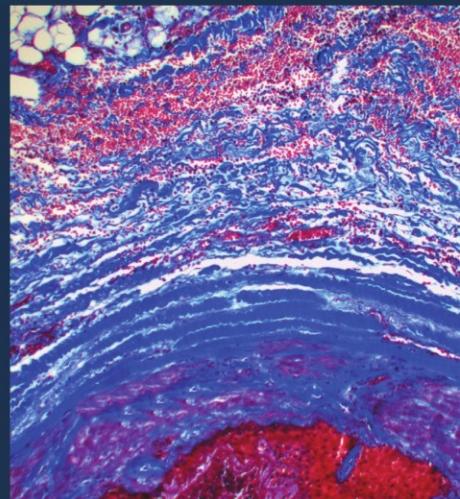
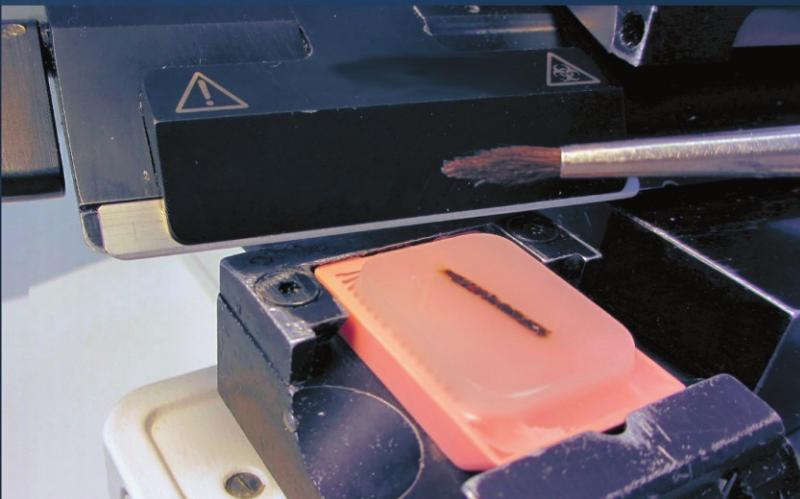


Gudrun Lang

# Histotechnik

Praxislehrbuch für die  
Biomedizinische Analytik

2. Auflage



SpringerWienNewYork



Gudrun Lang

# **Histotechnik**

Praxislehrbuch für die  
Biomedizinische Analytik

Zweite, überarbeitete und aktualisierte Auflage

SpringerWienNewYork

**Gudrun Lang**

Biomedizinische Analytikerin, Linz, Österreich

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdruckes, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Buch berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

Produkthaftung: Sämtliche Angaben in diesem Fachbuch/wissenschaftlichen Werk erfolgen trotz sorgfältiger Bearbeitung und Kontrolle ohne Gewähr. Insbesondere Angaben über Dosierungsanweisungen und Applikationsformen müssen vom jeweiligen Anwender im Einzelfall anhand anderer Literaturstellen auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Eine Haftung des Autors oder des Verlages aus dem Inhalt dieses Werkes ist ausgeschlossen.

© 2006 und 2013 Springer-Verlag/Wien

SpringerWienNewYork ist ein Unternehmen von  
Springer Science + Business Media  
[springer.at](http://springer.at)

Satz: le-tex publishing services GmbH, Leipzig, Deutschland  
SPIN: 86057960

Mit 213 Abbildungen

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-211-33141-5 1. Aufl. SpringerWienNewYork

ISBN 978-3-7091-1189-5 SpringerWienNewYork

## **Geleitwort zur ersten Auflage**

---

Diagnosen, die auf Basis histologischer Präparate erstellt werden, besitzen den höchsten Sicherheitsgrad und die größte Aussagekraft gegenüber allen sonstigen diagnostischen Untersuchungen am Patienten. Außerdem haben sie einen weiteren, nicht zu unterschätzenden Vorteil, nämlich den der niedrigen Kosten. Wie gelangt man eigentlich zu einem guten oder – besser gesagt – schönen, histologischen Schnitt, Ziel und Wunschtraum eines jeden Pathologen? Die Verarbeitung eines Präparates beginnt bekanntlich bereits bei seiner Entnahme. Wie kann falsche Behandlung, die zu Schäden am Präparat führt, bereits bei der Entnahme vermieden werden? Schließlich kann die beste histologische Technik eine einmal eingetretene Veränderung nicht mehr wettmachen. Diese und viele weitere Fragen beantwortet dieses Buch. Beste technische Verarbeitung stellt nicht nur die Grundlage für einen qualitativ hochwertigen Befund dar, sondern ist unabdingbar für alle weiterführenden Untersuchungen wie Immunhistochemie und PCR.

Seit längerer Zeit ist zu diesem Thema im deutschen Sprachraum keine so umfassende Publikation erschienen. Daher wird dieses Buch nicht nur den Biomedizinischen AnalytikerInnen in Ausbildung und bei der täglichen Laborarbeit eine wertvolle Stütze sein, sondern sollte auch allen angehenden PathologInnen helfen, sich mit der Technik der Aufarbeitung von Gewebe auseinanderzusetzen. Nur wer die beste technische Qualität kennt und weiß, wie man sie erreichen kann, ist im Stande unzureichendes Material zurückzuweisen und damit Fehler zu vermeiden.

Linz, Februar 2006

**Univ.-Doz. Dr. Gerhard Syré**

# **Vorwort zur zweiten Auflage**

---

Ein Satz, den man häufig beim Studium von histotechnischen Texten über Färbungen findet, ist: „Das Rezept wurde empirisch ermittelt.“ Viele dieser Rezepte sind mittlerweile über hundert Jahre alt. Viele Histologen, Anatomen, Pathologen haben sich damit beschäftigt, auch ein paar Histochemiker und kaum ein Molekularbiologe. Trotzdem findet man eben diesen Satz immer noch in unserer modernen histotechnischen Literatur und leider fehlt meist die entsprechende histochemische/zellbiologische Erklärung der Methode. Eine große Zahl dieser Rezepte ist über die Jahre wieder in Vergessenheit geraten oder hat sich ganz einfach erübrig. Die wenigen, die sich im modernen Histodiagnostiklabor durchgesetzt haben, sind eigentlich überschaubar. Es ist auch irgendwie auffällig, dass sich manche Prinzip-Beschreibungen durch das Histotechnik-Jahrhundert hindurch kaum verändert haben. So verwende ich selbst auch – in Ermangelung von besseren Erkenntnissen – teilweise alte Begriffe und Erklärungen.

Diese Technik, auf deren Basis einschneidende Diagnosen erstellt werden, ist erschreckend unpräzise und schleierhaft. Denken wir nur an die Formaldehydfixierung, die mehr oder weniger per Zufall entdeckt und deren genaue Wirkungsweise immer noch nicht restlos aufgeklärt ist. Dazu kommen unsere vielgeliebten, laborspezifischen Eigenheiten – also das genaue Gegenteil der Standardisierung.

Geht es Ihnen auch wie mir? Als Biomedizinische Analytikerin im 21. Jahrhundert würde ich es lieber sehen, wenn wir unsere tägliche Arbeit auf wissenschaftlich fundierte und im Detail erforschte Grundlagen stellen könnten. Ehrlicherweise muss man zugeben, dass die histologische Routinediagnostik immer noch auf dem Äquivalentbild beruht. Das bedeutet, dass der Histologe davon ausgehen kann, dass sich Gewebe- und Gewebeveränderungen immer gleich darstellen, sofern die Vorbehandlung des Präparats die gleiche war. Und die Beurteilung dieses Äquivalentbildes ist zudem eine subjektive, auf Erfahrung beruhende Fähigkeit.

Wer kann sich der ungelösten Fragen annehmen? Ich finde es ungeheuer spannend, was sich histochemisch in den Gewebeproben und -schnitten abspielt. Die Beschäftigung mit dieser Problematik ist sehr anspruchsvoll. Der Forscher benötigt Wissen in Histologie, Histochemie, organischer und anorganischer Chemie, Zellbiologie, Molekularbiologie u. v. m. Mit einem Augenzwinkern muss man eingestehen, dass es wohl „viel Plag und wenig Ehr“ bedeutet, sich der wissenschaftlichen Histotechnik zu widmen.

Und trotzdem. Die klassische Histotechnik ist ein überaus wichtiges Element in Diagnostik und Forschung. In vielen Fällen stellt sie die Basis für die modernsten Therapiewege dar. Und nebenbei ist sie auch noch kostengünstig. Keine Angst – Histotechnik funktioniert, was im Laufe des letzten Jahrhunderts ständig bewiesen wurde.

Ich hoffe, dass Sie in diesem Histotechnikbuch, einen modernen Ansatz in den jeweiligen Erklärungen entdecken und Sie neugierig macht, die zellbiologischen Zusammenhänge selbst zu erforschen. Auch die neueste Histotechnik, sprich Molekularpathologie im Histodiagnostiklabor, hat ihren Platz bekommen und deutet auf zukünftige Entwicklungen hin.

Apropos Zukunft. Der klassischen, diagnostischen Histotechnik wurde schon öfters ein frühes Ableben vorausgesagt. Schon vor Jahren prognostizierte man, dass sich die Herstellung und morphologische Begutachtung von Gewebeschnitten als nicht mehr notwendig erweisen würde. Bis jetzt hat sich das allerdings nicht bewahrheitet und ich denke, auch in den nächsten Jahren werden histodiagnostische Laboratorien ihre Daseinsberechtigung haben. Im Besonderen durch die Bestimmung von Tumorzelleigenschaften auf Protein- oder DNA-Ebene, um die sinnvolle Anwendung neu entdeckter Behandlungswege direkt zu prüfen, bieten sich große Entwicklungschancen.

Die Organisation innerhalb von histologischen Labors könnte sich jedoch ändern. Es gibt Bestrebungen in unterschiedliche Richtungen. Einerseits werden kleinere Labors aus wirtschaftlichen Gründen immer mehr zu Groß-Histologien zusammengefasst, wo man dann durch Aufgliederung der Tätigkeiten auch weniger qualifizierte Mitarbeiter auf eingeschränkte Prozessschritte schulen kann und eine Art Fließband-Histologie erzeugt. Gleichzeitig versucht man die Probenmassen durch „*kontinuierlichen Workflow*“ möglichst schnell durchzuschleusen und kommt dabei in die Gefahr Mindest-Fixierzeiten zu unterschreiten, wenn die „*Diagnose am selben Tag*“ zur obersten Zielsetzung erklärt wird. Andererseits gibt es Stimmen, die immer lauter eine Standardisierung, die Einhaltung von Mindest-Fixierzeiten und die Anerkennung der Histotechnik als hochkomplexe und hochqualifizierte Untersuchungsmethode fordern. Die Zusammenhänge zwischen Präanalytik, Fixierung und validen Untersuchungsergebnissen werden herausgestellt. Referenzzentren leiden heute schon unter der Anforderung auf Proben, die reichlich unterschiedlich vorbehandelt wurden, ihre Analysen durchzuführen. Szenarien, wo in „*Histofabriken*“ Routinehistotechnik betrieben wird und in Speziallabora die weiterführenden Analysen angeschlossen werden, sind denkbar und bestimmt auch schon Realität. Ob dies der Qualität und somit der Patientenbehandlung zuträglich ist, muss erst entschieden werden.

Der Inhalt von *Histotechnik* wurde aktualisiert und etwas umgestaltet, im Bestreben, die Übersichtlichkeit und Verständlichkeit zu verbessern.

Linz, Juli 2012

**Gudrun Lang**

# **Vorwort zur ersten Auflage**

---

Das histologische Labor löst bei Vertretern unserer Berufsgruppe sehr unterschiedliche Reaktionen aus. Die eine Hälfte denkt an unangenehme Gerüche, monotone Tätigkeiten und unappetitliche Eindrücke. Die andere Hälfte denkt an einen sehr abwechslungsreichen Tagesablauf, an handwerkliches Geschick, an Teamwork und verantwortungsvolles Arbeiten. Als langjährige „Histotechnikerin“ teile ich die Begeisterung für diesen Bereich der Laboratoriumsmedizin und halte ihn für anspruchsvoll, auch wenn die Biomed. AnalytikerIn hier nicht selbst befundet. Die histologische Technik ist Grundlage für die Erstellung von pathologischen Befunden aber auch Basis für Forschungsarbeiten und Studien. Erkenntnisse daraus beeinflussen wiederum die Entwicklung neuer Therapieformen.

Die Verantwortung den PatientInnen gegenüber ist hoch. Wir sind uns als HistotechnikerInnen bewusst, dass hinter jedem Präparat ein Mensch steht, der ungeduldig auf Antworten wartet. Proben, die uns überantwortet werden, sind Unikate und unwiederbringlich. Im Gegensatz zu bspw. Blutproben kann ein auffälliges Gewebeareal kein zweites Mal exzidiert werden. Wir verarbeiten die Gewebeproben über eine Vielzahl an Arbeitsschritten zu mikroskopierbaren Präparaten. Dabei befolgten wir schon immer Gesetze der Qualitätssicherung, noch bevor sie als solche bezeichnet wurden. Dies geschieht in dem Bewusstsein, dass auch die besten Mediziner aus schlecht verarbeitetem Material nichts mehr ablesen können und so eine Befunderstellung unmöglich wird. So bilden im pathologischen Institut MedizinerInnen und TechnikerInnen ein Team im Dienste des Patienten.

Mit diesem Buch möchte ich den umfangreichen theoretischen Hintergrund unserer Tätigkeit beleuchten. Ich habe mich dabei bemüht, vor allem relevante Fakten aus der Sicht der Biomedizinischen AnalytikerIn hier einzubringen. Im Vordergrund stehen die Abläufe im modernen, histodiagnostischen Labor.

Vielleicht wird es verwundern, dass es sich hier nicht um ein „Rezeptbuch“ handelt. Der Grund liegt einerseits im Umfang, den genauen Testvorschriften mit entsprechenden Tipps und Tricks einnehmen würden, andererseits darin, dass veröffentlichte Rezepte entweder durch eigene Erfahrung oder durch genaue Quellen legitimiert sein sollten. Aufgrund der Vielzahl an funktionierenden Verarbeitungswegen kann man die eigenen nicht unbedingt als die ultimativ besten darstellen, wenn man die anderen in der Praxis nicht kennt. Ich habe deshalb Rezepte als „Beispiele“ angeführt bzw. nur allgemein beschrieben.

Die „Basis“-Kapitel wie Fixierung, Einbettung, Schneide- und Färbetechnik sind recht ausführlich behandelt. Die „modernen“ Methoden wie Zellkultur, In-situ-Hybridisierung, PCR, Microarrays sind eher theoretisch umrissen. Es handelt sich bei diesen Bereichen um Spezialgebiete, die aus der Routine ausgelagert sind oder erst seit kurzem ihren Weg hinein finden.

## **Vorwort zur ersten Auflage**

Für einen Einblick in die Farbenvielfalt der Histologie empfehle ich das Internet als leicht zugängliche Quelle. Eine Auswahl von interessanten Links mit Gewebebildern, Beschreibungen und Online-Protokollen habe ich im Anhang zusammengestellt.

Ansprechen möchte ich mit diesem Buch Mitarbeiter im histologischen Labor, die die theoretischen Grundlagen ihrer Arbeit nicht außer Acht lassen wollen. Allen, die neugierig sind, möchte ich den Zugang etwas erleichtern. Es ist mir wichtig, dass sich unsere Berufsgruppe als Träger des histotechnischen Wissens sieht. Und ich denke, dass dieses Buch für Studenten der Laboratoriumstechnik als praktische Lernunterlage dienen kann.

Mein Dank geht vor allem an meine Familie, die meine ungeteilte Aufmerksamkeit doch für längere Zeit entbehren musste. Ich bedanke mich auch bei Frau Kreuzberger für das Korrekturlesen, bei Frau Fliesser für ihre Unterstützung bei der EM-Technik, und bei Herrn Univ.-Dozent Syré für seine einleitenden Worte. Bei allen Firmen bedanke ich mich für das freundliche Bereitstellen der Geräteabbildungen. Außerdem danke ich all jenen, die mir zeigten, wie wichtig eine selbstständige Fortbildung, das berufliche Selbstbewusstsein und der Mut zur Umsetzung einer Idee sind.

Linz, Juni 2006

**Gudrun Lang**

# Inhaltsverzeichnis

---

1	<b>Aufgaben der histologischen Technik / Pathologie</b>	1
2	<b>Ablauf in einem histodiagnostischen Labor</b>	5
3	<b>Biochemie</b>	9
3.1	<b>Aufbau der Zelle</b>	10
3.1.1	Zellkern (Nukleus)	10
3.1.2	Nukleolus	10
3.1.3	Cytoplasma	11
3.1.4	Endoplasmatisches Reticulum (ER)	11
3.1.5	Ribosomen	11
3.1.6	Mitochondrien	11
3.1.7	Lysosome	12
3.1.8	Peroxisome	12
3.1.9	Golgi-Apparat	12
3.1.10	Zentriol	12
3.1.11	Paraplasma	12
3.1.12	Zellmembran	12
3.1.13	Mikrovilli	13
3.2	<b>Gewebe-Bausteine</b>	13
3.2.1	Wasser	14
3.2.2	Salze	14
3.2.3	Proteine	15
3.2.4	Kohlenhydrate	22
3.2.5	Lipide	27
3.2.6	Nukleinsäuren	29
3.2.7	Bindegewebeaufbau	30
3.3	<b>Zusammenfassung</b>	33
4	<b>Untersuchungsmaterial</b>	35
4.1	<b>Gewinnungsart</b>	36
4.2	<b>Präanalytik – Faktoren der Vorbehandlung</b>	38
4.2.1	Einsenderichtlinien	38
4.2.2	Gewünschte Vorbehandlung durch den Chirurgen	38
4.2.3	Art des Fixiermittels	40
4.2.4	Menge des Fixiermittels – Einsendegefäß	40
4.2.5	Identifikation und Beschreibung der Probe – Etiketten, Einsendeschein	40
4.2.6	Probentransport	41
4.3	<b>Fixierungszustand</b>	41

## Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Fixiertes Gewebe .....	41
4.3.2	Natives, unfixiertes Material .....	41
4.4	<b>Vitalzustand</b> .....	44
4.4.1	Tote Zellen, totes Gewebe .....	44
4.4.2	Lebende Zellen .....	44
4.5	<b>Sonstiges Probenmaterial</b> .....	44
4.5.1	Probenmaterial von Obduktionen .....	44
4.5.2	Probenmaterial von Tieren .....	45
4.5.3	Probenmaterial von Pflanzen .....	45
5	<b>Fixierung</b> .....	47
5.1	<b>Faktoren der Fixierung</b> .....	48
5.2	<b>Fixierungsartefakte</b> .....	50
5.3	<b>Fixierung der Gewebe-Bausteine</b> .....	51
5.3.1	Proteine .....	51
5.3.2	Lipide .....	53
5.3.3	Kohlenhydrate .....	53
5.3.4	Nukleinsäuren .....	53
5.4	<b>Fixiermittel</b> .....	54
5.4.1	Formaldehyd .....	54
5.4.2	Andere gebräuchliche Fixative .....	65
5.4.3	Eigenschaften der einzelnen Fixative – Übersicht .....	71
5.4.4	Übersicht der Fixative nach dem Untersuchungsziel .....	73
5.5	<b>Andere Formen der Fixierung</b> .....	73
5.5.1	Trocknen .....	73
5.5.2	Gefrieren .....	74
5.5.3	Gefriertrocknen .....	75
5.5.4	Gefriersubstitution .....	76
5.5.5	Kritische-Punkt-Trocknung .....	76
5.5.6	Bedampfen .....	76
5.5.7	Phasentrennung .....	76
5.5.8	Mikrowelleneinsatz bei der Fixierung .....	77
6	<b>Verarbeitung von hartem Gewebe</b> .....	79
6.1	<b>Entkalkung</b> .....	81
6.1.1	Entkalkung durch Säure .....	81
6.1.2	Entkalkung durch Chelatbildung .....	82
6.1.3	Prüfung der Entkalkung .....	83
6.1.4	Vor- und Nachbehandlung der Entkalkung .....	84
6.1.5	Beschleunigung der Entkalkung .....	84
6.1.6	Erweichen von Knorpel und Horn (Nägel, Haare) .....	85
6.1.7	Einbettung von entkalktem Gewebe .....	85
6.1.8	Schneiden von entkalktem Gewebe .....	85

## Inhaltsverzeichnis

6.1.9	Oberflächenentkalken .....	85
6.1.10	Färbung von entkalktem Gewebe.....	85
6.1.11	Kalkhartes Untersuchungsmaterial im Histodiagnostiklabor.....	86
6.2	<b>Mazeration .....</b>	88
6.3	<b>Hartschnittechnik – Hartschlifftechnik.....</b>	88
6.3.1	Geräte zur Präparatherstellung .....	88
6.3.2	Beispiele für Knochenverarbeitung .....	89
6.3.3	Gefrierschnitte von unentkalkten Präparaten.....	90
6.3.4	Färbungen an unentkalkten Schliffpräparaten.....	90
6.3.5	Färbungen an Methacrylatschnitten von unentkalkten Knochenbiopsien .....	91
6.3.6	Fluoreszenz-Markierung in Knochen.....	92
6.3.7	Autoradiografie.....	92
6.3.8	Kontaktradiografie.....	92
6.3.9	Histomorphometrische Methoden am unentkalkten Knochen.....	92
7	<b>Makroskopische Begutachtung – vom Fläschchen in die Kassette .....</b>	95
8	<b>Einbettungsprozess .....</b>	101
8.1	<b>Paraffinwachseinbettung .....</b>	103
8.1.1	Beispiel eines Einbettungsprotokolls.....	103
8.1.2	Faktoren des Einbettungsprozesses .....	103
8.1.3	Prozessschritte .....	105
8.1.4	Automation .....	108
8.1.5	Ausgießen, Einblocken (Embedding).....	111
8.1.6	Multigewebeblock (Tissuearray).....	113
8.1.7	Rückführen.....	114
8.2	<b>Gelatine-Einbettung.....</b>	114
8.3	<b>Agar-Einbettung.....</b>	115
8.4	<b>Celloidin-Einbettung (Nitrocellulose) .....</b>	116
8.5	<b>Polyethylenglykol-Einbettung (PEG) .....</b>	117
8.6	<b>Polyesterwachs-Einbettung .....</b>	118
8.7	<b>Kunststoff-Einbettung.....</b>	119
8.7.1	Prinzip .....	120
8.7.2	Kunststoff-Typen .....	122
8.8	<b>Übersicht – Processing-Reagenzien.....</b>	129
8.8.1	Nachbehandlung bei Fixierung mit anderen Fixantien außer neutral gepuffertem Formalin .....	129
8.8.2	Dehydrations-Reagenzien.....	130
8.8.3	Clearing-Reagenzien.....	130
8.8.4	Reagenzien für kombinierte Entwässerung und Clearing-universelle Lösungsmittel ..	131
8.8.5	Einbettungsmedien.....	131

## Inhaltsverzeichnis

<b>9</b>	<b>Mikrotomie</b>	133
9.1	Einbettmedien – Schnittdicken	134
9.2	<b>Mikrotom</b>	134
9.2.1	Schlittenmikrotom	135
9.2.2	Rotationsmikrotom	137
9.2.3	Kryostat	138
9.2.4	Ultramikrotom	138
9.2.5	Gefriermikrotom	139
9.2.6	Rocking Mikrotom (Schaukelmikrotom)	139
9.2.7	Sägemikrotom	139
9.2.8	Vibratom	140
9.3	<b>Mikrotommesser</b>	140
9.3.1	Stahlmesser	141
9.3.2	Einmalklingen	143
9.3.3	Wolframcarbidmesser	143
9.3.4	Glasmesser	143
9.3.5	Diamantmesser	144
9.3.6	Saphirmesser	145
9.4	<b>Schneidetechnik</b>	145
9.4.1	Schneidewinkel	146
9.4.2	Herstellen von Paraffinschnitten	147
9.4.3	Herstellen von Gefrierschnitten	153
9.4.4	Schneiden am Ultramikrotom	157
9.4.5	Herstellen von Sägepräparaten	161
9.4.6	Herstellen von Schlifffräparaten	162
9.5	<b>Anhaften der Schnitte am Objekträger</b>	162
9.5.1	Adhäsive	163
9.5.2	Tape-Transfersystem	165
9.6	<b>Laser Capture Microdissection (LCM)</b>	166
<b>10</b>	<b>Histologische Färbung</b>	169
10.1	<b>Geschichtliches</b>	170
10.2	<b>Farbstoffe</b>	171
10.2.1	Chemische Struktur	171
10.2.2	Numerische Deskriptoren von Farbstoffen	176
10.2.3	Elektrische Ladung / Säure-Base-Verhalten von Farbstoffen	176
10.2.4	Kernfarbstoffe	177
10.2.5	Cytoplasmafarbstoffe	178
10.3	<b>Färbetheorie</b>	178
10.3.1	Faktoren der Färbereaktion	179
10.3.2	Bindungstypen der Färbereaktion	185
10.4	<b>Behandlung der Schnitte vor der Färbung</b>	190
10.4.1	Formalin-fixiertes-Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE)	190

## Inhaltsverzeichnis

10.4.2	Andere Fixantien und Einbettungsmedien .....	191
10.5	<b>Färbeprotokolle</b> .....	191
10.5.1	Begriffe .....	192
10.5.2	Hinweise für die Praxis .....	193
10.5.3	Mikrowelle in der Färbechnik .....	194
10.5.4	Alphabetische Aufstellung der Spezialfärbungen nach Färbesubstrat .....	194
10.6	<b>Hämatoxylin – Eosin – Färbung</b> .....	197
10.6.1	Hämatoxylin .....	197
10.6.2	Eosin .....	203
10.6.3	Protokoll und Färbeergebnis HE-Färbung .....	203
10.7	<b>Trichromfärbung</b> .....	205
10.7.1	Geschichtliches .....	205
10.7.2	Färbesubstrat .....	205
10.7.3	Farbstoffe der Trichromfärbung .....	207
10.7.4	Farbstoffbindung .....	208
10.7.5	Färbetheorien .....	209
10.7.6	Masson-Trichrom-Färbung .....	211
10.7.7	Van-Gieson-Färbung .....	212
10.7.8	Chromotrop-Anilinblau-Färbung nach Gömöri (CAB) .....	213
10.7.9	MSB-Färbung (Martius-yellow-Soluble Blue-Brilliant Crystal) .....	213
10.7.10	SFOG-Färbung nach Mallory/Cason .....	214
10.8	<b>Silberimprägnation</b> .....	215
10.8.1	Silberimprägnation nach Gömöri – Gitterfaserfärbung .....	217
10.8.2	Perjodsäure-Silbermethenamin-Imprägnation nach Gömöri/Jones – Basalmembranfärbung .....	218
10.9	<b>Darstellung der elastischen Fasern</b> .....	219
10.9.1	Weigert's Resorcin-Fuchsin-Färbung .....	219
10.9.2	Verhoeff'sche Färbung .....	220
10.10	<b>Lipid-Darstellung</b> .....	220
10.10.1	Sudan-III-Färbung .....	221
10.11	<b>Kohlenhydrat-Darstellung</b> .....	222
10.11.1	Perjod-Acid-Schiff'sche Reaktion nach McMannus .....	222
10.11.2	Best's Carmin-Färbung .....	225
10.11.3	Alcianblau-Färbung .....	225
10.11.4	Müller-Mowry-Färbung (Kolloidales Eisen, Hale-Färbung) .....	226
10.11.5	Azur A-Färbung / Toluidinblau-Färbung .....	227
10.11.6	Kohlenhydrat-Darstellung mit Lektinen .....	227
10.12	<b>Romanowsky-Giemsa-Färbung</b> .....	228
10.13	<b>Kongorottfärbung nach Highman – Amyloidfärbung</b> .....	230
10.14	<b>Pigment-Darstellung</b> .....	231
10.14.1	Berliner-Blau-Reaktion – Eisenfärbung .....	232
10.14.2	Silberimprägnation nach Fontana-Masson – Melaninfärbung .....	233
10.14.3	Schmorl-Reaktion – Lipofuszinfärbung .....	233

## Inhaltsverzeichnis

10.14.4	Hall-Färbung (Fouchet) – Bilirubinfärbung .....	234
10.14.5	von Kossa-Silberimprägnation – Kalziumnachweis.....	234
10.14.6	Alizarinrot S-Färbung – Kalziumfärbung.....	235
10.14.7	Rhodanin-Färbung – Kupferfärbung .....	235
10.15	<b>Mikroorganismen-Darstellung</b> .....	235
10.15.1	Gramfärbung .....	236
10.15.2	Ziehl-Neelsen-Färbung – säuerfeste Stäbchen.....	236
10.15.3	Silberimprägnation nach Grocott-Gömöri (GMS) – Pilze, Pneumocystis .....	237
10.15.4	Warthin-Starry-Versilberung – Spirochäten.....	238
10.16	<b>Darstellung neurologischer Strukturen</b> .....	239
10.16.1	Kresylechtfärbung – Nissl Substanz Färbung .....	240
10.16.2	Versilberung nach Bielschowsky – Axonfärbung .....	240
10.16.3	Luxol-Fast-Blue nach Klüver-Barrera – Myelinscheidenfärbung .....	241
10.16.4	PTAH-Färbung (Phosphorwolframsäure-Hämatoxylin nach Mallory) – Astrozytenfärbung.....	241
10.17	<b>Nukleinsäuren-Darstellung</b> .....	241
10.17.1	Feulgenreaktion – DNA-Färbung .....	242
10.18	<b>Darstellung von biogenen Aminen</b> .....	243
10.19	<b>Darstellung funktioneller Gruppen</b> .....	243
10.20	<b>Knochenfärbungen</b> .....	243
10.21	<b>Nachbehandlung der Schnitte</b> .....	244
10.22	<b>Färbeautomaten</b> .....	247
10.22.1	Zitadellenfärber .....	247
10.22.2	Linearfärber .....	247
10.22.3	Robotfärber .....	248
10.22.4	Tellerfärber.....	248
10.23	<b>Färbung in der Elektronenmikroskopie</b> .....	249
11	<b>Enzymhistochemie</b> .....	251
11.1	<b>Enzyme</b> .....	252
11.2	<b>Indikationen</b> .....	253
11.3	<b>Fixierung</b> .....	253
11.4	<b>Nachweisprinzip</b> .....	254
11.4.1	Diazo-Reaktion .....	254
11.4.2	Tetrazolium-Reaktion .....	255
11.4.3	Metall-Präzipitationsreaktion .....	257
11.4.4	Farbige Substrate .....	257
11.4.5	Praxis-Tipps .....	257
11.5	<b>Phosphatasen</b> .....	257
11.5.1	Alkalische Phosphatase .....	257
11.5.2	Saure Phosphatase .....	258
11.5.3	Glucose-6-Phosphatase .....	259
11.6	<b>Esterasen</b> .....	259

## Inhaltsverzeichnis

11.6.1	Unspezifische Esterasen.....	259
11.6.2	Lipasen .....	260
11.6.3	Acetylcholinesterase (AChE, ACE).....	260
11.6.4	Cholinesterase.....	261
11.6.5	Naphthol AS-D Chlorazetatesterase .....	261
11.6.6	Peptidasen und Proteinasen.....	261
11.7	<b>Oxidoreductasen</b> .....	262
11.7.1	Succinodehydrogenase (SDH, Bernsteinsäuredehydrogenase).....	264
11.7.2	Coenzym abhängige Dehydrogenasen.....	264
11.7.3	Diaphorasen .....	265
11.7.4	Peroxidasen.....	265
11.7.5	Cytochromoxidase.....	267
11.7.6	Tyrosinase (DOPA-Oxidase).....	268
11.7.7	Aminoxidase (Monoaminoxidase, MAO).....	268
12	<b>Immunhistochemie</b> .....	269
12.1	<b>Prinzip</b> .....	270
12.2	<b>Diagnostische Anwendung der Immunhistochemie</b> .....	271
12.3	<b>Antikörper</b> .....	272
12.3.1	Antikörper sind Glykoproteine.....	273
12.3.2	Monoklonal – Polyklonal.....	274
12.3.3	Spezifität des Antikörpers .....	274
12.3.4	Affinität / Bindungsstärke des Antikörpers .....	275
12.3.5	Reaktionstemperatur – Inkubationszeit .....	275
12.4	<b>Marker</b> .....	276
12.4.1	Enzyme .....	276
12.4.2	Fluorochrome .....	276
12.4.3	Biotin .....	276
12.4.4	Enzymkonjugierte Polymere .....	277
12.4.5	Radioisotope .....	278
12.4.6	Kolloidale Metalle .....	278
12.4.7	Quantum Dots.....	278
12.5	<b>Fixierung, Processing, Schneiden in der Immunhistologie</b> .....	278
12.6	<b>Antigen-Demaskierung</b> .....	280
12.6.1	Andauung durch proteolytische Enzyme.....	281
12.6.2	Hitze.....	281
12.6.3	Kombination von Hitze und Enzymandauung .....	283
12.7	<b>Reaktionspartner</b> .....	283
12.7.1	Antigen .....	283
12.7.2	Primärer Antikörper.....	283
12.7.3	Sekundärer Antikörper / Brückenantikörper .....	285
12.7.4	Enzymkomplexe/-konjugate .....	285
12.7.5	Chromogene .....	285

## Inhaltsverzeichnis

12.7.6	Gegenfärbung.....	286
12.8	<b>Methoden</b> .....	286
12.8.1	Direkte Methode (Ein-Schritt-Methode).....	287
12.8.2	Indirekte Methode (Zwei-Schritt-Methode).....	288
12.8.3	Drei-Schritt-Methode .....	289
12.8.4	Unmarkierte-Antikörper-Methode (PAP, APAAP) .....	289
12.8.5	ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) .....	290
12.8.6	LAB / LSAB-Methode (Labelled-Strept-Avidin-Biotin).....	291
12.8.7	Zwei-Schritt-Polymermethode .....	291
12.8.8	Doppelfärbungen .....	293
12.9	<b>Amplifikationsmethoden</b> .....	294
12.9.1	Amplifikation durch Mehrschritttechnik.....	294
12.9.2	Amplifikation durch Imidazol.....	294
12.9.3	Amplifikation mit biotinyliertem Tyramid .....	294
12.9.4	Amplifikation durch Silberpräzipitation bei Gold-Labelling-Methoden.....	294
12.10	<b>Hintergrund-Färbung</b> .....	295
12.10.1	Hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen .....	295
12.10.2	Endogene Enzymaktivität .....	295
12.10.3	Endogenes Biotin.....	296
12.10.4	Spezifische Hintergrundfärbung.....	297
12.10.5	Autofluoreszenz .....	297
12.10.6	Sonstige Ursachen.....	297
12.11	<b>Qualitätssicherung in der Immunhistologie</b> .....	298
12.11.1	Positivkontrollen .....	298
12.11.2	Negativkontrollen .....	299
12.11.3	Troubleshooting.....	299
12.12	<b>Bearbeitung von zytologischem Material und Gefrierschnitten</b> .....	300
12.13	<b>Automation</b> .....	301
12.14	<b>Begriffe</b> .....	303
13	<b>In-situ-Hybridisierung</b> .....	305
13.1	<b>Anwendungen</b> .....	306
13.2	<b>Prinzip und Methoden</b> .....	308
13.2.1	Sondentypen.....	310
13.2.2	Sondenherstellung und Marker.....	311
13.3	<b>Ablauf</b> .....	312
13.3.1	Gewebe-Vorbehandlung.....	312
13.3.2	Denaturierung.....	314
13.3.3	Hybridisierung .....	314
13.3.4	Stringentes Waschen.....	315
13.3.5	Detektion .....	315
13.3.6	Gegenfärbung.....	317
13.3.7	Puffer .....	317

## Inhaltsverzeichnis

13.3.8	Protokoll-Beispiel für DNA-ISH .....	317
13.3.9	Kontrollen.....	318
13.3.10	Auswertung Interphasen-ISH.....	319
13.3.11	Hintergrundfärbung .....	319
13.3.12	Kunststoffschnitte, Gefrierschnitte.....	320
13.4	<b>Automation</b> .....	320
13.5	<b>In-situ-PCR</b> .....	320
13.6	<b>Begriffe</b> .....	321
14	<b>Molekularpathologie</b> .....	323
14.1	<b>Extraktion von Nukleinsäuren aus fixiertem Gewebe</b> .....	324
14.2	<b>PCR</b> .....	326
14.3	<b>Gelelektrophorese</b> .....	326
14.4	<b>Mutationsanalyse</b> .....	327
14.4.1	Real-time PCR .....	328
14.4.2	Pyrosequenzierung .....	328
14.4.3	Sanger Sequenzierung.....	329
14.4.4	Mutationsanalysen mit Festphasen-Hybridisierung .....	330
14.5	<b>OSNA</b> .....	331
14.6	<b>Microarrays</b> .....	331
15	<b>Zellkultur</b> .....	335
15.1	<b>Technik</b> .....	336
15.1.1	Kulturgefäße .....	337
15.1.2	Kulturmedien .....	337
15.1.3	Methoden.....	338
15.2	<b>Anwendungsbeispiele</b> .....	343
15.2.1	Toxizitätstest .....	343
15.2.2	Virusnachweis .....	344
15.2.3	Chromosomenpräparation.....	344
15.3	<b>Gewebe- und Organkulturen</b> .....	344
15.4	<b>Begriffe</b> .....	345
16	<b>Mikrowellentechnik</b> .....	347
16.1	<b>Mikrowellen-Physik</b> .....	348
16.2	<b>Faktoren der Energieaufnahme</b> .....	349
16.2.1	Resonanz des Körpers.....	349
16.2.2	Leitfähigkeit des Materials .....	349
16.2.3	Dipolarität .....	349
16.2.4	Relaxationszeit .....	349
16.2.5	Erwärmung .....	349
16.2.6	Dielektrizitätskonstante.....	350
16.2.7	Eindringtiefe .....	350

## Inhaltsverzeichnis

16.3	<b>Temperatursteigerung</b> .....	350
16.4	<b>Mikrowellenherde</b> .....	351
16.4.1	Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Mikrowellenherden .....	351
16.4.2	Leistungsregelung .....	351
16.4.3	Mikrowellenprozessor .....	352
16.5	<b>Praktisches Arbeiten mit Mikrowellen</b> .....	352
16.6	<b>Anwendungen</b> .....	353
16.6.1	Stabilisierung von unfixiertem Gewebe durch Mikrowellen .....	353
16.6.2	Mikrowellenunterstützte Fixierung mit Fixativen .....	353
16.6.3	Mikrowellen zur Gewebeeinbettung mit Paraffin .....	354
16.6.4	Mikrowellen zur Entkalkung .....	355
16.6.5	Mikrowellen und Färben .....	355
17	<b>Mikroskopie</b> .....	357
17.1	<b>Hellfeldmikroskop</b> .....	358
17.2	<b>Dunkelfeldmikroskop</b> .....	359
17.3	<b>Phasenkontrastmikroskop</b> .....	359
17.4	<b>Interferenzkontrastmikroskop</b> .....	359
17.5	<b>Polarisationsmikroskop</b> .....	359
17.6	<b>Fluoreszenzmikroskop</b> .....	360
17.7	<b>Konfokales Raster-Lasermikroskop</b> .....	360
17.8	<b>Stereomikroskop</b> .....	361
17.9	<b>Elektronenmikroskop</b> .....	361
17.9.1	Transmissionselektronenmikroskop (TEM) .....	361
17.9.2	Rasterelektronenmikroskop (REM) .....	362
17.9.3	Rastertransmissionselektronenmikroskop (STEM, scanning transmission electronmicroscopy) .....	362
17.9.4	Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) .....	363
17.9.5	Rasterkraftmikroskop (Atomic force microscopy, AFM) .....	363
17.9.6	Rastertunnelmikroskop (Scanning Tunnel Microscopy, STM) .....	363
17.9.7	Präparation für Elektronenmikroskopie .....	363
17.10	<b>Digitale Bildgebung</b> .....	365
18	<b>Qualitätssicherung im Labor</b> .....	367
18.1	<b>Projekt</b> .....	368
18.2	<b>Produkt</b> .....	371
18.3	<b>Prozesse</b> .....	372
18.4	<b>Projektteam</b> .....	374
18.4.1	Fehlermanagement (Messung, Analyse, Verbesserung) .....	374
18.4.2	Schulungen, Fortbildung (Management der Mittel) .....	375
18.4.3	Schnittstellen zu anderen Bereichen .....	376
18.4.4	Beschaffung .....	376
18.5	<b>Dokumente</b> .....	376

## Inhaltsverzeichnis

18.5.1	Vorgabedokumente .....	377
18.5.2	Formulare .....	378
18.5.3	Nachweisdokumente .....	378
18.6	<b>Faktor Mensch</b> .....	378
18.7	<b>Begriffe</b> .....	378
19	<b>Sicherheit im histologischen Labor</b> .....	383
19.1	<b>Chemische Arbeitsstoffe</b> .....	384
19.1.1	Aufnahme in den Körper .....	385
19.1.2	Metabolisierung und Ausscheidung .....	385
19.1.3	Der Begriff „Gift“ .....	385
19.1.4	Beurteilung der Gefährlichkeit .....	386
19.1.5	Kennzeichnung gefährlicher Stoffe .....	387
19.1.6	Sicherheitsdatenblatt .....	390
19.1.7	Grenzwerte .....	391
19.1.8	Gesundheitsüberwachung .....	393
19.1.9	Die Evaluierung .....	393
19.1.10	Maßnahmen im Labor zur Vermeidung von Gefahren .....	394
19.2	<b>Biologische Arbeitsstoffe</b> .....	395
19.3	<b>Wohlfühlfaktor am Arbeitsplatz</b> .....	396
19.4	<b>Gesetzliche Richtlinien</b> .....	397
19.4.1	Arbeitsnehmerschutzrecht .....	397
19.4.2	Mutterschutzgesetz .....	398
19.4.3	Chemikaliengesetz .....	398
19.4.4	Verordnung über biologische Arbeitsstoffe .....	398
19.4.5	Abfallwirtschaftsgesetz und Abfallverordnung .....	399
19.5	<b>Auflistung von Chemikalien im Histolabor</b> .....	399
20	<b>Geschichte der histologischen Technik</b> .....	415
20.1	<b>Zeittabelle</b> .....	417
20.2	<b>Persönlichkeiten der historischen Histopathologie</b> .....	426
	<b>Anhang</b> .....	431
	Abkürzungsverzeichnis .....	432
	Quellen .....	434
	Bildnachweis .....	440
	Sachverzeichnis .....	442

# **1 Aufgaben der histologischen Technik / Pathologie**

Man könnte sagen: Der Zweck der histologischen Technik liegt darin, die Neugier des Menschen auf sein Inneres zu befriedigen.

Die medizinische Forschung versucht schon seit Jahrhunderten, die Geheimnisse des menschlichen Lebens zu ergründen. Mit den Leichenöffnungen im Mittelalter wurde die Anatomie erkundet. Der erste Riesenschritt gelang mit der Erfindung des Mikroskops (1621). Dazu musste man auch Techniken entwickeln, die es möglich machten, Präparate von Zellen und Gewebe herzustellen. Damit wurde der Schritt von der Makroskopie in die Mikroskopie gemacht. Die Techniken wurden immer mehr verbessert und die darstellbaren Strukturen immer kleiner. Die Elektronenmikroskopie brachte uns in die Zelle hinein. Und die Molekularbiologie zeigt uns die Welt der Erbinformation, der menschlichen Codierung. Wer weiß, wie der nächste Schritt aussieht?

Der **Pathologe** ist jener Mediziner, der die krankhaften Veränderungen im menschlichen Organismus untersucht. Er möchte herausfinden, wie diese Veränderungen aussehen und wodurch sie ausgelöst werden. Je nachdem, wie sich die Veränderung darstellt, wird er sie einer Erkrankung zuordnen können. Er liefert dem Kliniker Informationen, die für die Diagnose, Therapie und Prognose des Patienten ausschlaggebend sind.

Als Untersuchungsmaterialien dienen dem Pathologen einerseits gewonnene Zellen (Zytologie) oder Gewebe (Histologie). Früher lag die Hauptaufgabe des Pathologen in der Leichenbeschau (Obduktion) zur Feststellung der Todesursache und Erforschung des Krankheitsverlaufs. Dieser Teil wird zu Gunsten der morphologisch-mikroskopischen Untersuchung von biotischem Material zurückgedrängt.

Als moderne Gebiete in der Pathodiagnostik kommen die Techniken der Zell- und Gewebe-kulturen, Immunologie, Molekularbiologie und Gentechnik dazu.

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wird in diesem Buch nur die männliche Berufsbezeichnung verwendet. Es soll aber ausdrücklich betont werden, dass auch viele Frauen als **Pathologinnen** in der morphologischen Diagnostik arbeiten.

### Aufgaben der morphologischen Untersuchungen:

- Instrument der Vorsorgeuntersuchung (z. B. Portioabstrich)
- Sicherung der klinischen Diagnose
- Frühdiagnostik von Tumoren (z. B. Magenbiopsien)
- Diagnostik und Differenzierung von gut- und bösartigen Tumoren
- Erkennen von Stoffwechselerkrankungen, parasitären, bakteriellen, entzündlichen Erkrankungen
- Nachweis von immunpathologischen Vorgängen
- Informationen zur Therapiewahl
- intraoperatives Instrument zur Diagnosesicherung (Schnellschnittuntersuchung)
- Forschung

### Aufgaben der molekularbiologischen Methoden in der Histotechnik:

- Nachweis von Genmutationen zur Tumordiagnostik (Therapieansprechen bei bestimmten Mutationen in Tumorzellen, molekulare Medizin, Molekularpathologie) oder im Rahmen von Erbkrankheiten
- Untersuchung der genomspezifischen Wirksamkeit von Medikamenten
- Darstellung von viralen Erregern (Bsp. Human Papilloma Virus)
- allgemein Darstellung von Genen (DNA-Nachweis) und ihrer Expression (mRNA-Nachweis)
- Forensik
- Forschung

**Aufgaben der Elektronenmikroskopie:**

- allgemein Darstellung von Ultrastrukturen
- Nachweis von Viren
- bioptische Diagnostik von Niere, Leber und Muskel
- Forschung

**Aufgaben von Zell- und Gewebekultivierung:**

- Nachweis von Viren
- Herstellung von Antikörpern
- Zytogenetik
- Nachweis von zellschädigenden Substanzen (Gifte, Strahlung, Onkogene)
- Überprüfung von Medikamenten
- Tissue engineering (Gewebe- und Organersatz), Untersuchungen mit biomimetischen Materialien
- Forschung

**Aufgaben der Obduktion:**

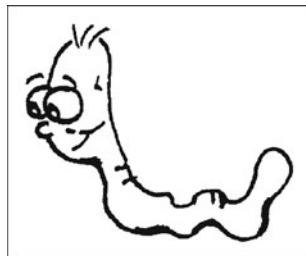
- Überprüfung der klinischen Diagnose und der Therapieeffekte
- Aussagen über Entstehung und Verlauf von Krankheiten
- Abklärung der Folgezustände von Krankheiten
- Erfassung der Todesursachen
- Grundlagen für Statistiken über Krankheiten und Todesursachen
- Erkennung von Erbkrankheiten (Familienplanung)
- Ausbildung von Medizinern
- Gerichtsmedizinische Erkenntnisse
- Forschung

Die unmittelbare Aufgabe der Histotechnik umfasst alle Prozeduren, die notwendig sind, um aus Gewebe **mikroskopierbare Präparate** zu fertigen. Im weiteren Sinne umfasst die Histotechnik auch die modernen Prozeduren, wo Gewebe in irgendeiner Form aufgearbeitet wird, um daraus Informationen zu gewinnen. Mit der Histotechnik verwandte Methoden findet man auch in der Botanik und in der Werkstoffanalyse.

## **2 Ablauf in einem histodiagnostischen Labor**

Dieses Buch will anhand des Ablaufs in einem histodiagnostischen Labor die grundlegenden Prozeduren der Histotechnik beschreiben. Im Weiteren werden noch Spezialtechniken bzw. Spezialgebiete behandelt.

Zur Veranschaulichung wollen wir den Standardweg einer Appendix verfolgen (Abb. 1).



■ Abb. 1

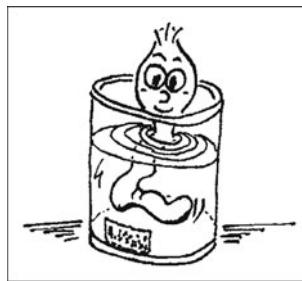
1. Unser Patient hat seit mehreren Tagen heftige Unterbauchschmerzen. Er beschließt sich in der chirurgischen Ambulanz untersuchen zu lassen und erfährt die Diagnose „Appendicitis“. Die **Operation** wird gleich angesetzt (Abb. 2).



■ Abb. 2

2. Während der Operation wird dem Patienten im endoskopischen Verfahren die Appendix entfernt. Wir erhalten ein **Operationspräparat**.

3. Um die Appendix möglichst gut zu erhalten, wird sie sofort in die **Fixierlösung** gebracht. Das Gewebe wird in einem mit Formalin gefüllten Probengefäß, das mit dem Datenetikett des Patienten beklebt ist, untergetaucht und „fixiert“ (Abb. 3).



■ Abb. 3

4. Der Chirurg füllt einen Begleitschein aus. Darauf findet man die Daten des Patienten und die **klinischen Angaben** zur Operation.
5. Gewebeprobe (Appendix) und Begleitschein werden ins Labor gebracht.
6. In der „Materialannahme“ im pathologischen Institut wird die Probe entgegengenommen. Dabei werden die Angaben auf dem Gefäß und dem Begleitschein überprüft. Die Gewebeprobe bekommt eine Einlaufnummer zur Identifikation. Die zugehörigen Daten werden im EDV-System erfasst.
7. Der nächste Schritt ist die „**makroskopische Beurteilung**“ der Appendix. Der Pathologe beschreibt Aussehen, Form, Größe und Besonderheiten an der Gewebeprobe. Ist die Appendix schon gut durchfixiert, wird sie zurechtgeschnitten. Die aussagekräftigen Teile der Appendix kommen in eine Kunststoffkassette (2,5 x 3 x 0,5 cm), die mit der Identifikationsnummer beschriftet ist (Abb. 4).
8. Gemeinsam mit vielen anderen Kassetten wird die Appendix über Nacht in einem **Einbettungsautomat** (*processing*) entwässert und dabei von der Fixierflüssigkeit in ein Paraffinbad übergeführt (Abb. 5).

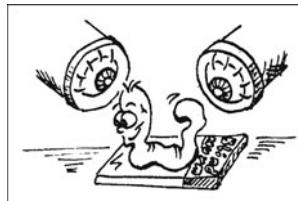


■ Abb. 4



■ Abb. 5

9. Am nächsten Morgen werden die Gewebestückchen in einen Paraffinblock ausgegossen (eingeblockt). Man hat nun einen kleinen Paraffinquader, in dem man die Gewebeteile erkennen kann. Dieser Quader ist fest verbunden mit dem gekennzeichneten Unterteil der Kunststoffkassette.
10. Der gekühlte Block kann nun in ein Mikrotom eingespannt werden. Mit diesem Gerät **schneidet** man mikrometerdünne Schnitte von der Appendix, die man auf Glasobjektträger aufbringt.
11. Diese Schnittpräparate werden mit der üblichen **Übersichtsfärbung** (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) angefärbt.



■ Abb. 6

12. Schließlich hat man ein fertiges histologisches Präparat, das zur **mikroskopischen Befundung** einem Pathologen vorgelegt wird (Abb. 6).
13. Der Pathologe erstellt einen histologischen Befund. In unserem Fall passt die Morphologie des Präparates mit der **Diagnose** „akute Appendicitis“ zusammen.
14. Der Befund wird in der Datenverarbeitung erfasst und an die Einsenderabteilung geschickt. Der Chirurg kann nun seinem Patienten die Bestätigung seiner klinischen Diagnose vorlegen. In ein paar Tagen wird dieser das Krankenhaus wieder verlassen können.
15. In der Pathologie werden alle Präparate im **Archiv** über viele Jahre aufgehoben. Der Befund ist Teil der Patientengeschichte. Der Rest der Appendix wird nach Fertigstellung des Befundes entsorgt.

Bei einem komplikationslosen Fall dauert es von der Entnahme des Gewebes bis zum histologischen Präparat ein bis zwei Tage, je nach Größe des Gewebes. Die Befundung des Präparates hängt von der Schwierigkeit des Falles ab, sollte üblicherweise aber auch innerhalb eines Tages erfolgen, sofern keine weiteren, technischen Verarbeitungen notwendig sind. (Hier wurde der Postweg ins Labor und zurück zum Einsender nicht berücksichtigt.)

#### Aus der kleinen Geschichte kann man vier Prozeduren der Histotechnik ableiten:

1. Fixierung
2. Einbettung (*processing*) und Ausblocken
3. Schneidetechnik (Mikrotomie)
4. Histologische Färbung

Außerdem kann man erkennen, dass die Qualität der Untersuchung nicht nur vom Labor allein abhängt. Auch die **Probengewinnung und -behandlung** vor dem Eintreffen im Labor ist Ausschlag gebend und sollte mittels „**Einsenderichtlinien**“ festgelegt werden. Im Allgemeinen sollte **Qualitätssicherung** im Labor groß geschrieben werden (Probenidentifikation, einheitliche Arbeitsvorschriften, Fehlermanagement etc.).

Im modernen Histolabor spielt natürlich auch die **elektronische Datenverarbeitung** eine immer größer werdende Rolle. Einerseits kann sie in der Textverarbeitung, andererseits in der Datenverwaltung und auch zur **Statistik und Befundauswertung** eingesetzt werden.

In letzter Zeit werden auch elektronische Systeme zur **Probenverfolgung** angeboten. Hierbei

werden die Proben und die produzierten Präparate mit Barcodes oder anderen Code-Systemen gekennzeichnet. Mit den entsprechenden Lesegeräten an den einzelnen Prozesspunkten lässt sich die „Spur“ der Probe verfolgen und in der EDV anzeigen. Idealerweise ist diese Anwendung mit der IT des Labors und den einzelnen Färbeautomaten kompatibel und erlaubt so bspw. eine online-Anforderung von weiteren Färbungen oder die Auswertung der gesammelten Daten (Umlaufzeiten, Anzahl bestimmter Färbungen, Leistungsabrechnung).

Da wir im Histolabor bleibende Präparate herstellen, die man als „Patientendokument“ ansehen kann, werden sie entsprechend den gesetzlichen Vorschriften jahrelang im **Archiv** aufbewahrt.

# 3 Biochemie

- 3.1 Aufbau der Zelle – 10**
  - 3.1.1 Zellkern (Nukleus) – 10
  - 3.1.2 Nukleolus – 10
  - 3.1.3 Cytoplasma – 11
  - 3.1.4 Endoplasmatisches Reticulum (ER) – 11
  - 3.1.5 Ribosomen – 11
  - 3.1.6 Mitochondrien – 11
  - 3.1.7 Lysosome – 12
  - 3.1.8 Peroxisome – 12
  - 3.1.9 Golgi-Apparat – 12
  - 3.1.10 Zentriol – 12
  - 3.1.11 Paraplasma – 12
  - 3.1.12 Zellmembran – 12
  - 3.1.13 Mikrovilli – 13
- 3.2 Gewebe-Bausteine – 13**
  - 3.2.1 Wasser – 14
  - 3.2.2 Salze – 14
  - 3.2.3 Proteine – 15
  - 3.2.4 Kohlenhydrate – 22
  - 3.2.5 Lipide – 27
  - 3.2.6 Nukleinsäuren – 29
  - 3.2.7 Bindegewebeaufbau – 30
- 3.3 Zusammenfassung – 33**

Um die Vorgänge bei der Fixierung und anderen histotechnischen Prozessen zu verstehen, sollte man über die Bestandteile von Gewebe bzw. Zellen und deren biochemischen Eigenschaften Bescheid wissen.

Der Inhalt des Kapitels „Aufbau der Zelle“ wurde zum Teil dem Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage © Urban & Fischer Verlag München entnommen. Für umfangreichere und detailliertere Erklärungen siehe die Lehrbücher von Zytologie, Histologie und Biochemie.

## 3.1 Aufbau der Zelle

### 3.1.1 Zellkern (Nukleus)

Die größte Organelle der Zelle ist durch die Kernmembran gegen das Zytoplasma abgegrenzt (poröse, Stoffaustausch ermöglichte Doppelmembran). Der Zellkern enthält in seiner Matrix (Karyoplasma, Karyolymph) Erb-

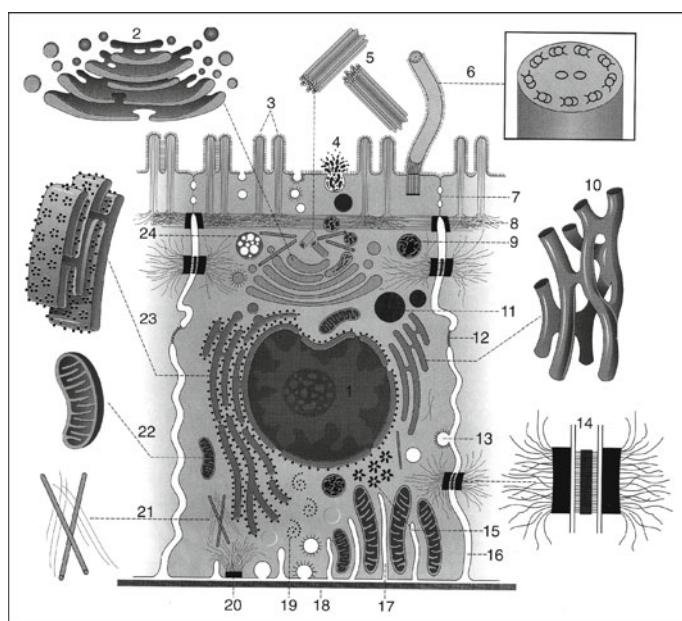
gut in Form der DNA, die bei der Mitose und Meiose als sichtbare **Chromosomen** erkennbar wird (Chromatin), und das **Kernkörperchen** (Nucleolus).

Er besteht zu 75 % aus Nucleoproteinen; u. a. an DNA gebunden, darunter Histone, und frei als Enzyme (siehe *Nukleoproteide Seite 15, Nukleinsäuren Seite 29*).

### 3.1.2 Nukleolus

Der Nukleolus beschreibt einen scharf begrenzten, homogenen, **RNA** und basische Proteine enthaltenden Raum im Zellkern; bildet sich solitär oder multipel in der späten Telophase an Nucleolar-chromosomen, wächst in der Interphase, löst sich zwischen Pro- und Metaphase auf oder ab.

Bildungs- und primärer Sammelraum für m-RNA, r-RNA und Ribosomen.



1 Kern mit Hetero- (dunkel) und Euchromatin (heller) sowie Nucleolus; 2 Golgi Apparat; 3 Mikrovilli (mit Glykokalix); 4 Sekretgranulum (mit Exozytose); 5 Zentriolen; 6 Kinozilie; 7 Zonula occludens; 8 terminales Netz mit Zonula adhaerens; 9 Lysosom; 10 glattes endoplasmatisches Retikulum (glattes ER); 11 Peroxisom (ein Zytosom); 12 Verbindung („gap junction“); 13 klathrinbedeckte Endozytosefigur; 14 Desmosom; 15 Glykogen; 16 Interzellulärspalt; 17 Einfaltung des basalen Labyrinths; 18 Lamina densa der Basallamina; 19 Polysomen; 20 Hemidesmosom; 21 Mikrotubuli und Keratinfilamente; 22 Mitochondrium; 23 raues endoplasmatisches Retikulum (raues ER); 24 multivesikulärer Körper

■ Abb. 7 Schematische Darstellung einer Epithelzelle mit den wichtigsten Organellen und typischen Oberflächen-differenzierungen. Einige der Zellbestandteile, die im Schnittpräparat zweidimensional erscheinen, sind zum besseren Verständnis dreidimensional und vergrößert herausgezeichnet.

### 3.1.3 Cytoplasma

Das Protoplasma der Zelle (in der Elektronenmikroskopie bezeichnet als „Hyaloplasma“, in der Biochemie als „Zytosol“, in den Muskelzellen als „Sarkoplasma“) ist durchsetzt von Zellorganellen, Neuro-, Tono-, Myofibrillen; ist der Ort des Glucosestoffwechsels, der Fettsäuresynthese, Porphyrinbiosynthese, der Aktivierung von Aminosäuren und deren Übertragung auf die t-RNA, des Abbaus von Aminosäuren und Pyrimidinen; steht in lebhaftem Stoffaustausch (meist über Carrier) mit den Mitochondrien; ist beteiligt (zusammen mit der Zellmembran an der Bildung von Pseudopodien, Mikrovilli etc.

### 3.1.4 Endoplasmatisches Reticulum (ER)

Das ER ist ein im Zellplasma (Endoplasma) gelegenes Zellorganell als System kommunizierender, bläschen- oder schlauchförmiger Hohlräume und konzentrischer Membran-Doppellamellen, welches mit dem kernnahen Raum (perinukleäre Zisterne) und, über den Golgi-Apparat, mit dem Extrazellulärraum verbunden ist; liegt in der Nähe des Zellkerns, ist v. a. bei Zellproliferation sowie in Drüsen-, Nerven- und Embryonalzellen reichlich ausgeprägt (fehlt aber in reifen, kernlosen Erythrozyten, in Thrombozyten und in Bakterien).

Die aus Phospholipiden und Proteinen bestehenden Wände enthalten RNA; sie sind z. T. mit Ribosomen besetzt (= **raues endoplasmatisches Reticulum**), z. T. aber ohne Ribosomenbesatz (= **glattes endoplasmatisches Reticulum**).

Die Rauform sieht man gelegentlich als dicht gelagerte parallele Zisternen = „**Ergastoplasma**“. Es enthält als „**Retikuloplasma**“ von den Ribosomen gebildete Polypeptide in Form von Granula, welche anschließend im Golgi-Apparat zur Endform der Proteine heranreifen; ist im Übrigen elektronenoptisch kontrastarm.

Wird in seiner Glattform gebildet durch Knospung aus der Rauform, von der auch die Kernmembran gebildet wird.

**Funktionen.** Polypeptid-Transport, Synthese von Glykogen, Potentialverteilung in der Zelle (Calcium-Ionen-Akkumulation), Entgiftung von Endo- und Exotoxinen.

### 3.1.5 Ribosomen

Bei allen Organismen in Vielzahl vorhandene, elektronenmikroskopisch kleine, runde bis ellipsoide Zellpartikel (15–25 nm), in denen die Biosynthese der Eiweißkörper stattfindet (Anlagerung von t-RNA an die Codons der m-RNA und Verknüpfung der aktivierte Aminosäuren).

Sie sind den Membranen des endoplasmatischen Retikulums angelagert (= gebundene Ribosomen; bilden v. a. Sekretproteine wie Verdauungsenzyme, Immunglobulin) oder frei im Zytoplasma, evtl. in Gruppen und v. a. zelleigene Proteine bildend. Sie enthalten basische Proteine, niedermolekulare Basen sowie v. a. RNA.

### 3.1.6 Mitochondrien

Stäbchenförmiges bis kugeliges Organell der Zellen, das zahlreich im Zellkörper der Eukaryonten vorkommt als „**Kraftwerk**“ der Zelle für die Umwandlung von Substraten in energiereiches ATP. Es besteht aus feingranulärem Grundplasma und zwei Elementarmembranen; von der inneren, eng der äußeren anliegenden Membran springen Falten und/oder Röhrchen, selten gestielte Bläschen in die Matrix vor (Crista-, Tubulus- bzw. Sacculus-Typ).

Die Matrix enthält außer DNA und RNA-Ribosomen zu Einheiten geordnete Multi-Enzymsysteme für den **Citratzyklus** und **oxidativen Fettäureabbau**.

In der inneren Membran sind für die **Atemskette** an ATP-Bildung beteiligte Enzyme eingelagert.

Die Mitochondrien sind halbautonom. Sie bilden einige ihrer Bauproteine selbst und sind zur identischen Vermehrung (= Reduplikation) befähigt.