

Histologische Technik (Teil 1)

Das Ziel dieser Arbeit ist, zu zeigen, dass es mit relativ einfachen Mitteln möglich ist, tierisches Gewebe zu präparieren. Alle Daten, wie z.B. Laufzeiten, stammen zum Teil aus histologischen Büchern (Romeis), zum Teil wurden sie empirisch ermittelt. Hierbei werden Zeiten angegeben, die für beste Ergebnisse vorteilhaft sind, man kann die stark von der Objektgröße abhängigen Schritte jedoch auch abkürzen.

Dieser 1. Teil umfasst die Schritte von der Gewebeentnahme bis zur Einbettung in Paraffin.

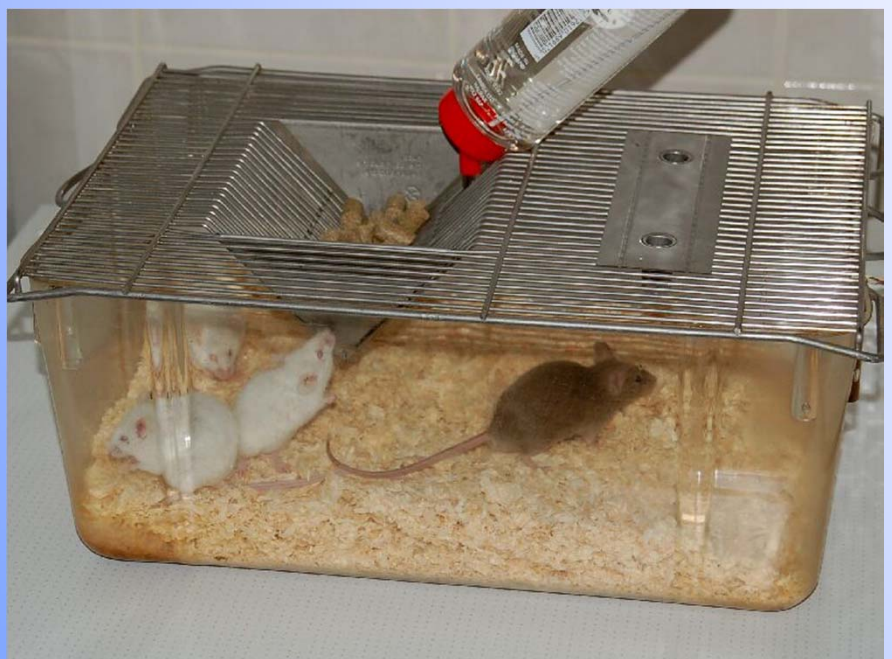
Histologie

Was ist Histologie? Histologie im eigentlichen Sinne des Wortes bedeutet: die Wissenschaft von den biologischen Geweben. Um mit einem Lichtmikroskop tierisches Geweben wie Lunge, Herz oder Niere auf zellulärer Ebene studieren zu können, ist es notwendig, sie zuerst zu fixieren (Einstellung der chemischen Prozesse), sie dann in sehr dünne Scheiben zu schneiden, sie auf einer festen Oberfläche zu befestigen, danach zu färben und schließlich in Kunstharz einzubetten. Die ganze Aufarbeitung wird histologische Technik genannt. Dieser gesamte Prozess wird immer nach einem festen Muster abgearbeitet.

1. Entnahme von Gewebe
2. Fixieren
3. Entwässerung (Dehydration)
4. Einbetten in Paraffin
5. Gewebe schneiden mit ein Mikrotom
6. Schnitte auf einen Objektträger aufziehen
7. Zurück in Wasser bringen (Hydrieren)
8. Färben
9. Präparat haltbar machen.

1. Entnahme von Gewebe

Das Gewebe sollte vor allem frisch sein. Nach ca. 1 Stunde beginnt die Autolyse (Gewebszersetzung) einzusetzen, mit der das Material für histologische Zwecke zunehmend weniger brauchbar wird. Geeignetes Gewebe kann man z.B. gewinnen durch: frisch gefangene Fische, Besuch eines Schlachthofs oder z.B. indem man selbst Mäuse züchtet.

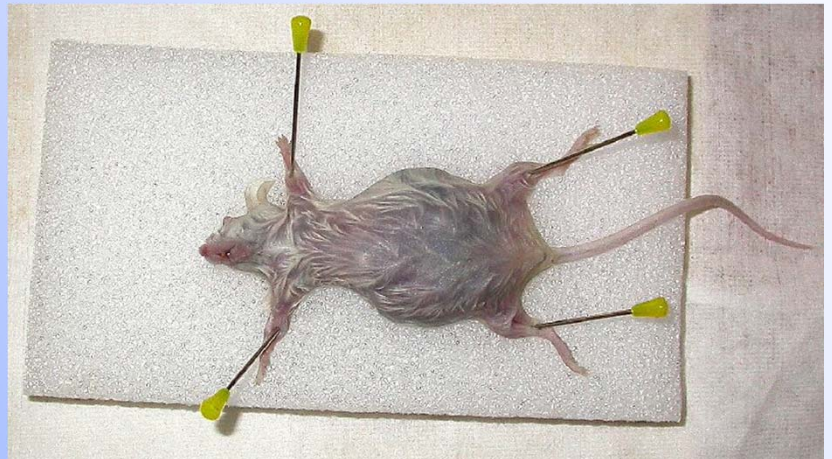


Um z.B. eine Maus gut zu präparieren, sollte der Arbeitstisch mit verschiedenen Instrumenten gut vorbereitet werden.

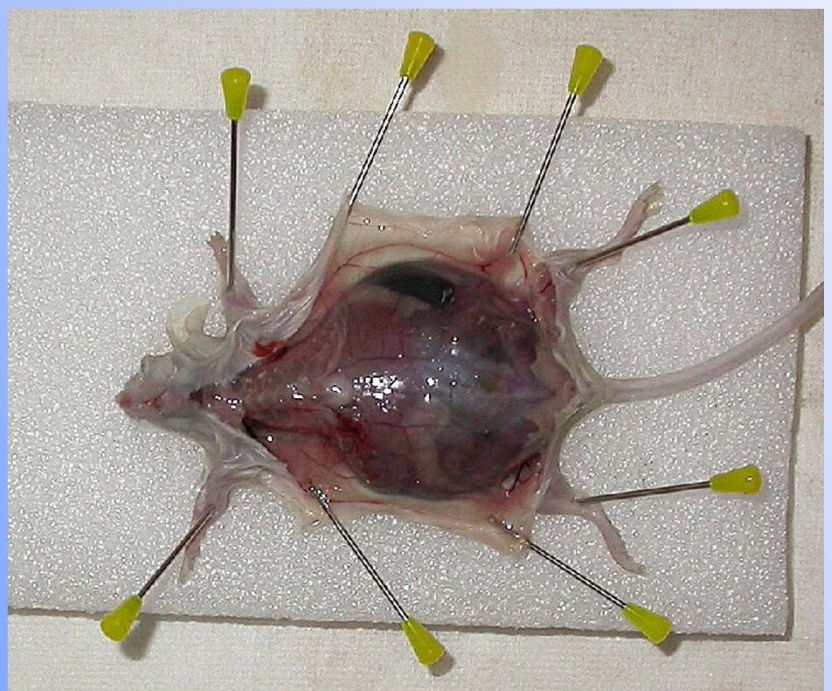


Die Tötung der Maus geht einfach und rasch mit einem in Ether getränkten Wattebausch in einem geschlossenen Behälter.

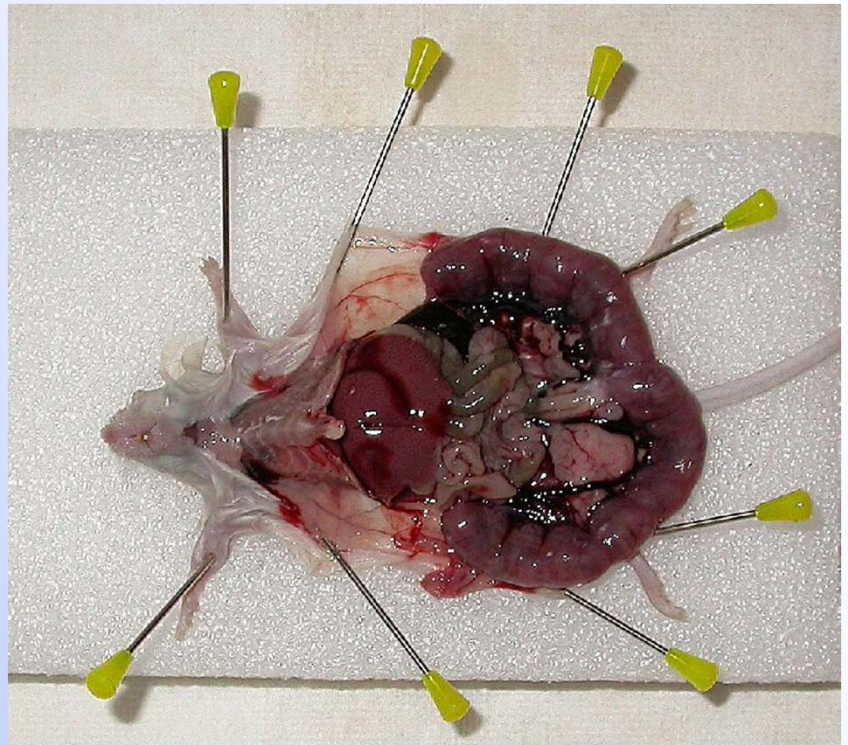
Die getötete Maus wird kurz in 50% Ethanol eingetaucht. Ethanol macht die Maus steril und vermeidet, dass während der Eröffnung des Abdomens Haare verschleppt werden. Die Maus wird mit Nadeln ordentlich aufgespannt.



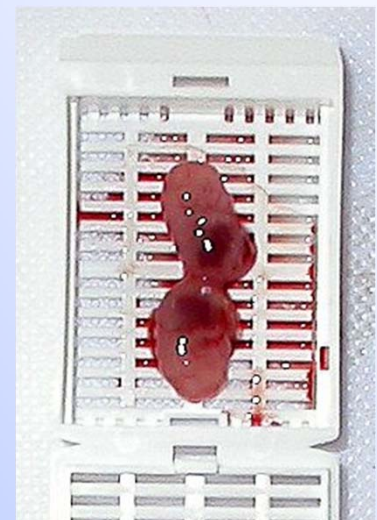
Die Haut vorsichtig öffnen und mit Nadeln sichern. Das nun isolierte Gewebe würde schnell austrocknen, was immer vermieden werden sollte. Das Gewebe ab und an mit einer 0,9%igen Kochsalzlösung (9 Gramm Salz werden in 1 Liter Wasser gelöst) zu benetzen, verhindert dies. Diese Lösung hat den gleichen osmotischen Druck wie das Gewebe, und damit schrumpft oder schwillt es nicht.



Nun können die Organe oder das Gewebe entfernt werden. Die genauere Anatomie kann man auf diesem Link finden: <http://reni.item.fraunhofer.de/reni/trimming/index.php>



Sobald die Organe entnommen sind, sollten sie so bald wie möglich in Fixiermittel gestellt werden. Um Gewebe angeordnet zu fixieren, können Einbettungskassetten verwendet werden. Diese Kassetten sind gut mit einem wasserfesten Stift zu beschriften. Dieser Schritt ist notwendig, weil nach der Fixierung die meisten Gewebe schlecht zu identifizieren sind (alles ist braun und sieht ähnlich aus).



2. Fixieren

Es gibt verschiedene Fixiermittel, die alle ihre besonderen Merkmale haben. Eine weit verbreitete Fixierung ist die 4% Formaldehyd-Lösung. Der Vorteil von Formaldehyd ist, dass das Gewebe Monate darinaufbewahrt werden kann, ohne dass wesentliche Änderungen der Struktur auftreten. Für die Routine HE-Färbung (Haematoxylin/Eosin) ist sie eine ausgezeichnete Lösung.



Eine andere sehr nützliche Fixierlösung ist die Bouin'sche Flüssigkeit. Dies kann fertig gekauft werden, aber sie ist auch einfach herzustellen. Erforderlich ist: Pikrinsäure 1,2%, Formalin 37% und Eisessig. Verhältnis: 15 ccm Pikrinsäure, 5 ccm Formalin und 1 ccm Eisessig. Bouin dringt schnell ein, und das Gewebe kann lange darin liegen bleiben. Das Gewebe ist nach dieser Fixierung sehr gut zu Färben.



Eine andere weitverbreitete Fixierung ist das Zenker'sche Gemisch. Dieses ist auch ein Kombinationsfixativ: Sublimat (Quecksilber-2-chlorid), Kaliumbichromat, Natriumsulfat, Eisessig und destilliertes Wasser. Zenker dringt sehr rasch in das Gewebe ein. Man sollte das Gewebe nicht zu lange fixieren, weil es sonst zu hart wird und schwer zu schneiden ist. Ein weiterer Nachteil von Zenker ist die Fällung von Quecksilber. Dieser Niederschlag muss mit Lugol'scher Lösung (Mischung von Jod und Kaliumjodid) und Natriumthiosulfat entfernt werden. Dies kann auf Präparatenebene ausgeführt werden.



Die Gewebestücke sollten nicht zu groß sein. Je größer das Stück, desto größer ist die Gefahr, dass die Autolyse (Zellvernichtung) des Gewebes beginnt. Manchmal kann es für größere Objekte, wie z.B. einen ganzen Mausfetus (Ungeborenen), nützlich sein, sie warm vor zu fixieren. Ziel ist es dann, schnell etwas Festigkeit zu erreichen. Nach ein paar Stunden kann man mit einem alten Mikrotommesser das Gewebe durchschneiden. Im Bild fixieren links eine Bouin- und rechts eine Zenker-Flasche bei 30 Grad Celcius.



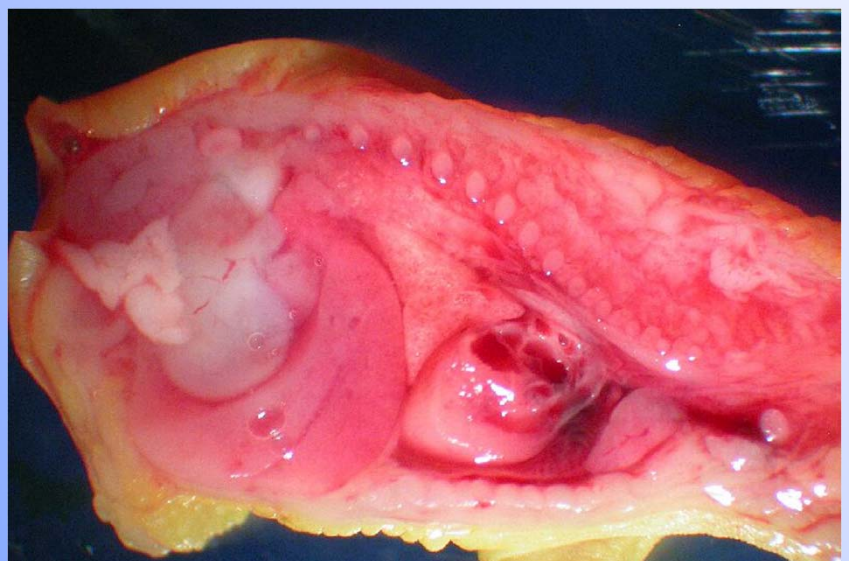
Unter einem Stereomikroskop ist mit einem alten Mikrotommesser ein Längs-oder Querschnitt exakt auszuführen.



Dieses Bild zeigt eine neu geborene Maus, die drei Stunden in Bouin warm fixiert wurde.

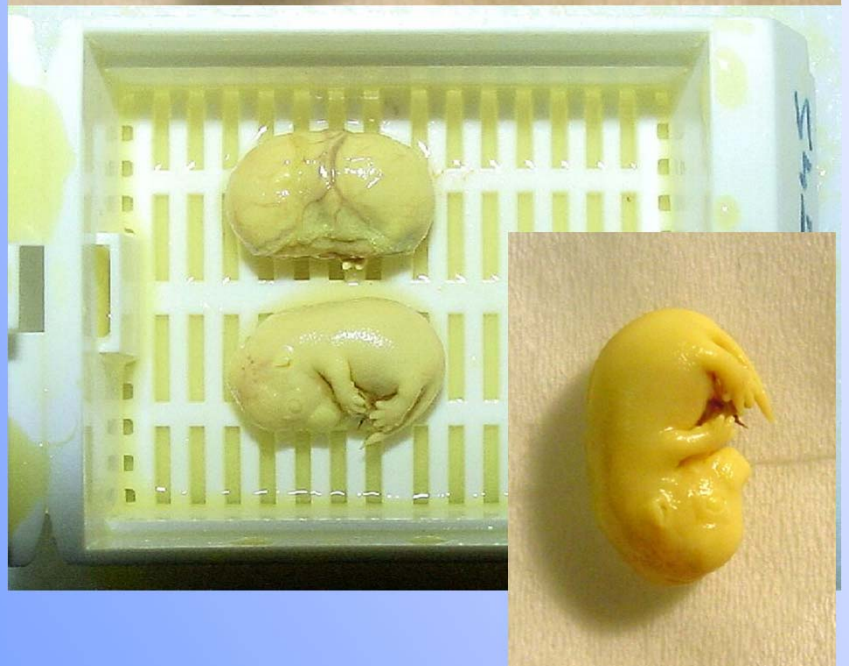


Im Längsschnitt sind Wirbel, Leber, Herz und Thymus schon gut zu erkennen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die weitere Fixierung ordnungsgemäß erfolgen kann. Der Nachteil ist, dass später beim Schneiden zuerst ein paar Millimeter Gewebe abgehobelt werden müssen, bevor die ersten guten Schnitte gemacht werden können.



Für allerbeste Resultate sollte das Gewebe jetzt vorzugsweise kalt weiter fixiert werden, am besten im Kühlschrank. Hierbei schreitet die Autolyse langsamer voran, aber auch die Fixierung braucht länger. Die Fixierung bei 15°C zeigt einen guten Kompromiss. Kleine Stücke (5 x 5 x 5 mm) benötigen einen, besser mehrere Tage, größere Stücke bis zu eine Woche. Gelegentliches Schütteln fördert eine gute Fixierung.

Nach der Fixierung wird das Gewebe aussehen wie auf dem Bild (Herz rechts oben, Lunge links und unten, Thymus ganz oben).



Nach der Fixierung muss das Gewebe gespült werden, Zenker und Formaldehyd in Wasser. Nach Bouin wird das Material direkt in 70%iges Ethanol überführt, hierbei gehen gelbe Wolken ab. Es wird empfohlen, regelmäßig das Wasser oder Ethanol zu wechseln. Für beste Ergebnisse sollte das Spülen mindestens 24 Stunden geschehen.



3. Entwässern (Dehydrieren)

Wenn das Fixativ richtig ausgespült ist, kann mit der Entwässerung begonnen werden. Ziel ist, das Wasser langsam zu entfernen und durch Alkohol und später durch Paraffin oder Paraplast zu ersetzen.



Die folgenden Schritte werden jetzt durchgeführt:

- 50% Ethanol
- 70% Ethanol
- 85% Ethanol
- 95% Ethanol
- 100% Isopropanol
- Xylol
- Xylol/Paraplast
- Paraplast

Es ist sinnvoll, Vorratsgefäße mit Ethanol bereit zu halten. Das 100%-ige Ethanol kann auch durch 100%iges Isopropanol ersetzt werden, da 100%iges Ethanol ziemlich teuer ist und schnell Luftfeuchtigkeit anzieht. Die Verwendung von Aceton ist in der normalen Histologie wegen der drastischen Schrumpfung des Gewebes kaum zu empfehlen.

Für beste Ergebnisse bleiben kleine Stücke (5 x 5 x 5 mm) 12 Stunden in jedem Bad, während größere Stücke 24 Stunden in jedem Bad bleiben können. Es ist praktisch, wenn der Badwechsel regelmäßig stattfindet, z. B. 7:00 Uhr und 19:00 Uhr.



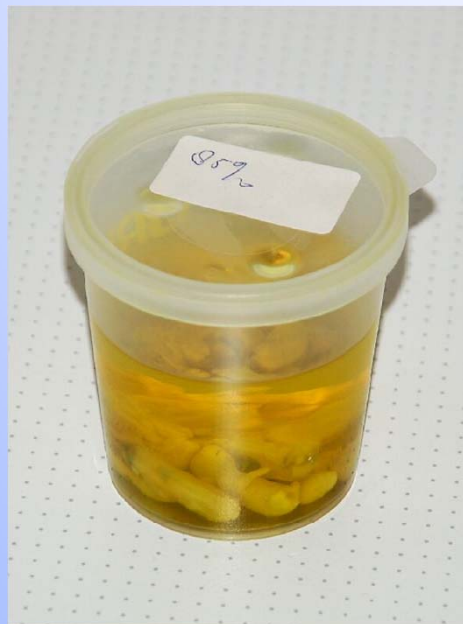
Die folgende Verdünnungstabelle kann helfen:

In diesem Beispiel:

Vorhanden: 95% Ethanol
Benötigt : 70% Ethanol
Nimm: 70ml 95% Ethanol
Hinzufügen: 25ml AD
Bekommen: 95ml 70% Ethanol.

Sterkte aanwijzingen geconcentreerde oplossing.		100	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50	40	30
Te verkrijgen sterkte in % en te gebruiken volume van geconcentreerde oplossing.	95	5												
	90	10	5											
	85	15	10	5										
	80	20	15	10	5									
	75	25	20	15	10	5								
	70	30	25	20	15	10	5							
	65	35	30	25	20	15	10	5						
	60	40	35	30	25	20	15	10	5					
	55	45	40	35	30	25	20	15	10	5				
	50	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5			
	40	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10		
	30	70	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	10	
	20	80	75	70	65	60	55	50	45	40	35	30	20	10
		Volume toe te voegen oplosmiddel												

Alle Schritte werden sorgfältig durchgeführt. Man kann das Gewebe in der Kassette oder auch lose in der Flüssigkeit entwässern. Vorsicht ist beim Wechsel geboten. Das Gewebe fasst man mit einer Pinzette, z.B. an einem Blutgefäß, an. Es empfiehlt sich, das Gewebe einen Augenblick auf Fließpapier zu legen, sodass wenig Flüssigkeit mit in das nächste Bad genommen wird. Hier ist es erneut empfohlen, die Töpfe gelegentlich zu bewegen, so dass immer neue Flüssigkeit um das Gewebe fließt. Nach 100% Isopropanol folgt der Xylol-Schritt. In diesem Schritt wird das Gewebe durchscheinend. Es ist wichtig, das Gewebe nicht länger als notwendig im Xylol zu lassen, weil es sonst zu hart wird. z. B. Leber oder Milz kann so hart werden, dass sie nicht mehr zu schneiden sind.

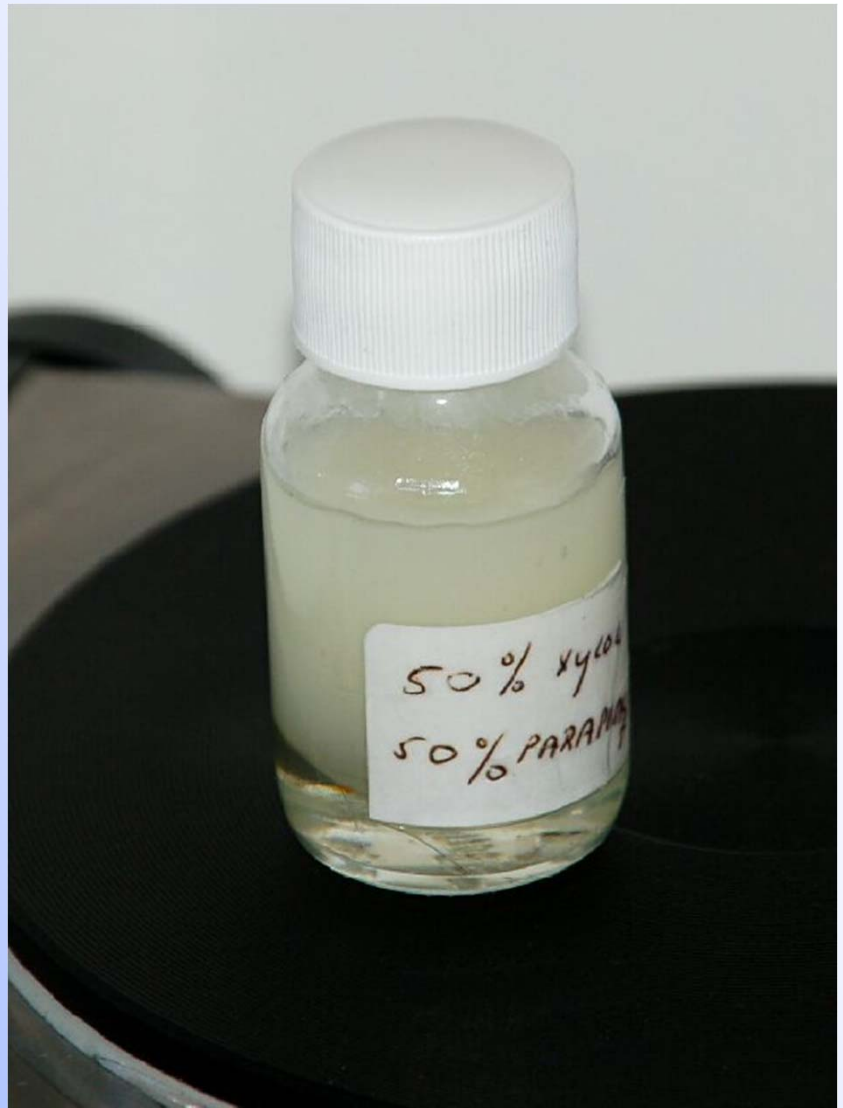


Jetzt folgt eine warme Mischung aus Xylol und Paraplast oder Paraffin (1:1). Paraplast dringt schneller ins Gewebe ein als Paraffin, aber es sollte nicht heißer als 62°C werden.



Im Bild wird die Mischung gerade aufgewärmt. Lassen Sie die Mischung langsam warm werden. Ein Wärmeschrank mit Thermostat, eingestellt auf einen Wert, der über dem Schmelzpunkt und unter der Maximaltemperatur liegt, ist hierbei sehr hilfreich. Das Wachs soll flüssig sein, mehr nicht. In diesem Schritt bleibt das Gewebe 2x so lange wie in den vorherigen Schritten.

Für beste Ergebnisse benötigen kleine Stücke (5 x 5 x 5 mm) 24 Stunden. Größere Stücke 2 x 24 = 48 Stunden.



Alles Wasser ist jetzt aus dem Gewebe verschwunden und durch Xylol ersetzt. Im letzten Schritt wird wiederum das Xylol vollständig entfernt und durch Paraplast ersetzt. Hierfür füllt man 2 Tassen mit Paraplast-Pellets ab und lässt sie in Ruhe schmelzen (dauert ca. eine Stunde).

Das Gewebe kommt dann in die erste Tasse für:
kleine Stücke (5 x 5 x 5 mm) 24 Stunden,
größere Stücke 2 x 24 = 48 Stunden.



Nebenan wird die Mischung langsam aufgewärmt. Das Wachs sollte gerade flüssig sein. Nach dem ersten Schritt ist ein leichter Geruch von Xylol über der Flüssigkeit zu bemerken. Der nächste Schritt ist die Infiltration mit frischem, sauberem Paraplast. Auch hier gilt für jeden Schritt für beste Ergebnisse: kleine Stücke (5 x 5 x 5 mm) 2 x 24 = 24 Stunden und größere Stücke 48 Stunden. Das Xylol darf man jetzt nicht mehr riechen, im Zweifelsfall lieber eine neue Paraplast-Tasse schmelzen und das Gewebe in ein drittes Bad überführen (der Aufenthalt in flüssigem Paraplast hat eigentlich kein Maximum, es schadet dem Gewebe kaum). Wenn nur ein wenig Xylol im Gewebe bleibt, ist es nicht gut zu schneiden, und alle Arbeit ist umsonst gewesen!

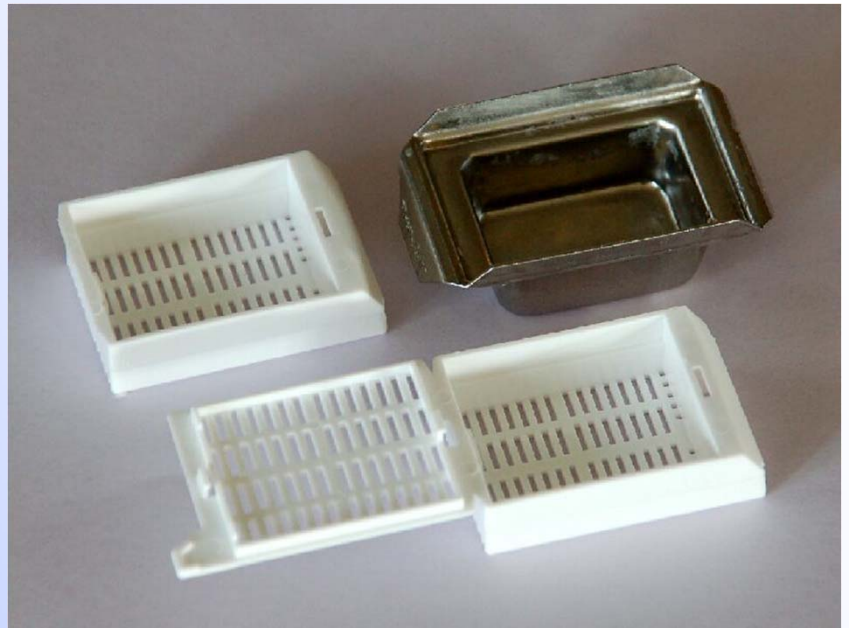


Nach dem letzten Schritt kann ausgegossen werden. Wenn die Ausgießschritte anfangen, sollte man bis zu einem halben Tag reservieren (es gibt keine Zeit mehr für andere Dinge). Man beginnt, indem man frisches Paraplast schmilzt (die Temperatur von Paraplast darf 62° C nicht überschreiten).

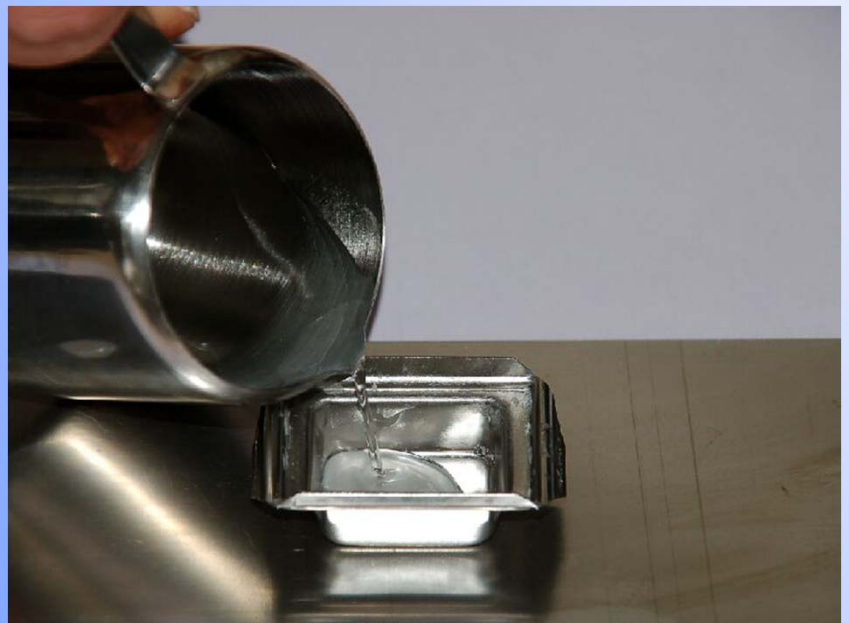


4. Einbetten in Paraplast

Bei der Verwendung von Einbettungs-Kassetten passt diese genau auf die Giessform. Die Form ist aus Edelstahl gefertigt, sodass sie immer wieder verwendet werden kann.



Jetzt geht es darum, schnell zu arbeiten. Die Form wurde hier auf eine kalte Stahlplatte gestellt, sodass das Paraplast rasch abkühlt und erstarrt.



Das Gewebe sollte z. B. in einem warmen Glas zur Verfügung liegen.



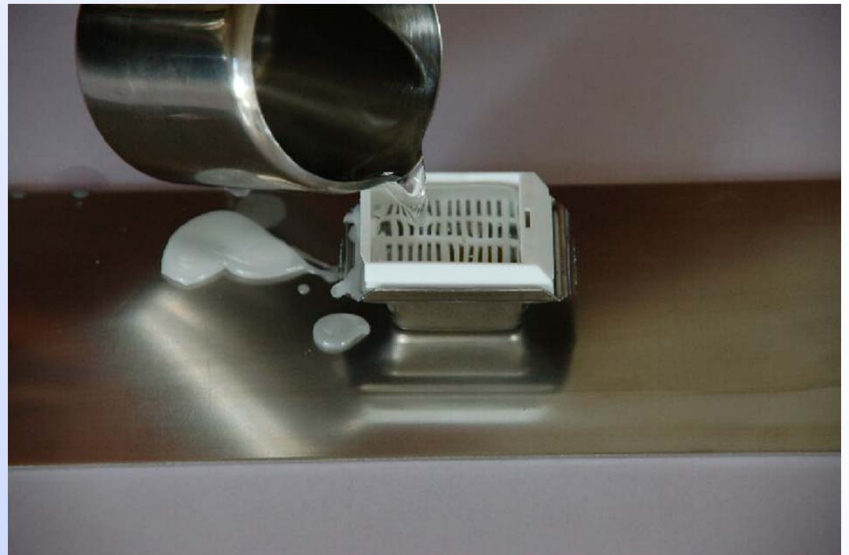
Das Gewebe schnell positionieren in dem bereits erstarrenden Paraplast. Es gibt nur ein paar Sekunden Zeit, um zu arbeiten. Die Pinzette muss vorher gut angewärmt werden, sonst klebt das Objekt an ihr fest.



Die Form wird mit flüssigem Paraplast aufgefüllt bis zum ersten Rand.



Dann wird die Kassette mit dem Boden nach unten aufgelegt und die Form mit Paraplast aufgefüllt, bis der Boden vollständig im Wachs verschwunden ist.



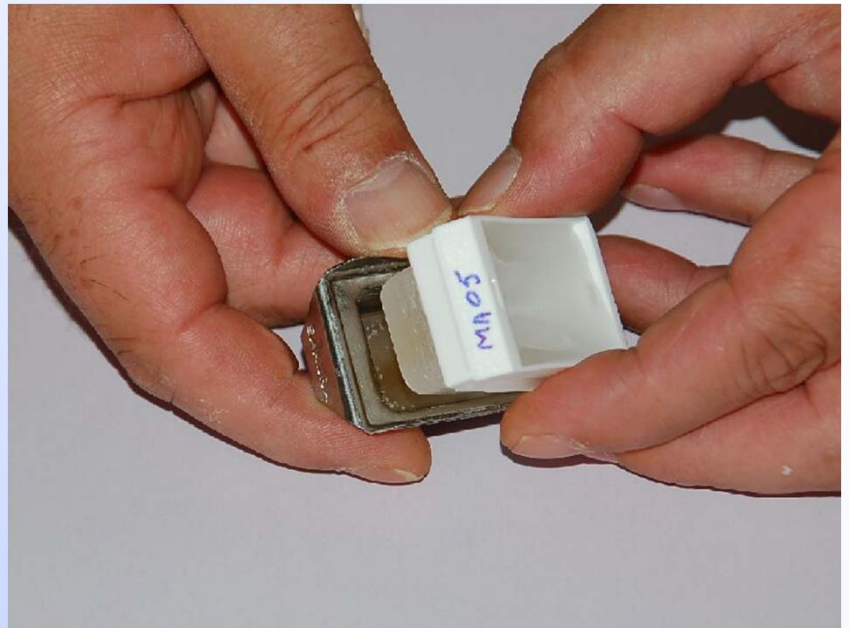
Alles wird bald anfangen fest zu werden. Die warme Form kann vorzugsweise in einem kalten Ort (Kühlschrank) abgestellt werden. Je schneller die Abkühlung, desto kleiner werden die Paraplast- oder Paraffinkristalle, was später eine bessere Schneidbarkeit bewirkt. Paraplast schrumpft hierbei stark, wodurch ein Schrumpfungstal entsteht. Das ist in Ordnung. Bei tieferen Minusgraden (Gefrierfach) kann der Block Risse bekommen und sich stark verziehen.



Eine Viertelstunde später ist alles ausgehärtet.



Weil das Paraplast geschrumpft ist, wird der Block leicht aus der Form fallen.



Nun kann der fertige Block nachbearbeitet werden. Alles abgeschnittene Paraplast kann wieder verwertet werden.



Die Blöcke nummerieren und archivieren. Sie können für viele Jahre und Jahrzehnte aufbewahrt werden.

