

## 1. Allgemeines

Für die Herstellung von gleichmäßig dünnen Gewebeschnitten ist eine Einbettung unerlässlich. Dem wasserfreien Gewebe wird hierbei ein Intermedium, dann ein flüssiges Einbettmedium zugeführt, welches nach dem Erstarren durch physikalische oder chemische Reaktion alle Zellen und Zellzwischenräume einnimmt. Ziel der Einbettung ist es, das Gewebe in einem Medium zu stabilisieren und einen Zustand der Homogenität zu erreichen, bei dem beide Komponenten „wie aus einem Guss“ miteinander verbunden sind.

Der Prozess der Einbettung besteht in der Regel aus vier Schritten:

- Entwässerung
- Infiltration mit dem Intermedium
- Infiltration mit dem Einbettmedium
- Aushärtung des Einbettmediums

## 2. Entwässerung

Oft befindet sich das Gewebe in einer wässrigen Fixierlösung oder in einer Waschlösung um Fixiermittelreste zu entfernen. Um es nun mit einem, meist hydrophoben Intermedium oder wasserunlöslichen Einbettmedium zu verbinden, ist eine Entwässerung notwendig. Ein weiterer Vorteil des Wasserentzugs ist die Verdichtung und Härtung der Gewebeprobe und dem damit verbundenem Stabilitätsgewinn.

### 2.1 Entwässerungsmittel

Voraussetzung für ein Entwässerungsmittel ist eine hohe Affinität zu Wasser. In der Praxis hat sich besonders das Lösungsmittel Ethanol bewährt und ist für die Einbettung in Paraffin meist das Mittel der Wahl. Für lichtmikroskopische Zwecke sind vergällte Alkohole zur Entwässerung, vollkommend ausreichend.

#### 2.1.1 Durchführung der Entwässerung

Grundsätzlich wird zu einer stufenweisen Entwässerung, der so genannten Alkoholreihe geraten. Dabei wird das Gewebe einer langsam steigenden Alkoholkonzentration (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) ausgesetzt, was Rissbildungen und Schrumpfungen vermeiden soll, und eine gleichmäßige Dehydration begünstigt. Hier sollte auch bei den geringen Alkoholkonzentrationen genug Zeit zum Entwässern gegeben sein. Anderenfalls kommt es zu einer schnellen Verhärtung des äußeren Bereiches, während im Inneren immer noch Wasser zurückbleibt.

Des Weiteren ist zu empfehlen die Probe hoch liegend oder hängend zu entwässern, da sich wasserreicher Alkohol immer am Boden des Gefäßes sammelt. Auch ein Bewegen der Proben mittels Schüttler erweist sich als hilfreich. Die hochprozentigen Alkohole sollten häufiger

erneuert werden, da sich dort schnell Wasser aus der Raumluft, und gelöste Fette aus den Gewebeproben ansammeln. Auch sollte man das Lösungsvolumen nicht zu gering halten. Für ein ca. 10x5x5 mm großes Gewebstück, ist ein Volumen von etwa 5 ml zu empfehlen. Die Dauer der Entwässerungszeit ist je nach Wassergehalt, Größe und Beschaffenheit der Probe verschieden.

### 3. Intermedium

Als Intermedium wird die Lösung bezeichnet, die das Verbindungsglied zwischen Entwässerungslösung und Einbettmedium darstellt. Es muss sowohl mit dem Entwässerungsmedium mischbar, als auch das Lösungsmittel für das Einbettmedium sein. Als gebräuchlichste Intermedien sind Xylol, Toluol, Benzol und Chloroform zu nennen. Bei einer Paraffineinbettung, wird beispielsweise Xylol als Intermedium zwischen Alkohol und Paraffin eingesetzt, da es mit Alkohol mischbar und in Paraffin löslich ist.

Um gewebeschonend vorzugehen ist es sinnvoll, die Gewebeprobe nicht direkt vom Alkohol in das Xylol zu überführen, sondern Zwischenschritte einzulegen. Z.B. Alkohol und Xylol im Verhältnis 1:1. Bei Kunststoffeinbettungen gibt es in der Regel kein richtiges Intermedium. Hier erfolgt der Übergang zwischen Entwässerungslösung und Polymerisationslösung direkt oder über eine Zwischenkomponente ohne polymerisierenden Härter. Hier sind ebenfalls Zwischenschritte empfehlenswert.

Xylol und Toluol sind als gesundheitsschädlich eingestufte Lösungsmittel. Eine gesündere Alternative bieten daher Ersatzstoffe, die schon seit vielen Jahren in die histologischen Labore eingezogen sind. Auf Benzol ist wegen seines krebserregenden Potentials zu verzichten.

### 4. Einbettmedium

Die Möglichkeiten bei der Wahl des Einbettmediums sind vielseitig und stark abhängig von der Beschaffenheit des zu schneidenden Materials. Ebenso von der weiteren Verwendung der Schnitte. Einbettmedien sind flüssig um in das Gewebe eindringen zu können, und härten auf unterschiedliche Weise aus. Flüssiges Paraffin härtet durch Abkühlen, Epoxidharze und Methacrylate polymerisieren unter Hitzeeinwirkung, und Spezialkunststoffe bei Kälte oder UV- Bestrahlung. Bei der Wahl des Einbettmediums ist vor allem zu beachten, dass es stets mindestens so hart sein muss wie das zu schneidende Objekt. Je dünner die gewünschten Schnitte, desto härter sollte das gewählte Einbettmedium sein. Als Standardmethode in der Routinepathologie ist Paraffin als am häufigsten eingesetztes Einbettmedium zu nennen.

Wichtige Einbettmedien in der Histologie:

- Paraffin
- Methacrylate
- Epoxidharze

## 5. Einbettformen und Probenorientierung

Einbettformen sind maßgeblich für die Formgebung des Probenblocks verantwortlich. Das gewählte Volumen richtet sich dabei nach der Größe der Probe und sollte möglichst nicht zu groß sein. Unnötig große Blöcke bedeuten oft längere Polymerisationszeiten bei Kunststoffeinbettungen und aufwendigeres Trimmen und Zuschneiden der Blöcke. Die Formen sollten des Weiteren so beschaffen sein, dass sie nicht durch das Einbettmedium löslich sind oder das Einbettmedium in die Form hineindiffundiert. Auch sollten sich die ausgehärteten Blöcke wieder gut aus den Formen entnehmen lassen.

### 5.1 Einbettung in Paraffin

Die Einbettung von Proben in Paraffin erfolgt zumeist mit Hilfe von Einbettrahmen, Einmal-Kunststoffformen oder Metallschälchen bei der Verwendung von Kassettensystemen. Die Proben werden in den Formen orientiert so lange das Einbettmedium von flüssiger Konsistenz ist. Die Formen können ggf. vor dem Befüllen dünn mit Glycerin eingerieben werden, was das spätere Ausblocken erleichtert. Bei einer unbefriedigenden Ausrichtung der Proben können die Blöcke problemlos wieder bei 60°C eingeschmolzen, und die Proben neu eingebettet werden.

### 5.2 Einbettung in Acrylate und Epoxidharze

Für Kunststoffeinbettungen empfehlen sich Silikon- oder Kunststoffformen, Gelatine oder Kunststoffkapseln oder aus Aluminiumfolie geformte Mulden. Für einige Einbettssysteme sind auch spezielle Einbettformen erhältlich. Kapseln lassen sich verschließen, was für sauerstoffsensitive Einbettmedium von Vorteil ist. Flache Formen können mit Folie oder Glasplättchen abgedeckt werden. Für eine genaue Ausrichtung und Orientierung der Proben sind hingegen flache Einbettformen im Vorteil. Nach dem Polymerisieren werden die Formen mit den Blöcken auf Raumtemperatur gebracht, und können dann problemlos aus den Formen entnommen werden. Gelatinekapseln lässt man am besten kurz in heißem Wasser quellen um die Blöckchen zu befreien. Unbefriedigend ausgerichtete Objekte in Methyl- oder Butylmethacrylat lassen sich durch Lösungsmittel, vorwiegend Xylol, aus den Blöcken herauslösen. Objekte in Epoxidharzen können aus den Blöcken herausgetrimmt oder gesägt werden.

## 6. Einbettung in Paraffin

### 6.1 Paraffin

Paraffinwachs ist eine Mischung aus gesättigten, festen Kohlenwasserstoffen, welche durch Raffinierung von Erdöl gewonnen werden. Die Festigkeit ist abhängig vom Molekulargewicht, welche durch die Kettenlänge der Kohlenwasserstoffe bestimmt wird. Dies hat Einfluss auf die Schmelztemperatur. Je fester das Paraffin, desto höher liegt die Schmelztemperatur. Sie liegt in einem Bereich von etwa 38 bis 68°C. In flüssiger Form ist Paraffin leichtflüssig und dringt gut in das vorbehandelte Gewebe ein. Hierbei ist zu beachten, dass es nicht mit Wasser oder Alkohol mischbar ist. Eine Entwässerung und eine Infiltration mit einem Intermedium (z.B. Xylol, Toluol, Chloroform) ist daher unbedingt notwendig. Das Erstarren des Paraffins erfolgt durch Auskühlen (Kristallisation) auf Eis oder bei Raumtemperatur. Je schneller dies erfolgt, desto feiner und homogener ist die Paraffinstruktur.

Festigkeit und Schneideigenschaften können auch durch Zugabe weiterer Komponenten beeinflusst werden. So z.B. Bienenwachs oder nicht vulkanisiertes Gummi (Naturkautschuk). Als positive Eigenschaften sind die unbegrenzte Haltbarkeit der Paraffinblöcke und die gute Schneidbarkeit zu nennen. Negativ ist die relativ große Schrumpfung des Gewebes (10-20%) und die hohen Schmelztemperaturen. Eine mehrstündige Infiltration bei 60°C kann sich unter Umständen negativ auf Proben für molekularbiologische Fragestellungen auswirken (da Nukleinsäuren geschädigt werden können). Die Paraffinschnitttechnik bietet eine Vielfalt von möglichen Färbevarianten. In Bezug auf die Schnittdicke, können mit der Paraffinschnitttechnik keine so dünnen Schnitte hergestellt werden als dies bei Kunststoffeinfaltungen der Fall ist. Ebenso ist mit Paraffin keine Einbettung bei niedrigen Temperaturen möglich.

## 6.2 Durchführung der Paraffineinbettung

Wie zuvor beschrieben folgt vor der Einbettung mit Paraffin eine gründliche Entwässerung und die Infiltration mit einem Intermedium. Die Paraffininfiltration bei 60°C sollte in geöffneten Gefäßen oder Schalen mit möglichst großer Oberfläche erfolgen. Nur so können die Reste des Intermediums vollständig aus dem Paraffin verdampfen.

Paraffin-Einbettprotokoll

Schritt	Stufe	Zeit	Temperatur
1	Alkohol 30%	2h	Bei Raumtemperatur
2	Alkohol 50%	2h	
3	Alkohol 70%	2h	
4	Alkohol 80%	2h	
5	Alkohol 90%	2h	
6	Alkohol 96%	2h	
7	Alkohol absolut I	2h	
8	Alkohol absolut II	2h	
10	Alkohol absolut – Xylol 1:1	2h	
11	Xylol I	2h	
12	Xylol II	2h	
12	Paraffin I	4h	Bei 60°C
14	Paraffin II	4h	

### Ausgießen

Zum Ausgießen wird stets frisches Paraffin verwendet. Überhitztes und durch Oxidation gelblich gefärbtes Paraffin ist für die Einbettung unbrauchbar.

#### *Einbettung mit Ausgießrahmen:*

Die Einbettrahmen und eine glatte Unterlage, z.B. eine Glasplatte, werden mit einer dünnen Schicht Glycerin eingerieben um die fertigen Blöckchen später leichter entfernen zu können. Die vorgewärmten Rahmen werden auf der Glasplatte ausgerichtet und bis zur Hälfte mit frischem Paraffin ausgegossen. Es folgt das Einlegen und Orientieren der, mit Paraffin durchtränkten Probe. Diese wird so lange angedrückt bis das Paraffin leicht fest wird und die Probe so fixiert ist. Dann wird die Gussform vollständig mit Paraffin aufgefüllt und abgekühlt.

### *Einbettung mit Kassetten und Einbettformen:*

Die Einbettform wird vorgewärmt und zur Hälfte mit flüssigem Paraffin gefüllt. Die Probe wird aus der Kassette genommen und wie oben beschrieben orientiert. Anschließend wird die Form vollständig mit Paraffin gefüllt und das untere Kassettenteil ohne Deckel aufgesetzt. Zum Abkühlen werden die Formen zügig auf eine Kühlplatte oder auf Eis überführt.

### *Einbettung mit Einmal-Kunststoffformen:*

Die Form wird mit flüssigem Gießparaffin befüllt und die Probe darin ausgerichtet. Nach dem vollständigen Erstarren des Paraffins, kann der Block einfach aus der Form herausgedrückt werden.

Zum Einsetzen und Orientieren der Proben wird stets mit vorgewärmten Instrumenten gearbeitet. Das Abkühlen sollte immer schnell erfolgen. Zügig erkaltetes Paraffin ist feinkristallin, von glasigem Aussehen und gewährt gleichmäßig ausgehärtete Blöcke von guter Schneidbarkeit.

### **Aufblocken**

Verwendet man zur Einbettung Blöcke mit Kassettenteil, so können diese in spezielle Halter im Mikrotom eingespannt werden. In Rahmen gegossene Paraffinblöcke hingegen müssen zum Einspannen erst aufgeblockt werden. Hierfür eignen sich am besten kleine Holzblöckchen. Das erkaltete Blöckchen wird aus dem Rahmen genommen und mit einer Klinge getrimmt. Anschließend wird die Unterseite des Blöckchens mit einem heißen Spatel angeschmolzen und auf dem Holzblöckchen fixiert.

### **Schneiden**

Das Schneiden von Paraffinblöcken erfolgt am Schlitten- oder Rotationsmikrotom mit Einmalklingen. Die Schnitte werden in einem ca. 40°C warmen Wasserbad gestreckt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die fertigen Objektträger werden auf der Heizplatte bei ca. 50°C getrocknet. Anschließend erfolgt das Festbacken der Schnitte für 20-30 min bei 55°C im Trockenschrank.

## **7. Einbettung in Acrylate**

Besonders bei härteren Probenmaterialien kommen Kunststoffe als Einbettmedium zum Einsatz. Der Vorteil von Methacrylaten ist die Möglichkeit sehr dünne Schnitte herzustellen. Moderne kaltpolymerisierende Methacrylate erlauben zudem auch die Durchführung von immunhistologischen Untersuchungen und In situ Hybridisierungen weil das Gewebe durch die niedrigen Temperaturen bei der Aushärtung nur wenig beansprucht wird und Nukleinsäuren und Antikörper besser erhalten bleiben. Während Butyl- und Methylmethacrylate durch Lösungsmittel wie z.B. Xylol wieder aus den Schnitten herausgelöst werden kann und damit die Möglichkeit für eine Vielzahl von Färbemethoden bietet, ist dies bei Hydroxyethylmethacrylaten nicht der Fall. Der Kunststoff bleibt hier in den Schnitten und wird nicht herausgelöst. Diese Art von Acrylaten sind so konstruiert, dass Antikörper, Hybridisierungssonden oder Farbstoffe den Kunststoff diffundieren und das Gewebe anfärben können.

Beispiele für Acrylate in der Histologie sind:

- Butylmethacrylat
- Methylmethacrylat
- Hydroxyethylmethacrylat bzw. Glycolmethacrylat z. B. Technovit 8100, LR white

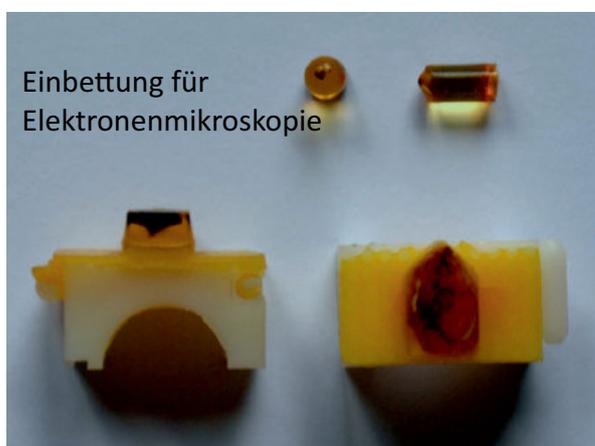
## 8. Einbettung in Epoxidharze

Eine Einbettung in Epoxidharze eignet sich ganz besonders für die Anwendungen in der Elektronenmikroskopie. Auf Grund der höheren Resistenz gegenüber Elektronenstrahlen eignen sich Epoxide in diesem Bereich deutlich besser als Acrylate. Aber auch in der Lichtmikroskopie hat die Epoxideinbettung ihren Platz gefunden. Aus den harten und gleichmäßig ausgehärteten Blöcken lassen sich sehr dünne Schnitte von hoher Qualität herstellen, die in morphologischen Untersuchungen Anwendung finden. Auch die Herstellung von lückenlosen Serien ist mit Epoxiden wesentlich einfacher als mit anderen Einbettmedien. So eignen sich diese Schnitte beispielsweise hervorragend als Grundlage für die Fertigung 3-dimensionaler Rekonstruktionen aus Schnittserien. Epoxidharze setzen sich aus mehreren Komponenten (Monomer, Härter, Beschleuniger, Katalysator) zusammen, die je nach Mischungsverhältnis Einfluss auf die Viskosität und Härte haben.

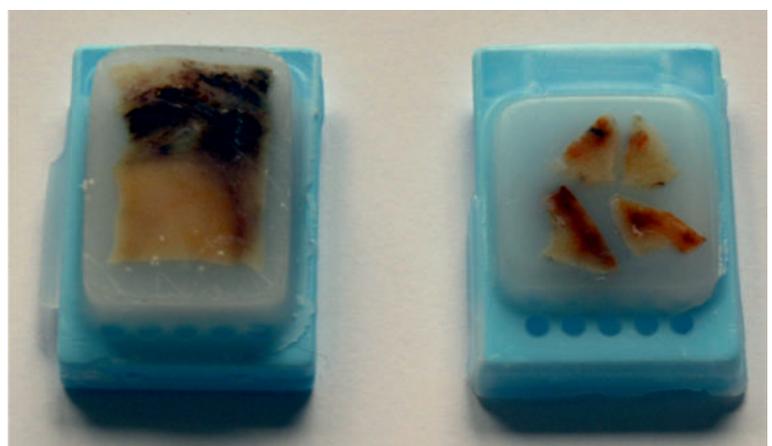
Da die meisten Epoxide nicht mit Wasser mischbar sind, ist auf eine gründliche Dehydrierung der Proben zu achten. In der Regel sind die Harze auch nicht vollständig mit Alkoholen mischbar, deshalb werden Aceton- Stufen zwischen Dehydration und Harz-Infiltration eingelegt. Das Harz kann nach dem Schneiden nicht bzw. nur sehr schwer aus den Schnitten gelöst werden. Die Färbemöglichkeiten sind also sehr begrenzt und beschränken sich auf nur wenige Übersichtsfärbungen.

Beispiele für Epoxidharze in der Histologie sind:

- Araldit
- Epon
- Spurr
- Durcupan



Einbettung für Semidünnschnitte



Paraffineinbettung: links nicht angeschnittenes Material

# Fragen zum Einbettungsvorgang

1. Aus welchen vier Schritten besteht eine Einbettung?
2. Bei der Paraffineinbettung findet Xylol Anwendung!  
Die Eignung des Xylols begründet sich welche Eigenschaften?
3. Welche vier Eigenschaften des Paraffins machen es zum gebräuchlichsten Einbettungsmittel in der Histologie?
4. Worin liegen die Vorteile, wenn ein Paraffinblock zügig erkaltet?
5. Welche Vorteile haben kaltpolymerisierende Methacrylate?
6. Methyl- und Butylmetacrylate haben welchen Vorteil gegenüber Hydroxyethylmetacrylaten?
7. Welches Einbettungsmittel wird für die Elektronenmikroskopie verwendet?