

**Projekt Berzelius**

# **Workshop Mikroskopieren**

Modul:

**Herstellung von Dauerpräparaten**



## Modul Herstellung von Dauerpräparaten

### 1 Theoretischer Teil (Vorbereiten und Einbetten in Paraffin)

Der zeitliche Aufwand zur Herstellung von Dauerpräparaten ist sehr gross. In diesem Modul wird dieser Herstellungsprozess beschrieben. Teile davon wie zum Beispiel das Schneiden der Proben mit einem Microtome (Rotationsmicrotome) sowie das Färben der Schnitte weniger zeitintensiv und könne problemlos durchgeführt werden.

#### 1.1 Vorbemerkung

Die folgende Zusammenfassung wurde mehrheitlich der Broschüre «Paraffineinbettung und Schnittpräparation mit dem Mikrotom» der Firma Leica Microsystems entnommen.

([https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img\\_uploads/histology\\_systems/2010/Microtomy\\_booklet\\_german\\_online.pdf](https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/histology_systems/2010/Microtomy_booklet_german_online.pdf))

Die Präparation hochwertiger Schnitte für die Mikroskopierung erfordert Geschick und Erfahrung. Dieses Modul soll Anfängern in der Mikrotomie und Präparation von Paraffinschnitten als erste Orientierung dienen, während sie Erfahreneren die Auffrischung des vorhandenen Wissens ermöglicht. Sie deckt die wichtigsten Aspekte ab, die bei der Einrichtung und dem sicheren Betrieb eines Rotationsmikrotoms zur Präparation von Paraffinschnitten zu beachten sind.

#### 1.2 Proben richtig fixieren

Der wichtigste Schritt bei der Präparation histologischer Proben ist das Fixieren. Sie können beim Infiltrieren und Schneiden von Gewebeproben noch so sorgfältig vorgehen - die wirklich wichtigen morphologischen Details werden nur erkennbar, wenn das Gewebe unverzüglich und fachgerecht fixiert wird.

- Unzureichend fixierte Proben lassen sich fast immer schwerer schneiden als gut fixierte Proben.
- Unzureichend fixiertes Gewebe weist immer eine minderwertige Morphologie auf, selbst wenn es optimal infiltriert und sorgfältig geschnitten wird.

#### 1.3 Gewebe fachgerecht infiltrieren

Paraffinblöcke lassen sich nur dann mühelos schneiden, wenn eine gut fixierte Probe innerhalb eines angemessenen Zeitraums korrekt infiltriert wurde.

- Proben können ungenügend infiltriert (Probe zu gross, Zeitraum zu kurz) oder übermässig infiltriert (Zeitraum zu lang für Grösse und Art der Probe) werden. In beiden Fällen lassen sie sich nur schwer oder unter Umständen gar nicht schneiden.
- Mit Hilfe verschiedener Verfahren lassen sich auch aus schwierigen Blöcken Schnitte erzeugen.
- Wenn sich das Schneiden des Blocks schwierig gestaltet, weil das Gewebe hart oder brüchig ist, kann die freiliegende Fläche in kaltem Wasser oder einem Weichmacher eingeweicht werden, z. B. einer schwachen Reinigungsmittellösung, einem Gewebeweichmacher oder Mollifex<sup>TM</sup>.
- Bei kalkhaltigen Proben lassen sich unter Umständen mehrere Schnitte herstellen, wenn man auf das freiliegende Gewebe ca. 10 Minuten (oder länger) einen Oberflächenentkalker einwirken lässt. Spülen Sie die Blöcke gut ab, bevor Sie sie in den Probenhalter des

Mikrotoms einsetzen und den Schneidevorgang wiederholen, da die Andruckplatte des Messerhalters durch Rückstände des Entkalkers beschädigt werden könnte.

- Falls Sie aus einem Block gar keine Schnitte erzeugen können, weil die Probe unzureichend infiltriert wurde, ist unter Umständen eine erneute Infiltration notwendig.



Dieser Pankreas-Block wurde unzureichend fixiert und nach einem viel zu kurzen Protokoll verarbeitet. Er weist die typischen Zeichen einer ungenügenden Infiltrierung auf, die zu einer beträchtlichen Schrumpfung der Probe innerhalb des umgebenden Wachses führte. Das Gewebe war weich und schwammig und liess sich nicht schneiden. Daher war eine erneute Verarbeitung erforderlich.

## 1.4 Schritte für eine fachgerechte Infiltration

Sind die Proben (meistens tierische oder menschliche Gewebe) in Formalin gelagert, müssen vorgängig entsprechende Schritte unternommen werden. Diese Schritte sind hier nicht beschrieben.

### 1.4.1 Entwässerung

Formalin ist ein wässriges Medium, Paraffin ist ein hydrophobes Medium. Es lässt sich nicht mit Wasser mischen.

Während des Entwässerungsprozesses wird das ganze Wasser aus dem Gewebe verdrängt. Dazu dient eine Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration 70%, 80%, 96%, 100% (= aufsteigende Alkoholreihe)

Ethanol entzieht dem Gewebe das freie Wasser und löst dabei auch manche Zellbestandteile auf, die dann ausgeschwemmt werden. Bsp. Lipide. Obwohl gut fixiertes Gewebe kaum mehr für osmotische Veränderungen empfindlich sein sollte, ist es trotzdem noch durch die verschiedenen Reagenzien im Einbettungsprozess beeinflussbar. Deshalb ist es wichtig das Gewebe auch hier schonend zu behandeln. Schonende Behandlung wird erreicht durch geringe Gradationsschritte.

Langes Verweilen von Gewebe in absolutem Alkohol, macht es spröde und hart auf Grund der Entfernung von gebundenem Wasser aus Kohlehydraten und Proteinen.

Bei manueller Dehydrierung rechnet man bei 3-5mm dicken Gewebescheiben 2 – 4 Stunden pro Alkoholbad, wobei die Dauer in den hochprozentigen Alkoholen verdoppelt wird. (Im Automaten gibt es vorprogrammierte Abläufe für den Einbettungsprozess, der jeweils vom Gewebe und der Temperatur abhängig ist.)

Die Verwendung von je zwei Alkoholbädern ist sinnvoll, da das Erste meist durch Verschleppung verunreinigt wird. Das letzte Alkoholbad ist dann möglichst Wasserfrei.

## 1.4.2 Clearing

Da Paraffin nicht mit Wasser und Alkohol mischbar ist, braucht es ein Intermedium. Dies vermittelt zwischen Alkohol und Paraffin. Daher soll es gut mit Alkohol und Paraffin mischbar sein.

Wasser oder Alkoholverunreinigungen im Paraffin, führen zu einer schlechten Schneidbarkeit. Deshalb soll beides vom Intermedium komplett verdrängt werden.

Das Clearing (→ Aufhellen) bezieht sich darauf, dass diese Intermedien einen Brechungsindex haben, der ähnlich dem von fixiertem Gewebeprotein ist. Ist das Gewebe vollständig durchtränkt, wirkt es durchscheinend.

Meistens wird Xylol verwendet. Xylol gehört zu den cyclischen Kohlewasserstoffen und hat einen typischen Geruch. Es hellt das Gewebe schnell auf und macht es durchscheinend. Xylol wirkt härtend auf das Gewebe, deshalb sollte es nicht zu lange im Xylol verbleiben. Es ist als organisches Lösungsmittel fähig, Lipide aus dem Gewebe zu lösen. Xylol steht unter dem Verdacht krebserregend zu sein. Es kann zu Kopfschmerzen und Schäden am ZNS (zentrales Nervensystem) führen. Es wirkt hautreizend und entzündlich. Um mit Xylol zu arbeiten muss man sich mit entsprechenden Mitteln schützen. (Handschuhe, Schutzbrille, Labormantel, arbeiten nur unter einem Laborabzug!)

Unterdessen gibt es sehr gute Xylol-Ersatzmittel, die dem Xylol bezogen auf das Ergebnis sogar überlegen sind. Die Handhabbarkeit und Wirtschaftlichkeit sind jedoch gute Argumente für das Xylol. Auch die Tatsache, dass die Labormitarbeiter beim Einbettungsprozess im Automaten diesem Lösungsmittel nur wenig ausgesetzt sind, ist ein Argument dafür, das günstige Xylol zu verwenden.

Bei manueller Methode rechnet man bei 3-5mm dicken Gewebescheiben zwischen 4 -13 Stunden für das Clearing. Der Endpunkt wird durch das Beobachten der Gewebetransparenz bestimmt. (Im Automaten gibt es vorprogrammierte Abläufe für den Einbettungsprozess, der jeweils vom Gewebe und der Temperatur abhängig ist. Auch hier ist es Sinnvoll wegen der verschleppten Verunreinigung zwei Bäder zu verwenden.)

## 1.5 Proben sorgfältig einbetten

Das Einbetten ist ein wichtiger Schritt, der umsichtig angegangen werden muss. Andernfalls können sich bei der Mikrotomie grössere Schwierigkeiten ergeben.

- Einerseits ist eine unzureichende Füllung der Einbettkassette zu vermeiden, da dies zu einer instabilen Einspannung im Mikrotom und somit zu variierenden Schnittdicken und anderen Problemen führen kann.
- Andererseits darf die Kassette aber auch nicht überfüllt werden, weil dies die korrekte Ausrichtung der Schnittfläche des Blocks behindern könnte.
- Vor dem Einspannen sollte überschüssiges Wachs von den Aussenflächen der Kassette entfernt werden, um sicherzustellen, dass der Block beim Schneiden fest arretiert bleibt.
- Darüber hinaus ist auf die richtige Probenausrichtung zu achten



Beispiele für Kassettenfüllung: zu wenig Wachs (links), zu viel Wachs (rechts) und richtig befüllt (Mitte). Enthält die Kasette zu viel oder zu wenig Wachs, können bei der Mikrotomie Schwierigkeiten auftreten.

## 1.6 Schritte für eine wirkungsvolle Einbettung

### 1.6.1 Paraffin Infiltration

Unter Infiltration versteht man in diesem Fall das Eindringen von Paraffin, das meist auch als Einbettmedium genutzt wird, in die Gewebehohlräume bis zur Sättigung. Dafür muss das Paraffin flüssig sein. Dies geschieht durch Erhitzen des Paraffins über dessen Schmelzpunkt von 52° - 60°C

Die Infiltration mit niedrig schmelzendem Paraffin ist für das Gewebe schonender und hat eventuell auch Vorteile beim Erhalt von Antigenen.

Der Begriff Einbetten wird doppelt gebraucht. Zum einen als Synonym für Infiltration, zum anderen beim Ausgießen von Blöcken, in denen sich das Gewebe in bestimmter Orientierung befindet.

Paraffin verfestigt sich durch abkühlen, dabei ist es wichtig, dass ein ausgegossener Block möglichst schnell (auf einer Kühlplatte) abkühlt, damit er eine möglichst homogene feinkristalline Konsistenz erhält. Dies wirkt sich positiv auf die Schneidbarkeit aus.

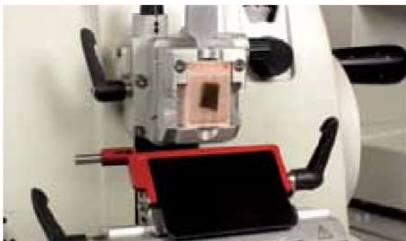
## 2 Praktischer Teil (Schnitte herstellen und färben)

### 2.1 Sicherheitsfunktionen korrekt verwenden

Machen Sie sich mit den Sicherheitsfunktionen des Mikrotoms, das Sie verwenden, vertraut und beachten Sie beim Schneiden einige Grundregeln.

- Die Mikrotommesser und Einwegklingen sind extrem scharf und können bei unsachgemässer Handhabung ernsthafte Verletzungen verursachen. Arbeitsunfälle drohen insbesondere, wenn Anwender abgelenkt oder unkonzentriert sind.
- Heben Sie Schnitte oder Wachsreste nicht mit den Fingern, sondern mit einer Pinzette oder einem Pinsel von der Klinge oder der Schneidfläche des Blocks ab.
- Um einen sicheren Betrieb zu gewährleisten, sind die Rotationsmikrotome von Leica mit einem Fingerschutz, einer Handradverriegelung und einer Handradbremse ausgestattet.
- Der Fingerschutz kann so eingestellt werden, dass die Messerschneide auf ihrer gesamten Länge abgedeckt ist.
- Die Handradverriegelung, mit der der Objektkopf in der oberen Endlage des Schneidehubs arretiert wird, ist beim Wechseln von Blöcken zu verwenden.
- Bevor ein Block in die Kassettenklammer eingespannt oder aus ihr entfernt wird oder der Block anderweitig bei eingespanntem Messer bzw. eingespannter Klinge im Einsatz ist, muss der Fingerschutz verwendet und das Handrad verriegelt werden.

- Mit der Handradbremse wird das Mikrotom bei einer beliebigen Handgriffstellung arretiert; diese Sicherheitsvorrichtung wird bei der Neuausrichtung eines Blocks oder beim Verstellen des Grobtriebs verwendet.
- Das Messer oder die Klinge sollte aus dem Mikrotom entfernt werden, wenn das Gerät unbeaufsichtigt ist oder gereinigt wird. Zu diesem Zweck lösen Sie am besten die Klammernklemmung, um die Klinge dann mit der Auswurfhilfe, die links am Fingerschutz angebracht ist, seitlich aus der Klammer zu schieben. Dann können Sie das Messer bzw. die Klinge mit einer Pinzette (nicht mit bloßen Fingern) oder dem Magnet am Ende des Leica-Pinsels sicher entfernen. Gebrauchte Klingen sind ordnungsgemäß in einem Sharp-Behälter oder in dem entsprechenden Aufnahmefach im Boden des Klingendispensers zu entsorgen.
- Legen Sie ein Messer oder eine Klinge nie mit nach oben gerichteter Schneide auf die Arbeitsfläche oder in eine Aufbewahrungskiste. Falls Ihnen eine Klinge aus der Hand rutscht, lassen Sie sie zu Boden fallen. Versuchen Sie unter keinen Umständen, sie aufzufangen (dies ist ein natürlicher Reflex, den Sie unterdrücken müssen).



Der rote Fingerschutz des Leica-Mikrotoms RM2235 wurde in dieser Abbildung nach oben geklappt. Er deckt die Schneidkante der Klinge vollständig ab.



Hier ist die Handradverriegelung dargestellt; das Handrad befindet sich in der 12 Uhr-Stellung und ist in dieser Stellung verriegelt. Die Verriegelung kann nur in dieser Stellung in der oberen Endlage des Schneidehubs aktiviert werden.



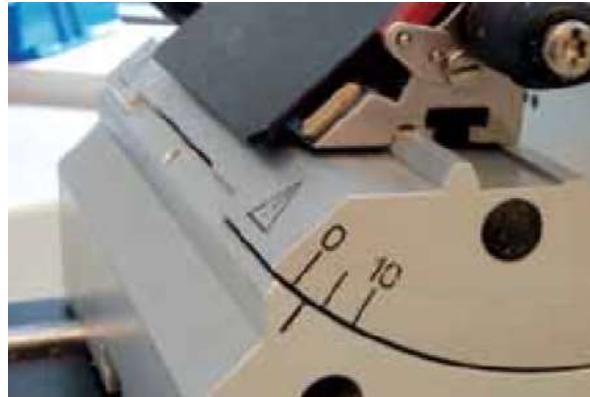
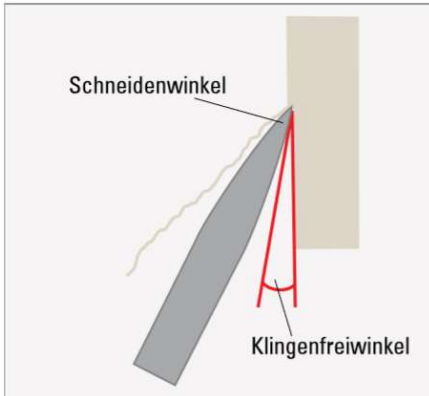
Diese Abbildung zeigt die verriegelte Handradbremse des Leica RM2235. Die Bremse kann in einer beliebigen Stellung des Handrads aktiviert werden. Unerwünschte Mikrotombewegungen können über die Handradverriegelung oder die Handradbremse verhindert werden.

## 2.2 Klingenfriewinkel optimal einstellen

Der Klingenfriewinkel ist verstellbar, denn nur bei einem optimalen Friewinkel erzielen Sie eine optimale Schnittqualität.

- Der Friewinkel verhindert, dass die Messerschneide die Schneidfläche des Blocks berührt.
- Der Schneidenwinkel ist der Winkel zwischen den beiden Schneiden, die die Schneidkante bilden. Für Routineschnitte eingesetzte Messer und Einwegklingen weisen einen Schneidenwinkel von ca. 35° auf, doch kann dieser Winkel je nach Klingentyp und Hersteller variieren.
- Daher muss der Friewinkel bei jedem Klingentyp optimal eingestellt werden.
- Stellen Sie den empfohlenen Winkel entsprechend der Richtlinien des Mikrotomherstellers ein. Für Messer und Klingenthaler von Leica wird ein Winkel zwischen 1° und 5° empfohlen.





## 2.3 Klingenlebensdauer maximieren

Ein paar ganz einfache Tipps helfen, die Lebensdauer der Klingen zu maximieren.

- Wenn Sie die Klinge reinigen, sollten Sie keinerlei Gegenstände an der Schneidkante entlangziehen. Selbst Zellstofffasern können die Klinge beschädigen.
- Berühren Sie die Schneidkante unter keinen Umständen mit harten Objekten wie einer Pinzette oder einem Pinsel.
- Nutzen Sie die Klinge systematisch, von einem Ende bis zum anderen. Damit können Sie jeden Bereich der Klinge maximal nutzen.
- Verwenden Sie einen Bereich der Klinge zum Trimmen und einen anderen Bereich für den endgültigen Schnitt oder setzen Sie für diese beiden Vorgänge separate Klingen ein.
- Bei Mikrotomen, die mit einem Rückzugmechanismus ausgestattet sind, verlängert sich die Standzeit der Klingen dadurch, dass die Probe beim Aufwärtshub von der Klinge abgerückt wird und sich somit an der Klingenrückseite keine Rückstände ansammeln können.

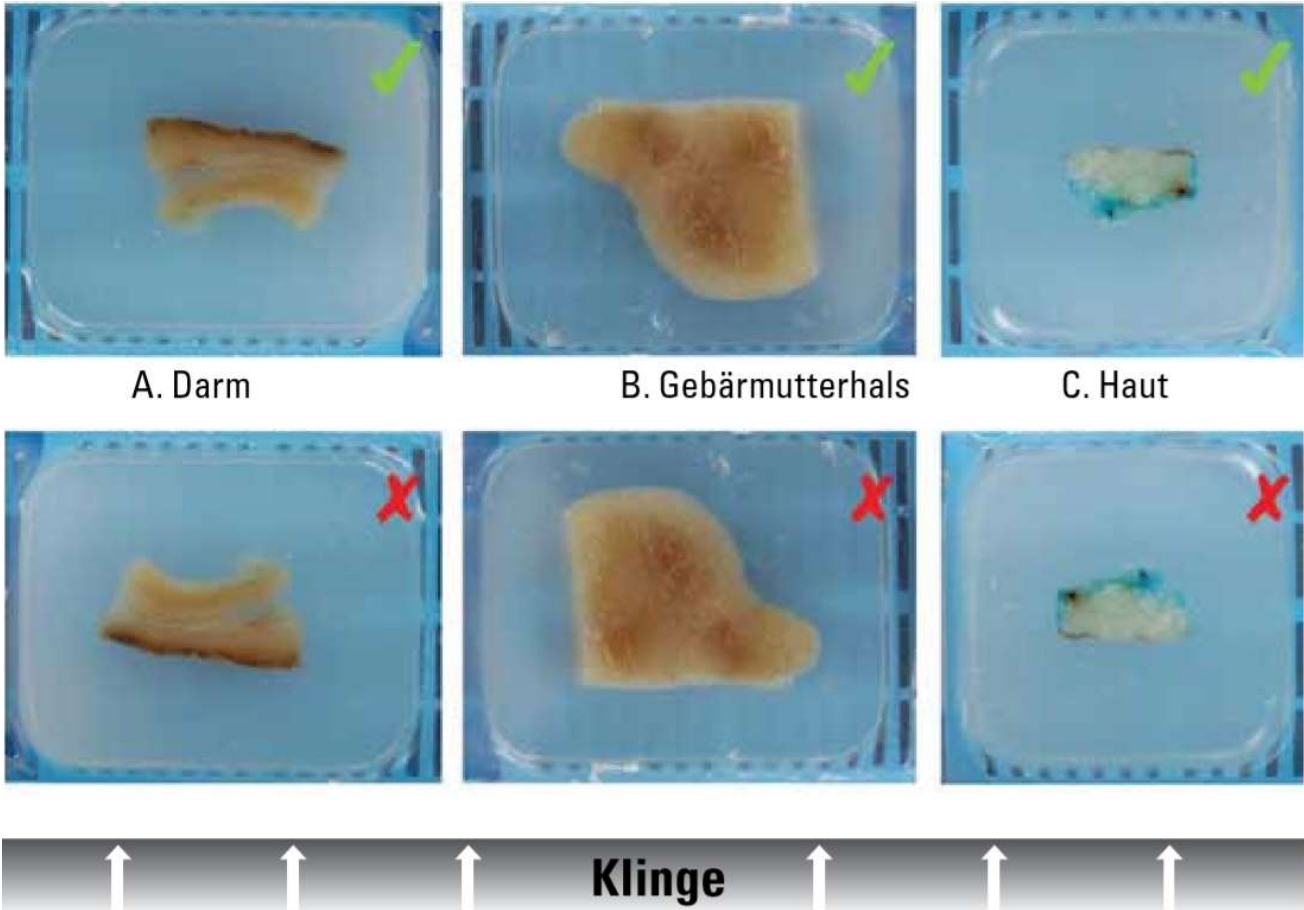
## 2.4 Proben korrekt ausrichten

Wie leicht sich beim Schneiden ein Schnittband erzielen lässt, ist unter anderem von der Ausrichtung der Probe gegenüber der Klinge während des Schneidehubs abhängig; somit hat die Probenausrichtung auch einen direkten Einfluss auf die Schnittqualität.

- In den meisten Labors werden alle Kassetten mit derselben Ausrichtung in die Objektklammer eingesetzt (d. h. Beschriftungsfeld links bei waagrechter Ausrichtung oder Beschriftungsfeld oben bei senkrechter Ausrichtung). Dies erleichtert die Grobbearbeitung mehrerer Blöcke vor der Erzeugung der endgültigen, hochwertigen Schnitte; somit können tiefere Schnitte oder Wiederholungsschnitte ohne übermäßige Gewebeverluste vorgenommen werden. Die Ausrichtung der Proben zur Klinge muss daher bereits beim Einbetten berücksichtigt werden. Diese Vorbedingung wird oftmals übersehen.
- Die Abbildung auf Seite 12 zeigt die bevorzugte Ausrichtung bei einigen typischen Proben. Sicherlich gibt es bei manchen Probentypen unterschiedliche Meinungen zur optimalen Ausrichtung; wichtig ist jedoch, dass die Ausrichtung auf jeden Fall berücksichtigt wird.
- Beispiel A. Darm: Die Klinge schneidet erst zum Schluss durch die Schleimhaut.
- Beispiel B. Gebärmutterhals: Die Klinge sollte nicht an einer geraden Kante, sondern besser an einer Stelle mit dichtem Gewebe angesetzt werden.
- Beispiel C. Haut: Die Klinge schneidet erst zum Schluss durch die Epidermis.
- Mikrotome wie das Leica RM2235 verfügen über eine Feinorientierung mit kalibrierten Bedienelementen, mit deren Hilfe sich ohne grössere Mühen eine Nullposition oder eine



messbare Variable auf der x/y-Achse bestimmen lässt. Diese Vorrichtung ist besonders beim erneuten Schneiden von Blöcken hilfreich, die bereits in anderen Labors oder auf anderen Mikrotomen präpariert wurden; ein unnötiger Verlust an Gewebe lässt sich dabei durch eine präzise Ausrichtung verhindern. Beim Schneiden mehrerer Blöcke in einem Routinelabor ist darauf zu achten, dass der Probenhalter vor Beginn des Schneidevorgangs für beide Achsen in eine Nullstellung gebracht wird. Dies lässt sich mit Hilfe der roten Indikatoren, der Rastpunkte und der Markierungen mühelos vornehmen.



## 2.5 Funktionsmerkmale des Mikrotoms und deren Verwendung

Bei Mikrotomen, die mit einem Rückzugmechanismus ausgestattet sind, wird die Probe beim Aufwärtshub von der Klinge abgerückt. Stellen Sie unbedingt fest, ob Ihr Mikrotom über einen derartigen Mechanismus verfügt.

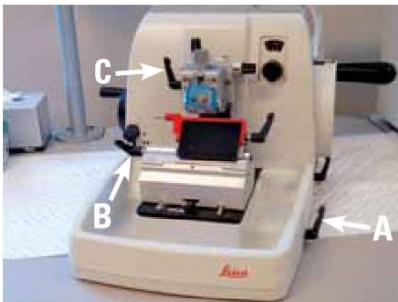
- Der Probenrückzug ist ein Funktionsmerkmal, das beim Schneiden signifikante Vorteile bietet und die Klingens Lebensdauer verlängert.
- Bei Verwendung eines Mikrotoms mit Probenrückzug muss die Ausrichtung der Schneidfläche des Blocks zur Messerschneide während des Abwärtshubs des Blocks vorgenommen werden (d. h. während der Probenzustellung, nicht während des Rückzugs).
- Wenn Sie während des Probenrückzugs nur einen geringen Abstand zwischen der Messerschneide und einem Block einstellen, wird der Block bei der nächsten vollen Umdrehung des Handrads um den Rückzugswert plus die ausgewählte Schnittdicke zugestellt (= nach vorn bewegt). Dabei wird eine besonders dicke Scheibe geschnitten, was zu einer Beschädigung von Probe und Klinge führen kann.

- Mikrotome gibt es in einer manuellen, einer halbautomatischen und einer vollautomatischen Version.
- Bei automatischen Geräten werden sich häufig wiederholende, manuelle Bewegungen, die zu Störungen des Bewegungsapparats führen könnten, reduziert.

## 2.6 Vorsicht beim Trimmen oder Grobbearbeiten

Diese Phase der Mikrotomie erfordert grosse Sorgfalt, da schnell ein Verlust von Gewebe von diagnostischer Signifikanz oder eine Beschädigung der Blockoberfläche eintreten kann.

- Vergewissern Sie sich vor dem Trimmen immer, dass alle Klemmvorrichtungen fest angezogen sind.
- Das Ziel beim Trimmen ist die konservative Offenlegung des Gewebes bis zu einer Tiefe, in der ein repräsentativer Schnitt erzeugt werden kann.
- Normalerweise wird eine Trimmstärke zwischen 10 und 30  $\mu\text{m}$  gewählt.
- Beim schnellen Grobtrimmen von sprödem Gewebe besteht die Gefahr einer Beschädigung der Probenoberfläche<sup>2</sup>. Gehen Sie daher insbesondere beim mechanischen Trimmen bei 30  $\mu\text{m}$  besonders umsichtig vor.
- Im letzten Schritt wird die Blockfläche durch einige vorsichtig ausgeführte, dünne Schnitte geglättet. Damit vermeiden Sie das auf Seite 24 in Abbildung 18B dargestellte Problem.



Der Klemmhebel A für die Messerhalterbasis, der Klemmhebel B für die seitliche Verschiebung sowie der Klemmhebel C für die x/y-Ausrichtung sollten fest angezogen sein, wenn Sie einen Block trimmen. Andernfalls können der Block und die Klinge beschädigt werden.



Die mechanische Trimmvorrichtung ist insbesondere bei der Grobbearbeitung in der unteren (..) Einstellung, mit der eine Zustellung von 30  $\mu\text{m}$  erzielt wird, vorsichtig einzusetzen.

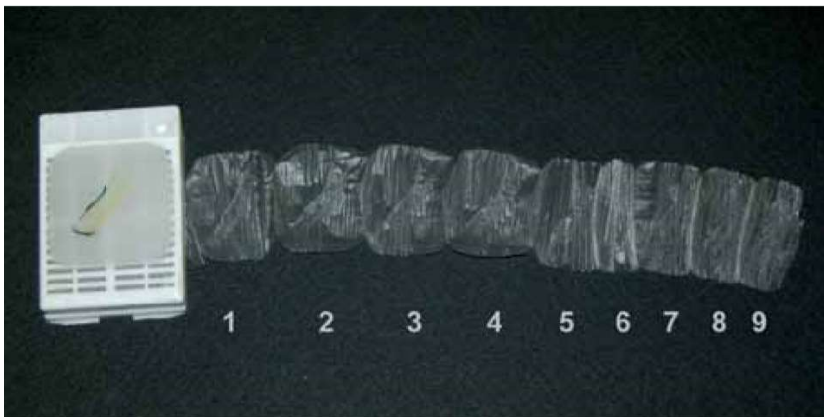


Vorsicht ist auch bei der Betätigung des Grobtriebrads während der Grobbearbeitung geboten, um nicht ungewollt dicke Schnitte zu erzeugen und damit die Probe zu beschädigen.

## 2.7 Berücksichtigung der Faktoren, die die Schnittstärke beeinflussen

Wählen Sie am Mikrotom die gewünschte Schnittstärke aus, doch beachten Sie dabei, dass die tatsächlich erzeugte Schnittstärke von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird.

- Ein zusammenhängender Schnitt mit einer Dicke von 4  $\mu\text{m}$  liefert unter Umständen mehr Informationen als ein Schnitt mit 2  $\mu\text{m}$ , der zahlreiche Brüche aufweist.
- Die ersten Schnitte eines Schnittbands weisen beim Schneiden eines kalten Blocks auf Grund der thermischen Ausdehnung<sup>3, 4</sup> unter Umständen eine grössere Schnittstärke auf, als am Gerät angezeigt wird (siehe die nachfolgenden Schnitte 1, 2 & 3).
- Weitere Faktoren wie die Rotationsgeschwindigkeit, der eingestellte Freiwinkel und der Zustand der Messerschneide können die tatsächliche Schnittstärke ebenfalls beeinflussen.



### Nur kalte Blöcke verwenden

Die beim Schneiden erzielte Qualität lässt sich in der Regel verbessern, wenn die Probe und das Wachs eine ähnliche Härte aufweisen. Aus diesem Grund sollten beim Schneiden in den meisten Fällen kalte Blöcke verwendet werden. Von grosser Bedeutung ist dabei die zum Kühlen des Blocks angewendete Methode.

- Kaltes Wachs bietet den härteren Anteilen einer Probe einen besseren Halt und ermöglicht somit geringere Schnittdicken.
- Legen Sie die Blöcke einige Minuten auf eine Kühlplatte oder eine kalte feuchte Oberfläche (z. B. einen abschmelzenden Eisblock).
- Wasser dringt in die oberen Schichten des Blocks ein und verursacht ein Aufschwellen des Gewebes, das sich auf diese Weise leichter schneiden lässt. Dies ist insbesondere wichtig bei zu stark entwässertem, trockenem oder brüchigem Gewebe.
- Wenn Sie die Blöcke in eine Gefriertruhe legen, können Oberflächenrisse entstehen; an diesen Stellen löst sich das Gewebe von dem Wachs. Zusammenhängende Schnitte lassen sich unter diesen Umständen nur schwer erzielen.



Die links dargestellten Schnitte wurden aus einem relativ warmen, nicht gekühlten Block geschnitten. Die rechts dargestellten Schnitte wurden aus demselben Block geschnitten, der jedoch zuvor auf abschmelzendem Eis gekühlt wurde.

## 2.8 Verfahren zur Herstellung gleichförmiger, hochwertiger und dünner Schnitte

Erfahrung lässt sich durch nichts ersetzen, doch gibt es gewisse Grundregeln, die die Aufgabe einfacher machen.

- Verwenden Sie einen Abschnitt der Klinge, der nicht für das Trimmen verwendet wurde.
- Achten Sie beim Grobtrieb darauf, dass Sie nicht ungewollt dicke Schnitte erzeugen, da auf diese Weise sowohl das Messer als auch die Blockfläche beschädigt werden können.
- Wenn der Block warm wird oder tiefere Gewebeschichten dargestellt werden sollen, muss der Block unter Umständen nochmals gekühlt werden.
- Grundsätzlich liefert eine langsame, gleichförmige Schneidbewegung die besten Ergebnisse bei einer geringstmöglichen Gewebestauchung.
- Die Schneidbewegung darf nicht unterbrochen und dann fortgesetzt werden, da dies innerhalb eines Schnitts zu Bereichen unterschiedlicher Dicke führt.
- In manchen Labors ist es eine gängige Praxis, die Schneidfläche des gekühlten Blocks unmittelbar vor dem Schneiden vorsichtig anzuhauen. Der warme, feuchte Atem fördert die interne Kohäsion der Schnitte, er verursacht jedoch auch eine thermische Ausdehnung, was wiederum zu dickeren Schnitten führt.
- Verunreinigungen an der Unter- oder Oberkante des Blocks oder der Rückseite der Klinge können die Kohäsion innerhalb eines gesamten Schnittbands beeinträchtigen und das Band während der Aufwärtsbewegung von der Klinge abheben. Entfernen Sie gegebenenfalls vorhandene Verunreinigungen, kühlen Sie den Block erneut und beginnen Sie dann nochmals von vorn.



Dieses Schnittband wurde mit einer langsamen und gleichmässigen Bewegung aus einem gut infiltrierten und gekühlten Block geschnitten. Die Schnitte weisen selbst vor dem Aufschwimmen nur eine sehr geringe Stauchung auf.

## 2.9 Richtige Auswahl von Objektträger und Beschichtung

Die Auswahl des Objektträgers und der Beschichtung sind abhängig von der Färbemethode, die daran anschliessend angewendet werden soll.

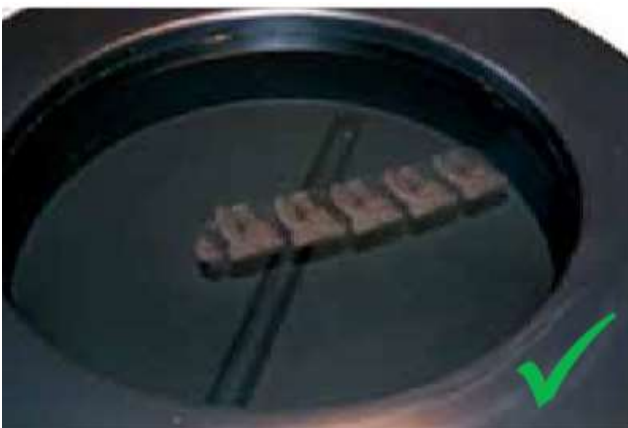
- Die Objektträger müssen fett- und staubfrei sein; achten Sie ausserdem auf eine ordnungsgemässe Lagerung und Handhabung.
- Wenn eine immunhistochemische Färbung (IHC, Antigen-Retrieval), eine in-Situ-Hybridisierung (ISH, Enzymvorbehandlung) oder eine längere Inkubation vorgesehen ist, sind geladene Objektträger oder Beschichtungen wie Aminoalkylsilan (AAS) zu verwenden. Einige Spezialfarbstoffe können ausserdem ein Ablösen der Schnitte verursachen, insbesondere wenn sie alkalische Reagenzien enthalten.
- Objektträger müssen immer präzise und entsprechend der jeweiligen Laborrichtlinien gekennzeichnet werden.



## Schnitte vorsichtig in Wasserbad aufschwimmen lassen

Beim Aufschwimmen soll sich der Schnitt auf die ursprünglichen Abmessungen ausdehnen und vollständig flach ausgebreitet werden.

- Achten Sie unbedingt auf die richtige Temperatur. Die Temperatur muss 5 - 9 °C unter dem Schmelzpunkt des Wachses liegen.
- Vergewissern Sie sich, dass das Wasser sauber und blasenfrei ist und keine Schnittreste enthält (zur Vermeidung einer Kreuzkontamination).
- Legen Sie die Schnitte mit der glänzenden Seite nach unten in das Wasserbad.
- Legen Sie die Schnitte mit einer vorsichtigen, streichenden Bewegung auf die Wasseroberfläche.
- Die Schnitte können leicht beschädigt werden, wenn Sie versuchen, Falten oder Blasen mit einem Pinsel oder einer Pinzette herauszustreichen.
- Untersuchen Sie jeden Schnitt beim Aufschwimmen an der Wasseroberfläche auf erkennbare Fehler.
- Lassen Sie den Schnitt nur so lange aufschwimmen, bis er vollständig flach ist. Bleibt der Schnitt zu lange im Wasser, kann die Morphologie in empfindlichen Bereichen gestört werden.
- Nehmen Sie die Objektträger vertikal aus dem Wasser, damit das Wasser gut ablaufen kann; auf diese Weise wird verhindert, dass der Schnitt vom Objektträger rutscht.
- Halten Sie die Objektträger noch kurz senkrecht, um überschüssiges Wasser abtropfen zu lassen, bevor Sie die Objektträger in einen Objektträgetrockner oder einen Wärmeofen stellen.
- Schnitte aus verschiedenen Blöcken dürfen nicht gleichzeitig in das Wasserbad gelegt werden. Selbst wenn die Schnitte von unterschiedlichen Proben typen stammen, besteht die Möglichkeit einer Kreuzkontamination und einer fehlerhaften Kennzeichnung durch Verwechslung. Daher ist ein derartiges Vorgehen immer zu vermeiden.
- Ziehen Sie Wasseroberfläche zwischen verschiedenen Proben mit einem fusselfreien Tuch ab, um die Möglichkeit einer Kreuzkontamination auszuschliessen.
- Um jegliche Verwechslungen zu vermeiden, sollten Sie immer nur Schnitte aus demselben Block in das Wasserbad legen.



Schnitte aus verschiedenen Blöcken dürfen nicht gleichzeitig in das Wasserbad gelegt werden. Selbst wenn die Schnitte von unterschiedlichen Proben typen stammen, besteht die Möglichkeit einer Kreuzkontamination und einer fehlerhaften Kennzeichnung durch Verwechslung. Daher ist ein derartiges Vorgehen immer zu vermeiden.

## 2.10 Objektträger ordnungsgemäss trocknen

Ein ordnungsgemässes Trocknen stellt sicher, dass die Schnitte vollständig entwässert und flach sind, keine Wärmeschäden aufweisen und sich beim Färben nicht abheben.

- Unter dem Schnitt befindliches Wasser muss vor dem Trocknen entfernt werden. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn die Objektträger auf einer flachen Wärmeplatte getrocknet werden.
- Objektträger können senkrecht in Objektträgerhalter gestellt und dann in einem Wärmeofen getrocknet werden.
- In der Regel sollte die Trocknungstemperatur 65 °C nicht überschreiten.
- Eine übermässige Erwärmung beim Trocknen kann Wassertropfen, die sich eventuell noch unter einem Schnitt befinden, zum Sieden bringen und dadurch entsprechende Schäden verursachen.
- Die Trocknungsdauer sollte zwischen 10 und 30 Minuten betragen.
- Bei manchen empfindlichen Proben stellen sich bei einer Trocknungstemperatur von 37 °C und einer längeren Trocknungsdauer (mehrere Stunden, teilweise über Nacht bis zum nächsten Tag) die besten Ergebnisse ein.

## 2.11 Mikrotom sorgfältig reinigen und instandhalten

Gewebereste und Paraffin sind nach der Verwendung des Mikrotoms unbedingt zu entfernen. Ausserdem ist eine regelmässige vorbeugende Wartung zu empfehlen.

- Reinigen Sie das Gerät täglich.
- Entfernen Sie vor der Reinigung immer das Messer oder die Klinge.
- Der Messerhalter lässt sich einfach entfernen, damit alle Bereiche für die Reinigung gut erreichbar sind.
- Entfernen Sie Schnittreste am besten mit einem trockenen Pinsel.
- Die Aussenflächen dürfen nicht mit Alkohol oder Xylol gereinigt werden, da sie nicht gegen diese Lösemittel beständig sind; generell ist der Kontakt mit Xylol zu vermeiden. Stattdessen wird ein Paraffinentferner, ein milder, handelsüblicher Haushaltsreiniger oder Seife und Wasser empfohlen.
- Achten Sie darauf, dass bei der Reinigung keinerlei Flüssigkeit in das Innere des Geräts gelangt.
- Lassen Sie das Gerät mindestens einmal pro Jahr durch einen qualifizierten Kundendiensttechniker überprüfen.
- Befolgen Sie die Wartungshinweise des Gerätehandbuchs und verwenden Sie die empfohlenen Schmierstoffe.

## 2.12 Das Färben

Damit die Strukturen unter dem Mikroskop gut erkennbar sind, müssen die Schnitte eingefärbt werden. Es gibt viele unterschiedliche Färbeprozesse, welche alle für bestimmte Probentypen (tierische Gewebe, pflanzliche Stoffe, Knochenmaterial etc.) optimiert sind. In der Regel werden zwei- oder mehrstufige Färbungen vorgenommen.

Die meisten Farbstoffe werden in wässriger oder alkoholischer Lösung aufgebracht. Das Hydrophobe und alkoholunlösliche Paraffin verhindert bzw. erschwert den Zugang der Farbstoffe zum Gewebe. Die Schnitte müssen vor der Färbung entparaffiniert und in ein wässriges Medium gebracht werden.

Entparaffiniert wird in Reagenzien, die auch als Intermedium beim Einbettungsprozess verwendet werden. Bsp. Xylolersatzmittel = Clearing Reagenzien.

In der Routinehistologie werden die warmen Objektträger direkt aus dem 56° - 60° Brutofen, wo die Schnitte ca. 30 min angetrocknet und das Paraffin verflüssigt wurde in die Clearinglösung eingestellt und gleichmässig bewegt. Ist das Paraffin nicht vollständig herausgelöst, wird die Färbung fleckig. Das lange Verbleiben in der Entparaffinierlösung hat keine negativen Auswirkungen auf das Gewebe.

Rehydriert wird gleich anschliessend mit einer absteigenden Alkoholreihe bis zum destillierten Wasser. Diese Schritte können auch automatisch ablaufen.

Der Entparaffinierte und rehydrierte Schnitt kann nun der histologischen Färbung zugeführt werden.

### 2.12.1 Protokoll HE- Färbung

Welches der Hämalaune zur Kernfärbung gebraucht wird, hängt von der Vorliebe des Betrachters ab. Die Intensität der Eosin Färbung und ihre Zusammensetzung können ebenso variieren. Das Färbeprotokoll wird entsprechend dem gewünschten Färbeergebnis erstellt.

Der pH-Wert der Hämalaunlösung liegt bei 3 – 4, der Farbton erscheint bräunlich-rot. Die gewünschte Blaufärbung erreicht man durch das anschliessend an die Färbung folgende Spülen in lauwarmem Leitungswasser (pH liegt um 7).

Ein Spritzer 1% Lithiumcarbonatlösung zum Leitungswasser erhöht die alkalische Wirkung. Zum Bläuen kann auch die Scott`sche Lösung gebraucht werden.

Regressiv färbende Hämalaune werden vor dem Bläuen in saurem Wasser (Aqua dest. mit einigen Tropfen Eisessig) differenziert.

Eosin wird immer im Überschuss angeboten und im Weiteren durch Wasser bzw. aufsteigende Alkoholreihe differenziert.

Bsp. HE Protokoll für Paraffinschnitte

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Schnitte entparaffinieren                     | 3 x 5 min    |
| 2. hydrieren in absteigender Aloholreihe         | je 1 - 2 min |
| 3. Kernfärbung in Mayer`s Hämatoxylin            | 10 min       |
| 4. In lauwarmem Leitungswasser spülen und bläuen | 10 min       |



5. Plasmafärbung in wässrigem Eosin Y + 1 Tropfen Eisessig auf 100 ml 2 min
6. Spülen in Leitungswasser
7. Differenzieren und entwässern in aufsteigender Alkoholreihe je 1 - 2 min
8. Klären in Xylolersatz 3 x je 1 – 2 min
9. Eindecken

Um Farbniederschläge zu verhindern kann man nach dem Hämatoxylin in saurem Aqua dest. spülen und dann erst mit Leitungswasser.

### 2.12.2 Unser HE Protokoll für Paraffinschnitte

- 1) Mit dem Microtome Probenschnitte aus einem Paraffinblock schneiden. Dicke ca. 6 bis 8 µm. Schnitte in ein Wasserbad von 40°C geben, damit diese sich glätten.
- 2) Paraffinschnitt aus dem Wasserbad auf einen Objektträger aufziehen
- 3) Objektträger 20 min. bei 70°C trocknen (Wärmeofen oder Wärmeplatte)

#### Entparaffinieren und Rehydrieren

- 4) Xylol (rein): 15 min
- 5) Alkohol 100%: ca. 20 s
- 6) Alkohol 100%: ca. 10 s
- 7) Alkohol 100%: ca. 10 s
- 8) Alkohol 95%: ca. 10 s
- 9) Alkohol 95%: ca. 10 s
- 10) Alkohol 70%: ca. 10 s (bis keine Streifen mehr sichtbar sind)
- 11) Dest. Wasser: spülen

#### Färben

- 12) Färben mit H&E-Lösung 1: 4 min
- 13) Leitungswasser: spülen 10s (3 Wasserbäder)
- 14) Salzsäure 0.1%: Differenzieren 10 s
- 15) Leitungswasser warm fließend: Bläuen bis Schnitte blau sind (ca. 6 min)
- 16) Färben mit H&E-Lösung 2: 20 s
- 17) Leitungswasser fließend: spülen 30 s

#### Dehydrieren

- 18) Alkohol 70%: ca. 20 s
- 19) Alkohol 95%: ca. 20 s
- 20) Alkohol 95%: ca. 10 s
- 21) Alkohol 100%: ca. 10 s
- 22) Alkohol 100%: ca. 10 s

- 23) Alkohol 100%: ca. 10 s
- 24) Xylol (rein): bis keine Streifen mehr sichtbar sind (eventuell in 3 Bädern aufgeteilt)
- 25) Mit Pertex und einem Deckgläschen abdecken
- 26) Trocknen lassen

### 2.12.3 Färbeergebnis HE Färbung

Zellkerne, Kalk grampositive Bakterien blau – violett

Cytoplasma, Kollagenfasern, Erythrozyten und restl. Gewebe in Rottönen

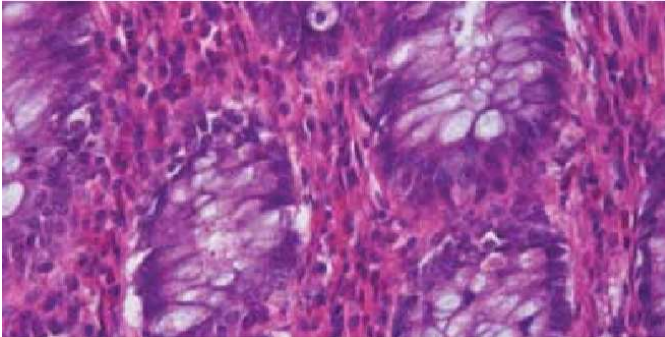
Es treten Effekte der Mehrfachfärbung auf: Es kommt nicht nur zur ausschliesslichen Anfärbung der Kerne durch Hämalaun sondern auch zur Anfärbung mit Eosin. Wobei die rote Farbe durch die Blaufärbung überdeckt wird. Dies führt zu einem schönen rotstichigen Blauton der Kerne.

Manche Hämalaunarten färben auch Schleime blau an.

## 2.13 Wiederkehrende Fehler erkennen und korrigieren

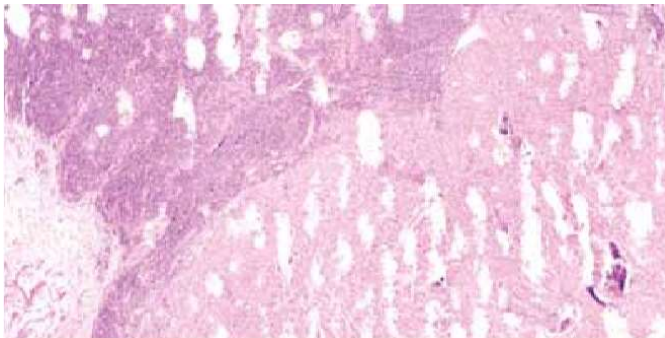
Die folgenden Fehler treten bei Paraffinschnitten häufig auf:

### A. Schnitt zu dick



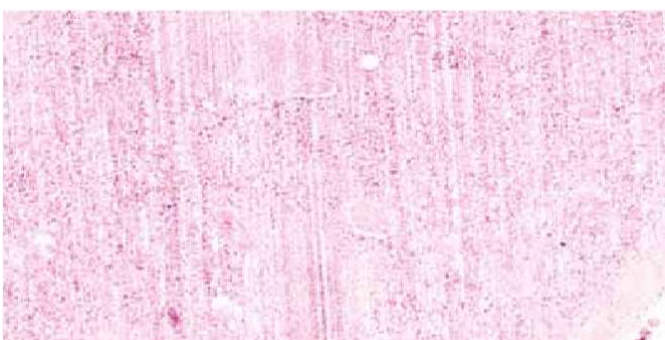
- Falsche Mikrometereinstellung
- Anhauchen des kalten Blocks, um das Schneiden zu erleichtern
- Verwendung des ersten Schnitts eines Schnittbands
- Zu hohe Schnittgeschwindigkeit
- Unzureichende Gewebeeinfiltration
- Neukalibrierung des Mikrotoms erforderlich

### B. Löcher in Folge von zu starkem Trimmen



- Block wurde zu schnell getrimmt
- Blockoberfläche wurde nach dem Trimmen nicht mit einigen dünnen Schnitten überschnitten
- Falsche Schnittdicke beim Trimmen
- Block beim Trimmen spröde (zu stark prozessiert?) oder zu kalt

### C. Messerspuren (vertikale Riefen in Schnitt)



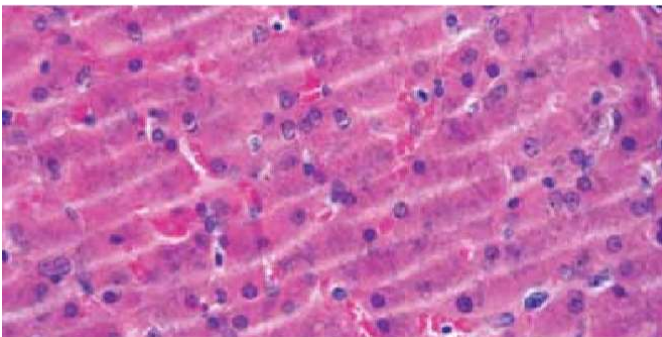
- Messer oder Klinge beschädigt
- Unzureichende Gewebeeinfiltration
- Block enthält hartes Material wie Kalk
- Verunreinigungen in ungefiltertem Wachs
- Proben enthalten ausgefälltes Puffersalz

## D. Gewebebrüche



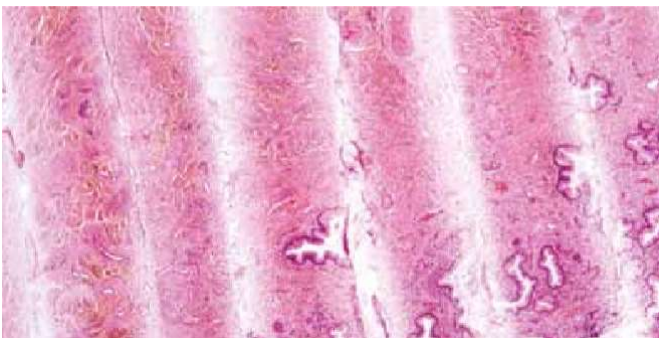
- Unachtsame Handhabung der Proben beim Trimmen
- Unzureichende Gewebeeinfiltration (unvollständige Entwässerung, Intermedium oder Infiltration)
- Unsanfte Behandlung während des Entfernens von Falten beim Aufschwimmen
- Zu lange Verweilzeit im Wasserbad oder zu hohe Temperatur des Wasserbads

## E. Feinrisse oder Mikro-Rattermarken



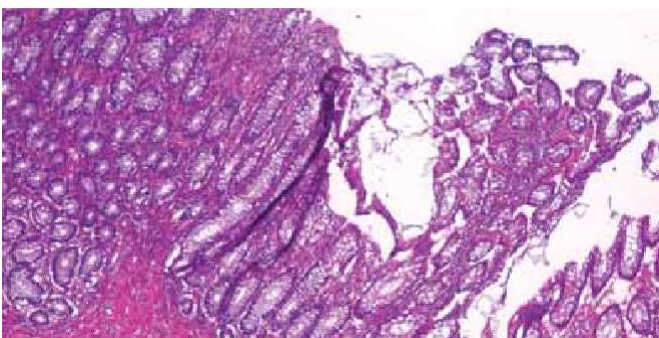
- Zu starke Infiltration des Gewebes (überprozessiert)
- Block zu kalt
- Zu hohe Schnittgeschwindigkeit
- Klemmvorrichtungen nicht fest angezogen
- Freiwinkel nicht korrekt eingestellt

## F. Grobe Rattermarken



- Klemmvorrichtungen nicht fest angezogen
- Sehr harte oder sehr grosse Probe
- Unzureichende Gewebeeinfiltration
- Freiwinkel nicht korrekt eingestellt
- Zu hohe Schnittgeschwindigkeit
- Mikrotomverschleiss

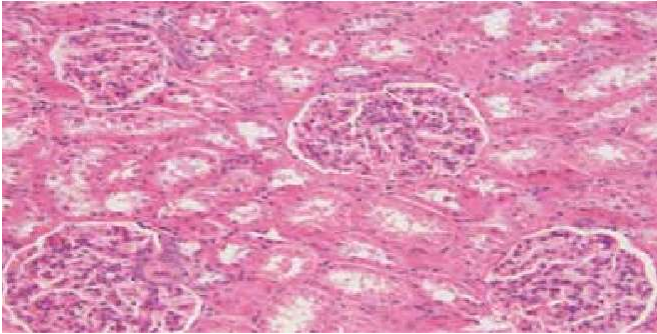
## G. Falten



- Unzureichende Streckung
- Unzureichende Fixierung und/oder Infiltration
- Warmer Block
- Zu geringe Schnittdicke
- Zu grosser Freiwinkel
- Temperatur des Wasserbads zu hoch

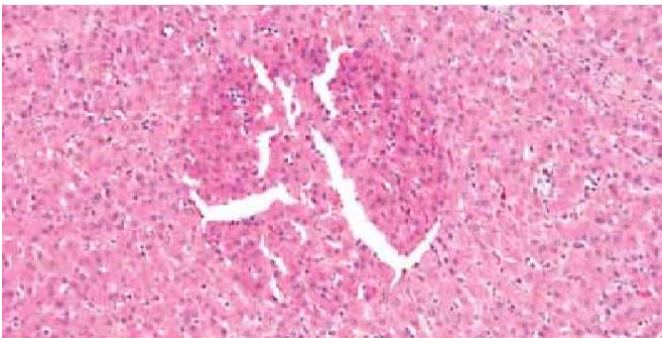


## H. Zu starke Stauchung



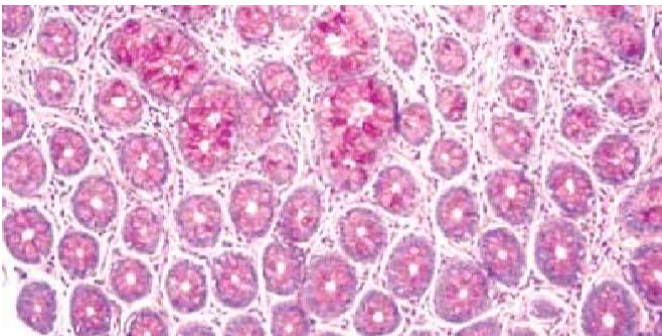
- Unzureichende Infiltration
- Warmer Block
- Zu hohe Schnittgeschwindigkeit
- Messerschneide stumpf
- Zu grosser Freiwinkel
- Schlechte Paraffinqualität

## I. Blasen unter dem Schnitt



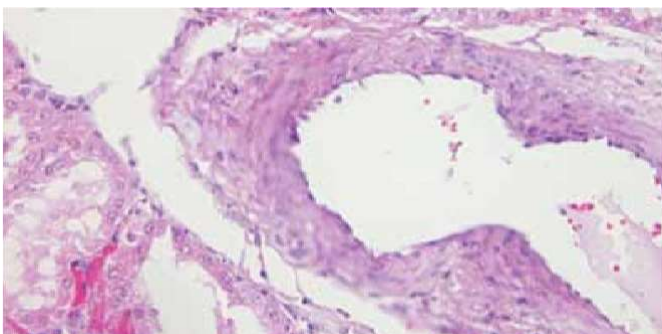
- Blasen am Boden und an den seitlichen Wänden des Wasserbads
- Beim Aufziehen des Schnittes auf den Objektträger Blasenbildung unter dem Schnitt

## J. Zu starke Ausdehnung beim Aufschwimmen



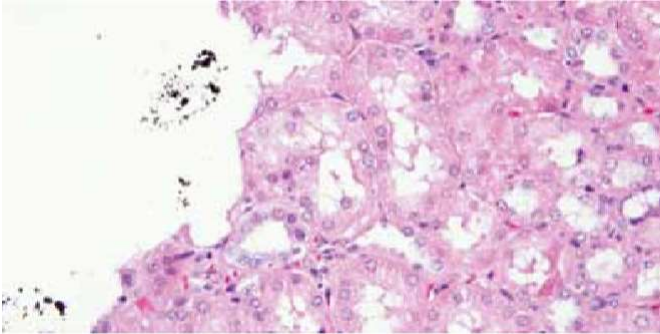
- Temperatur des Wasserbads zu hoch
- Verweildauer des Schnitts im Wasserbad zu lang
- Unzureichende Fixierung und/oder Infiltration (Lösemittelrückstände)

## K. Schnitt nicht flach (unzureichende Haftung)



- Unzureichende Qualität des Schnitts (Falten, Blasen)
- Wasserbad zu kalt
- Verwendung nicht beschichteter Objektträger
- Schnitt nach dem Aufschwimmen nicht ausreichend abgetropft
- Trocknungsdauer zu kurz
- Trocknungstemperatur zu niedrig

## L. Staubreste



- Objektträger verschmutzt
- Verunreinigungen nicht von Oberfläche des Wasserbads entfernt oder Wasserbad kontaminiert
- Objektträger mit Schnitten in staubiger Umgebung
- Reste der Bleistiftmine nach Beschriftung