

Zur Feinstruktur von formalinfixiertem Biopsie- und Autopsiematerial nach Paraffineinbettung* **

G. HÜBNER

Pathologisches Institut der Universität zu Köln (Komm. Leiter: Prof. Dr. R. Fischer)

Eingegangen am 15. Juli 1970

Fine Structure of Formalin-Fixed Biopsy- and Autopsy-Specimens after Paraffin-Embedding

Summary. The fine structure of human biopsy and autopsy specimens fixed in formalin and embedded in paraffin was investigated after re-embedding the tissue in Epon. In doing so, it could be shown that the fine structural conservation of the material mainly depends on the quality of the initial fixation. Therefore small biopsy specimens, especially needle biopsies, give the best results, showing a good preservation of nuclear components, ergastoplasm, ribosomes, mitochondria, cell inclusions (lysosomes), basement membranes, differentiations of the cell membrane, and intra- and intercellular fibrils. Other cellular constituents, for instance, the smooth endoplasmic reticulum, the Golgi complex and after prolonged fixation also the karyoplasm, the cytoplasmatic ground substance as well as glycogen disappear. Even in autopsy material important cellular structures – chromatin, nucleolus, ergastoplasm and polyribosomes, desmosomes, fibrils, pigment granules and virus particles – are well preserved. In special cases therefore it may prove useful to carry out a fine structural analysis by electron microscopy of human material from the big pool of paraffin-embedded specimens stored in every department of pathology.

Zusammenfassung. Zur Biopsie und Autopsie gewonnene formolfixierte und in Paraffin eingebettete menschliche Gewebeproben wurden nach Entparaffinieren und Umbettung in Kunststoff elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei zeigt sich, daß insbesondere kleine Gewebestücke, z.B. Nadelbiopsien, auch nach Paraffineinbettung noch eine ausgezeichnet stabilisierte Feinstruktur erkennen lassen. Der Erhaltungsgrad des Gewebes hängt dabei vorwiegend von der Qualität der initialen Formalinfixierung ab; er ist daher bei Leber- und Nierenbiopsien besonders gut. Die meisten der für eine feinstrukturelle Analyse von Zellen und Geweben wichtigen Strukturdetails, wie Kernbestandteile, Mitochondrien, Zelleinschlüsse, Differenzierungen der äußeren Zellmembran, Basalmembranen, intra- und interzelluläre Fibrillen sowie Fibrin- oder Amyloideinlagerungen bleiben gut erhalten. Dagegen sind glattes endoplasmatisches Reticulum und der Golgi-Komplex im allgemeinen nicht mehr nachweisbar; bei längerer Vorfixierung gehen Karyoplasma, Glykogen und zelluläres Grundplasma zunehmend verloren. Am Autopsiematerial sind nach Paraffineinbettung trotz erheblich stärkerer Substanzverluste noch wesentliche feinstrukturelle Details erkennbar. Es ergibt sich somit die Möglichkeit, bestimmte menschliche Gewebeproben, wie in toto in Paraffin eingebettete Nadelbiopsien, noch nachträglich einer elektronenmikroskopischen Untersuchung zu unterziehen, die seither aus äußeren Gründen hierfür nicht geeignet erschienen. Eine selektive feinstrukturelle Untersuchung des sehr reichhaltigen paraffineingebetteten menschlichen Gewebematerials, das in den Pathologischen Instituten archiviert ist, läßt neue wichtige Erkenntnisse zur feinstrukturellen Organisation gesunder und kranker menschlicher Zellen und Gewebe erwarten.

* Mit freundlicher Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** In memoriam Nicole Granboulan.

Im Laufe der letzten 15 Jahre ist die feinstrukturelle Organisation tierischer Zellen und Gewebe weitgehend aufgeklärt worden. Obwohl es nicht an Versuchen gefehlt hat, die zahlreichen in den pathologischen Instituten eingehenden menschlichen Gewebeproben auch einer elektronenmikroskopischen Untersuchung zugänglich zu machen, sind hingegen unsere Kenntnisse von der Feinstruktur normaler oder krankhaft veränderter menschlicher Organe nach wie vor recht lückenhaft.

Die Ursache hierfür liegt an methodischen Gegebenheiten: So ist beispielsweise eine routinemäßige gleichzeitige Fixierung des Gewebes sowohl in Osmiumsäure oder Glutaraldehyd für die elektronenmikroskopische Untersuchung als auch separat in Formalin für die lichtmikroskopische Untersuchung aus finanziellen und personellen Gründen nur in Einzelfällen und bei guter Zusammenarbeit zwischen dem klinisch tätigen Arzt und dem Pathologen durchführbar. Eine weitere Möglichkeit, vermehrt Biopsien einer feinstrukturellen Analyse zuzuführen, besteht in der Verwendung von glutaraldehydfixiertem Gewebe für die licht- wie die elektronenmikroskopische Untersuchung (Hübner 1964, 1965). Nachdem aber einerseits die Glutaraldehydfixierung bei Anwendung der üblichen histologischen Färbungen nicht immer optimale Ergebnisse erbringt, und andererseits aus technischen Gründen stets nur eine kleine Zahl von einsendenden Ärzten dazu veranlaßt werden kann, vom bewährten Formalin abzugehen, wurden schließlich Versuche mit Formalin unternommen. In eigenen Untersuchungen unter Verwendung von rohem ungepuffertem 5–10 % igen Formalin konnte festgestellt werden, daß bei einem derartigen Vorgehen die Feinstruktur bestimmter Gewebs- und Zellstrukturen gut erhalten bleiben kann (Hübner, 1966; Hübner und Paulussen, 1966, 1968). Aber selbst dieser Weg, welcher bestimmte Gewebe trotz „suboptimaler“ Stabilisierung ihrer Feinstruktur einer elektronenmikroskopischen Analyse zugänglich macht, ist aus zweierlei Gründen vielfach nicht begehbar: Einmal wird üblicherweise das formalinfixierte Material nach Paraffineinbettung der wichtigsten Gewebsabschnitte zumindest nach erfolgter lichtmikroskopischer Durchmusterung verworfen. Zum anderen werden zahlreiche kleine Gewebeproben, insbesondere Leber- und Nierenbiopsien, wegen der geringen zur Verfügung stehenden Gewebsmenge sofort in toto in Paraffin eingebettet, so daß dann formalinfixiertes Material für eine elektronenmikroskopische Untersuchung überhaupt nicht zur Verfügung steht. Diese Gegebenheiten führten zu der Überlegung, ob sich nicht auch paraffineingebettetes Gewebe für eine elektronenmikroskopische Untersuchung eignen würde, zumal wir vor mehreren Jahren am Beispiel eines Onkocytems der Speicheldrüsen (Hübner und Paulussen, 1966) hatten feststellen können, daß dieses formalinfixierte Gewebe auch nach Paraffineinbettung noch wesentliche feinstrukturelle Details erkennen ließ.

Es sollte daher in einer größeren Untersuchungsreihe formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes menschliches Gewebe, wie es im Rahmen der täglichen Routinediagnostik einem Pathologischen Institut zugeführt wird, elektronenmikroskopisch untersucht werden. Die Untersuchung von derartig vorbehandeltem Biopsiematerial erschien uns insbesondere auch deshalb aussichtsreich, weil solches Gewebe, insbesondere Nadelbiopsien, im allgemeinen sofort nach der Entnahme in Formalin eingelegt wird. Auch war zu erwarten, daß bei derartigem gut fixiertem Material die nach langer Formalineinwirkung elektronenmikroskopisch nachweisbaren Artefakte (Hübner und Paulussen, 1968) bei nur 1–2tägigem Verbleib des Materials in Formalin und nachfolgender Paraffineinbettung möglicherweise nicht eintreten würden. — Wenn auch nach eigenen früheren Erfahrungen (Hübner und Paulussen, 1966) bei Verwendung von Autopsiematerial mit stärkeren autolytisch bedingten feinstrukturellen Abweichungen von der Norm gerechnet werden mußte, bezogen wir der Vollständigkeit halber Sektionsmaterial ebenfalls in unsere Untersuchungsreihe ein.

Versuchsanordnung und Methodik

Zur Untersuchung kamen die folgenden Gewebeproben:

I. Biopsiematerial

8 Nadelbiopsien der Leber (3 Fälle von chronischer Hepatitis, eine Lebercirrhose, ein Morbus Dubin-Johnson, eine Leber mit Phenacetin-Pigment-Einlagerung, 2 Leberglykogenosen). — 3 Nierenbiopsien (nephrotisches Syndrom). — 4 normale Dickdarmexcisionen. — 1 normale Schilddrüsenexcision. — 2 Skelettmuskelbiopsien (1 normales Muskelstück, 1 Fall von Muskelglykogenose Typus McArdle). — 6 Geschwülste (1 Kolloidstruma, 1 Nebennierencarcinom, 4 hyperplastische Dickdarmpolypen).

II. Autopsiematerial

1. *Sofort nach dem Tode entnommenes Gewebe.* 2 Lungengewebsstücke (Schocksyndrom Zytomegalie der Lunge). — 1 Lebergewebsstück bei Morbus Moschcowitz.

2. *24—36 Std post mortem entnommenes Autopsiematerial.* 3 Herzgewebsstücke⁺ (Morbus Moschcowitz, Galaktosämie, normales Herz). — 6 Nierengewebsstücke (2 Fälle Morbus Moschcowitz⁺, 2 Nierenamyloidosen, 1 Nierenzytomegalie, 1 Glomerulonephritis). — 2 Lungengewebsstücke⁺ (Zytomegaliepneumonie, Bronchopneumonie). — 2 Aortenstücke⁺ (Medianekrose, normale Aorta). — 4 Geschwülste⁺ (2 Carcinome des Dünndarms, 1 Lebermetastase eines Dünndarmcarcinoides, 1 Onkocytom der Glandula parotis).

Die mit einem ⁺ versehenen Gewebestücke wurden zum Vergleich auch formalinfixiert ohne nachfolgende Paraffineinbettung direkt in Kunststoff eingebettet.

Die Gewebeproben waren sämtlich in rohem 5—10%igem ungepuffertem Formalin bei Zimmertemperatur eingelegt worden; die Fixationszeit betrug 2 Std bis 4 Monate. Bei den größeren Biopsien bzw. bei dem Autopsiematerial betrug die Stückgröße etwa 1 mal 1 × 3 cm. Nach der üblichen Paraffineinbettung wurde das Gewebe nach Ablauf von mehreren Tagen bis 5 Jahren für die elektronenmikroskopische Untersuchung in üblicher Weise entparaffiniert und nach Überführen in wäßriges Medium für 2 Std in 2%iger Osmiumsäurelösung nachfixiert. Sodann erfolgte entweder eine Einbettung der auf etwa 2 mal 2 × 5 mm Größe zurechtgeschnittenen Gewebstückchen in der üblichen Weise in Epon 812 oder aber es wurde eine Schnelleinbettung von insgesamt 3 Std Dauer (Tsutsumi und Bencosme, 1970) in flachen Plastikschalen durchgeführt. Von diesen Gewebstückchen wurden Semidünnschnitte hergestellt und mit Azur II nach Richardson u. Mitarb. (1960) bzw. mit einer modifizierten Azur II-PAS-Reaktion gefärbt. Ausgesuchte Gewebspartien wurden sodann mit Diamantmessern der Firmen Dupont bzw. Dehmer ultradünn geschnitten, mit konzentrierter Uranylacetat- und alkalischer Bleilösung (Karnovsky, 1961, Methode A) kontrastiert und in einem Siemens-Elmiskop IA Elektronenmikroskop auf unterstützender Trägermembran untersucht.

Ergebnisse

Die *lichtmikroskopische Durchmusterung der 1 μ dicken Semidünnschnitte* ergab eine ausgezeichnete Konservierung der Gewebsstruktur; Unterschiede gegenüber solchem Material, das aus Formalin direkt in Epon eingebettet worden war, ließen sich nicht feststellen. Die *elektronenmikroskopische Untersuchung* des vorher paraffineingebetteten Materials zeigte an den untersuchten Biopsien eine ausgezeichnet erhaltene Feinstruktur des *Zellkernes* (Abb. 1—4). Chromatingerüst, Nucleolus und Kernporen waren deutlich dargestellt. Das Karyoplasma ließ sich am Biopsiematerial meist vollständig nachweisen; nur dann, wenn das Gewebe vor der Paraffineinbettung längere Zeit im Formalin gelegen hatte, war ein Herauslösen des Karyoplasma aus dem Zellkern festzustellen. Die Kernmembran war, ebenso wie die meisten zellulären Membranen, entsprechend den Befunden nach einer Formalinfixierung nur angedeutet zu erkennen; an Stelle der Membran fanden sich meist

strahlenddurchlässige Bezirke. Das äußere Blatt der Kernmembran war mit deutlich sichtbaren Ribosomen besetzt (Abb. 1). Im Zytoplasma der untersuchten Zellen fand sich stets ein ausgezeichneter Erhaltungsgrad des organisierten (rauen) endoplasmatischen Reticulum, des sogenannten Ergastoplasma (Abb. 1 und 2). Die Ribosomen saßen an angedeuteten Membranen bzw. an Aussparungen, welche den Ort der Membran markierten. Freie Ribosomen waren in Rosettenform im Zytoplasma gut erkennbar. Dagegen waren die glattwandigen Bläschen des sogenannten glatten endoplasmatischen Reticulum nicht mit Sicherheit auszumachen, auch der Golgi-Komplex war im allgemeinen nicht darzustellen. Die Mitochondrien zeigten vielfach einen ausgezeichneten Erhaltungszustand (Abb. 1 und 2). Ihre Matrix war strahlendicht; nur in seltenen Fällen waren Schwellungsartefakte zur Darstellung gekommen. Die Mitochondrienmembranen waren meist nur als strahlenddurchlässige Lücken dargestellt, der Raum zwischen den Außenmembranen bzw. zwischen den Cristae war oft als strahlenundurchlässiger Spalt erkennbar. Die dichten Matrixeinschlüsse der Mitochondrien waren nur ganz vereinzelt nachweisbar. Zentriolen waren regelmäßig in der üblichen Form erkennbar. Die äußere Zellmembran bestand meist aus einer Verdichtung des angrenzenden Zytoplasma; ihr Verlauf war ohne Schwierigkeiten zu verfolgen. Differenzierungen der äußeren Zellmembran, z. B. Mikrovilli und Desmosomen waren stets vorhanden (Abb. 4). An den einzelnen untersuchten Gewebsarten waren darüber hinaus noch folgende Besonderheiten bemerkenswert: In den meisten *Leberbiopsien* war außer den hier aufgeführten Befunden Glykogen deutlich erkennbar. Dies war besonders auffällig bei den 2 Fällen von Leberglykogenose; hier fand sich das Glykogen in typischer gleichförmiger Rosettenform im Grundplasma gelegen (Abb. 2), das im übrigen an einigen Stellen Defekte durch Herauslösen aufwies. Intrazelluläre Pigmenteinschlüsse unterschieden sich nicht wesentlich von denen, die nach üblicher elektronenmikroskopischer Fixierung dargestellt werden. Kollagene Fasern im Glissonschen Feld oder bei den chronischen Lebererkrankungen im Leberläppchen waren stets in ihrer Struktur wie in ihrem Verlauf deutlich nachweisbar. In den Kapillaren gelegene Erythrozyten zeigten oberflächliche rundliche Substanzdefekte. — An den *Nierenbiopsien* war ebenfalls ein guter Erhaltungszustand der zellulären Feinstruktur auffällig: Die Basalmembranen der Glomerulumkapillaren ließen sich gut darstellen; jeweils vorhandene Verdickungen oder Auflagerungen waren in gleicher Weise wie bei *lege artis* fixiertem Material nachweisbar. An den Epithelzellen waren die zahlreichen Fußfortsätze gut zu erkennen (Abb. 3). Endothelzellschwellungen ließen sich ohne Schwierigkeiten feststellen; die Kapillarendothelien zeigten im Querschnitt wie auch auf Flachschnitten zahlreiche deutliche Endothelporen (Abb. 3). Die Zellen der Harnkanälchen enthielten normal geformte Mitochondrien; Zelleinschlüsse, z. B. hyaline Eiweißtropfen, waren hier in üblicher Form und Struktur vorhanden. Das gleiche gilt für die basal gelegenen eingefalteten Zellmembranen. Der Bürstensaum war an vielen Zellen noch intakt. — An den *Dickdarmbiopsien* ebenso wie an den Dickdarmpolypen fiel der gute Erhaltungszustand der Mikrovilli des Bürstensaumes auf (Abb. 4). — An den *Skelettmuskelbiopsien* waren die Mitochondrien wegen starker Schwellung nur noch schattenhaft erkennbar. Dagegen waren Myofilamente, Querstreifung und Glykogen in typischer Weise dargestellt (Abb. 5). Insbesondere bei dem Fall der

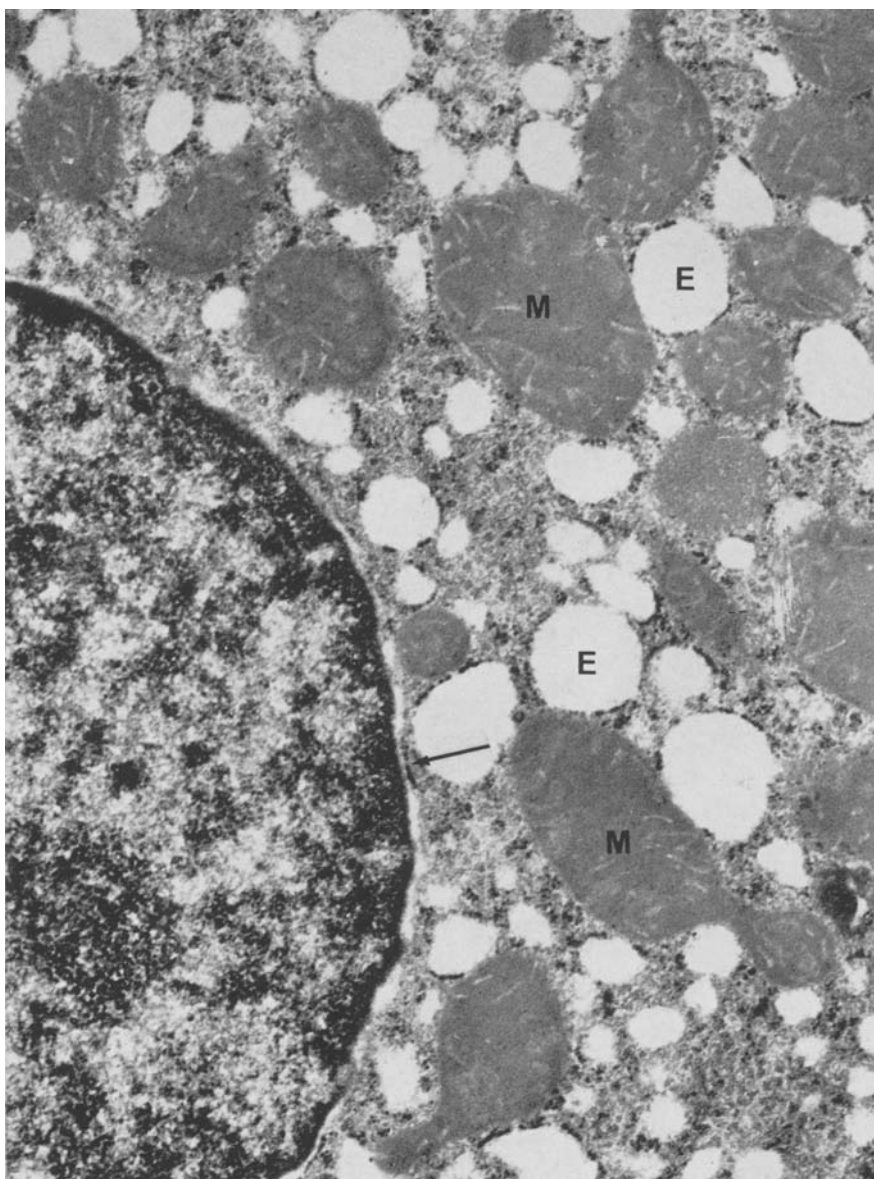


Abb. 1. Leber, Mensch, Nadelbiopsie, chron. Hepatitis. Formolfixierung, Paraffineinbettung, anschließend Umbettung in Epon. In der angeschnittenen Leberzelle gut dargestellte Mitochondrien *M*, Ergastoplasmazisternen *E* mit Ribosomenbesatz. Am links unten liegenden Zellkern einzelne Ribosomen an der äußeren Kernmembran (Pfeil). Arch.-Nr. 7336. Vergr. el. optisch 6000 \times ; Endvergr. 18000 \times

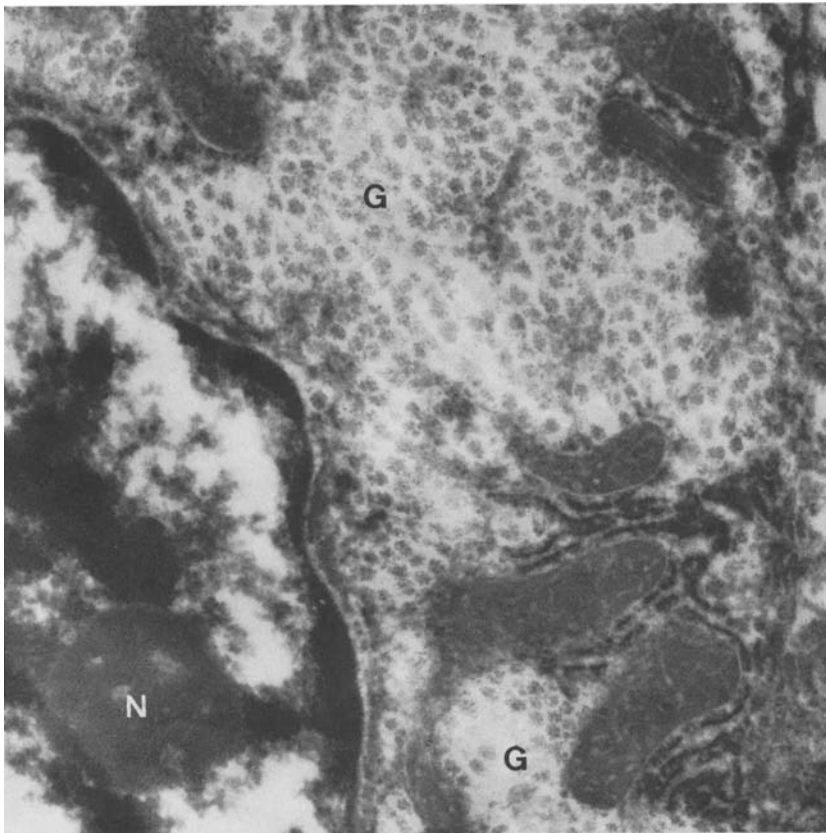


Abb. 2. Leber, Mensch, Nadelbiopsie, Leberglykogenose. Formolfixierung, Paraffineinbettung, anschließend Umbettung in Epon. Ausschnitt aus einer Leberzelle zeigt neben einem Anschnitt des Zellkerns mit Nucleolus *N* im Zytoplasma Mitochondrien, Ergastoplasmaprofile sowie zahlreiche etwa gleich große Glykogenpartikel *G*. Arch.-Nr. 73338. Vergr. el. optisch 10000 \times ; Endvergr. 30000 \times

Muskelglykogenose fielen die reichlichen Glykogenablagerungen auf, die sich in gleicher Weise darstellten, wie an dem Material, das direkt nach einer Glutaraldehydfixierung in Epon eingebettet worden war.

Autopsiematerial. Am Autopsiematerial waren erwartungsgemäß stärkere Einbußen der feinstrukturellen Organisation festzustellen. Sie waren geringer an denjenigen Gewebstücken, die sofort nach dem Tode entnommen und in Formalin fixiert worden waren sowie bei denjenigen, die nur kurze Zeit in Formalin gelegen hatten. So konnten wir bei dem sofort nach dem Tode entnommenen Lungengewebe die Struktur von sogenannten hyalinen Thromben ohne Schwierigkeiten analysieren, diese bestanden aus zusammengesinterten Erythrozyten, zwischen denen vereinzelt Thrombozyten und reichlich Fibrinfäden mit der typischen Querstreifung gelegen waren (Abb. 6). Bei der Lungenzytomegalie war eine gute

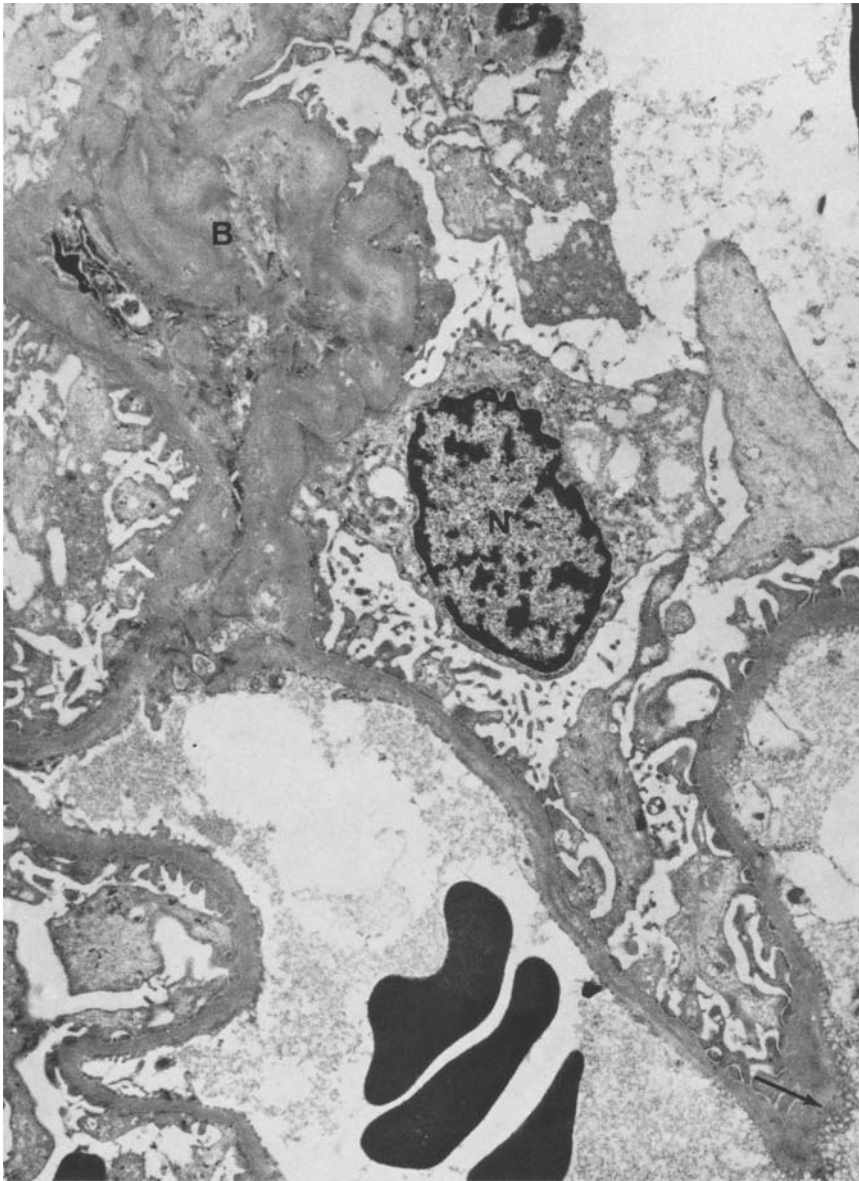


Abb. 3. Niere, Mensch, Nadelbiopsie, nephrotisches Syndrom. Formolfixierung, Paraffineinbettung, anschl. Umbettung in Epon. Ausschnitt aus einem Glomerulum zeigt angeschnittene Kapillarschlingen mit gut dargestellter Basalmembran. Bei *B* Verdickung der Basalmembranen und Ablagerung eines basalmembranartigen Materials. Die in Bildmitte liegende Deckzelle mit Zellkern *N* entsendet zahlreiche Fußfortsätze gegen die Basalmembran. In der rechts unten liegenden Kapillare zahlreiche Endothelporen im Flachschnitt (Pfeil). Arch.-Nr. 7312. Vergr. el. optisch 2000 \times ; Endvergr. 6000 \times

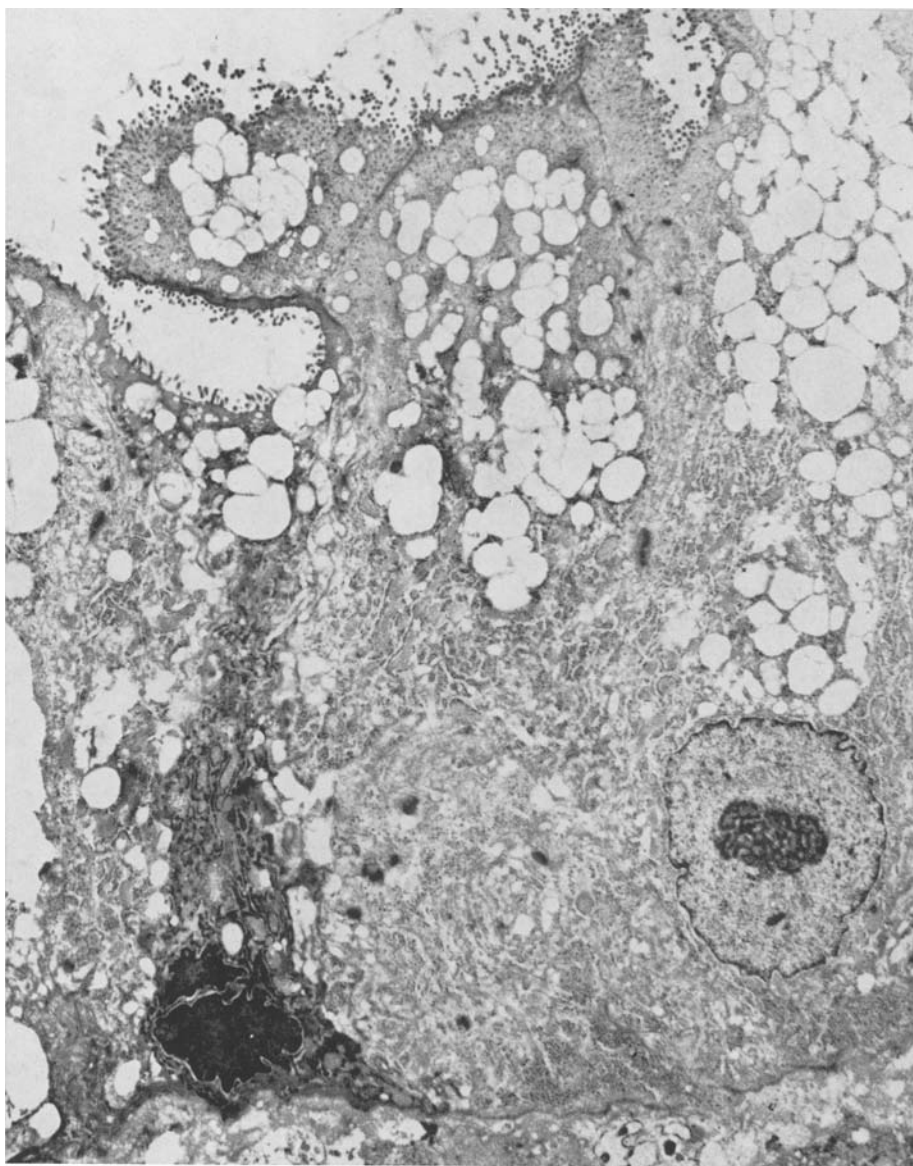


Abb. 4. Hyperplastischer Dickdarmpolyp, Biopsiematerial. Formolfixierung, Paraffineinbettung, anschließend Umbettung in Epon. Die Zellen entsenden gegen das oben gelegene Drüsenlumen zahlreiche Mikrovilli. Sie enthalten zahlreiche Schleimvakuolen. In der linken Bildhälfte eine verdichtete Zelle mit pyknotischem Zellkern. Arch.-Nr. 7521.

Vergr. el. optisch $2000\times$; Endvergr. $6000\times$

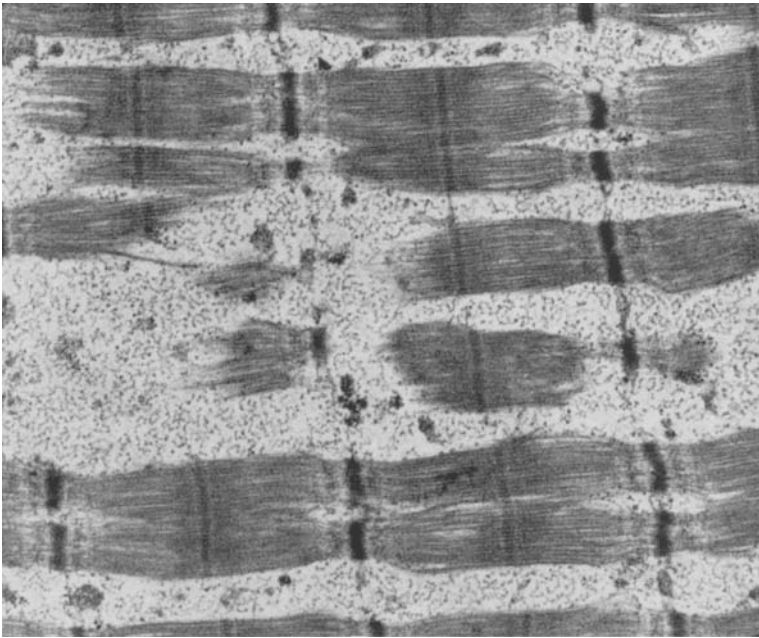


Abb. 5. Mensch, Skelettmuskelbiopsie. Formolfixierung, Paraffineinbettung, anschließend Umbettung in Epon. Ausschnitt aus Skelettmuskelfaser zeigt Myofibrillen mit deutlicher Querstreifung, dazwischen zahlreiche Glykogenkörnchen. Arch.-Nr. 7326. Vergr. el. optisch 6000 \times ; Endvergr. 18000 \times

Erhaltung der Zellkerne sowie der Viruspartikel zu erkennen. Das *Lebergewebsstück* beim Morbus Moschcowitz enthielt typische intravasculäre Fibrinablagerungen.

Am übrigen Autopsiematerial waren zunächst ebenso wie bei den untersuchten Biopsien keine wesentlichen Unterschiede im Grade der Strukturerhaltung beim Vergleich von paraffin- und nichtparaffineingebettetem Gewebe festzustellen. Es fand sich an den Zellkernen zwar eine gute Darstellung des Chromatingerüsts, das Karyoplasma war jedoch weitgehend herausgelöst. Die äußere Kernmembran war jeweils mit Ribosomen besetzt. Im Zytoplasma war das Ergastoplasma ebenso wie die Polyribosomen gut erhalten. Die Mitochondrien zeigten dagegen Schwellungen und enthielten strahlendichte (calciumhaltige?) Einschlüsse. Das glatte endoplasmatische Reticulum war ebenso wie der Golgi-Komplex nicht mehr nachweisbar, dagegen konnte gelegentlich Glykogen in seiner typischen Form aufgefunden werden. Die *Nierengewebsstücke* zeigten ähnliche Veränderungen; an den gut erhaltenen Basalmembranen waren Verdickungen und Auflagerungen gut sichtbar. In den Fällen von Morbus Moschcowitz waren Fibrinablagerungen in den Gefäßen wie in den Gefäßwänden und subendotheliale fibrilläre Gefäßwandeinlagerungen einwandfrei festzustellen. Das gleiche gilt für feinfibrilläre Amyloideinlagerungen. An den *Lungengewebsstücken* konnten die verschiedenen Typen von Entzündungszellen, wie gelapptkernige Leukozyten, Plasmazellen und eosinophile Leukozyten

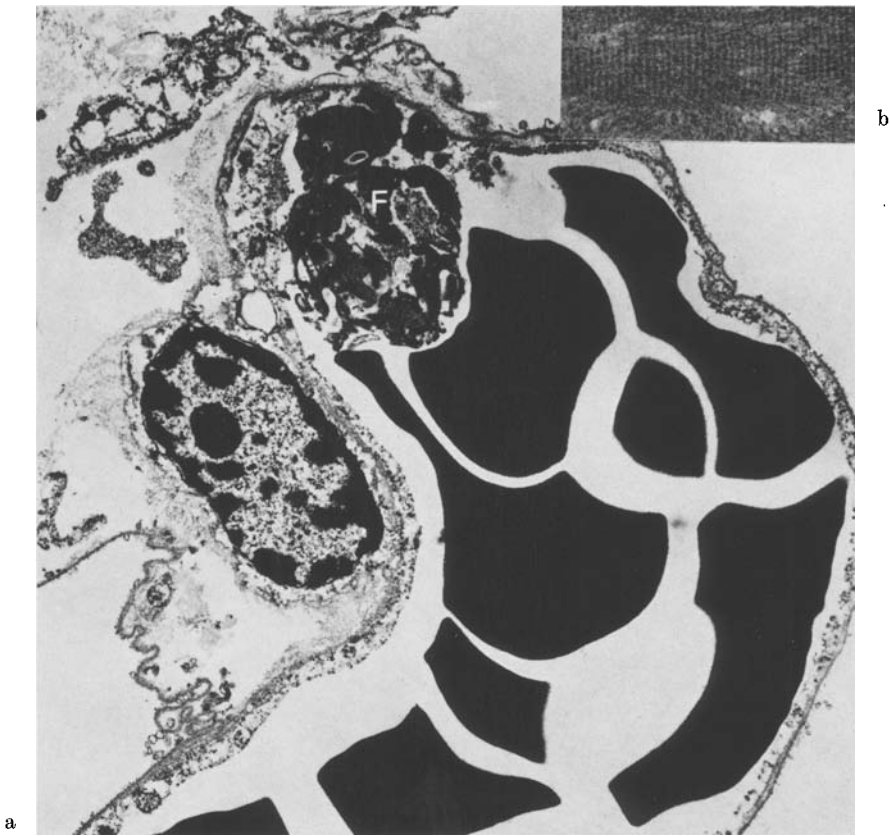


Abb. 6 a u. b. Mensch, Lunge. a Autopsiematerial 2 Std nach dem Tode entnommen. Formalinfixierung, Paraffineinbettung, anschließend Umbettung in Epon. In einer Lungenkapillare zahlreiche Erythrozyten sowie strahlendichte Fibrinablagerungen *F*. Arch.-Nr. 7190. Vergr. el. optisch $2000\times$; Endvergr. $6000\times$. b Ausschnitt rechts oben: Bei starker Vergrößerung deutliche Querstreifung des Fibrin. Arch.-Nr. 7192. Vergr. el. optisch $18000\times$; Endvergr. $54000\times$

leicht identifiziert werden; sowohl hier, wie in dem Fall einer Nierenzytomegalie waren die Zytomegalieviren ausgezeichnet zur Darstellung zu bringen (Abb. 7). An den untersuchten Geschwülsten schließlich fiel auf, daß in den Zellen der *Carcinoide* ebenso wie in der Carcinoidmetastase der Leber jeweils typische intrazelluläre strahlendichte Granula vorlagen, die als spezifisch für das Carcinoid anzusehen sind. Am *Onkocytom der Glandula parotis* schließlich war der Erhaltungszustand der vergrößerten und abartig geformten Mitochondrien so gut, daß diese Zellen ohne Schwierigkeiten als Onkocyten identifiziert werden konnten.

Besprechung der Ergebnisse

Die hier vorgelegten Befunde einer feinstrukturellen Untersuchung von formalinfixiertem und anschließend in Paraffin eingebettetem Gewebe zeigen, daß an solchem für die lichtmikroskopische Routinediagnostik vorbereitetem Material

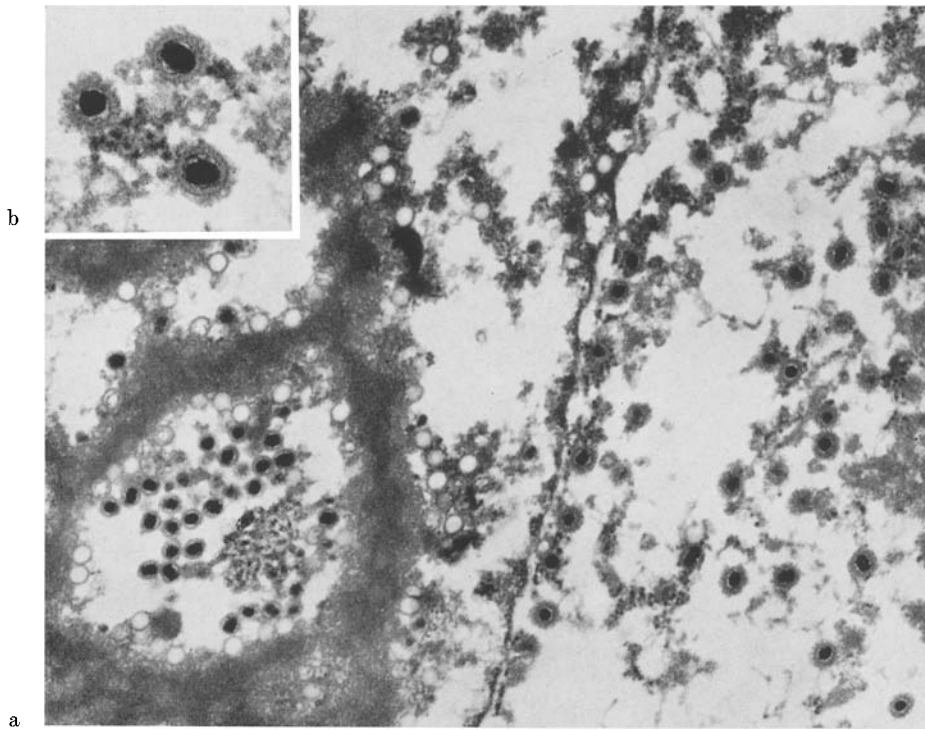


Abb. 7 a u. b. Niere, Mensch, Autopsiematerial 36 Std nach dem Tode entnommen, Zytomegalie. Formalinfixierung, Paraffineinbettung, 5 Jahre später Umbettung in Epon. a Ausschnitt aus zytomegal umgewandelter Nierenepithelzelle zeigt im Zellkern (linke Bildhälfte) wie im Zytoplasma (rechte Bildhälfte) Viruskörper in verschiedenen Entwicklungsstadien. Arch.-Nr. 71194. Vergr. el. optisch $10000\times$; Endvergr. $30000\times$. b Ausschnitt links oben: Viruspartikel aus dem Zytoplasma bei stärkerer Vergrößerung. Arch.-Nr. 7116, Vergr. el. optisch $14000\times$; Endvergr. $81000\times$

ohne wesentliche Schwierigkeiten anschließend eine ultrastrukturelle Analyse mit Hilfe des Elektronenmikroskopes durchführbar ist. Dabei hängt offensichtlich die Stabilisierung der Feinstruktur vorwiegend von der Güte und Dauer der initialen Gewebsfixierung ab. Demzufolge wird Gewebe, das sofort nach der Entnahme in kleinen Stücken in die Formalinlösung eingelegt wurde, besser erhalten sein als solches, das erst einige Zeit nach der Entnahme in Formalin gelangte oder bei dem die Fixierung möglicherweise zu langsam ablief. Dagegen scheint die an die Paraffineinbettung angeschlossene Entparaffinierung und Neueinbettung des Gewebes in Epon die Feinstruktur des Gewebes nur noch unbedeutend zu beeinflussen; auch die Verweildauer des Materials in Paraffin spielt offenbar keine Rolle. Dies erklärt, weshalb kleine bioptisch gewonnene Gewebsstücke, besonders Nadelbiopsien, für eine an die Paraffineinbettung angeschlossene Umbettung in Kunststoff mit darauffolgender elektronenmikroskopischer Untersuchung besonders geeignet sind, was von erheblicher praktischer Bedeutung ist: Derartiges Material wird im allgemeinen von vornherein in toto in Paraffin eingebettet und steht als formalinfixiertes restliches Feuchtmaterial gar nicht mehr zur Verfügung. Der bei

längerer Formalineinwirkung nachweisbare Materialverlust durch Herauslösung bestimmter Zellbestandteile (Hübner und Paulussen, 1968) ist auch am paraffineingebetteten Gewebe erkennbar. Überhaupt ähneln die Befunde am paraffineingebetteten Gewebe durchaus denjenigen, die an formalinfixiertem Material ohne zwischengeschaltete Paraffineinbettung beobachtet wurden. Während die meisten Zell- und Gewebsbestandteile gut erhalten bleiben, findet sich ein schlechter Stabilisierungseffekt am glattwandigen endoplasmatischen Reticulum, am Golgi-Komplex und bei längerer Fixierungsdauer am Karyoplasma, am Glykogen und am zellulären Grundplasma. Die zellulären Membranen sind häufig, wie nach einfacher Formalinfixierung, nur angedeutet oder als „Negativ“ zu erkennen. Die geringen optischen Dichteunterschiede bei der Membrandarstellung sind am ehesten bei völlig glatten Ultradünnschnitten, wie sie mit Diamantmessern hergestellt werden können, nachweisbar. — An dem autoptisch gewonnenen Material sind naturgemäß stärkere durch Autolyse bedingte Substanzdefekte zu verzeichnen. Sie entsprechen in ihrer Intensität etwa denjenigen, die nach einer Präparation von entsprechenden formalinfixiertem „Feuchtmaterial“ und anschließender alleiniger Kunststoffeinbettung beobachtet wurden (Paulussen und Hübner, 1966). Immerhin sind auch an einem derartigen Autopsiematerial, das zunächst in Paraffin eingebettet worden war, an den Zellkernen und im Zytoplasma wichtige Details, wie Chromatingerüst und Nucleolus, Kernporen, Ergastoplasma und Polyribosomen, intrazelluläre Fibrillen, Desmosomen, Virus- und Pigmenteinschlüsse nachweisbar. Ebenso bereitet der Fibrinnachweis mit der typischen Querstreifung und die Analyse von fibrillärem Amyloid keine Schwierigkeiten. Als besonders wichtig erscheint, daß auch am Autopsiematerial die Basalmembranen mit gegebenenfalls vorhandenen Auflagerungen oder Verdickungen sehr gut erkennbar sind, eine Tatsache, die für die Nierendiagnostik nicht von zu unterschätzender Bedeutung sein dürfte.

Abschließend läßt sich feststellen, daß paraffineingebettete menschliche Gewebeproben ohne übermäßige Einbußen an feinstruktureller Information einer elektronenmikroskopischen Untersuchung zugeführt werden können. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, gegebenenfalls das reichhaltige in den pathologischen Instituten archivierte paraffineingebettete Material einer feinstrukturellen Analyse zu unterziehen. Für den elektronenoptisch arbeitenden Pathologen ist damit ein Zugang gerade zu denjenigen bioptisch gewonnenen Gewebeproben geschaffen, die wegen einer in toto erfolgten Paraffineinbettung einer elektronenmikroskopischen Untersuchung bisher nicht zugänglich erschienen. Nicht übersehen werden sollte der weitere Vorteil, daß das in Kunststoff eingebettete Material zur Herstellung von Semidünnschnitten bereits lichtoptisch eine wichtige zusätzliche Informationsquelle darstellt. Es liegt auf der Hand, daß die hier sich eröffnenden informativen Möglichkeiten Fortschritte besonders bei der Untersuchung von Nadelbiopsien erwarten lassen. Es sollte jetzt möglich sein, die bisher wegen technischer Schwierigkeiten bei der Beschaffung geeignet vorbehandelten Materials unterlassene Untersuchung der feinstrukturellen Charakteristika bestimmter Krankheitsbilder nachzuholen, und damit unsere bisherigen relativ geringen Kenntnisse zur Morphologie derartiger Veränderungen auf eine gesichere Basis zu stellen.

Frl. B. Grohs, Fr. M. Peters und Frl. S. Linnenkohl bin ich für wertvolle technische Assistenz zu Dank verpflichtet.

Literatur

- Ashworth, C. T., Stembrigde: Utility of formalin-fixed surgical autopsy specimens for electron microscopy. *Amer. J. clin. Path.* **42**, 466—480 (1964).
- Hübner, G.: Glutaraldehyd, ein neues Fixationsmittel für licht- und elektronenmikroskopische Gewebsuntersuchung. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **105**, 428 (1964).
- Zur Methodik der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Leberbiopsien. *Klin. Wschr.* **43**, 798—800 (1965).
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen an menschlichem Gewebe nach protrahierter Formalinfixierung. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **109**, 556—557 (1966).
- Paulussen, F.: Electron microscopy of formalin fixed human biopsy and autopsy specimen. *VI. Int. Cong. Int. d. Pathologia Clinica Riassunti d Relazioni e comunicazioni*, p. 72—73. Edizioni C. E. P. I. Roma: 1966.
- — Die Feinstruktur des Gewebes nach protrahierter Formalinfixierung. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* **1**, 107—119 (1968).
- Karnovsky, M. J.: Simple methods for staining with lead at high pH in electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 729—732 (1961).
- Paulussen, F., Hübner, G.: Feinstrukturelle Untersuchungen an formalinfixiertem Sektionsmaterial. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **109**, 557 (1966).
- — Zur Substruktur des Gewebes nach protrahierter Formalinfixierung. *Mikroskopie* **23**, 127 (1968).
- Richardson, K. C., Janett, L., Finke, E. H.: Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain. Technol.* **35**, 313—323 (1960).
- Tsutsumi, V., Bencosme, S.: A fast method for processing biological material for electron microscopy. *Proc. 8th Int. Congr. Int. Acad. Path.* p. 109. May 11.—19. Mexico: 1970.

Privatdozent Dr. G. Hübner
 Pathologisches Institut der Universität Köln
 D-5000 Köln-Lindenthal 41
 Josef Stelzmann-Straße 9