

Über eine neue Paraffinschnelleinbettungsmethode

T. J. FLÓREZ-COSSIO

Anatomisches Institut, Lehrstuhl I der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. J. W. Rohen)

Institut für Cytobiologie und Cytopathologie der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. W. Thoenes)

Eingegangen am 20. Juni 1970

A New Fast Embedding Method for Paraffin

Summary. A new fast embedding method for paraffin is described, by which the specimen can be embedded in about 60—70 min. With the so treated sections all routine and special stainings can be carried out. This procedure is especially suitable for a fast diagnosis with human biopsy specimens.

Zusammenfassung. Es wird über eine neue Methode zur Schnelleinbettung von Geweben in Paraffin berichtet, wobei unter relativ geringem Zeitaufwand (60—70 min) das Material schonend in Paraffin überführt wird. Alle Routine- und zahlreiche Spezialfärbungen können durchgeführt werden. Das Verfahren eignet sich besonders zur Schnelldiagnostik an menschlichem Biopsiematerial.

Die herkömmlichen Paraffineinbettungsmethoden können der Forderung nach schneller und zugleich schonender Verarbeitung frisch entnommenen Gewebes nicht immer gerecht werden. Es schien daher lohnend, nach einem geeigneten Verfahren zu suchen, das die Vorteile der Paraffinmethode (Davenport, 1964) besitzt, aber ohne größere Nachteile für das Gewebe wesentlich rascher durchführbar ist. Ein solches Verfahren ist in der pathologischen Biopsiediagnostik besonders dann wünschenswert, wenn nur kleine Gewebsstücke (z. B. Punktionscylinder parenchymatöser Organe) vorliegen, an denen die übliche Gefrierschnitt-Schnelldiagnostik nicht möglich ist. Die folgende Einbettungsmethode ist in diesem Sinne erprobt worden und hat sich bestens bewährt. Die histologische Diagnose kann innerhalb 1—2 Std nach der Gewebsentnahme der Klinik übermittelt werden. Das kann bei der Differentialdiagnose bestimmter Krankheitsbilder (z. B. akutes Nierenversagen) von wesentlicher Bedeutung sein.

Vorgeschlagenes Einbettungsverfahren

1. Fixierung

Frische oder in der üblichen Weise in Formalin fixierte Gewebsstücke bis zu 3 mm Dicke werden 3—5 min in dem folgenden Gemisch (Flórez, 1969) fixiert bzw. nachfixiert:

60 ml Methanol abs. (für Analyse)

30 ml Aceton abs. (für Analyse)

20 ml Formaldehydlösung min 37 Gew.-% (Formol — säurefrei, für die Histologie) (vor Gebrauch 3mal filtrieren)

2 g Quecksilber (II) — Chlorid (für Analyse)

2 g Trichloressigsäure (für Analyse)

10 ml Essigsäure (99—100% Eisessig) (für Analyse)

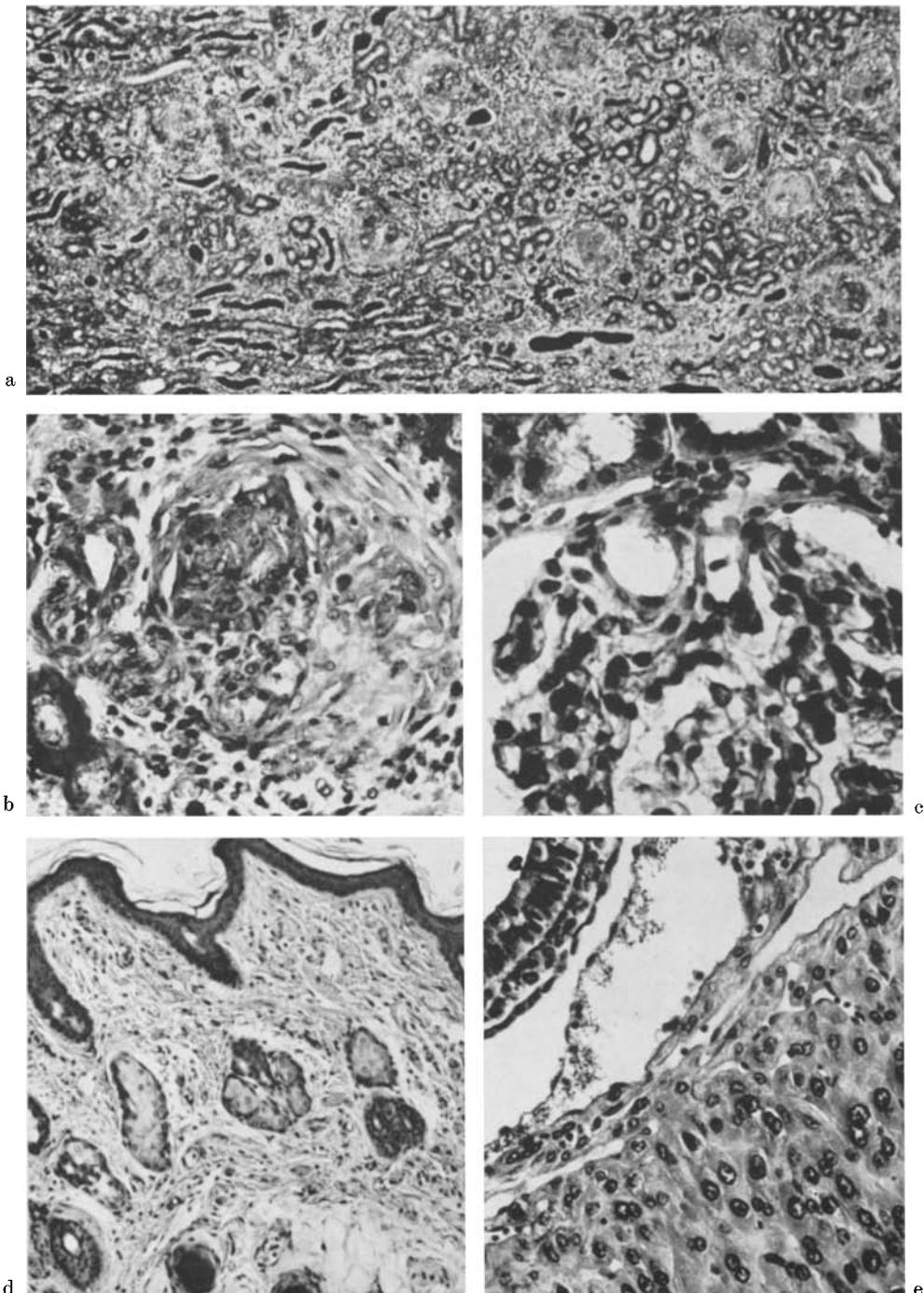


Abb. 1 a—e. Beispiele für Gewebeschnitte, die mit der angegebenen Paraffinschnelleinbettungsmethode gewonnen wurden. a—c Biopsisch gewonnenes Nierengewebe des Menschen: a Glomerulonephritische Schrumpfniere, Übersicht, Pearse, $\times 56$. b Chronische Glomerulonephritis, Pearse, $\times 385$. c Milde proliferative intracapilläre Glomerulonephritis, H.E., $\times 410$. d u.e Tierische Gewebe (Ratte): d Haut, Trichrom nach Goldner, $\times 120$. e Decidua (rechts unten) mit Eicylinder (links oben), Trichrom nach Goldner, $\times 340$

2. Spülung

Einbringen des fixierten Gewebes unmittelbar in Methanol 80% bis 1 min. (In dieser Lösung kann das Gewebe gegebenenfalls auch bis zu 24 Std liegen bleiben.)

3. Entwässerung und Entfernung des Alkohols

- a) Gemisch von Methanol (80%) und Methylbenzoat im Verhältnis 4:1 für 1 min.
- b) Gemisch von Methanol (90%) und Methylbenzoat im Verhältnis 3:1 für 1 min.
- c) Gemisch von Methanol (96%) und Methylbenzoat im Verhältnis 2:1 für 1 min.
- d) Gemisch von Methanol (100%) und Methylbenzoat im Verhältnis 1:1 für 2 min.
- e) Gemisch von Methanol (100%) und Methylbenzoat im Verhältnis 1:2 für 2 min.
- f) Gemisch von Methanol (100%) und Methylbenzoat im Verhältnis 1:3 für 2 min.
- g) Gemisch von Methanol (100%) und Methylbenzoat im Verhältnis 1:4 für 2 min.
- h) Reines Methylbenzoat für 2 min.

Der Entwässerungsvorgang kann in den Stufen d bis h durch das Absinken der Präparate kontrolliert werden. [Das angegebene Methylbenzoat entspricht dem Benzoesäuremethylester (für Mikroskopie).]

4. Einbettung

- a) Paraffin (Schmelzpunkt 42°) — Methylbenzoat, Mischungsverhältnis 1:1, für 3 min.
- b) Paraffin (42°) — Methylbenzoat, Mischungsverhältnis 2:1, für 3 min (jeweils in einem geschlossenen Glas bei + 55° C im Brutschrank).
- c) Reines Paraffin (42°) mit zwei Durchgängen — je 3 min.
- d) Reines Paraffin (53°) mit zwei Durchgängen — je 3 min (jeweils bei + 55° C im Brutschrank).
- e) Einblockung in Paraffin (53°) — (das Erkalten wird durch kurzes Verbleiben und Erhärten des Paraffins zunächst in Raumtemperatur, anschließend durch 3 min Aufenthalt im Kühlfach beschleunigt).

5. Herstellung der Paraffinschnitte

Die in der angegebenen Weise eingebetteten Gewebsstücke lassen sich gut schneiden und wie andere Paraffinschnitte entparaffinieren und färben. Zum Aufkleben der Schnitte verwenden wir anstelle von Eiweißglycerin ein Gelatine-Chromalaun-Gemisch (1 g Gelatine, 200 ml Aqua bidest., 0,1 g Chromalaun). Die Gelatine wird in Aqua bidest gelöst und dann mit Chromalaun versetzt. Vor Gebrauch ist das Gemisch zu filtrieren; es ist nicht länger als 12 Std haltbar.

Diskussion

Das angegebene Schnelleinbettungsverfahren wurde empirisch entwickelt. Wichtig erscheint, daß bereits während der Fixierung mit dem Methanol-haltigen Gemisch (Flórez, 1969) die Entwässerung eingeleitet wird. Die anschließend verwendeten Methylalkohol-Methylbenzoat-Gemische (Apathy, 1912) verbinden die Entwässerung mit der Entalkoholisierung, so daß das Präparat sehr rasch in reines Methylbenzoat gelangt. Da sich bei einer Temperatur von + 55° C Methylbenzoat entgegen üblicher Meinung durchaus mit Paraffin mischt, kann auf die üblicherweise angeschlossene Benzol-Stufe verzichtet und das Gewebe über Methylbenzoat-Paraffin-Gemische direkt in Paraffin eingebracht werden.

Das Einbettungsverfahren wurde an Ratten- und Hühnerembryonen wie an verschiedenen Organen (Leber, Niere, Augen, Haut) erwachsener Organismen (Ratte, Kaninchen, Hamster, Mensch) erprobt. Celluläre und extracelluläre Strukturen zeigen einen guten Erhaltungszustand (Abb. 1).

Es können alle Routinefärbungen sowie auch histochemische Spezialverfahren insbesondere für Polysaccharide, Mucopolysaccharide, Proteine, Nucleinsäuren

(Gallocyanin-Chromalaun, Pyronin-Methylgrün, Feulgen) durchgeführt werden. Auch Silberimprägnationsverfahren gelingen an derart eingebettetem Material.

Literatur

- Apáthy, S. von: Neuere Beiträge zur Schneidetechnik. Z. wiss. Mikr. **29**, 449—515 (1912).
Davenport, H.: Histological and histochemical technics. London: W. B. Saunders Comp. 1964.
Flórez, T. J.: Eine neue Fixierung zur lichtmikroskopischen Darstellung morphologischer und histochemischer Vorgänge bei embryonalen und erwachsenen Geweben für Schnitt- und Totalpräparate. Z. Mikr. u. mikr. Technik **69**, 3, 157—161 (1969).
Graumann, W., Neumann, K.: Handbuch der Histochemie, Bd. I und II. Stuttgart: Gustav Fischer 1962.
Hackl, H.: Eine Schnelleinbettung kleiner Gewebsstückchen für die histologische Untersuchung. Z. wiss. Mikr. **64**, 4, 248—252 (1959).
Romeis, B.: Mikroskopische Technik, 16. Aufl. München: R. Oldenbourg 1968.

Dr. T. J. Flórez-Cossio
Anatomisches Institut der Universität
D-3550 Marburg, Robert Koch-Str. 6