

Gudrun Lang

Histotechnik

Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik

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 Springer-Verlag /Wien · Printed in Austria
Springer Wien New York ist ein Unternehmen von
Springer Science+Business Media
springer.at

Satz: KarSon Grafik- und Verlagsservice, 1020 Wien, Österreich
Druck: Strauss GmbH, 69509 Mörlenbach, Deutschland

Gedruckt auf säurefreiem, chlorfrei gebleichtem Papier – TCF

Mit 150 Abbildungen
SPIN: 11680468

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie,
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN-10 3-211-33141-7 Springer Wien New York
ISBN-13 978-3-211-33141-5 Springer Wien New York

Geleitwort

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 auseinander zu setzen. 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.

Vorwort

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 Biomed. 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 genaue 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.

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 neuig sind, möchte ich den Zugang etwas erleichtern. Es ist mir wichtig, dass sich un-

sere 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 Fr. Kreuzberger für das Korrekturlesen, bei Fr. Fliesser für ihre Unterstützung bei der EM-Technik, und bei Hrn. 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.

Gudrun Lang

Inhaltsverzeichnis

Aufgaben der histologischen Technik / Pathologie	1
Ablauf in einem modernen, histodiagnostischen Labor	3
Biochemie	6
Untersuchungsmaterial	27
Fixierung	39
Verarbeitung von hartem Gewebe	66
Makroskopische Begutachtung – Vom Fläschchen in die Kassette	82
Einbettungsprozess (Tissue processing)	86
Mikrotomie	123
Histologische Färbung	159
Enzymhistochemie	237
Immunhistochemie	257
In Situ Hybridisierung	295
Zellkultur	319
Mikrowellentechnik	333
Mikroskopie	344
Qualitätssicherung im Labor	354
Sicherheit im histologischen Labor	371
Geschichte der histologischen Technik	406
Abkürzungen	411
Quellen	414
Bildnachweis	422
Sachverzeichnis	423

Die Unterverzeichnisse finden sich bei den einzelnen Kapiteln.

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 Gewebekulturen, Immunologie, Molekularbiologie und Gentechnik dazu.

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

Aufgaben der morphologischen Untersuchungen:

- Instrument der Vorsorgeuntersuchung (z.B. Portioabstrich)
- Sicherung der klinischen Diagnose
- Frühdiagnose von Tumoren (z.B. Magenbiopsien)
- 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 Erbkrankheiten (in-situ-Hybridisierung, Gen-Array)
- Untersuchung von Wirkstoffen (genomspezifische Wirksamkeit von Medikamenten)
- Darstellung von viralen Erregern (Human Papilloma Virus)
- allgemein Darstellung von Genen
- Forensik
- Forschung

Aufgaben der Elektronenmikroskopie:

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

Aufgaben von Zell- und Gewebekulturen:

- Nachweis von Viren
- Herstellung von Antikörpern
- Zytogenetik
- Nachweis von zellschädigenden Substanzen (Gifte, Strahlung, Onkogene)
- Überprüfung von Medikamenten
- tissue engineering (Gewebe- und Organersatz)
- 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.

Ablauf in einem modernen, histodiagnostischen Labor

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

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

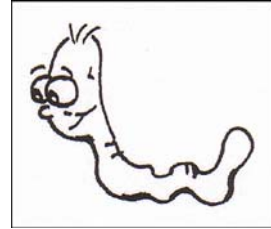


Abb.1

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



Abb.2



Abb.3

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)
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)



Abb.4



Abb.5

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)
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.
12. Schließlich hat man ein fertiges histologisches Präparat, das zur **mikroskopischen Befundung** einem Pathologen vorgelegt wird. (Abb.6)

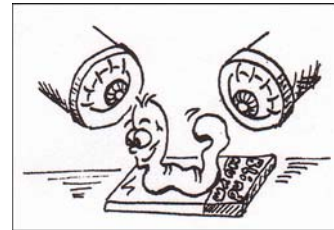


Abb.6

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.

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

Biochemie

A. Aufbau der Zelle.....	7
1. Schematische Darstellung einer Epithelzelle	7
2. Zellkern (Nukleus)	8
3. Nukleolus.....	8
4. Cytoplasma.....	8
5. Endoplasmatisches Reticulum (ER)	8
6. Ribosomen	9
7. Mitochondrien	9
8. Lysosome.....	9
9. Golgi-Apparat	9
10. Zentriol	10
11. Paraplasma	10
12. Zellmembran	10
13. Mikrovilli	10
14. Gewebe	11
15. Interzellulär-Substanz.....	11
B. Bausteine.....	11
1. Wasser	11
2. Salze	12
3. Proteine	12
4. Kohlenhydrate	17
5. Lipide.....	22
6. Nukleinsäuren.....	25
C. Zusammenfassung.....	26

Biochemie

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

Der Inhalt dieses Kapitels wurde größtenteils dem Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage © Urban & Fischer Verlag München entnommen. Für umfangreichere und detailliertere Erklärungen siehe die Lehrbücher von Zytologie, Histologie und Biochemie.

A. Aufbau der Zelle

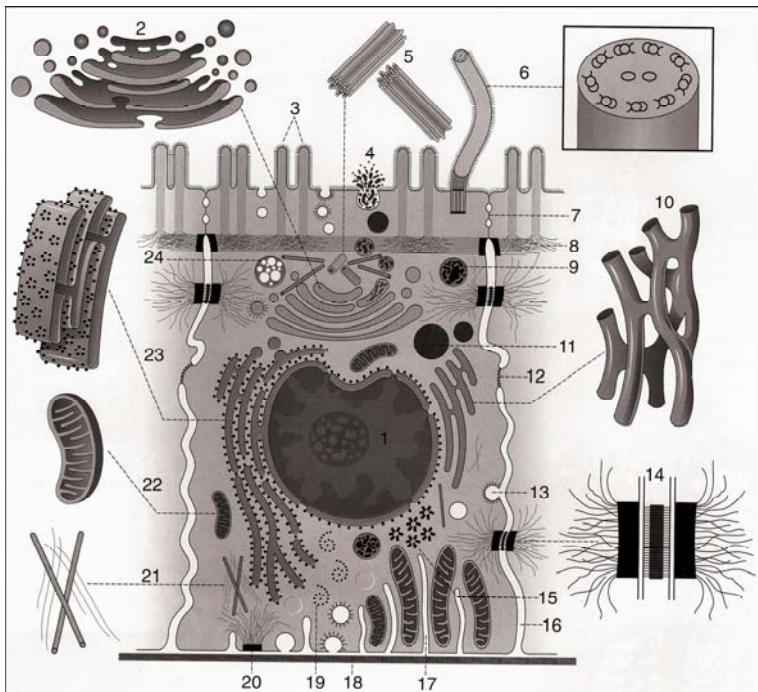


Abb.7

1. Schematische Darstellung einer Epithelzelle

Schematische Darstellung einer Epithelzelle mit den wichtigsten Organellen und typischen Oberflächendifferenzierungen. Einige der Zellbestandteile, die im Schnittpräparat zweidimensional erscheinen, sind zum besseren Verständnis dreidimensional und vergrößert herausgezeichnet.

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 adherens; 9 Lysosom; 10 glattes endoplasmatisches Retikulum (glattes ER); 11 Peroxisom (ein Zytosom); 12 Verbindung (»gap junction«); 13 klathrinbedeckte Endozytosefigur; 14 Desmosom; 15 Glykogen; 16 Interzellularspalt; 17 Einfaltung des basalen Labyrinths; 18 Lamina densa der Basallamina; 19 Polysomen; 20 Hemidesmosom; 21 Mikrotubuli und Keratinfilamente; 22 Mitochondrium; 23 rauhes endoplasmatisches Retikulum (rauhes ER); 24 multivesikulärer Körper

2. Zellkern (Nukleus)

Die größte Organelle der Zelle ist gegen das Zytoplasma abgegrenzt durch die Kernmembran (poröse, Stoffaustausch ermöglichende Doppelmembran). Der Zellkern enthält in seiner Matrix (Karyoplasma, Karyolymphe) Erbgut in Form der **DNS** (die bei der Mitose und Meiose als sichtbare **Chromosomen** erkennbar wird; Chromatin) und das **Kernkörperchen** (Nucleolus).

Besteht zu 75% aus Eiweißkörpern (Nucleoproteine; u.a. an DNS gebunden, darunter Histone, und frei als Enzyme. Die **Proteine** können unter Umständen die Bildung antinukleärer Autoantikörper hervorrufen.

3. Nukleolus

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

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

4. 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-RNS, 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.

5. 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 Extrazellularraum 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 RNS; sie sind z.T. mit Ribosomen besetzt (= **rauhes endoplasmatisches Reticulum**), z.T. aber ohne Ribosomenbesatz (= **glattes endoplasmatisches Reticulum**).

Die Rauhform 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 Rauhform, 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.

6. Ribosomen

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

7. Mitochondrien

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

Die Matrix enthält außer DNS und RNS-Ribosomen zu Einheiten geordnete Multi-Enzymsysteme für den **Citratzyklus** und **oxidativen Fettsäureabbau**;

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

Die Mitochondrien sind halbautonom; bilden einige ihrer Bauproteine, sind zu identischer Vermehrung = Reduplikation befähigt.

8. Lysosome

Von einfacher Elementarmembran (Lipoproteine) umgebene, im Golgi-Apparat gebildete Zellorganellen, die reichlich **Hydrolasen** (wirksam bei saurem pH; z.B. Glucosidasen, Lipasen, Proteinasen etc.) enthalten.

Ort der intrazellulären Verdauung von Kernsäuren, Glykogen, Proteinen, Glykosaminoglykanen, Lipiden;

Bei Freisetzung der Enzyme (z.B. Zelltod): Autolyse der Zelle.

9. Golgi-Apparat

Organell jeder kernhaltigen Zelle, das mikroskopisch – nach Schwärzung mit Osmiumsäure oder Silbersalzen – als Knäuel- und Bälkchenstruktur oder als Netz erkennbar wird; weist eine lipidfreie, nicht geschwärzte Innenstruktur auf;

wird unterteilt in Cis-Golgi-Netzwerk und Trans-Golgi-Netzwerk; liegt meist in Kernnähe, im sog. Golgi Feld.

Der Golgi-Apparat ist u.a. Sitz von Enzymen, die überwiegend an der Synthese und Modifizierung von Oligo- und Polysacchariden beteiligt sind. Er spielt eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel (chem. Abwandlung von Produkten des endoplasmatischen Retikulums, Speicherung, Transport).

10. Zentriol

Ein sich in der Interphase spontan verdoppelndes, zylinderförmiges, meist zweiteiliges, aus Mikrotubuli bestehendes Zellorganell im Zentrioplasma.

Zu Beginn der Mitose wandert je 1 Zentriol(enpaar) in Richtung der gegenüberliegenden Zellpole unter Bildung der Polstrahlung; besteht aus Mikrotubuli.

In der Mitose ist das Zentriol Ansatzpunkt der polaren Fasern des Spindelapparates.

11. Paraplasma

Die, meist tropfig-granulären, „toten“ Stoffe im Zytoplasma (paraplastische Einschlüsse), z.B. Wasser, Salze, Kohlenhydrate, Fette, Nahrungsprotein, Vitamine, Pigmente, auch Viruspartikel.

12. Zellmembran

Die jede tierische Zelle umgebende und deren inneres Milieu aufrechterhaltende, elastisch verformbare, lichtmikroskopisch nicht erfassbare Membran.

Bestandteile:

- a. **Lipide**, v.a. Phosphatide, Cholesterin, Glykolipide, deren polare, hydrophile Enden in die wässrige Phase ragen, während die apolaren, hydrophoben Enden herausragen.
- b. **Eiweißkörper**; tauchen in den Lipidfilm ein,
 - sind z.T. mehr zur Innen- bzw. Außenfläche hin gelagert oder durchdringen die Lipidschicht völlig (= **Tunnelproteine**), stehen durch ihre hydrophoben Bezirke mit den Lipiden in Wechselwirkung;
 - verfestigen als **Strukturproteine** die Membran und sind kontraktile (z.B. als Spectrine, Actin und Glykophorin der Ery-Membran)
 - als **Glykoproteine** ragen sie, wie auch die **Glykolipide** (v.a. Ganglioside), gegen die äußere Oberfläche vor und bestimmen weitgehend deren Elektronegativität, sind Träger der Antigenität (z.B. als Blutgruppensubstanz, Transplantationsantigene), besitzen Rezeptoreigenschaft (z.B. der Neuraminsäurerest der Ganglioside als Virusrezeptor), sind aber auch Ladungsträger;
 - andere wirken als Transportproteine oder als Enzymproteine.

Besondere Membrangebilde sind z.B. Mikrovilli, pseudopodienartige Fortsätze bzw. Membraneinstülpungen (für Phago- und Pinozytose), Zellkontaktgebilde.

13. Mikrovilli

Fingerförmige, meist unverzweigte Ausstülpungen der Plasmaoberfläche (100–800 nm; 50–100 nm dick) am Resorptionspol bestimmter Epithelzellen, z.B. der Enterozyten der Darmwand, in Nierentubuli, Plexus choroidei;

bilden den sog. Bürstensaum dieser Epithelien; sind von einer Filamentschicht (= fuzzy coat = Glykokalix) bedeckt; besitzen Verdauungsenzyme, aktive Transportaktivitäten, Energiekonvertanten und im Inneren Längs- und Querfilamente.

14. Gewebe

Ein durch spezifische Leistungen gekennzeichnete Verband gleichartig entwickelter = „**differenzierter**“ Zellen (samt deren Interzellulärsubstanz); z.B. Epithel, Binde-, Stütz-, Muskel-, Nervengewebe, Blut.

15. Interzellulär-Substanz

Von Körperzellen gebildete und in den Interzellulärraum ausgeschiedene, dem Gewebeaufbau dienende Stoffe, die sich z.T. zu retikulären, kollagenen und elastischen Fasern zusammenfügen (= **geformte Interzellulärsubstanz**), teils strukturlos bleiben und als Grund- oder Kittsubstanz (= **ungeformte Interzellulärsubstanz**) das Binde- bzw. Einschlußmittel für die Fasern bilden. Geformte und ungeformte Interzellulärsubstanz treten stets gemeinsam auf, am reichlichsten im Knorpel- und Knochengewebe.

B. Bausteine

Der Organismus ist aus anorganischen und organischen Stoffen aufgebaut. Ein Mensch besteht zu 70% aus Wasser, zu 15% aus Eiweiß, zu 10% aus Fett und zu 5% aus Mineralien. Anorganische Stoffe liegen mit Ausnahme von Wasser überwiegend in Form von Salzen vor. Gelöst im Wasser sind die Ionen für das Milieu (pH-Wert, osmotischer Druck) verantwortlich, das für die biologischen Reaktionen notwendig ist.

Osmose ist die einseitige Diffusion einer Flüssigkeit durch eine semipermeable Membran mit der Tendenz, die Konzentrationsunterschiede gelöster Teilchen auf beiden Seiten auszugleichen. Durch die semipermeable Membran ungehindert durchtretende Wassermoleküle verdünnen die einseitig höhere Konzentration größerer Teilchen. Der dabei wirksame osmotische Druck entspricht dem, den die gleiche Menge gelöster Substanz bei gleicher Temperatur und gleichem Volumen in Gaszustand auf die einschließenden Raumwände ausüben würde. Der osmotische Druck in den Zellen und Körperflüssigkeiten beträgt 0,3 osm. (Abb.8)

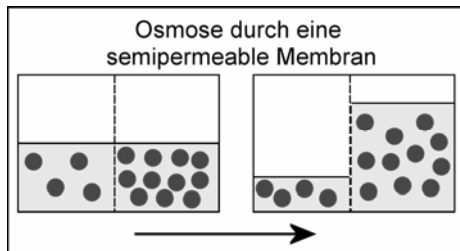


Abb.8 Osmose

1. Wasser

Wasser hat eine sehr große Bedeutung im Organismus. Alle Stoffe werden darin transportiert, alle Reaktionen laufen im wässrigen Milieu ab. Wasser bindet sich als Hydratationswasser an Kolloide, wie Eiweiß und Glykogen. Es steht hier in enger räumlicher Verbindung zu den Strukturen und bewahrt sich gleichzeitig die Eigenschaft als Lösungsmittel für Salze.

Tabelle 1: entnommen aus H.C. Burck, histologische Technik

Gewebe	Wassergehalt in %	Gewebe	Wassergehalt 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	Lymphne	96
Haut	72	Tränen	98
Muskel	78	Schweiß	99,5
Pankreas	78	Speichel	99,5

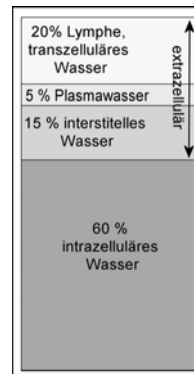


Abb.9

Die verschiedenen Gewebetypen bzw. Organe haben einen unterschiedlich hohen Wassergehalt. Zahnschmelz enthält z.B. nur 0,2% Wasser, während Bindegewebe zu 80% aus Wasser besteht. Innerhalb des Gewebes verteilt sich das Wasser auf den intrazellulären Raum und die interstitielle Flüssigkeit. Zwischen diesen Räumen kommt es zu ständigen Wasserumlagerungen (Abb.9). In Bezug auf die histologische Verarbeitung muss man bedenken, dass wasserreiches Gewebe sich hier empfindlicher verhält als wasserarmes wie z.B. Knochengewebe.

Die histologische Darstellung von Wasser gelingt im eigentlichen Sinne nicht. Wasser ist in den verwendeten Fixierreagenzien löslich und wird dann bei der Entfernung dieser Reagenzien herausgespült. Optisch leere Hohlräume innerhalb von Zellen gelten, wenn sie kein Fett enthalten, als intrazelluläre Wasseransammlungen (Vakuolen).

2. Salze

Die gelösten Salze befinden sich in Form von geladenen Teilchen (Ionen) in unterschiedlicher Konzentration im intra- bzw. extrazellulären Raum. Am meisten vertreten sind hier Natrium-, Kalium- und Kalziumionen als positiv geladene Teilchen. Natrium kommt fast ausschließlich extrazellulär vor, Kalium dagegen hauptsächlich intrazellulär. Den anionischen Teil der Salze bilden Chloride, Phosphate und Karbonate.

Um das osmotische Gleichgewicht zu erhalten, muss die Zelle ständig Ionen hinaus- bzw. hineintransportieren. Bei einer relativen Erhöhung des inneren osmotischen Drucks kommt es zur Zellschwellung durch Wasseraufnahme. Im Gegensatz dazu kommt es zur Zellschrumpfung bei relativer Abnahme des inneren osmotischen Drucks. Will man in der histologischen Verarbeitung diese Veränderungen vermeiden, muss man den osmotischen Druck der Fixierlösung an den physiologischen Zustand anpassen.

3. Proteine

Proteine sind weitverbreitete Naturstoffe in tierischen und pflanzlichen Zellen, die aus Aminosäuren zusammengesetzt sind. Die Aminosäuren sind durch Peptidbindungen miteinander verbunden. Sie bilden charakteristische Ketten- und Raumstrukturen (Eiweißstruktur) und bestehen durchschnittlich aus 50% Kohlenstoff, 7% Wasserstoff, 16% Stickstoff, 20% Sauerstoff und 2% Schwefel.

Nach Größe (Molekulargewicht) kann man sie unterscheiden in:

- Oligopeptide (mit weniger als 10 Aminosäuren)
- Polypeptide (mit 10 bis 100 As.)
- Proteine (Makropeptide; mit mehr als 100 As.)

Nach ihrer Gestalt kann man sie unterscheiden in:

- langgestreckte (fibrilläre) Proteine, die als Stütz- und Substranz dienen (z.B. Keratin, Kollagen, Elastin, Myosin)
- kugelige (globuläre) Proteine (Globulin, Albumin), die vielfältige Funktionen in Zellkern, Zellmembran und Zytoplasma sowie in Körperflüssigkeiten erfüllen (Plasmaproteine, Immunglobuline, Peptid- und Proteohormone, Enzyme) oder dem Sauerstofftransport dienen (Hämoglobin, Myoglobin).

Proteine, die mit Stoffen ohne Eiweißcharakter zusammengesetzt sind, werden auch Proteide genannt (Chromo-, Glyko-, Häm-, Lipo-, Nucleo-, Metall-, Phosphoproteide oder -proteine).

3.1. Aminosäuren

Aminosäuren sind frei oder gebunden (als Eiweißbaustein) vorkommende, mit einer Aminogruppe substituierte, aliphatische Carbonsäuren und aromatische Säuren. Die natürlichen Aminosäuren tragen die Aminogruppe allgemein an dem der endständigen Carboxylgruppe nächsten C-Atom, dem „ α -C-Atom“ (sind also Alphaamino-Karbonsäuren = α -Aminosäuren, Abb.10). Seltener findet man sie an einer weiter entfernten Position z.B. als β -Alanin oder γ -Aminobuttersäure. Die α -Aminosäuren stellen insgesamt als Peptid- und Proteinbausteine eine für die Körpersubstanz, aber auch für den Intermediärstoffwechsel wichtige Stoffgruppe dar.

Sie werden unterschieden nach verschiedenen Kriterien:

Nach dem isoelektrischen Punkt in:

- neutrale Aminosäuren
- saure Aminosäuren
- basische Aminosäuren
- amphoter: Aminosäuren mit je einer NH_2 - und COOH -Gruppe sind amphoter. Ihre Lösungen sind Ampholyte. Sie liegen in neutralen Lösungen als Zwitterionen, in saurem Milieu als Kationen, im alkalischen als Anionen vor.

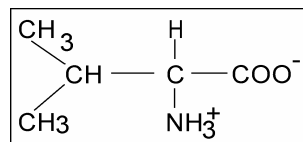


Abb.10 Valin

Unterscheidung nach der Polarität der Seitenketten, und zwar als Aminosäure mit:

- neutraler und hydrophober (= unpolarer) Seitenkette
- neutraler und hydrophiler (= polarer) Seitenkette
- saurer und hydrophiler Seitenkette
- basischer und hydrophiler Seitenkette

Nach Stoffwechselbesonderheiten werden unterschieden:

- ketoplastische (Ketokörper bildend)
- aketoplastische
- glukoplastische, d.h. in Zucker umwandelbare = metabolisierbare
- aglukoplastische

Nach Biosynthese-Aspekten werden unterschieden:

- nichtessentielle Aminosäuren
- essentielle Aminosäuren (in der Nahrung unentbehrlich, da nicht durch körpereigene Biosynthese ersetzbar; sind daher ausreichend zuzuführen)

α -Aminosäuren als Bausteine der Proteine

Alanin, Leucin, Arginin, Lysin, Asparagin, Methionin, Aspartat, Phenylalanin, Cystein, Prolin, Glutamin, Serin, Glutamat, Threonin, Glycin, Tryptophan, Histidin, Tyrosin, Isoleucin, Valin

Aminosäuren haben die Fähigkeit sich durch **Peptidbindungen** miteinander zu verketten. Dabei wird die OH-Gruppe einer Aminosäure durch eine NH₂-Gruppe substituiert. Es entsteht ein Säureamid. Wird nun ein H-Atom daraus durch einen Aminosäurerest ersetzt kommt man zur Peptidbindung. Durch Wiederholung entsteht ein Polypeptid. (Abb. 11)

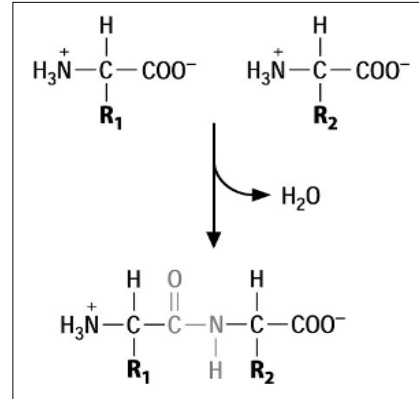


Abb.11 Peptidbindung

3.2. Proteinstruktur

Als **Primärstruktur** bezeichnet man die während der Eiweißbiosynthese festgelegte Reihenfolge (Aminosäuresequenz) und Zahl der Aminosäuren.

Als **Sekundärstruktur** bezeichnet man die räumliche Anordnung der Moleküle, z.B. schraubenförmig gewunden (Helix) oder regelmäßig abgewinkelt (Faltblattstruktur).

Als **Tertiärstruktur** bezeichnet man die räumliche, über die Sekundärstruktur hinausgehende Anordnung der Polypeptidketten, z.B. in Form von Knäueln (globuläre Struktur), die über längere Strecken durch Wasserstoffbindungen, Disulfidbindungen, Ionenbeziehungen und Fremdmoleküle stabilisiert werden, ferner durch Einstülpung hydrophober Gruppen in das Innere der Ketten, bedingt durch das umgebende wässrige Milieu.

Als **Quartärstruktur** bezeichnet man die räumliche Anordnung mehrerer Untereinheiten (Polypeptidketten) zu einem funktionsfähigen Proteinmolekül, wie z.B. beim Hämoglobin.

Zur Analyse der Primärstruktur werden Proteine entweder unkontrolliert durch starke Säuren oder Basen abgebaut oder kontrolliert durch Einwirkung proteolytischer Enzyme (Endopeptidasen, Exopeptidasen) in kleinere Bruchstücke zerlegt (Proteolyse). Bei der Sequenzanalyse nach Pehr Edman (1950) reagiert die N-terminale (d.h. außenstehende, nichtgebundene) Aminogruppe mit Phenylisothiocyanat, wodurch die Peptidkette schrittweise um eine Aminosäure verkürzt wird; in einer Apparatur (Sequenator) kann die Aminosäuresequenz von Polypeptiden automatisch bestimmt werden.

Die Analyse der Tertiär- und Quartärstruktur erfolgt durch Beugung kurzwelliger Strahlen (Elektronen, Neutronen, Röntgen- oder γ -Strahlen) an kristallisierten Molekü-

len oder mit höchstauflösender Elektronenmikroskopie auch an gelösten Proteinen. Die Ergebnisse werden in Großrechnern zu einem dreidimensionalen Molekülbild zusammengesetzt.

3.3. Hydratation

Darunter versteht man in wässrigen Lösungen die Anlagerung von Wassermolekülen durch Nebervalenzen an Ionen oder Moleküle (z.B. Proteine, Kolloide).

Die Wassermoleküle werden in die Eiweißstruktur räumlich eingelagert und umgeben das Protein mit einer Hydratationshülle, wodurch das Protein „in Schwebelage“ gehalten wird. Ursache hierfür ist die Dipoleigenschaft von Wasser.

3.4. Denaturierung

Als Denaturierung bezeichnet man die im Allgemeinen nicht umkehrbare, den ursprünglichen Zustand zerstörende Strukturveränderung von Eiweißkörpern durch Fällung, Lösung von Peptidbindungen, Einwirkung verdünnter Säuren, Alkalien etc., Erhitzen oder Bestrahlung. Bei der Denaturierung kommt es zum Übergang von einer höheren Struktur zu einem wahrscheinlicheren, ungeordneten Zustand. Man kann leichte und starke Denaturierung unterscheiden. Leichte Denaturierung z.B. durch Entfernen der Hydratationshülle kann reversibel sein. Bei starker Denaturierung werden Peptidbindungen aufgebrochen.

Bei der histologischen Fixierung kann man durch eine möglichst geringe Denaturierung den Erhalt der biologischen Reaktivität der Proteine erreichen, was beim Nachweis von Enzymen oder antigenen Strukturen wichtig ist.

3.5. Proteide

Proteide sind aus Proteinen und anderen Stoffgruppen zusammengesetzte Moleküle.

Je nach Stoffgruppe unterscheidet man:

- Phosphoproteide (z.B. Casein)
- Chromoproteide (z.B. Hämoglobin)
- Glykoproteide (Eiweiße mit einem Kohlenhydratanteil, der aus kurzen, Galaktose, Mannose, Fucose, Galaktose und Glucosamin oder Sialinsäure enthaltenden Seitenketten besteht; Mucine, Mucoide; Teil der Glykokalix)
- Nukleoproteide (Chromatin)
- Lipoproteide (für den Transport der wasserunlöslichen Lipide (v.a. Cholesterin, -ester, Triglyceride, Phospholipide) im Blut)

Nukleoproteide:

Chromatin ist das spezifisch anfärbbare Material des Zellkerns. Es ist eine fädige Struktur, bestehend v.a. aus DNA und **Histonen** (basisches Chromosomenprotein), die gemeinsam Nucleosomen bilden, sowie aus internukleosomaler DNA, kleineren Mengen RNA und nichtbasischen Proteinen (Hertone).

Die Arbeitsform von Chromatin ist im Zellkern decondensiert und ausgebreitet; im Gegensatz zur Transportform, d.h. zu den in bestimmten Phasen des Zellzyklus mikroskopisch erkennbaren **Chromosomen** (siehe Nukleinsäuren).

Für die histologische Technik spielt die Darstellung des Chromatins eine große Rolle. Man spricht von gekräuseltem (crisp), lockerem oder verdichtetem Kernchromatin. Um Kerne in der Zellteilungsphase gut zu erkennen, verwendet man zur Fixierung Mittel, die eine relative Kernschwellung hervorrufen und die mitotischen Chromosomen kürzer und dicker erscheinen lassen. (Abb. 12)

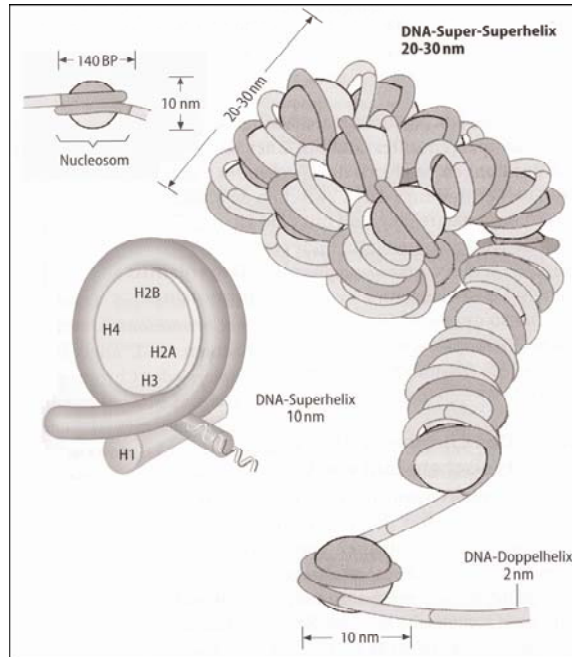


Abb.12 Chromatin

3.6. Enzyme

Enzyme sind für den Stoffwechsel aller Organismen unentbehrliche Eiweißkörper, die als **Biokatalysatoren** die biochemischen Vorgänge durch Senkung der notwendigen Aktivierungsenergie ermöglichen, sie beschleunigen und in eine gewünschte Richtung ablaufen lassen, ohne selbst verändert zu werden. Durch ihre Eiweißstruktur sind sie befähigt, den Stoff, dessen Reaktion sie steuern sollen, zu erkennen (Substratspezifität), und ermöglichen so die Vielfalt gleichzeitiger Stoffwechselfvorgänge. Die Eiweißbiosynthese der Enzyme kann dem Bedarf angepasst werden und ist organabhängig unterschiedlich sowie individuell verschieden.

Manche Enzyme benötigen für ihre Wirkung niedermolekulare Stoffe (Cofaktoren, z.B. Metallionen), prosthetische Gruppen oder Coenzyme (Das vollständige Enzym wird als Holoenzym, der Eiweißbestandteil als Apoenzym bezeichnet.) oder aber den räumlichen Zusammenhang mit anderen Enzymen (Multienzymkomplex).

Enzyme können im Körper entsprechend ihrer Funktion an Strukturen gebunden sein (Zell- und Zellkernenzyme, Mitochondrienenzyme; auch an der Zellmembran usw.)

oder frei in Körperflüssigkeiten vorliegen (z.B. Exkretions-, Serum-, Verdauungsenzyme).

Sie werden meist nach der von ihnen katalysierten Reaktion oder nach dem spezifischen Substrat benannt. Dies geschieht durch das Anhängen der Silbe „-ase“ entweder an das umgesetzte Substrat (Phosphatase) bzw. an den Reaktionstyp (Hydrolase). Wie in jeder dynamischen Forschung wurde mit zunehmender Anzahl an entdeckten Enzymen die Benennung verwirrender. Als Abhilfe wurde ein Nummernsystem durch eine Kommission etabliert (EC-Nummern). Für die Histotechnik verbleibt man bei der Verwendung von gewohnten Bezeichnungen. Für detaillierte und umfangreiche Information über Enzyme verweise ich auf Literatur der Biochemie. (**Enzymnomenklatur** unter: www.expasy.org/enzyme)

Nach internationalen Empfehlungen werden sie in sechs Hauptgruppen eingeteilt:

1. Oxidoreductasen:	katalysieren Reaktionen, wo das Substrat oxidiert (gibt Elektronen ab) bzw. reduziert (nimmt Elektronen auf) wird. Bsp.: Oxidasen (Cytochromoxidasen), Dehydrogenasen
2. Transferasen:	Enzyme, die best. Gruppen zwischen Donor und Akzeptor übertragen; z.B. Transaminasen, Phosphorylase
3. Hydrolasen:	Enzyme, die Substrate in reversibler Reaktion hydrolytisch spalten, z.B. Esterase
4. Lyasen:	Oberbegriff für alle, die Spaltung von Molekülen katalysierenden Enzyme: Katalasen, (De-)Carboxylasen, Aldolase etc.
5. Isomerasen:	Enzyme, die die reversible Umwandlung eines Substrats in ein Isomer katalysieren; v.a. Razemasen, Epimerasen, <i>cis-trans</i> -Isomerasen
6. Ligasen:	Enzym, das eine C–C-, C–N-, C–O- oder C–S-Bindung bewirkt

Lokalisation in den Zellorganellen:

- **Mitochondrien:** Enzyme der oxidativen Stoffwechselforgänge (z.B. Succinatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase); bei Schädigung der Mitochondrien gehen die Enzyme ins Zytoplasma und weiter ins Blutplasma über (Nachweismöglichkeit).
- **Lysosome/endoplasmatisches Retikulum:** Enzyme zur Regulation des Blutglukosespiegels, (z.B. Glucose-6-Phosphatase; Cytochrome; Saure Phosphatase, Esterasen); die Enzyme sind an der Struktur fixiert.

In der histologischen Technik spielen Enzyme einerseits als Markermoleküle zur Identifikation von bestimmten Zellen eine Rolle. Andererseits sind sie in der Immunhistochemie beim Antigenretrieval und als Teil des Detektionssystems eingesetzt.

Beim Umgang mit Enzymen muss man ihre Empfindlichkeit gegenüber Fixierlösungen, hohen Temperaturen, pH-Wertverschiebungen und Verunreinigungen bedenken.

4. Kohlenhydrate

Unter Kohlenhydraten versteht man die im Allgemeinen aus Kohlen-, Wasser- und Sauerstoff zusammengesetzten Zucker sowie deren chemische Abkömmlinge und monomeren Bausteine (Monosaccharide). Kohlenhydrate sind kalorisch hochwertige Energielieferanten und Baustoffe, die im Körper einer raschen, hormonal gesteuerten

Verwertung unterliegen (Kohlenhydratstoffwechsel), z.T. aber in polymerer Form (Glykogen) gespeichert werden.

Kohlenhydrate stellen eine wichtige Organkomponente dar. Chemisch gehören sie zu den Ketonen oder Aldehydderivaten von Alkoholen (mit vielen OH-Gruppen). Man kann sie unterteilen in Mono-, Oligo- und Polysaccharide nach Anzahl der Zuckereinheiten (= Saccharide). Als Polysaccharide sind sie wenig löslich und relativ stabil, als Mono- und Oligosaccharide gut löslich und von süßem Geschmack. Kohlenhydrate findet man in Kombination mit Lipiden als Glykolipide und weiters als Anteil der Nukleinsäuren. Die übrigen im Histoschnitt darzustellenden Kohlenhydratderivate werden als Mucosubstanzen oder Schleimstoffe zusammengefasst.

Kohlenhydrate kann man unterteilen in:

- **einfache Kohlenhydrate** (= Monosaccharide)
- **zusammengesetzte Kohlenhydrate**
d.h. Disaccharide, Oligosaccharide, Polysaccharide
- **konjugierte Verbindungen**
Glykolipide und proteingebundene Kohlenhydrate (Glykoproteide).

4.1. Einfachzucker

Monosaccharide sind einfache, hydrolytisch nicht weiter aufspaltbare Zucker der allgemeinen Formel $[\text{CH}_2\text{O}]_n$.

Mono- und Oligosaccharide können wegen ihrer Wasserlöslichkeit im Histoschnitt nicht dargestellt werden. (Abb.13)

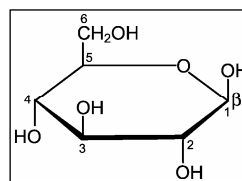


Abb.13 Glucose

Die einfachen Zucker werden unterteilt in:

- Aldosen (mit Aldehydgruppe)
- Ketosen (mit Ketogruppe)

Nach der Zahl der Kohlenstoffatome werden sie unterteilt in:

Di- bis Nonosen (letztere mit 9 C-Atomen)

- 6er-Zucker: Glucose, Galaktose, Fructose
- 5er-Zucker: Ribose, Desoxyribose

4.2. Zweifachzucker

Disaccharide sind aus zwei Monosaccharid-Molekülen bestehende Zucker z.T. mit halbacetalischer OH-Gruppe und mit reduzierenden Eigenschaften.

z.B. Maltose, Lactose, Saccharose (besteht aus Glucose und Fructose)

4.3. Mehrfachzucker

Polysaccharide sind hochmolekulare Kohlenhydrate aus mehr als zehn glykosidisch verknüpften Monosacchariden. Sie werden unterteilt in

- Homo-Polysaccharide aus nur einem Kohlenhydrattyp als Baustein, z.B. Glykogen
- Hetero-Polysaccharide aus verschiedenen KH-Bausteinen

4.3.1. Glykogen

Glykogen ($C_6H_{10}O_5$)_n ist ein Makromolekül von zweigartiger Struktur. Es besteht aus einer linearen Kette mit α -1,4-glucosidischen Bindungen und Verzweigungsstellen nach jeweils 8–12 Glucose-Einheiten durch α -1,6-glucosidische Bindungen. Glykogen hat ein Molekulargewicht von 10^6 – 10^7 . Es ist optisch aktiv, reduziert nicht die Fehling-Lösung und gibt mit Jod eine Braun- bis Violettfärbung. Glykogen ist gegen Alkalien stabil; wird jedoch durch Säuren zu Glucose gespalten (Hydrolyse). Enzymatisch wird es von Amylase zu Maltose gespalten. Glykogen stellt die Kohlenhydrat-**Speicherform** beim Menschen dar. Es wird vor allem in der Leber und Muskulatur gespeichert. (Abb.14)

Glykogen bildet infolge des hohen Molekulargewichts eine kolloidale Lösung und muss deshalb in der histologischen Technik wie wasserlösliche Stoffe behandelt werden. Es kann aber bei rascher Fixierung dargestellt werden (wird in Protein-Netz sozusagen gefangen).

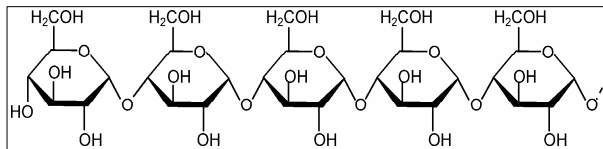


Abb.14 Glykogen

4.3.2. Glykokonjugate (Schleimstoffe)

Die Erforschung der Schleimstoffe begann in der Mitte des 19. Jahrhunderts. Im Laufe des folgenden Jahrhunderts wurden Eigenschaften verschiedener Schleimstoffe definiert (löslich, unlöslich, sialin-, neuramin-hältig). Die wichtigsten Färbungen wurden in der zweiten Hälfte des 20. Jh. entdeckt, wie z.B. Perjodacid-Schiff (PAS)-, Alcian- oder Aldehydfuchsin-Färbung. Spezifische Identifikationen werden erst heutzutage durch immunhistologische und molekularbiologische Techniken erreicht, was aber vorerst nur in der Forschung Anwendung findet. Aufgrund der laufenden, neuen Erkenntnisse ist die Terminologie und Klassifikation der Kohlenhydratderivate recht unübersichtlich. Zu den mehrdeutigen Begriffen gehören „*Mucine (Schleime), Mucoïd, Mucopolysaccharid, Mucoprotein, Sialomucin, Sulphomucin*“. Es gibt Einteilungen, denen die histochemischen Eigenschaften zugrunde liegen, und solche, die auf dem biochemischen Aufbau basieren. Der neue Begriff für Kombinationen von Proteinen und Kohlenhydraten ist **Glykokonjugate**. Glykokonjugate werden unterteilt in Proteoglykane und Glykoproteine.

a. Proteoglykane

Proteoglykane haben unverzweigte Kohlenhydrat-Seitenketten (= Glykosaminoglykane, Mucopolysaccharide), bestehend aus wiederholten Einheiten aus zwei oder mehr verschiedenen Monosacchariden. Diese Einheiten beinhalten immer einen stickstoffhaltigen Zucker und eine Zuckersäure. Zu den Zuckersäuren gehören Uronsäure und Sulfatester einer Hexose. z.B.: Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Keratansulfat, Heparin. Sie bestimmen die Affinität zu kationischen Farbstoffen (basophile Anfärbung). (Abb.15)

Ein Proteoglykanmolekül besteht aus Chondroitin-, Dermatan- oder Keratansulfat mit einer typischen Länge von 50–200 nm gebunden an ein **Trägerprotein** von ca. 300 nm Länge. Oligosaccharide, ähnlich den Glykoproteinen (5–15 Einheiten), sind ebenso an das Trägerprotein gebunden. Die extrazelluläre Matrix enthält kleinere Verbindungsproteine und lange Stränge von Hyaluronsäure als dreidimensionales Geflecht, das den Raum zwischen den Kollagenfasern ausfüllt. Proteoglykane stellen die Hauptkomponente der Bindegewebe neben Kollagen dar. Die Zusammensetzung der Komponenten variiert in den Gewebetypen.

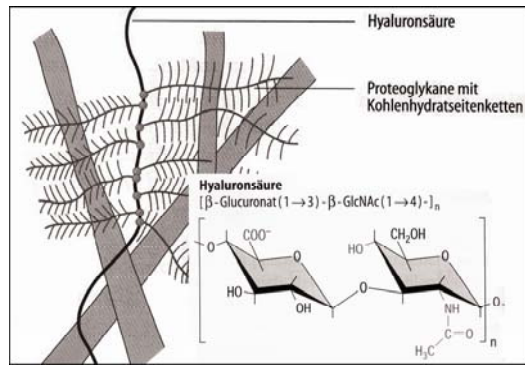


Abb.15 Proteoglykan-Struktur und Hyaluronsäure

Mucopolysaccharide (= Glykosaminoglykane) sind nicht-verzweigte Polysaccharidketten. Ihre Bausteine sind evtl. sulfatierte Disaccharide, die aus einem Hexosamin (Aminozucker, z.B. Glucosamin, Galaktosamin) und einem Monosaccharid ohne Stickstoff bestehen.

Saure Mucopolysaccharide lassen sich mit **Alzianblau** oder Toluidinblau anfärben.

Neutrale Mucopolysaccharide sind in der **Perjodacid-Schiff'schen-Reaktion** positiv.

Tabelle 2 Proteoglykane

Proteoglykan	Seitenketten (Zahl der Ketten pro Molekül)	Gewebe, Zellen	Subzelluläre Lokalisation
Aggrecan	Chondroitinsulfat	ca. 100	Knorpel (50 mg/cm ³)
	Keratansulfat	ca. 30	
Fibromodulin	Keratansulfat	4	kollagenes Bindegewebe
Decorin	Chondroitinsulfat	1	kollagenes Bindegewebe
Biglycan	Keratansulfat	2	kollagenes Bindegewebe
Versican	Chondroitinsulfat	20–25	Wand von Blutgefäßen
Perlecan	Heparansulfat	3	Basallamina
Basalmembran-Proteoglykan hoher Dichte	Heparansulfat	4	Basallamina (u.a. der Nierenglomeruli)
Syndecan	Heparansulfat	3	Plasmamembran von Epithelzellen
	Keratansulfat	1	
	Dermatansulfat	1	
Seryglycin	Heparin	ca. 12	Mastzellen

b. Glykoproteine

Glykoproteine haben eine Polypeptidstruktur mit verzweigten Kohlenhydrat-Seitenketten, die aus 2–12 Monosaccharideinheiten bestehen können. Glykoproteine sind in größerer Zahl und Variationen vorhanden als Proteoglykane. Oft findet man als Zucker Galaktose, Mannose, Glukosamin, Galaktosamin, Fucose (= „neutrale Zucker“) und Sialinsäure.

Glykoproteine kommen an Zelloberflächen als **Glykokalix** (cell coat) und als Komponenten der **Basallamina** sowie der anschließenden Kollagenfibrillenschicht vor. Sie haben mechanische Aufgaben und bilden wahrscheinlich eine regulierende Stofftransportschranke zwischen interstitiellem Raum und anliegenden Zellen, wobei sie Stoffe an Zelloberflächen akkumulieren können. Weiters kommen sie als **Enzyme** und **Hormone** vor. Die schleimigen **Sekrete** der Drüsen von Verdauungs-, Bronchial- und Genitaltrakt sind großteils Glykoproteine und PAS-positiv. Glykoproteine gehören zu den **Grundsubstanzen des Bindegewebes** wie auch die Proteoglykane und die interstitielle Flüssigkeit. **Amyloidablagerungen** bestehen aus Glykoproteinen mit Sialinsäuren, sulfatierten Zuckern und neutralen Monosaccharidresten.

Einteilung nach Culling (1985):

I. Neutrale Polysaccharide

- Glucose beinhaltend (Glykogen, Stärke, Cellulose)
- N-Acetyl-glucosamine beinhaltend (Chitin)

Diese Gruppe gibt eine **sehr starke PAS-Reaktion** und eine negative Reaktion mit Alcianblau.

II. Saure Mucopolysaccharide (Proteoglykane)

- mit Karboxylgruppen (Hyaluronsäure; Bindegewebe)
- mit Sulfatgruppen und Karboxylgruppen (Knorpel, Hornhaut, Blutzellen; Haut, Bindegewebe, Aorta, Lunge)
- nur mit Sulfatgruppen (Aorta, Rinderhornhaut)

Es sind sogenannte Bindegewebsschleime und **PAS-negativ**.

III. Glykoproteine (Mucine, Mucoïd, Mucoproteine, Mucosubstanzen)

- neutral (Eiweiß, Magenschleim, Epithelzellgranula)
- mit Karboxylgruppen (Sialoglykoproteine; Mucine von Gl. submaxillaris; Gl. Sublingualis, Dünndarm, oberer Teil der Colorkrypten; Serumglycoproteine, Blutgruppensubstanzen)
- mit Sulfatgruppen und Karboxylgruppen (Mucine vom Colon)

Diese Glykoproteine sind hauptsächlich epitheliale Mucine. Manche können auch im Bindegewebe auftauchen. Diese Glykoproteine **können, müssen aber nicht PAS-positiv sein**.

IV. Glykolipide

- Cerebroside (Fettsäurerest gebunden an Kohlenhydrat)
- Phosphatide (beinhaltet kein Kohlenhydrat aber **PAS positiv**; Lecithin, Cephalin, Sphingomyelin)

Weitere Form der Einteilung (Bancroft 2002):

- Saure Mucine
 - stark sulfatierte Bindegewebsmucine (Alcianblau pos. bei pH 1)
 - stark sulfatierte epitheliale Mucine (Alcianblau pos. bei pH 1, PAS pos.)
 - schwach sulfatierte epitheliale Mucine (Sulfomucine, Alcianblau pos. bei pH 2,5)
 - sulfatierte, histochemisch atypische Mucine (Alcianblau pos., keine Reaktion mit üblichen Techniken für sulfatierte Mucine)
 - carboxylierte Mucine (Sialidase labile/-resistente Sialomucine)
 - sulfatierte Sialomucine
 - Hyaluronsäure (gleiche Anfärbbarkeit mit Alcianblau wie Sialomucine)
- Neutrale Mucine

4.3.3. Glykokalix

Glykokalix nennt man den Kohlenhydratanteil der **Zellmembran** (Glykoproteine und -lipide). Sie enthält saure und neutrale Mucopolysaccharide mit Carboxyl- und Sulfatgruppen, ferner Immunglobulin-Rezeptoren und außerdem zahlreiche Antigene (darunter solche des HLA-Systems). Die Glykokalix wirkt durch ihren Enzymgehalt mit an der Aufnahme von Substraten in die Zelle (Abb. 16).

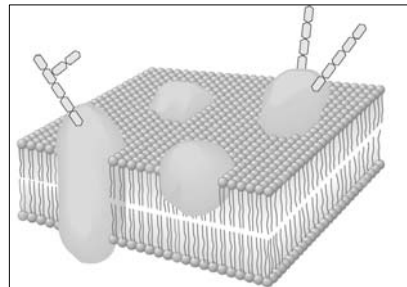


Abb.16 Zellmembran mit Doppellipidschicht, integrale Membranproteine und Kohlenhydratseitenketten

4.3.4. Basalmembran

Die Basalmembran stellt die lichtmikroskopisch erkennbare, glasklare, aus Gitterfasern und proteoglykanhaltiger Kittsubstanz bestehende Grenzschiicht (Lamelle) zwischen Bindegewebe und nicht-bindegewebigen Bestandteilen dar. Man findet sie bspw. unterhalb von Epithelien.

Elektronenmikroskopisch ist es die 0,5–1 µm breite, zweischichtige Grenzlamelle mit äußerer, elektronendichter Lamina densa (die Topographie entspricht der lichtmikroskopischen Basalmembran).

Histotechnisch lässt sich die Basalmembran durch die PAS-Reaktion und durch Silberimpregnation darstellen.

5. Lipide

„Lipide“ ist die Sammelbezeichnung für Fette und fettähnliche Stoffe (= Lipoide) mit unterschiedlicher, chemischer Struktur. Gemeinsam ist ihnen die schlechte Löslichkeit in Wasser (und gute in organischen Lösungsmitteln), die auch die besonderen physikalisch-chemischen und biochemischen Eigenschaften der Lipide bestimmt: z.B. erfolgt der Transport im Blut durch Vereinigung mit Eiweißstoffen (Lipoproteine, Transportproteine für Steroidhormone, Albumin u.a.m.), in Fetttropfen und an Zellmembranen von Blutzellen.

Fett als exogenes (zugeführtes) **Nahrungsfett und Depotfett** ist ein wesentlicher Energielieferant und -speicher. Fette werden auch als **Körperbaustoff** (ca. 160 g/kg) und Wärmeisolator eingesetzt.

Fette sind Träger essentieller Fettsäuren und fettlöslicher Vitamine.

Zur Darstellung der Fette in der histologischen Technik muss man bedenken, dass sie durch die üblicherweise verwendeten, organischen Lösungsmittel aus dem Gewebe herausgelöst werden. Deshalb erfolgt die Anfärbung von Neutralfett am **Gefrierschnitt** mittels spezieller Fettfärbung (Sudan, Ölrot). Lipide können beim Fixiervorgang durch die umgebenden, vernetzten Proteine „eingefangen“ werden.

Tabelle 3 entnommen aus: Burck, histologische Technik

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

5.1. Triglyceride

Eine Lipid-Unterklasse der Neutralfette sind Triglyceride, die mit drei Molekülen gleicher oder verschiedener **Fettsäuren** pro Glycerinmolekül verestert sind. Diese Säuren sind v.a. Öl-, Linol-, Linolen-, Palmitin- und Stearinsäure. Triglyceride enthalten meist unverseifbare Begleitstoffe (Carotinoide, Sterine, Squalen etc.).

Abhängig vom Gehalt an ungesättigten Fettsäuren sind sie flüssig bis fest, unlöslich in Wasser (hydrophob), löslich in organischen (lipophilen) Lösungsmitteln und empfindlich gegenüber Sauerstoff, Mikroorganismen, Enzymen, Wärme und hydrolytischen Stoffen. (Abb.17)

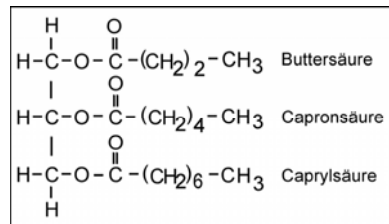


Abb.17 Triglycerid

Fettsäuren:

Gesättigte Fettsäuren sind aliphatische Monocarbonsäuren der allgemeinen Formel $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}-\text{COOH}$. (z.B. die Essig-, Butter-, Palmitin-, Stearinsäure)

Ungesättigte Fettsäuren haben die allgemeinen Formel $\text{C}_n\text{H}_{2n-1,3,5}-\text{COOH}$.

Sie werden unterschieden in einfach, doppelt oder dreifach bis mehrfach ungesättigte Fettsäuren. (z.B. die Ölsäure bzw. Linolsäure bzw. Linolensäure bzw. Arachidonsäure). Einige der ungesättigten Fettsäuren sind **essentielle Fettsäuren** (Linolsäure, Arachidonsäure). Diese werden vom Säugetierorganismus nicht synthetisiert, und ihr Fehlen in der Nahrung hat Mangelerscheinungen zur Folge. Sie sind Bestandteil von