibrin:	rot
Muskel:	rot
Schleim:	kräftig grün
Kollagene Fasern:	kräftig grün

**1.3.5.5.2.5 Mallory-Färbung** Die Mallory-Färbung ist eine trichrome Bindegewebsfärbung. Kollagene Fasern lassen sich gut gegenüber Muskelgewebe darstellen. Die Kerndarstellung erfolgt mit Säurefuchsin. Die färbenden Anteile des sauren Farbstoffs sind Anion, die sich an die positiv geladenen Histone der DNS im Zellkern anlagern. Der grob disperse Farbstoff hat außerdem eine Affinität zu elastischen Fasern, die nur getönt, aber nicht selektiv dargestellt werden. Phosphormolybdänsäure fixiert die Kernfärbung und beizt die kollagenen Fasern. Die Mallorylösung enthält Anilinblau, Orange G und Oxalsäure und wirkt nach dem Prinzip der Dispersität.

#### **Durchführung der Mallory-Färbung**

1. Vorbehandlung
2. 0,1 % Säurefuchsin 10 min
3. Spülen Aqua dest.
4. In 2 % Phosphormolybdänsäure fixieren und differenzieren 3 min
5. Spülen Aqua dest.
6. Mallory-Lösung 1:3 mit Aqua dest. verdünnt 5 min
7. Kurz Spülen Aqua dest.
8. Differenzieren in 96 % Alkohol
9. Nachbehandlung hier ab 100 % Alkohol

**Färbeergebnis**

Zellkerne:	blaß rot
Kollagene Fasern:	blau
Retikuläre Fasern:	hellblau getönt (durch die Affinität von Anilinblau)
Elastische Fasern:	rötlich getönt (durch die Affinität von Säurefuchsin)
Muskulatur:	orange
Erythrozyten:	orangerot

**1.3.5.5.2.6 Ladewig-Färbung** Die Ladewig-Färbung ist eine trichrome Färbung zur Darstellung von Fibrin. Der Fibrin-Nachweis könnte z.B. zur Diagnostik einer Lobärpneumonie oder einer fibrinösen Perikarditis eingesetzt werden. Bei der Durchführung sollte ein Fibrin positiver Kontrollschnitt mitgefärbt werden. Die Kerndarstellung erfolgt mit dem säureresistenten Eisenhämatoxylin nach Weigert. Das Spülen in 1 % Säurealkohol entfernt eventuell vorhandenen Niederschlag. Die Ladewig-Lösung enthält Anilinblau, Säurefuchsin und Goldorange. Die Färbung erfolgt nach dem Prinzip der Dispersität und unterschiedlicher Konzentration der Farbstoffe.

**Durchführung Ladewig-Färbung**

1. Vorbehandlung
2. Eisenhämatoxylin nach Weigert 5 min
3. Kurz in HCl-Alkohol differenzieren und entfernen der grauen Niederschläge
4. Mit Leitungswasser „Bläuen“ 10 min
5. 5 % Phosphorwolframsäure 5 min
6. Spülen Aqua dest.
7. Ladewig-Lösung 15 min
8. Spülen in Aqua dest.
9. Differenzieren in 96 % Alkohol
10. Nachbehandlung ab 100 % Alkohol

**Färbeergebnis**

Zellkerne:	schwarz-braun
Bindegewebe:	blau über blauviolett, rotviolett, je nach Beschaffenheit
Muskulatur:	rötlich-gräulich
Schleim:	blau
Fibrin:	leuchtend zinnoberrot
Erythrozyten:	rötlich, gelblich

### 1.3.5.5.3 Kohlenhydrat-Darstellung

**1.3.5.5.3.1 PAS-Reaktion nach McMannus** PAS steht für die Abkürzung aus dem Englischen: Perjodic-Acid-Schiff-Reaction. Sie dient der Färbung von Glykogen und neutraler Mucussubstanzen. Es lassen sich damit gut Basalmembran, Magendrüsenzellen, glykogenreiche Zellen in Leber, Herz- und Skelettmuskulatur, sowie Pilze in der dermatologischen Diagnostik darstellen. Das Prinzip basiert auf einer histochemischen Reaktion.

Perjodsäure oxidiert sogenannte Glykolgruppen bestimmter Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen. Im Anschluss reagieren die Aldehydgruppen mit dem Schiff'schen Reagenz. Welches durch Behandlung von basischem Fuchsin mit schwefliger Säure entsteht. Deshalb wird es auch fuchsin-schweflige Säure genannt. Diese Verbindung ist farblos. Erst durch Reaktion mit dem oben genannten Aldehydgruppen wird das chromophore System des Schiff'schen Reagenz wieder aktiviert. Dies zeigt sich als rot-violette Farbe. Durch Abspülen in Sulfitbädern wird überschüssiges Schiff'sch Reagenz entfernt und falsch positive Ergebnisse verhindert. Zur Kerndarstellung ist das Hämalaun nach Mayer geeignet. Lichtgrün ist zur Gegenfärbung in der Pilzdiagnostik geeignet. Eine selektive Darstellung von Glykogen gelingt nur durch die Verwendung zweier Gewebeschnitte, wobei einer vorweg mit Diastase behandelt wird. Eventuell vorhandenes Glykogen ist dort nicht zu sehen, sondern nur im Kontrollschnitt. Dies nennt man Blockierungsreaktion.

#### Durchführung der PAS-Reaktion

1. Vorbehandlung
2. 0,5 % Perjodsäure 5 min
3. Spülen mit Aqua dest.
4. Schiff-Reagenz 15 min
5. Sulfitwasserbäder I, II, III je 2 min
6. fließend Wässern 10 min
7. Hämalaun nach Mayer 2 min
8. Bläuen mit Leitungswasser 10 min
9. Nachbehandlung

#### Färbeergebnis

Zellkerne:	blau
Zellplasma:	graublau
neurale Mukopolysaccharide:	rot-violett
Kohlenhydrate:	rot-violett
Glykogen:	rot-violett

**1.3.5.5.3.2 Alcianblau-Färbung** Die Färbung ist auch unter dem Namen Astrablau-Färbung bekannt. Es handelt sich um eine histochemische Färbung zur Darstellung von sauren Mukopolysacchariden. Zunächst wird durch eine 2 % Weinsäure ein saurer pH-Wert eingestellt. Durch die Zugabe von 1 % positiv geladener Astrablau-Lösung entsteht eine irreversible Salzbildung zwischen dem basophilen Astrablau und den sauren Mukopolysacchariden. Diese Reaktion stellt sich als blaue Farbe dar. Die anschließende Kerndarstellung erfolgt mit dem sauren Kernechtrot und Aluminiumsulfat als Beize.

#### Durchführung der Alcianblau-Färbung

1. Vorbehandlung
2. 2 % Weinsäure 1–2 min
3. 1 % Astrablau-Lösung 10 min
4. Spülen in Aqua dest.
5. Kernechtrot 5 min
6. Spülen in Aqua dest.
7. Nachbehandlung

#### Färbeergebnis

Zellkerne:	rosarot
Zellplasma:	zart rosa
Saure Mukopolysaccharide:	blau

#### 1.3.5.5.4 Lipid-Darstellung

**1.3.5.5.4.1 Ölrot nach Lillie** Ölrot nach Lillie ist eine Fettfärbung. Es handelt sich um ein physikalisches Färbeprinzip zur Darstellung des sogenannten Neutralfetts. Der Farbstoff Ölrot löst sich im Gewebefett des Präparats besser als im angebotenen Lösungsmittel Isoopropanol. Ölrot diffundiert aus dem Lösungsmittel ins Gewebefett. Die Kerndarstellung erfolgt mit dem basischen Kernfarbstoff Hämaulaun nach Mayer. Zur Darstellung von Gewebefett ist die übliche FFPE Behandlung ungeeignet. Durch die verwendeten Lösungsmittel wird das Gewebefett herausgelöst, deshalb sind hier unfixierte Gefrierschnitte das Medium der Wahl. Eine kurze Fixierung von 1–2 Minuten in 4 % Formol ist möglich. (Der Ablauf der Färbung mit den Farbstoffen Sudan III und Sudan IV sind ähnlich.)

#### Durchführung der Ölrot nach Lillie-Färbung

1. Gefrierschnitte in 4 % Formol 1–2 min
2. Spülen in Aqua dest.
3. 50 % Alkohol 3–5 min
4. Ölrot-Lösung 8–10 min
5. Spülen in Aqua dest.
6. Hämaulaun nach Mayer 2 min

7. Bläuen mit Leitungswasser 10 min
8. Eindecken mit Glycerin-Gelatine

#### **Färbeergebnis**

Kerne:	blau
Neutralfett:	rot
Zellplasma:	zart-blau

### **1.3.6 Mikroskopieren**

Ob man bisher alles richtig gemacht hat, sieht man leider erst jetzt im letzten Schritt: dem Mikroskopieren. Im histologischen Routinelabor wird es eher selten vorkommen, dass eine MTA für die mikroskopische Diagnostik zuständig ist. Dies fällt in den ärztlichen Kompetenzbereich. In histologischen Speziallaboren ist es aber durchaus möglich, dass MTA Gewebeschnitte mikroskopisch beurteilen und eine vorläufige Diagnose erstellen, die anschließend von einem Arzt kontrolliert und bestätigt wird. Da in der MTA-Ausbildung im Fach Histologie eine der Schwerpunkte in der mikroskopischen Schnittbeurteilung liegt, wird hier das Mikroskop in seinen Grundzügen erläutert. Auf den geschichtlichen Hintergrund sowie auf die physikalischen Gesetzmäßigkeiten wird verzichtet und bei Interesse auf weiterführende Literatur verwiesen.

#### **1.3.6.1 Mikroskoptypen**

Die wichtigsten Mikroskoptypen werden hier vorgestellt. Die nachfolgenden Abschnitte beziehen sich dann aber nur auf das klassische Durchlicht-Hellfeldmikroskop.

- Hellfeldmikroskop

Das Objekt wird im Durchlichtverfahren auf hellem Grund sichtbar gemacht. Gut geeignet für kontrastreiche Objekte.

- Dunkelfeldmikroskop

Durch Ablenkung der Lichtstrahlen mithilfe eines speziellen Kondensors gelangen diese nicht mehr ins Objektiv. Ohne Präparat im Strahlengang bleibt das Okularbild dunkel. Erst wenn ein Objekt eingebracht wird, brechen sich die Lichtstrahlen und gelangen ins Objektiv. Das Ergebnis ist dunkler Hintergrund und helle Strukturen. Geeignet für die Sichtbarmachung von kleinen, kontrastarmen Objekten.

- Phasenkontrastmikroskop

Manche Objekte und Substanzen sind in der Lage, das sie durchflutende Licht relativ zu ihrer Umgebung zu verzögern. Diesen Vorgang nennt man Phasenverschiebung. Er tritt z.B. bei ungefärbten Zellen auf, die einen höheren Brechungsindex aufweisen als das sie umgebende Medium. Das gebeugte Licht zusammen mit dem direkten Mikroskopierlicht ergibt ein kontrastreiches Bild, welches sich mit dunkleren Strukturen auf hellerem Untergrund darstellt. Ermöglicht wird die Phasenverschiebung durch eine Ringblende, die auch

Phasenringblende genannt wird und sich in der hinteren Brennebene befindet. Der Phasenkontrast eignet sich besonders für durchsichtige, ungefärbte Präparaten.

- Fluoreszenzmikroskop

Hier macht man sich die Eigenschaften bestimmter Substanzen, den Fluorochromen, zu nutzen. Sie sind in der Lage bei Bestrahlung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge ebenfalls Licht auszusenden. Ursache dafür sind die Elektronen der Fluorochrome. Sie werden durch Licht aus ihrem Grundzustand in einen Anregungszustand gehoben werden. Beim Zurückkehren in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als langwelligeres Licht abgegeben. Wichtig ist, dass das Anregungslicht eine definierte Wellenlänge haben muss, welche für die verschiedenen Fluorochrome unterschiedlich ist.

Als Lichtquelle wird in der Regel eine Hochdruckmetall dampflampe verwendet. Mehrere Filtersysteme sorgen für die verschiedenen Anregungswellenlängen der Fluorochrome und für die anschließende Trennung von Anregungs- und Aussendungslicht.

- Elektronenmikroskop

Beim Elektronenmikroskop wird anstelle des Lichts, die unterschiedliche Elektronendichte zur Darstellung der Präparate verwendet. Dafür wird ein Elektronenstrahl erzeugt, gebündelt und an Hochspannung gelegt und über ein Präparat im Vakuum gelenkt. Man unterscheidet zwischen den beiden Grundtypen: Transmissions- und Rasterelektronenmikroskop. Bei dem TEM erhält man ein Durchlichtelektronenbild, das REM erzeugt hingegen ein räumliches Bild.

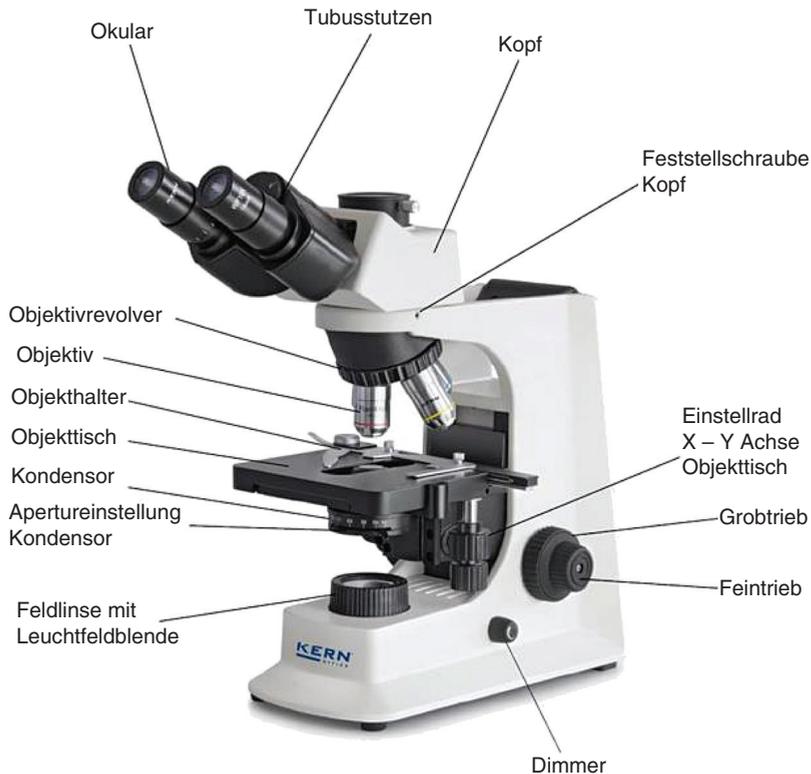
**Exkurs: Einsatz der Elektronenmikroskopie**

Zur Diagnostik von Viren wird in manchen Speziallabors das Elektronenmikroskop verwendet. Dafür werden sie mit Methoden wie Ultrazentrifugation oder Immunaggregation angereichert.

### 1.3.6.2 Aufbau Lichtmikroskop

Das klassische aufrechte Mikroskop für die Durchlicht-Hellfeldmikroskopie besteht aus folgenden wichtigen Komponenten (Aufzählung nach dem Weg des Lichts) (Abb. 1.4):

- ▶ **Standfuß mit eingebauter Lichtquelle:** Meist handelt es sich um Halogen- oder LED-Licht, das durch einsetzbare Filter, z.B. Neutralgraufilter, beeinflusst werden kann
- ▶ **Leuchtfeldblende:** Sie vermeidet Streulicht, welches den Kontrast mindern würde. Sie ist ein wichtiger Teil zur Einstellung der köhlerschen Beleuchtung
- ▶ **Kondensor mit Kondensorblende:** Der Kondensor ist in der Höhe verstellbar und lässt sich über Schrauben zentrieren. Er enthält die Kondensorblende, die auch Aperturblende genannt wird. Hiermit wird der auflösungsbegrenzende Beleuchtungswinkel festgelegt. Ist sie geöffnet, steigt die Auflösung und der Kontrast nimmt ab. Bei gefärbten Präparaten sollte sie zu 2/3 geöffnet sein. Bei ungefärbten Präparaten hingegen fast geschlossen. Zusammen mit der Leuchtfeldblende wird das Mikroskop korrekt eingestellt.

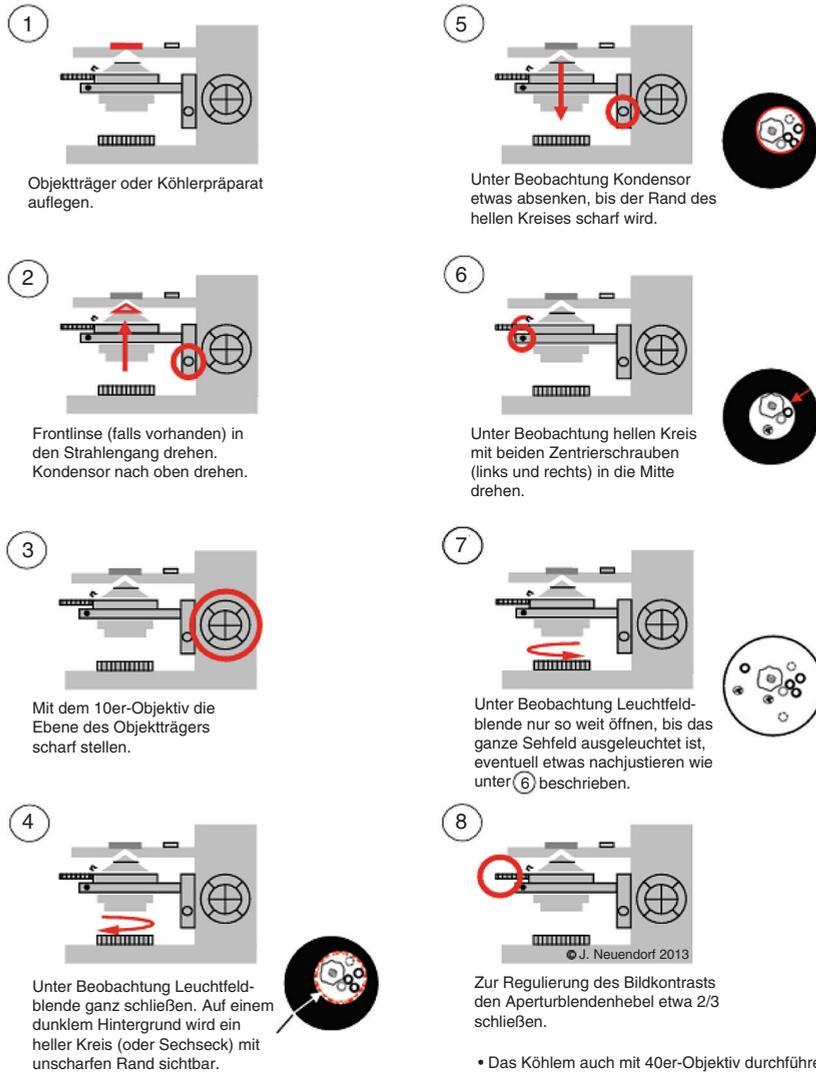


**Abb. 1.4 Aufbau Lichtmikroskop** (Mit Genehmigung der Kern & Sohn GmbH, Balingen; Durchlicht-Labormikroskop OBF-1, OBL-1).

- ▶ **Objekttisch:** Hier wird das Präparat eingespannt. Er ermöglicht das präzise Verschieben des Objektträgers und wird auch Kreuztisch genannt.
- ▶ **Objektivrevolver mit Objektiven:** Am Objektivrevolver können mehrere Objektive eingespannt sein.
- ▶ **Beobachtungstubus:** Hier werden die Okulare eingelassen. Eventuell ist ein Ausgang für einen Kameraadapter vorhanden.
- ▶ **Okular (lat. oculus = Auge):** Hier befindet sich die Sehfeldblende. Sie ist nicht sichtbar und feststehend und bestimmt die Größe des überschaubaren Blickfeldes.
- ▶ **Stativ:** Der Korpus des Mikroskops wird auch Mikroskopstativ genannt. Hier befinden sich noch Einstellungsmöglichkeiten für das Licht und für die Fokussierung, der Grob- und Feintrieb.

### 1.3.6.3 richtiges Einstellen des Lichtmikroskops – das Köhlern

Wenn man vom „Köhlern“ spricht, ist damit eine Abfolge von Mikroskop Einstellungen nach Professor August Köhler gemeint. Dieser veröffentlichte 1893 eine Anleitung mit deren Hilfe die bestmögliche Lichtführung und Auflösung erreicht wird. Auch heute noch empfiehlt es sich vor dem Start der Arbeit, das Lichtmikroskop zu justieren (Abb. 1.5). Alles, was man dafür benötigt, um die Einstellungen vornehmen zu können, ist ein gefärbtes



**Abb. 1.5 Einstellen der Beleuchtung nach Köhler** (Neuendorf, 2015 / mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature).

Präparat. Wichtig: das Präparat sollte dieselbe Dicke vorweisen, wie die anschließend zu mikroskopierenden Präparate.

#### 1.3.6.4 Gravuren am Okular

Gravuren am Okular: z.B.: 10(x) / 18 Brillensymbol periplan

- ▶ **10(x)**: ist der Vergrößerungsfaktor des Okulars
- ▶ **18**: ist die Sehfeldzahl. Sie gibt den Durchmesser der Sehfeldblende im Okular in mm an.

- ▶ **Sehfeldzahl:** Vergrößerungsfaktor des Objektivs = Sehfeldgröße in mm (überschaubares Blickfeld)

Beispiel: Sehfeldzahl 18 (Okular), Vergrößerungsfaktor  $100 \times$  (Objektiv)

$$18: 100 = 0,18 \text{ mm} = 180 \mu\text{m}$$

Mit Hilfe dieser Rechnung kann man die Größe von Objekten bestimmen mit mittlerer Genauigkeit.

- ▶ **Brillensymbol:** auch für Brillenträger geeignet
- ▶ **Periplan:** beschreibt die Linsenbeschaffenheit

Merke: Je höher der Vergrößerungsfaktor des Objektivs, je kleiner das Blickfeld.

#### 1.3.6.5 Gravuren am Objektiv

Gravuren am Objektiv: z.B.: 160/0,17 40/0,65 oel

- ▶ **160:** Gibt die Entfernung in mm zwischen der Aufsatzstelle des Okulars bis zur Aufschraubstelle des Objektivs an. Das Linsensystem ist auf diese Länge ausgerichtet.
- ▶ **0,17:** beschreibt die optimale Deckglasdicke für eine optimale Bildqualität
- ▶ **40:** Massstabszahl oder Vergrößerungsfaktor des Objektivs
- ▶ **0,65:** numerische Apertur NA
- ▶ **Oel:** benötigen einen Tropfen Immersionsöl zwischen Objektträger und Objektiv. Dies verringert die Lichtstreuung.

Die Objektive werden nach unterschiedlichen Korrektur-Güteklassen eingeteilt. Sogenannte Achromaten besitzen die einfachste Korrektur von chromatischen Aberrationen für zwei Wellenlängen des Lichts. Achromatische Linsensysteme korrigieren 3 Wellenlängen des Lichts. Und bei einer Linse mit der zusätzlichen Bezeichnung „Plan“, wird die Bildfeldwölbung korrigiert. Diese Objektive bezeichnet man als Planachromaten oder Planapochromaten.

#### 1.3.6.6 Gesamtvergrößerung und numerische Apertur

Das klassische Mikroskop vergrößert in zwei Schritten: Die erste Stufe erfolgt durch das Objektiv. Es erzeugt ein vergrößertes, seitenverkehrtes und reelles Zwischenbild im Tubus. Die zweite Stufe ist das Okular. Es vergrößert wie eine Lupe das Zwischenbild. Dadurch entsteht ein virtuelles Endbild. Man betrachtet also durch das Okular das Zwischenbild im Tubus.

Doch die Vergrößerung alleine reicht nicht aus. Die sogenannte Auflösung bestimmt, was sichtbar wird. Das Auflösungsvermögen des menschlichen Auges liegt bei ca. 0,3 mm. Das heißt, es ist in der Lage zwei Punkte als solche zu erkennen, wenn der Abstand zwischen ihnen nicht weniger als 0,3 mm beträgt. Mit Hilfe des Lichtmikroskops erhöht man die Auflösung auf ca. 0,2  $\mu\text{m}$ . Das Elektronenmikroskop ist sogar in der Lage eine Auflösung von ca. 0,15 nm zu erreichen.

Das Objektiv fängt das informationstragende Licht auf. Je größer der Öffnungswinkel des Objektivs ist, je besser wird das Licht aufgefangen. Für einen Vergleich zwischen den

Objektiven gibt es die numerische Apertur (NA). Die NA ist also ein Maß für das Auflösungsvermögen.

Die Gesamtvergrößerung ergibt sich aus der Objektivvergrößerung  $\times$  Okularvergrößerung. Doch welche Vergrößerung ist sinnvoll? Die Wahl des Okulars richtet sich nach der NA des Objektivs. Die Gesamtvergrößerung sollte das 500–1000 $\times$  der NA nicht unter- bzw. überschreiten. Dieser Bereich wird sinnvolle oder auch förderliche Gesamtvergrößerung genannt.

Beispiel:

**Es steht folgendes Objektiv zur Verfügung: 100/1,25**

Jetzt errechnet man die förderliche Gesamtvergrößerung.

$$500 \times 1,25 = 625$$

$$1000 \times 1,25 = 1250$$

Die förderliche Gesamtvergrößerung liegt also zwischen 625 und 1250.

**Folgende Okulare stehen zur Verfügung: 6x, 10x, 16x Vergrößerung**

- $6 \times 100 = 600$  Gesamtvergrößerung. Hier wird die förderliche Gesamtvergrößerung unterschritten. Die Auflösung des Objektivs wird nicht vollausgenutzt.
- $10 \times 100 = 1000$  Gesamtvergrößerung. Die Gesamtvergrößerung ist im förderlichen Bereich.
- $16 \times 100 = 1600$  Gesamtvergrößerung. Hier wird die förderliche Gesamtvergrößerung überschritten. Dies wird als „leere“ Vergrößerung bezeichnet.

### 1.3.7 Beurteilung

In der Beurteilung wird der mikroskopierfähige Gewebeschnitt einer kritischen Betrachtung unterzogen. Es wird geprüft, ob die Qualität für eine Beurteilung oder Diagnosestellung ausreicht.

1. Überprüfung der ID-Nummer, sind Organ und Färbung, wie angefordert?
2. Schnittbeurteilung:
  - a. Sind Falten, Scharten oder Risse vorhanden?
  - b. Wie ist die Schnittdicke, wie viele Kernlagen?
  - c. Liegt der Schnitt plan auf?
3. Färbebeurteilung
  - a. Soll-Färbeergebnis mit dem Ist-Färbeergebnis vergleichen
  - b. Farbniederschläge
4. Eindeckung
  - a. Deckglasdicke
  - b. Verunreinigungen
  - c. Luftblasen
5. Gesamtbeurteilung

Wichtig für die Beurteilung im Allgemeinen ist die Unterscheidung bei Mängeln zwischen Äquivalentbild und Artefakt.

- **Äquivalentbild:** Das Äquivalentbild ist eine nicht naturgetreue Veränderung einer Struktur im Präparat. Diese Veränderung ist aber typisch für diese Struktur und lässt sich reproduzieren. Dies unterscheidet sie zum Artefakt.
- **Artefakt:** Artefakte sind im eigentlichen Sinne nicht reproduzierbar. Sie entstehen durch Fehler oder technische Mängel. Typische Artefakte sind: Farbkristalle, Farbniederschläge, Falten, Risse und unterschiedliche Schnittdicke.

