

Histologische Technik

Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer
Präparate in Unterricht und Praxis

Hans-Christian Burck

4. unveränderte Auflage



Thieme

Hans-Christian Burck

Histologische Technik

Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer
Präparate in Unterricht und Praxis

47 Abbildungen, 8 Tafeln mit 31 zum Teil
farbigen Einzeldarstellungen und 11 Tabellen

4., unveränderte Auflage



1981

Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Prof. Dr. med. HANS-CHRISTIAN BURCK
Städtisches Krankenhaus
D-2300 Kiel

Du kannst es vielleicht nicht erreichen, mit dem Auge so weit zu dringen wie (der durch die Schärfe und Weitsicht seiner Augen berühmte) Lynkeus, aber du sollst es auch nicht verschmähen, dich wie ein Triefäugiger (d. h. Augenschwacher) mit Salben behandeln zu lassen (um dadurch deiner Augenschwäche aufzuhelfen).

HORAZ

(Übersetzung aus der Vignette von Seite II)

CIP-Kurztitelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Burck, Hans-Christian:

Histologische Technik : Leitf. für d. Herstellung
mikroskop. Präparate in Unterricht u. Praxis /
Hans-Christian Burck. – 4., unveränd. Aufl. –
Stuttgart ; New York : Thieme, 1981.

- 1. Auflage 1966
- 2. Auflage 1969
- 3. Auflage 1973
- 1. italienische Auflage 1969
- 1. polnische Auflage 1975
- 1. spanische Auflage 1969

Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden *nicht* besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann also nicht geschlossen werden, daß es sich um einen freien Warennamen handele.

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Verbreitung sowie der Übersetzung, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (durch Photokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

© 1966, 1981 Georg Thieme Verlag, Herdweg 63, Postfach 732, D-7000 Stuttgart 1
Printed in Germany

Satz und Druck: Druckhaus Dörr, Inhaber Adam Götz, Ludwigsburg

Vorwort zur 3. Auflage

Bei der erneuten Überarbeitung ist wieder versucht worden, das Buch mehr an Inhalt als an Umfang gewinnen zu lassen. So wurden auch jetzt einige inzwischen erkannte Lücken geschlossen und die Gerätebeschreibung sowie Färbemethoden auf einen neuen Stand gebracht. Dabei möchte ich den Rezensenten und Anfragenden für ihre konstruktive Kritik danken. Um den bewährten Rahmen der Taschenbuchreihe nicht zu sprengen, waren natürlich der Erweiterung enge Grenzen gesetzt, so daß wieder der Auswahl eigene Erfahrungen oder eigene besondere Neigungen zugrunde liegen, wofür der Leser Verständnis haben möge. Das erneut stark erweiterte Literaturverzeichnis dürfte bei den unbeantworteten Fragen hilfreich auf die Spur führen. Da bereits anderweitig ausreichend dargestellt, wurde auf die Erläuterung des Mikroskops, der Elektronenmikroskopie, Histoautoradiographie und Hämatologie sowie von botanischen und zoologischen Bearbeitungsproblemen abgesehen. Dagegen schien die Überbeanspruchung der Messerschleifanstanlen und die Verbesserung der Schleifautomaten es zu rechtfertigen, zum billigeren und vielleicht besseren, sicher aber schonenderen Selbstschleifen anzuregen. Eine neue Auflage sollte immer so viele und gute Änderungen bringen, daß auch Leser der alten Auflage neue Informationen finden. Hierum habe ich mich bemüht. So bleibt auch weiterhin das Ziel des Buches, für Anfänger ein Rüstzeug, für Eingeweihte neue Möglichkeiten, für Erfahrene interessante Aspekte, dem Könner ein griffiges Nachschlagebuch und dem Lehrer pädagogische Anregung zu vermitteln. Man bedenke: *Nihil est ab omni parte beatum.* (Horaz, Od. II 16, 27)

Tübingen, im Januar 1973

HANS-CHRISTIAN BURCK

Vorwort zur 1. Auflage

Wer dieses Büchlein zur Hand nimmt, wird von vornherein nach Format und Umfang nicht erwarten, daß die histologische Technik erschöpfend, gleichsam als „Handbuch en miniature“, abgehandelt wird. Die Fülle des Stoffes ließe sich durch keinen drucktechnischen Kunstkniff in ein leserliches Konzentrat dieses Volumens pressen. So stehen die Gesamtschau und die Ordnung des Stoffes, also der innere Sinnzusammenhang, vor jeglichem Vollständigkeitsbestreben.

Der Anstoß zu einer handlichen Zusammenfassung wichtiger histologischer Methoden und einer schlichten Erläuterung ihrer theoretischen Grundlagen kam aus Unterrichtserfahrungen für medizinisch-technische Assistentinnen und aus dem Umgang mit Studenten, die sich zu einer morphologischen Arbeit entschlossen haben. Die stürmische technische Entwicklung hat natürlich auch die ehrwürdige Disziplin mikroskopischer Forschung erfaßt. Daher wurde der Versuch

gewagt, den traditionellen Stoff in einen naturwissenschaftlich orientierten Rahmen zu stellen und ihn um die Fortschritte der letzten Jahre zu ergänzen, wobei Details soweit aufgenommen wurden, daß man mit diesen Vorschriften ausgerüstet startklar ist.

Der Akzent liegt auf der Zurichtung des Objekts zur mikroskopischen Untersuchung; das zur Betrachtung notwendige optische Inventar ist in zahlreichen Büchern bereits sehr gut erläutert und daher fortgelassen worden. Denn während der Lernende sich von den optischen Grundbegriffen trotz ihrer Bedeutung nur einmal einen Eindruck zu verschaffen pflegt, muß er auf die Rezepte und ihre wissenschaftlichen Voraussetzungen auch in der Praxis stets erneut zurückgreifen. Bei den Illustrationen wurden Färbungen ausgewählt, die im Rahmen einer Ausbildung weniger geprobt werden, um das Verständnis durch Anschauungsmaterial zu erleichtern und zur Anfertigung von Spezialpräparaten anzuregen. So war der Blick außer auf den pädagogischen Nutzen auch auf eine Bewährung in der Praxis gerichtet.

Auf diese Weise sollen die vorbereitenden Voraussetzungen für das Material bis zum Beginn der eigentlichen diagnostischen oder wissenschaftlichen Auswertung geschaffen werden. Als 1665 das erste brauchbare Mikroskop heutigen Konstruktionsstyps von ROBERT HOOKE in Form der auf dem Titelblatt dargestellten Abbildung veröffentlicht wurde, hatte man das Betrachtungsgerät, nicht aber die ausreichende Möglichkeit seiner Anwendung zur Verfügung. Die richtige Gewebspräparation folgte Jahre später nach. Heute halten sich Entwicklung und gegenseitige Beeinflussung von Optik und histologischer Technik vielleicht die Waage, obwohl auch jetzt neue differenzierte Geräte nur durch neue Aufbereitungsmethoden voll zur Nutzung kommen. So steht das Mikroskop nicht nur symbolhaft als Aufforderung an die histologische Technik am Anfang. Am Grundsätzlichen des mit beiden Hilfsmitteln Erkennbaren hat sich bis heute nichts geändert: auch die kleinsten Dimensionen werden von den Gesetzen der Natur bestimmt. So möge dieses Büchlein zur Vorbereitung jener Objekte anleiten, die uns lehren: *et in minimis natura latet*.

Meiner Mitarbeiterin Fräulein GABRIELE MARUHN danke ich für treue und gewissenhafte Unterstützung bei der Überprüfung der Rezepte. Wertvolle Hinweise erhielt ich dankenswerterweise durch Herrn Dr. HEINKE im Anatomischen Institut. Die Wachsplattenrekonstruktion verdanke ich Herrn Dr. HEINZEL aus unserem Institut. Herr K. H. SEEGER, Tübingen, besorgte mit Einfühlungsvermögen die Strichzeichnungen, wofür ich ihm auch hier danken möchte. Dem GEORG THIEME Verlag bin ich für die drucktechnische Gestaltung und namentlich für das Entgegenkommen bei der sachlich notwendigen Bildausstattung zu besonderem Dank verpflichtet.

Tübingen, im Herbst 1965

HANS-CHRISTIAN BURCK

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	V
Die chemischen Bausteine der Gewebe	1
Wasser	2
Salze	4
Proteine	6
Lipide	10
Sterine und Kohlenhydrate	12
Der chemische Aufbau der Zelle	14
Material und Entnahme	16
Native Untersuchungen	20
Vitalfärbung	21
Isolierungsmethoden	24
Rekonstruktionen	25
Korrosionspräparat, Tuscheinjektion	26
Fixierung	27
Grundbegriffe	27
Theorie des Fixierungsvorganges	28
Richtlinien für das Vorgehen	31
Reine Fixierungsmittel	33
Fixierungsgemische	42
Übersicht der Fixierungsmittel nach dem Untersuchungsziel	44
Kontrastieren und Nachkontrastieren	45
Beurteilung der abgeschlossenen Fixierung	46
Konservierung	48
Auswaschen	49
Entkalken und Erweichen	50
Einbettung	52
Entwässern und Härten	52
Paraffinmethode	53
Großobjekteinbettung für Ganzschnitte	58
Schnelleinbettung	60
Celloidineinbettung	63
Gelatineeinbettung	65
Carbowachseinbettung	66
Plexiglaseinbettung	67
Gefriertrocknung	71

Schneidetechnik	72
Mikrotome	72
Mikrotommesser und Schleifen	80
Schneidetechnik und Aufkleben	86
Behandlung vor und nach dem Färben	92
Färbung	96
Farben und Farbstoffe	97
Theorie des Färbevorganges	100
Färbevokabular	102
Physikalische und physiko-chemische Färbemethoden	104
Kernfärbungen	104
Plasmafärbungen	109
Übersichtsfärbungen	110
Trichromfärbungen zur Darstellung des Bindegewebes	112
Darstellung der elastischen Fasern	116
Silberimprägnation	118
Färbungen für neurohistologische Untersuchungen	123
Färbungen für Blutzellen	127
Spezialfärbungen für Zell- oder Gewebeteile (Fett, Glykogen, Schleim, Fibrin, Keratin, Kalk, Amyloid, Hypophyse, Herz- infarkt, Magenschleimhaut)	131
Histochemie	141
Pigmentnachweis	141
Adrenalinnachweis	144
Insulinnachweis, Eisenreaktion	145
FEULGENSche Nuklealreaktion, PAS-Reaktion	146
Methylgrün-Pyronin-Färbung	149
Saure Mucopolysaccharide	150
Enzymhistochemische Reaktionen (Oxydoreduktasen, Dehydro- genasen, Hydrolasen)	151
Fluorochromierung	164
Immunfluoreszenz	171
Histometrie	173
Anhang	
Gefahren im histologischen Labor	182
Übersicht über die Farbstoffe	183
Geschichtliche Übersicht	185
Literaturhinweise	187
Firmenanschriften	190
Sachverzeichnis	191

Die chemischen Bausteine der Gewebe

Aus der Sicht des Morphologen sind die Lebewesen aus Zellen und Zwischensubstanz, aus Geweben, Organen und Organsystemen aufgebaut. Für den Biochemiker haben Einzelheiten dieser Strukturen zweitrangige Bedeutung; für ihn steht ihr Stoffwechsel im Vordergrund, der das Wesen des Lebendigen ausmacht und erhält. Die Beschäftigung mit der Struktur, die die histologische Technik ermöglichen soll, und mit der Funktion, die auf die Gebilde bezogen werden muß, setzt eine Kenntnis des Materials voraus, aus dem die Gewebe bestehen und die im Rahmen des Stoffwechsels umgesetzt werden. Zahlreiche Methoden der histologischen Technik haben zum Ziel, diese Substanzen im Mikroskop sichtbar zu machen.

Der Organismus ist aus anorganischen und organischen Stoffen aufgebaut. Nach Zahl und Konzentration machen die *anorganischen Bestandteile* den geringeren Teil aus, obwohl sie für die Lebensprozesse mindestens die gleiche Bedeutung haben (Tab. 1). Mit Ausnahme des Wassers liegen sie überwiegend in Form von Salzen vor, so daß sie durch die Eigenschaft, in Ionen zu zerfallen, ihre Wirkung entfalten. Sie sind teilweise in Wasser gelöst, teilweise ungelöst und dann an der Bildung der Strukturen wesentlich beteiligt (z. B. Knochen). Ein Salzgehalt von genau bestimmbarer Konzentration und von einem Mischungsverhältnis, das nur wenig schwanken darf, ist für den geordneten Ablauf der Lebensvorgänge unerlässlich. Abweichungen von diesem genau äquilibrierten Milieu stören die Stoffwechselprozesse und können zu mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen führen. Der richtige Dissoziationsgrad und das Zusammenwirken der anorganischen Salze ist entscheidend an der Einstellung und Erhaltung des pH-Wertes der Zellen und Flüssigkeiten des Organismus beteiligt. Die Pufferwirkung wird hingegen im wesentlichen von den Eiweißen übernommen. Labile organische Strukturen, wie die Eiweiße, benötigen ihrerseits zur Erhaltung ihres Zustandes ein konstantes pH. Der Ablauf biologischer Reaktionen ist ebenso pH-abhängig. Die Anwesenheit einiger Salze ist für die biochemischen Umsetzungen deswegen unentbehrlich, weil die steuernden Fermente durch einige Ionen aktiviert, durch andere gehemmt werden. Diese „spezifische Ionenwirkung“ wird schon von sehr geringen Konzentrationen erreicht. Salze müssen auch bei der Prüfung von Gewebsschnitten auf ferment-

Tab. 1. Anteile der großen Stoffgruppen an der Zusammensetzung eines Erwachsenen.

Wasser	70 %
Eiweiß	15 %
Fett	10 %
Mineralien	5 %

tative Aktivität in genügender Menge vorhanden sein, um eine volle Wirksamkeit zu erzielen.

Wesentliche Aufgabe einer gleichbleibenden Salzkonzentration ist die Aufrechterhaltung des *osmotischen Druckes* der Flüssigkeit in den Zellen und den Körperflüssigkeiten. Dieser beträgt nach eigenen Untersuchungen überall einheitlich 0,3 osm.

Der osmotische Druck einer Lösung kommt dadurch zustande, daß der gelöste Stoff sich im Lösungsmittel so verhält, als fülle er denselben Raum für sich allein in gasähnlichem Zustand aus. Das Bestreben eines Gases, einen möglichst großen Raum auszufüllen, ruft einen Druck hervor. Eine molare Lösung (1 Mol in 1 Liter gelöst) hat bei 0 ° C den gleichen osmotischen Druck wie 1 Mol Gas in 1 Liter bei 0 ° C (22,4 Atmosphären).

Unter *Osmose* versteht man die Diffusion von Flüssigkeiten durch Membranen, die nur die kleineren Moleküle des Lösungsmittels, nicht aber die des gelösten Stoffes hindurchlassen (semipermeabel). Dabei ist die Osmose stets so gerichtet, daß das reine Lösungsmittel aus der geringer konzentrierten, hypotonen Lösung in die hypertonische hinüberwandert. Dadurch kommt ein Ausgleich der Konzentrationsunterschiede und des osmotischen Druckes zustande.

Nachweis und Messung geschieht durch den Versuch von PFEFFER: Eine Salz- oder Zuckerlösung befindet sich in einer Zelle, die von einer semipermeablen Membran umschlossen wird und an der ein Steigrohr angebracht ist. Das umgebende reine Wasser diffundiert in Folge des osmotischen Druckes in die Zelle so lange hinein, bis der Druck der Wassersäule im Rohr den osmotischen Druck der Salzlösung kompensiert und kein weiteres Wasser gegen diesen Druck in die Zelle eindringen kann.

Da der osmotische Druck von der Zahl der vorhandenen Teilchen bestimmt wird, haben dissoziierte Verbindungen eine höhere osmotische Wirksamkeit als ihrer molaren Konzentration entspricht. Eine vollständig dissoziierte NaCl-Lösung hat im Vergleich zur Konzentration den doppelten osmotischen Druck. Daher wird die osmotische Maßeinheit (Osmolarität = osm) nicht nach der Molarität, sondern nach den Molen osmotisch wirksamer Substanz unter Annahme vollständiger Dissoziation in einem Liter Lösungsmittel angegeben (z. B. eine 150 mmol NaCl-Lösung ist 0,3 osm oder 300 mosm).

Zellen und umgebende Flüssigkeit sind im osmotischen Gleichgewicht, obwohl in der Zelle und in der extrazellulären Flüssigkeit bei gleicher Gesamtkonzentration unterschiedliche Mengen der einzelnen Salze nachgewiesen werden können (BURCK).

Wasser

Nach der Menge seines Vorkommens steht das Wasser an erster Stelle (Tab. 1). Dieser Platz gebührt ihm auch nach der biologischen Bedeu-

tung, da in ihm alle Stoffe transportiert werden und alle Reaktionen ablaufen. Die verschiedenen Organe haben einen ziemlich konstanten, untereinander aber einen sehr unterschiedlichen durchschnittlichen Wassergehalt (Tab. 2). Neben der Vehikelfunktion und der Eigen-

Tab. 2. Wassergehalt einzelner Organe und Flüssigkeiten
(in ‰)

Zahnschmelz	0,2	Lunge	79
Zahnbein	10	Herz	79
Knochen	22	Niere	80
Fettgewebe	30	Bindegewebe	80
Knorpel	55	Blut	80
Gehirn (Mark)	70	Gehirn (Rinde)	86
Leber	71	Lymph	96
Haut	72	Tränen	98
Muskeln	78	Schweiß	99,5
Pankreas	78	Speichel	99,5

schaft als Lösungsmittel steht die Bindung des Wassers an Kolloide, wie Eiweiß, Glykogen, Lecithin, Thymonucleinsäure u. a. an Wichtigkeit nicht zurück. Dieses Quellungswasser oder Hydratationswasser hat enge räumliche Beziehungen zu den Strukturen, trotzdem kann es zur Lösung von Salzen zur Verfügung stehen. Man kann auf diese Weise „freies“ und „gebundenes“ Wasser unterscheiden. Wechselnde Wasserbindung an die Kolloide und damit verbundene Mengenänderungen des „gebundenen“ Wassers rufen strukturelle Differenzierungen des Protoplasma hervor und ermöglichen ein Nebeneinander verschiedener Funktionen innerhalb derselben Zelle.

Innerhalb der Organe verteilt sich das Wasser auf drei Räume: 5 ‰ des Körpergewichts erreicht die Menge des Wassers im Blut, 15 ‰ in der interstitiellen Flüssigkeit und 50 ‰ innerhalb der Zellen. Dies entspricht etwa 3,5 kg Blutplasma, 10,5 kg interstitieller Flüssigkeit und 35 kg Zellwasser. Wasserverschiebungen laufen zwischen diesen Räumen sehr rasch ab. So nehmen die Tubulusepithelzellen der Niere innerhalb von 10 sec die Hälfte einer kleinen angebotenen Wassermenge auf. 73 ‰ des Blutwassers werden in jeder Minute mit dem extrazellulären Wasser ausgetauscht. Sollen vor einer histologischen Untersuchung Wasserumlagerungen zwischen den drei Räumen vermieden werden, so ist bei Parenchyomen mit lebhaftem Wasserwechsel, wie es in Tafel II (s. S. 105) veranschaulicht wird, immer höchste Eile nach der Entnahme der Gewebprobe geboten. Organe mit langsamem Wasseraustausch sind entsprechend weniger anfällig (Knochen, Sehnen, Haut).

Das Wasser spielt in der histologischen Technik eine zwiespältige Rolle. Sein Vorkommen in einem Präparat entzieht sich einem direkten Nachweis, weil Wasser nicht fixiert, bei Zimmertemperatur nicht geschnitten, nicht erhalten und histologisch nicht angefärbt werden kann. Selbst bei Anwendung der Gefrierschnitttechnik wird das Wasser anschließend aus dem Gewebe entfernt. Eine befriedigende histologische Darstellung des Wassers ist bis heute nicht gelungen. Auf sein Vorhandensein kann nur durch einige zuverlässige Hinweise geschlossen werden. Optisch leere Hohlräume innerhalb von Zellen gelten, wenn sie kein Fett enthalten (Vergleich mit einer Fettfärbung notwendig), als intrazelluläre Wasseransammlungen. Sie werden wie alle intrazellulären Hohlräume, in denen in vivo etwas enthalten war, im Schnittpräparat *Vakuolen* genannt. Hydropische Vakuolen beherbergen aber außerdem die im Wasser gelösten, nicht nachweisbaren Stoffe. Die Rückschlüsse auf den extrazellulären Wassergehalt durch Abschätzen der Weite der interstitiellen Saftspalten sind wegen der Austauschgeschwindigkeit des Wassers problematisch (vergl. Tafel II, S. 105).

Ohne die Verwendung von Wasser ist eine histologische Technik nicht denkbar. Es dient vor allem als Lösungsmittel für Puffer, Beizen und die meisten Fixierungsmittel und Farbstoffe, wofür es nur als Aqua destillata benutzt werden soll. Für histochemische Reaktionen ist immer Aq. dest., für Fermentuntersuchungen doppelt destilliertes Wasser erforderlich. Ständig benutzt wird Wasser zum Spülen und Auswaschen von Substanzen (wässern). Hierfür kann überwiegend Leitungswasser (Brunnenwasser) genommen werden; in einigen Fällen ist es sogar erforderlich. Das Leitungswasser hat entsprechend seinem Herkunftsort ein unterschiedliches pH, dessen Kenntnis vorteilhaft ist. Kalkhaltiges und basisches Leitungswasser machen leicht Niederschläge, was durch Abkochen verhindert werden kann. Beste Ergebnisse erzielt man meist mit fließendem Wasser (vergl. S. 49). Für zahlreiche histologische Verfahren muß das Wasser aus dem Gewebe entfernt werden. Für das Entwässern bieten sich mehrere Verfahren an (vergl. S. 52).

Salze

Unter den dissoziierten Salzen führen mengenmäßig als Kationen (positiv geladen) die Alkali- und Erdalkalimetalle Natrium, Kalium und Kalzium. Magnesium, Brom, Jod, Fluor, Eisen, Kupfer, Mangan und Zink werden vom Körper nur in so geringen Mengen gebraucht, daß man sie Spurenelemente nennt. Natrium, das fast ausschließlich extrazellulär vorkommt (sog. Säftekation), und Kalium, das intrazellulär stark angereichert wird (Zellkation), liegen vorzugsweise als Chloride vor und bestimmen so wesentlich die Höhe des osmotischen Druckes. In kleinen Mengen haben sie als Phosphat und Bikarbonat

Pufferwirkung. Der größte Teil der Phosphate und Karbonate ist an Kalzium gebunden, welches wegen des Vorkommens im Knochen in Form von Hydroxylapatit mengenmäßig an der Spitze aller anorganischen Salze steht.

Bei gleicher Gesamtkonzentration besteht zwischen Zelle und extrazellulärem Raum ein Ungleichgewicht an Kalium und Natrium. Durch Energieaufwand der Zelle wird Natrium heraustransportiert, Kalium in entsprechender Menge innerhalb der Zelle retiniert. Trotzdem steht die Zelle mit der Umgebung in einem osmotischen Gleichgewicht (0,3 osm). Eine Zunahme des osmotischen Druckes in der Zelle oder eine Abnahme des Druckes in der Umgebung verursachen durch Wasseraufnahme eine Zellschwellung. Bei umgekehrten Bedingungen schrumpft eine Zelle. Bei unzureichender Energiezufuhr (Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, beim Absterben etc.) genügt der aktive Ionen-transport nicht mehr den Erfordernissen zur Aufrechterhaltung dieses Ungleichgewichts. Dann dringt auf Grund der DONNAN-Verteilung Natrium in stärkerem Maße in die Zelle ein, als Kalium auswandert. Gegenüber dem Normalzustand einer Isoionie entsteht eine Dysionie, eine falsche Elektrolytverteilung (BURCK). Dabei steigt der intrazelluläre osmotische Druck auf 450 mosm an. Wird der Druck der Außenflüssigkeit nicht entsprechend erhöht, so schwellen alle absterbenden und ungenügend versorgten Zellen. Derartige Kunstprodukte sollen durch die histologische Technik möglichst vermieden werden. *Daher sollte man niemals unfixierte Organe oder Gewebsstücke mit Leitungswasser abspülen, ehe sie einer histologischen Aufarbeitung zugeführt werden.* Lösungen, in die frische, noch lebende oder gerade abgestorbene Gewebstückchen verbracht werden sollen, müs-

Tab. 3. **Verschiedene Blutersatzlösungen**
(Qualität nach rechts abnehmend, Angabe in Teilen)

Lösungen	BURCK-C ²	KREBS-III	TYRODE	RINGER
0,232 M NaCl	80	—	—	—
0,154 M NaCl	—	95	80	80
0,154 M KCl	4	4	2	2
0,11 M CaCl ₂	3	3	2	2
0,11 M MgCl ₂	—	—	1	—
0,154 M KH ₂ PO ₄	1	1	1/4	—
0,155 M MgSO ₄ · 7H ₂ O	1	1	—	—
0,154 M NaHCO ₃ pH 7,4	21	3	7	7
Na-phosphatpuffer pH 7,4	—	3	Na-phosphatpuffer: 100 Teile 0,1M Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O + 25 Teile 0,1M NaH ₂ PO ₄ · 1H ₂ O	
0,16 M Na-pyruvat	4	4		
0,1 M Na-fumarat	7	7		
0,16 M Na-l-glutamat	4	4		
0,3 M d-Glucose	5	5		

sen in ihrem osmotischen Druck darauf abgestimmt sein, daß die Zellen weder schwellen noch schrumpfen.

Die dem osmotischen Druck der Körperflüssigkeit entsprechende 0,9^{0/0}-ige NaCl-Lösung (0,3 osm) wird zwar wegen gleichen Druckes als „physiologische Kochsalzlösung“ bezeichnet. Ihre Verwendung ist aber nur ein Notbehelf, weil die Gewebstücke unter Nährstoff- und O₂-Mangel einen höheren osmotischen Druck (0,45 osm) erreichen und folglich schwellen. Entsprechend dem Vorkommen anderer Ionen kommen sogen. Blutersatzlösungen zur Anwendung, die diesem Problem besser Rechnung tragen: RINGER-, TYRODE- (Tab. 3) sowie KREBS-III-Lösung. Die KREBS-RINGER-Lösung enthält zusätzlich Nährstoffe. Alle diese Lösungen führen trotzdem zu Zellschwellungen, weil sie nur 0,3 osm erreichen. Bessere Ergebnisse erzielt man mit der Lösung BURCK-C² (Tab. 3). Diese Flüssigkeit eignet sich zur Aufbewahrung von noch nicht fixiertem Material und ist 0,45 osm. *Die richtige ionale Zusammensetzung und der richtige osmotische Druck einer Lösung sollten für alle Flüssigkeiten berücksichtigt werden, mit denen ein nicht vollständig fixiertes Gewebe in Berührung kommt.*

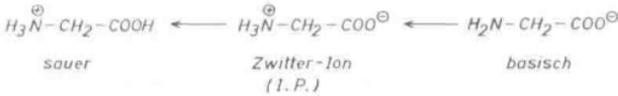
Proteine

Der Name *Eiweiß* geht auf das Vorkommen im Eiklar zurück. Ihm kommt eine umfangreichere biologische Bedeutung zu als den Fetten und Kohlenhydraten, weil es eng mit der *Struktur* des Lebendigen einerseits, andererseits mit dem Vorkommen der *Wirkstoffe* im Organismus (Enzyme, Hormone) verbunden ist. Nach dem heutigen Wissensstand ist ein Leben ohne Proteine unvorstellbar. Ihre Struktur ist wegen des hohen Molekulargewichtes und ihrer Labilität schwer aufzuklären. Die Eiweiße sind die wesentliche strukturelle Grundlage des Zellbaues und umgrenzen den Raum, in dem die Lebensprozesse ablaufen. Im Rahmen des Erhaltungsstoffwechsels wird für ihre Kontinuität gesorgt. Da sie verbrennbar sind, können sie aber auch als Energiespender zum Betriebsstoffwechsel herangezogen werden.

Die tierischen Proteine sind aus etwa 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut, die wegen dieser Zahl zu unendlich vielen Zusammenlagerungsmöglichkeiten kombiniert werden können. Hierdurch wird verständlich, daß sie individual- und artspezifisch sind. Diese kleinsten Bauelemente stellen organische Säuren dar, bei denen ein oder zwei Wasserstoffatome durch eine Aminogruppe ersetzt sind. Die einfachste Aminosäure ist das Glykokoll (NH₂-CH₂-COOH), die Aminoessigsäure, die dem Knochenleim einen süßlichen Geschmack gibt. Einige Aminosäuren enthalten außerdem Schwefel (Cystin, Cystein, Methionin), anderen sind Ringverbindungen angelagert (Histidin, Prolin, Tryptophan, Tyrosin).

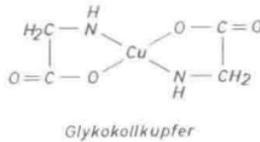
Die Aminosäuren können eine für die Karboxylgruppe charakteristische Reaktion geben (NH₂-CH₂-COO') oder sie können eine Reak-

tion wie primäre Amine zeigen ($^+NH_3-CH_2-COOH$). Dadurch verhalten sie sich Säuren gegenüber als Basen, Laugen gegenüber als Säuren. Weil sie mit beiden Salze bilden, nennt man dieses Verhalten amphoter (zwitterhaft). In der Mitte zwischen diesen beiden Formen ist die Aminosäure gleich stark positiv und negativ geladen, folglich elektrisch neutral:



Der pH-Wert, bei dem das elektrisch ausgeglichene Zwitterion vorliegt, ist der **isoelektrische Punkt**. Er bedeutet maximale Dissoziation ohne das Bestreben einer Salzbildung und minimale Lösungsstabilität, so daß Eiweiße bei diesem pH am leichtesten ausfallen.

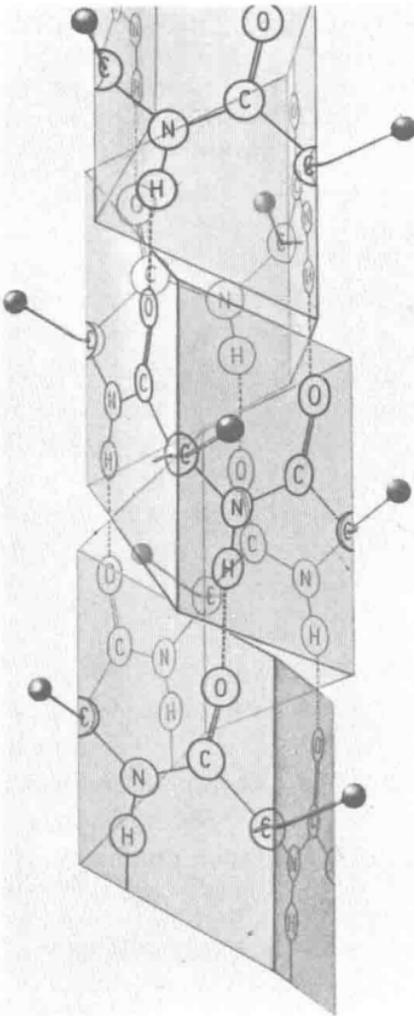
Aminosäuren bilden mit Schwermetallen komplexe Salze durch innere Bindungen, die sich schwer lösen (Chelate):



Die Reagibilität der Eiweiße wird auf diese Weise behindert, was bei der Fixierung mit Schwermetallsalzen zu berücksichtigen ist.

Die Zusammenlagerung der Aminosäuren zu Proteinen kommt durch Anlagerung einer Aminogruppe an eine Karboxylgruppe des nächsten Moleküls zustande (Peptidbindung). So entstehen Di-, Oligo- und Polypeptide als unverzweigte Kettenmoleküle (Aminosäuresequenz = Primärstruktur).

Diese Fadenmoleküle sind in sich unter weiterer Energiezufuhr in eine zusätzliche Raumordnung gebracht, die einer Spirale vergleichbar ist (α -Helixstruktur s. Abb. 1). Dieses System einer höheren Ordnung (Sekundärstruktur) wird durch Brückenbildungen zwischen den einzelnen Windungen stabilisiert, wie eine Wendeltreppe zusätzlich Halt durch ein durchlaufend befestigtes Geländer bekommt. Durch Lockerung dieser Bindungen wird leicht die wahrscheinlichere ungeordnete Form gewonnen. Die Helixstruktur gibt auch den Schlüssel zum Verständnis der *kolloidalen Löslichkeit* dieser hochmolekularen Stoffe, da Wasser in dieses Gebilde räumlich eingelagert werden kann. Dies Wasser ist zwar noch zur Lösung von Salzen „frei“ verfügbar, es ist aber dennoch „gebunden“ durch engere Beziehungen zu den Eiweißmolekülen (Hydratationswasser). Da außerdem auf Grund der Zwitterionen-Eigenschaft positive und negative Ladungen auf eine Distance



verteilt sind und so einen Dipolcharakter bewirken, stoßen sich die „wasserhaltigen“ Teilchen gegenseitig ab und halten sich in der Schwebe. Diese Eigenschaften eines lyophilen Kolloids müssen berücksichtigt werden, wenn bei der Fixierung das Eiweiß aus diesem Gleichgewichtssystem herausgebracht werden muß (vgl. S. 27 f).

Unter „Tertiär“struktur versteht man die räumliche Zusammenlagerung mehrerer Moleküle zu größeren geordneten Einheiten, den Micellen, wie sie für die globulären Proteine wichtig sind. Nur beim Häm- und Myoglobin ist sie bekannt. Nach ihrer Gestalt lassen sich Sphäroproteine mit Kugel- oder Ellipsoidgestalt und Linearproteine unterscheiden. Sie haben entsprechend verschiedene äußere Formen.

Abb. 1 Modell der α -Helix von Polypeptiden nach PAULING und COREY mit gefalteten Peptidgruppen (Flächen) und Seitenketten (Kugeln). (Aus P. KARLSON, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 6. Aufl., Thieme, Stuttgart 1967).

Die Strukturveränderung eines Proteins unter Verlust der biologischen Eigenschaft (Enzym- oder Hormonwirkung), Verringerung der Löslichkeit und Änderung chemischer und physikalischer Eigenschaften nennt man *Denaturierung*. Sie entspricht dem Übergang von einem geordneten in einen ungeordneten, wahrscheinlicheren Zustand und kann reversibel oder irreversibel sein.

Die Eiweißkörper lassen sich in einfache und zusammengesetzte Eiweiße, Proteine und Proteide einteilen. Nach Molekülgröße, Zusammensetzung, Verhalten und Vorkommen sind weitere Unterscheidungen möglich:

Einteilung der Eiweiße

I. Proteine

1. Histone
2. Albumine
3. Globuline

II. Proteide

1. Phosphoproteide
2. Chromoproteide
3. Glykoproteide
4. Nukleoproteide
5. Lipoproteide
6. Metallproteide

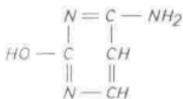
Unter den *Proteinen* sind die im Zellkern an Nukleinsäuren gebundenen Histone wegen basischer Reaktion für die Färbeverfahren wichtig. Die Albumine sind gut wasserlöslich und fallen erst bei Ammoniumsulfatsättigung aus. Globuline sind in reinem Wasser schwer löslich und fallen bei Halbsättigung mit Ammonsulfat aus.

Die *Proteide* haben die größere Verbreitung als Proteine. Sie enthalten am Eiweißmolekül angelagert eine sie charakterisierende Gruppe, die prosthetische Gruppe. Diese ist bei Phosphoproteiden, zu denen Casein gehört, einfach H_3PO_4 , bei Chromoproteiden, zu denen Hämoglobin und zahlreiche Fermente (Atmungsferment) zählen, der gefärbte Grundkörper Porphin, der Beziehungen zu den Phthalocyanin-farbstoffen hat (s. S. 151). Zu den Glykoproteiden gehören vor allem die *Schleime*, Mucine und Mucoide, schleimähnliche Stoffe. Sind die Mucine aus Eiweiß und langen Kohlenhydratketten aufgebaut, so nennt man sie Mucopolysaccharide (MPS). Entsprechend einem Gehalt an Schwefelsäureresten trennt man saure und säurefreie neutrale MPS. Sie kommen im Knorpel, Knochen, Sehnen, Haut, Hornhaut, Glaskörper, Magenschleim, Speichel und Tumoren vor und lassen sich färberisch erfassen.

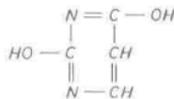
Die *Nukleoproteide*, die wesentliche Bestandteile des Zellkerns, aber in niederen Konzentrationen auch der Zellorganellen sind, zeichnen sich durch eine spezifische prosthetische Gruppe aus, die drei Bauelemente enthält:

Phosphorsäure — Pentose — Base

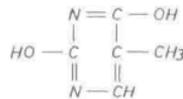
Bei den Basen handelt es sich um Abkömmlinge des Pyrimidin (Cytosin, Uracil, Thymin) oder Purin (Adenin, Guanin).



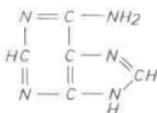
Cytosin



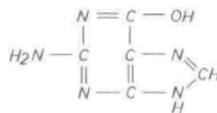
Uracil



Thymin



Adenin



Guanin

Base plus Pentose wird Nukleosid, die polymeren Gesamtverbindungen Polynukleotide oder Nukleinsäuren genannt (schematischer Bau s. S. 146). Entsprechend einem Gehalt an Desoxyribose werden Desoxyribonukleinsäuren (DNS), die nur im Kern gefunden werden, von Ribose enthaltenden Ribonukleinsäuren (RNS) getrennt. Auch die Viren sind aus Nukleoproteiden aufgebaut.

Die *Fermente* bestehen aus Eiweiß und einer prosthetischen Gruppe, wobei diese völlig unterschiedlichen Charakter haben kann. Die meisten stehen aber in naher Beziehung zu den Vitaminen. Fermente ermöglichen oder beschleunigen Stoffumsetzungen, die sonst unendlich lange dauern würden, oder sie bestimmen die Richtung eines Reaktionsablaufes. Die Wirkung kommt durch die prosthetische Gruppe jedoch nur bei Bindung an Eiweiß zum Tragen. Unter anorganischem Komplement versteht man jene Ionen, deren Vorhandensein zur Enzymaktivität unerlässlich ist. Diese Aktivatoren steigern nur die Wirksamkeit. Zellständige Fermente, Desmo-Enzyme, sollten von löslichen, Lyo-Enzymen, unterschieden werden. Die Wirkungsweise wird im Rahmen der histologischen Nachweisverfahren dargestellt (s. S. 151).

Lipide

In dieser Gruppe werden alle Stoffe mit der gemeinsamen Eigenschaft, in organischen Lösungsmitteln wie Pyridin, Benzin, Benzol, Äther, Aceton oder Tetrachlorkohlenstoff löslich zu sein, zusammengefaßt, obwohl sie nur entfernt verwandt zu sein brauchen. Fette nennt man nach strenger Definition nur die Neutralfette und trennt sie von den übrigen fettartigen Stoffen, den Lipoiden, ab. Nach der Menge des Vorkommens spielen Fette in den Bauchdecken, im Bauchraum, im Retroperitoneum und im Unterhautzellgewebe eine nennenswerte Rolle; das Knochenmark hat mit 65% den größten prozentualen Gehalt (Tab. 4). An der Struktur des Organismus beteiligtes Fett wird als *Baufett*, da es in den Organen enthalten ist, auch als *Organfett*, bezeichnet. Es erfährt wegen seiner integrierenden Bedeutung nur geringfügige Mengenänderungen. Das Speicherfett, das bei Überangebot an Nahrung abgelagert und als Reserve bei Bedarf mobilisiert werden kann, wird als *Depotfett* bezeichnet. Auch seine Zusammensetzung ist Schwankungen unterworfen.

Tab. 4. Fettgehalt einiger Organe

	%		%
Knochenmark	65	Skelett	10,0
Leber	21,3	Herz	8,3
Haut	15,0	Muskulatur	7,5
Gehirn	12,6	Nieren	5,2
Pankreas	10,5	Milz	3,0