

# Fixierung

## 1. Allgemeines

Die Fixierung ist ein chemischer Prozess, bei dem die Morphologie von Zellen und Geweben über den Tod eines Organismus hinaus konserviert wird. Ziel ist es also, Zellen und Gewebe so naturgetreu wie möglich zu erhalten und natürliche Zersetzungsprozesse aufzuhalten.

Stirbt ein Organismus, so setzen innerhalb kürzester Zeit natürliche Prozesse ein, die die Zellstrukturen zersetzen und die Morphologie eines Gewebes grundlegend verändern. Zu diesen Prozessen gehören Autolyse und Fäulnis.

Der Zeitpunkt des Zelltods ist nicht mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme gleichzusetzen. So können lebende Zellen auch noch einige Zeit nach der Entnahme nachgewiesen werden. Im günstigsten Fall wird das Gewebe direkt in das Fixativ überführt. Das zytotoxische Fixierungsmittel tötet die Zellen schnell ab und fixiert sie sofort. Auf diese Weise werden die besten Fixierungsergebnisse erzielt.

Des Weiteren wird das Gewebe durch die Fixierung vorgehärtet und erleichtert somit z. B. die Präparation. In vielen Fällen kann die Fixierung die anschließende Färbung der Schnitte positiv beeinflussen bzw. erst ermöglichen oder die Haftung der Schnitte auf dem Objektträger erhöhen. Präparation und Zuschnitt sollte immer an bereits vorfixierten Gewebe vorgenommen werden. Durch die fixierungsbedingte Härtung kann besser in das Gewebe eingeschnitten werden. Außerdem wird die Gefahr minimiert das Inhalte von Hohlorganen verloren gehen.

## 2. Durchführung der Fixierung

Das Fixierungsmittel sollte immer dem Probenmaterial und dem Ziel der Verarbeitung angepasst sein. Für einfache Färbungen der Schnitte sind die meisten Fixierungsmethoden eher unproblematisch. Für histochemische Nachweise sowie immunhistochemische und enzymhistochemische Untersuchungen sind hingegen nicht alle Fixierungsmethoden geeignet. So können wässrige Fixative Substanzen aus dem Gewebe herauslösen, die sich später im Schnitt nicht mehr nachweisen lassen. Für diese Fälle ist eher zu alkoholischen Lösungen zu raten.

Die Fixierlösung sollte etwa das 20 bis 50-fache Volumen der Probe ausmachen, um optimal wirken zu können. Das im Gewebe enthaltene Wasser würde sonst das Fixierungsmittel verdünnen und die Konzentration des Fixativs zu stark herabsetzen.

Die Proben sollten nach Möglichkeit etwas erhöht in der Fixierlösung gelagert oder ständig in Bewegung gehalten werden (z. B. durch Verwendung von Schüttlern). Schwerere Substanzen setzen sich immer am Boden des Gefäßes ab.

Die Infiltrationsgeschwindigkeiten der einzelnen Komponenten eines Fixierungsgemisches können sehr unterschiedlich sein. Aus diesem Grund sollten größere Proben zuerst mit einem einfachen Fixierungsmittel (z. B. Formalin) vorfixiert werden, bevor ein Nachfixieren im Fixierungsgemisch (z. B. Bouin) erfolgt.

Nach abgeschlossener Fixierung sollte die Probe gut gewaschen werden, um Rückstände des Fixierungsmittels vollständig zu entfernen. Zurückgebliebenes Fixativ kann Niederschläge im Gewebe bilden oder nachfolgende Färbungen und Reaktionen stören. Je nach Fixiermittel eignet sich als Lösungsmittel Wasser oder Alkohol.

### 3. Durchführung der Fixierung

Dem Fixierungsprozess können verschiedene Wirkungsmechanismen unterliegen. Diese Wirkungsweisen werden in Vernetzung, Wasserentzug, Salzbildung und Änderung des Quellungszustandes unterteilt.

**Vernetzung:** Bei der Fixierung mit vernetzenden Fixativen werden die Aminosäuren der Proteine durch Quervernetzung stabilisiert. Dabei lagert sich das Fixierungsmittel zwischen den Proteinmolekülen an und vernetzt diese. Es kommt zu einer Polymerisation, bei der das Protein denaturiert, seine Funktion verliert und die Enzymaktivität inhibiert wird. Bei dieser Reaktion verbraucht sich das Fixierungsmittel und sollte bei längerer Lagerung der Probe regelmäßig erneuert werden. Vernetzende Fixierungsmittel werden in wässrigen Lösungen angesetzt und eignen sich daher nicht für alle histochemischen Nachweisreaktionen, da wasserlösliche Bestandteile herausgelöst werden. Zu starke Vernetzung kann immunhistochemische Reaktionen beeinträchtigen. Beispiele für vernetzende Fixierungsmittel sind Formaldehyd, Glutaraldehyd und Osmiumsäure.

**Wasserentzug:** Die Denaturierung von Proteinen, Glycogen und Schleim erfolgt bei Wasserentzug besonders schnell. Wasser entziehende Fixierungsmittel sollten nicht in einer Konzentration von unter 70 % angewendet werden, da sonst die Gefahr von Gewebszerstörungen besteht. Zum einen wirken hypotone Lösungen quellend auf das Gewebe, zum anderen ist die desinfizierende Wirkung von zu niedrig konzentrierten Lösungen zu gering. Bei höheren Konzentrationen ist ebenfalls Vorsicht geboten, da diese oft zu Schrumpfungen und Härtungen führen. Wasserlösliche Bestandteile bleiben erhalten. Beispiele für Wasser entziehende Fixierungsmittel sind Ethanol, Methanol und Aceton.

**Salzbildung:** Diese Form der Fixierung wird auch als chemische Fixierung bezeichnet. Es erfolgt eine Fixierung durch die Verbindung der Proteinmoleküle mit chemischen Substanzen. Der Fixiervorgang verläuft sehr schnell. Allerdings dringen die fixierenden Substanzen nur sehr langsam in das Gewebe ein, weshalb Sie hauptsächlich in Fixierungsgemischen zur Anwendung kommen. Beispiele für Salz bildende Fixierungsmittel sind Kaliumdichromat, Quecksilbersalze, Pikrinsäure und Uranylacetat.

**Änderung des Quellungszustandes:** Fixierungsmittel dieser Art sind immer Säuren. Sie reduzieren die Wasseraufnahme und die damit verbundene Quellung von Proteinen auf ein Minimum. Dies führt zu einer Denaturierung und somit zur Fixierung des Gewebes. Auch diese Fixierungsmittel sind bevorzugt in Gemischen zu gebrauchen. Beispiele sind Essigsäure, Trichloressigsäure und Chromsäure.

## Folgende Faktoren spielen bei der Fixierung eine wichtige Rolle:

- **PH-Wert:** Ein saures Milieu begünstigt die Fixierung des Kernchromatins, ein alkalisches Milieu bewirkt eine bessere Fixierung der Organellen im Zytoplasma.
- **Temperatur:** Die Eindringzeiten des Fixierungsmittels sind stark temperaturabhängig. Bei Raumtemperatur erfolgt die Fixierung schneller als bei 5 °C im Kühlschrank. Bei ca. 40 °C wird die Fixierungszeit deutlich verkürzt. Temperaturen über 40 °C sollten jedoch vermieden werden, da diese zur Schädigung der Gewebestruktur führen.
- **Osmotischer Druck:** Das Fixierungsmittel sollte möglichst isotonisch sein um keine Schrumpfungen oder Quellungen des Gewebes zu bewirken.
- **Zeit:** Die Fixierdauer richtet sich immer nach der Beschaffenheit der Probe, der Art und Konzentration des Fixierungsmittels und der Temperatur. Von zu hoch konzentrierten Fixierlösungen ist abzuraten, da diese eine zu schnelle Proteinausfällung auf der Probenoberfläche begünstigen und ein Vordringen in das Probeninnere verhindern.

## 4. Fixierungsmittel

### 4.1 Einfache Fixierungsmittel

Einfache Fixierungsmittel sind, wie sich schon aus der Bezeichnung ableiten lässt, Lösungen mit nur einer fixierenden Komponente. Sie dringen in der Regel schnell in das Gewebe ein, können aber im Vergleich zu Fixierungsgemischen einige Nachteile aufweisen.

**Formaldehyd** ist das, im Routinelabor, am meisten eingesetzte Fixierungsmittel. Es wirkt durch Vernetzung und führt zur Ausfällung und Denaturierung von Proteinen sowie dem Verlust der enzymatischen Aktivität des Gewebes. Eine Lagerung sollte in dunklen Flaschen erfolgen, da die Lösung durch Bildung von Ameisensäure sonst übersäuert. Aus diesem Grunde empfiehlt sich die Verdünnung der meist 37 bis 40 %igen Formaldehydlösung mit Pufferlösungen. Fixiert wird in einer Konzentration von 2-10 %. Eine Fixierung über längere Zeit ist möglich, die Lösung ist in diesem Fall allerdings regelmäßig zu erneuern, da sich Formaldehyd mit der Zeit verbraucht. Die Schrumpfung der Objekte ist relativ gering. Nach der Fixierung sollten die Proben gründlich mit fließendem Wasser gewaschen werden um eine spätere Beeinflussung der Färbbarkeit der Schnitte auszuschließen. Formaldehyd ist universal auf alle Gewebe einsetzbar und zeigt auch bei Lipiden vorzeigbare Ergebnisse. Nicht geeignet ist der Einsatz bei der Fixierung von Glycogen, Guanin und Harnsäure. Ein entscheidender Nachteil des Formaldehyds ist seine Toxizität und Karzinogenität. Aus diesem Grund sind bereits zahlreiche ungiftige Alternativen im Handel erhältlich.

**Alkohol** dringt sehr schnell in das Gewebe ein und wirkt durch den Entzug von Wasser. Es härtet das Gewebe und verursacht bei einer zu langen Fixierungszeit Schrumpfungen und Brüchigkeit, welche die Schneidbarkeit negativ beeinflussen. Bei der Fixierung zu großer Präparate ist Vorsicht geboten. Alkohol entzieht der Probenoberfläche sehr schnell Wasser und führt zu Härtung, sodass kein weiterer Alkohol in das Probeninnere vordringen kann (Rindenbildung). Angewendet werden Alkohole in einer Konzentration von 70 bis 100 %. Von der Fixierung von Teilen über 5 mm ist mit Alkohol generell abzuraten. Bei Temperaturen um ca. 4 °C bleibt die natürliche Enzymaktivität erhalten. Besondere Vorteile zeigen sich bei der

Fixierung von Zytoplasma, Schleim, Glykogen, Eisen, Harnsäure und Kalk. Schlecht eignet sich diese Form der Fixierung allerdings für Lipide, Cholesterin und einige Sekrete, da diese herausgelöst werden.

**Aceton** wirkt ebenfalls durch Wasserentzug aber deutlich schneller, was sehr oft zu starken Schrumpfungen führt. Die Fixierung sollte bei ca. 0 °C erfolgen und ein Verhältnis zwischen Probe und Aceton von 1:20 nicht unterschreiten. Verwendet wird reines Aceton, welches mehrfach gewechselt werden muss. Eine Anwendung findet diese Methode vorwiegend für enzymhistologische Untersuchungen, da Aceton die Enzymaktivität des Gewebes erhält.

**Osmiumsäure** findet durch seine sehr guten Eigenschaften in der Strukturhaltung sowohl in der Lichtmikroskopie als auch in der Elektronenmikroskopie Anwendung. Neben der Fixierung erfolgt auch eine Kontrastierung des Gewebes. Hierfür kommen 1-2 %ige gepufferte Lösungen zum Einsatz. Um die Reduktion der Osmiumsäure durch organische Substanzen zu minimieren, kann der Ansatz auch in 0,1%iger Chromsäure erfolgen. Ein gründliches Auswaschen des Fixativs in Wasser ist unerlässlich. Für immunhistochemische und enzymatische Untersuchungen ist diese Form der Fixierung nicht geeignet. Wegen seiner langsamen Diffusionsgeschwindigkeit empfiehlt sich die Verwendung von Osmiumsäure vor allem in Fixierungsgemischen. Gute Ergebnisse verspricht sie auch bei der Darstellung von Proteinen, Lipiden, Markscheiden von Nervenfasern und Zellorganellen wie Mitochondrien und Golgi-Apparat.

**Glutaraldehyd** wirkt wie Formaldehyd vernetzend, jedoch stärker und ist in der Licht- und vor allem der Elektronenmikroskopie gängig. Nach Osmiumsäure liefert Glutaraldehyd die beste Erhaltung von Strukturen, härtet das Gewebe aber stark und ist vor allem für Kunststoffeinfaltungen zu empfehlen. Fixiert wird mit einer 2 bis 2,5%igen Lösung in Phosphat- oder Kakodylatpuffer. Die Weiterbehandlung ist gleich der Formaldehydfixierung.

**Essigsäure** fixiert durch die Änderung des Quellungszustandes und ist besonders für die Strukturhaltung der Zellkerne geeignet. Aufgrund der stark quellenden Eigenschaft und der teilweisen Auflösung des Zellplasmas ist von der Anwendung außerhalb von Fixierungsgemischen abzuraten. Relativ gute Ergebnisse zeigen sich in der Fixierung von Zellkernen bei einer Verwendung von einer 1%igen, wässrigen Essigsäurelösung. Die Fixierdauer beträgt bei kleineren Objekten 1-2 Stunden, bei Größeren 2-4 Stunden. Um eine zu starke Quellung zu vermeiden, muss eine schnelle Überführung in 70%igen Alkohol erfolgen.

**Pikrinsäure** wirkt durch Salzbildung. Sie dringt nur sehr langsam in das Gewebe vor, härtet dieses aber nicht. Anwendung findet Pikrinsäure in der Regel nur in Gemischen. Eine zu lange Fixierungszeit hat einen negativen Einfluss auf die Gewebsstrukturen und die Anfärbung. Nach der Fixierung folgt ein mehrmaliges Auswaschen mit Alkohol, bis die gelbe Farbe aus dem Gewebe verschwunden ist. Ausgangsstoff für Gemische sind sowohl alkoholische als auch wässrige Lösungen von Pikrinsäure. Die gelben Kristalle sind im trockenen Zustand äußerst explosiv und giftig. Es bietet sich daher an, auf gebrauchsfertige Pikrinsäurelösungen zurückzugreifen.

**Sublimat** (Quecksilber(II)-chlorid) fixiert durch Salzbildung. Es dringt schnell in das Gewebe ein, härtet aber stark und kann durch Rindenbildung das weitere Eindringen des Fixierungsmittels in das Probeninnere stören. Außerdem wirkt es schrumpfend auf das Zytoplasma und wird, falls nicht als halb gesättigte Lösung, vor allem in Fixierungsgemischen

verwendet. Sublimat fällt Proteine aus und löst Lipide. Es bildet Niederschläge im Gewebe, welche mit alkoholischen, jodhaltigen Lösungen wieder entfernt werden können. Als positiv, ist die gute Anfärbbarkeit sublimatfixierter Gewebe zu nennen. Aufgrund der hohen Toxizität und der zu Recht, strengen Vorschriften bei der Entsorgung, wird Sublimat nur noch sehr selten verwendet.

#### 4.2 Fixierungsgemische

Fixierungsmittel können nicht nur als Einkomponentenlösung, sondern auch als Fixierungsgemisch verwendet werden. In diesem Fall liegt eine Lösung vor, die aus mehreren fixierend wirkenden Substanzen besteht. Jede Fixierungsmittelkomponente bringt für die Anwendung seine Vor- und Nachteile mit sich. In einem Fixierungsgemisch werden die Nachteile der einen Komponente durch die Vorteile einer anderen Komponente im besten Falle wettgemacht. Die Wahl des richtigen Fixierungsgemisches richtete sich nach der Beschaffenheit der Probe und der zu untersuchenden Strukturen. Um die Wirkung der Fixierlösung zu garantieren sollten die Gemische stets erst kurze Zeit vor Gebrauch angesetzt werden.

<b>Boun'sches Gemisch</b>	
Eignung:	Zellkerne, Zytoplasma, Eier und Larven. Für In situ Hybridisierung und Immunhistochemie. Fixiert und entkalkt zugleich.
Anwendung:	Fixationszeit von 1 bis 24 h (länger schadet nicht)
Nachbehandlung:	Auswaschen mit 70%igem Alkohol. Die Lösung sollte so oft gewechselt werden, bis das Objekt keine gelbe Farbe mehr abgibt. Das Auswaschen kann durch Zugabe von 1 Tropfen Ammoniak auf 100 ml Ethanol beschleunigt werden.
Herstellung der Lösung:	Pikrinsäure, wässrig, gesättigt 15 ml
	Formaldehydlösung 37-40 % 5 ml
	Eisessig 1 ml
Hinweis:	Erst kurz vor Gebrauch ansetzen.

<b>Carnoy'sches Gemisch</b>	
Hinweis:	Durch das enthaltene Chloroform ist keine vorherige Entfettung des Insektes notwendig. Schnelle Durchdringung. Zu lange Fixierung härtet das Gewebe und verursacht Schrumpfungen. Fixiert und entkalkt zugleich.
Eignung:	Zellkerne, Zytoplasma, Nucleinsäuren. In situ Hybridisierung.
Anwendung:	Fixationszeit von 1 bis 3 h
Nachbehandlung:	Mehrmaliges Waschen in absoluten Alkohol
Herstellung der Lösung:	Ethanol absolut 80 ml
	Chloroform 30 ml
	Eisessig 10 ml
Hinweis:	Erst kurz vor Gebrauch ansetzen.

**FAE (Formalin-Alkohol-Eisessig)**

Eignung:	Übersichtsbilder, Zellkerne und Zytoplasma . Fixiert und entkalkt zugleich.	
Anwendung:	Fixationszeit von 1 bis 24 h	
Nachbehandlung:	Mehrmaliges Waschen in 70%igem Alkohol	
Herstellung der Lösung:	Ethanol 80 %	61 ml
	Formaldehydlösung 37-40 %	30 ml
	Eisessig	9 ml
Hinweis:	Erst kurz vor Gebrauch ansetzen.	

**Dietrich's/ Kahle's Fixierlösung**

Eignung:	Zellen und Gewebe. Fixiert und entkalkt zugleich.	
Anwendung:	Fixationszeit von 1 bis 24 h	
Nachbehandlung:	Mehrmaliges Waschen in 50%igem Alkohol	
Herstellung der Lösung:	Ethanol 95 %	15 ml
	Formaldehydlösung 37-40 %	6 ml
	Eisessig	1 ml
	Dest. Wasser	80 ml
Hinweis:	Erst kurz vor Gebrauch ansetzen.	

**Orth'sches Gemisch**

Eignung:	Nervengewebe	
Anwendung:	Fixationszeit von 24 bis 48 h, im Dunkeln	
Nachbehandlung:	Entfernung von Niederschlägen durch Behandlung mit 0,5%iger Chromsäure. Danach 24 h fließend wässern.	
Herstellung der Lösung:	Kaliumbichromat	2,5 g
	Dest. Wasser	100 ml
	Formaldehydlösung 37-40 %	10 ml
	<u>Oder:</u> Kaliumdichromat	2,5 g
	Natriumsulfat	1 g
	Dest. Wasser	100 ml
	Formaldehydlösung 37-40 %	10 ml
Hinweis:	Die Formaldehydlösung wird erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt.	

**Gemisch nach Burke**

Eignung:	Nervengewebe	
Hinweis:	Das Verhältnis zwischen Probe und Fixator sollte 1:20 nicht unterschreiten.	
Anwendung:	Fixationszeit von 48 h bis 7 Tage	
Nachbehandlung:	Mehrmaliges Waschen in 90%igem Alkohol	
Herstellung der Lösung:	Dest. Wasser	75 ml
	Formaldehydlösung 37-40 %	25 ml
	Pyridin	5 ml

### Gilson'sche Flüssigkeit

Eignung:	Übersichtsbilder, Zellkerne, Chitin	
Hinweis:	Dringt schnell ein und fixiert sehr gleichmäßig.	
Anwendung:	Fixationszeit von 1 bis 6 h	
Nachbehandlung:	Zur Entfernung von Sublimatniederschlägen wird mehrfach mit 70%igem Alkohol I + 6 Tropfen Lugol'scher Lösung/ 100 ml Alkohol gewaschen.	
Herstellung der Lösung:	Sublimat (Quecksilber(II)-chlorid)	2 g
	Dest. Wasser	88 ml
	Ethanol 60 %	10 ml
	Salpetersäure 60 %	1,5 ml
	Eisessig	0,4 ml

### Flüssigkeit nach Petrunkevitch

Eignung:	Chitin, Eier und Larven	
Hinweis:	Das Verhältnis zwischen Probe und Fixator sollte 1:20 nicht unterschreiten. Fixiert und entkalkt zugleich.	
Anwendung:	Fixationszeit für Eiern und Larven: 2-8 h Ganze Insekten: 6-24 h	
Nachbehandlung:	12-24 h fließend wässern. Zur Entfernung von Sublimatniederschlägen wird mehrfach mit 70%igem Alkohol + 6 Tropfen Lugol'scher Lösung/ 100 ml Alkohol gewaschen.	
Herstellung der Lösung:	Sublimat, gesättigt in dest. Wasser	30 ml
	Ethanol absolut	20 ml
	Salpetersäure 60 %	1 ml
	Eisessig	8 ml

### Formalin-Sublimat-Fixierung nach Heidenhain

Anwendung:	Fixationszeit 2 bis 24 h	
Nachbehandlung:	Zur Entfernung von Sublimatniederschlägen wird mehrfach mit 70%igem Alkohol + 6 Tropfen Lugol'scher Lösung/ 100 ml Alkohol gewaschen.	
Herstellung der Lösung:	Sublimat (Quecksilber(II)-Chlorid)	4,5 g
	Natriumchlorid	0,5 g
	Dest. Wasser	80 ml
	Formaldehydlösung 37-40 %	20 ml

### Gemisch nach Flemming

Hinweis:	Langsame Durchdringung. Nicht für Hämatoxylinfärbungen geeignet. Fixiert und entkalkt zugleich.	
Anwendung:	Fixationszeit 2-4h	
Nachbehandlung:	12-24 h fließend wässern.	
Herstellung der Lösung:	Chromsäure 1%	30 ml
	Osmiumsäure 2%	8 ml
	Eisessig	2 ml

### Fixierlösung nach Müller

Anwendung:	Fixationszeit 2 bis 12 h	
Nachbehandlung:	12-24 h fließend wässern.	
Herstellung der Lösung:	Kaliumbichromat	2,5 g
	Natriumsulfat	1 g
	Dest. Wasser	100 ml

### Susa-Gemisch nach Heidenhain

Hinweis:	Fixiert und entkalkt zugleich.	
Anwendung:	Fixationszeit 1 bis 24 h	
Nachbehandlung:	Mehrfaches Waschen in 90%igem Alkohol für 1-12 h	
Herstellung der Lösung:	Sublimat (Quecksilber(II)-Chlorid)	4,5 g
	Natriumchlorid	0,5 g
	Dest. Wasser	80 ml
	Trichloressigsäure	2 ml
	Eisessig	4 ml
	Formaldehydlösung 37-40 %	20 ml

### Fixierung nach Zenker

Hinweis:	Fixiert und entkalkt zugleich.	
Anwendung:	Fixationszeit 24 h	
Nachbehandlung:	24 h fließend wässern	
	Zur Entfernung von Sublimatniederschlägen wird mehrfach mit 70%igem Alkohol + 6 Tropfen Lugol'scher Lösung/ 100 ml Alkohol gewaschen.	
Herstellung der Lösung:	Sublimat (Quecksilber(II)-Chlorid)	5 g
	Natriumsulfat	1 g
	Kaliumbichromat	2,5 g
	Dest. Wasser	100 ml
	Eisessig	5 ml
Hinweis:	Das Ansäuern mit Eisessig erfolgt erst kurz vor Gebrauch.	

## 5. Methodenorientierte Fixierungen

### 5.1 Fixierung für Histochemie

In der Histochemie liegen die Anforderungen nicht nur bei der Strukturhaltung des Gewebes, sondern auch bei der Erhaltung der nachzuweisenden Substanzen. Diese dürfen vom Fixierungsmittel nicht herausgelöst werden. Ein universal einsetzbares Fixierungsmittel gibt es für diese Zwecke nicht. Stattdessen muss das Fixativ für jeden nachzuweisenden Stoff individuell gewählt werden, (vergleiche Tab. 2.1). So eignen sich z.B. wässrige Formaldehydlösungen für den Nachweis von alkohollöslichen Lipiden, jedoch nicht für den Nachweis von wasserlöslichem Glycogen. Alkohole hingegen ermöglichen den Nachweis von Glycogen, jedoch nicht den von Lipiden. Neben der Art des Fixierungsmittels spielt auch die Fixierungszeit eine wichtige Rolle. Die Nachweisbarkeit eines löslichen Stoffes richtet sich nicht nur nach der Zeit, in dem sich der Stoff in seinem Lösungsmittel befindet, sondern auch nach der Menge in dem er vorhanden ist. So kann z. B. Glycogen, das in einem Gewebe in

großer Menge vorhanden ist, auch nach einer wässrigen Formalinfixierung noch nachweisbar sein. Da es nur sehr wenige Einbettmethoden gibt, bei denen nicht mit Alkoholen entwässert wird, ist der Nachweis von alkohollöslichen Stoffen ohnehin schwierig. Mögliche Methoden sind die Gefrierschnitttechnik, die bei ganzen Insekten problematisch ist, oder die Einbettung in wasserlösliche Medien wie z. B. Durcupan der Firma Fluka. Für herauspräparierte Insektenorgane oder Larven sind die Möglichkeiten jedoch vielfältiger.

Nachzuweisender Stoff	Methode	Fixierungsmittel	Löslich in Alkohol
Eisen	Berliner Blau	Formalin, Bouin	nein
NH <sub>2</sub> -Gruppen	Ninhydrin-Schiff	Ethanol, Carnoy	nein
Kohlenhydrate	PAS	Formalin, Carnoy	nein
Saure Mucopolysaccharide	Alcianblau	Formalin, Carnoy	nein
DNA	Feulgen	Formalin, Ethanol, Carnoy	nein
DNA/ RNA	Gallocyanin-Chromalaun	Formalin, Ethanol, Carnoy	nein
DNA/ RNA	Methylgrün-Pyronin	Formalin, Carnoy	nein
Lipide	Scharlachrot	Formalin-Calcium	ja
Saure und neutrale Lipide	Nilblausulfat	Formalin-Calcium, Bouin	ja

Tab. 1.1) Mögliche Fixierungsmittel für ausgewählte histochemische Nachweisreaktionen.

## 5.2 Fixierung für Immunhistochemie

Die Wahl des Fixierungsmittels für die Immunhistochemie ist stark anwendungsabhängig. Grundsätzlich werden aber vor allem vernetzende Fixierungsmittel eingesetzt. Durch die fixierungsbedingte Quervernetzung der Aminosäuren kommt es zu einem Verlust der Immunaktivität des Gewebes. Bei entsprechender Behandlung der entparaffinierten oder entplasteten Schnitte durch Demaskierung kann die Struktur renaturierter Antigene zum großen Teil wiederhergestellt werden. Die Überführung des Probenmaterials in die Fixierungslösung sollte so zeitnah wie möglich erfolgen. Eine Überfixierung ist zu vermeiden und sollte 24 h nicht überschreiten.

Als wichtige Fixierungsmittel sind zu nennen:

- Gepufferte Formalinlösungen, 4-9 %
- Glutaraldehyd-Formaldehyd-Fixierung
- Formaldehyd-Ersatzstoffe
- Formaldehyd-Pikrinsäure
- Alkohol-Eisessig

## 5.3 Fixierung zytologischer Präparate

Die Fixierung von zytologischen Präparaten sollte sofort nach dem Ausstreichen auf dem Objektträger erfolgen. Ein Austrocknen der Zellen zwischen Ausstrich und Fixierung ist

unbedingt zu vermeiden. Der Fixiervorgang erfolgt bei Raumtemperatur in einer, mit Fixierlösung gefüllten Küvette. Die Lösung ist mehrfach verwendbar, sollte aber regelmäßig gewechselt werden. Nach einer Fixierungszeit von 10 bis 30 min wird das Präparat luftgetrocknet und kann weiterverarbeitet werden.

Als Fixierlösungen sind folgende zu nennen:

- Absolutes Ethanol und Ether 1:1
- Ethanol 95%
- 4 Teile Absolutes Ethanol und 1 Teil Glycerin (rein)

## 6. Entfernung von Fixierungsniederschlägen

Neben der konservierenden und strukturerhaltenden Wirkung können Fixierungsmittel auch negativen Einfluss auf das Gewebe haben. Bei Quellungen, Schrumpfungen oder Brüchigkeit des fixierten Materials, sollte die Wahl des Fixierungsmittels erneut überdacht werden und die Wahl auf ein anderes Mittel fallen. Anders hingegen beim Auftreten von Artefakten oder Niederschlägen, welche bei einigen Fixierungsmitteln auftreten können und je nach Beschaffenheit des Fixierungsmittels und des Präparates verschieden ausfallen können. Diese können auf recht einfachem Wege entfernt werden.

### Entfernung von Sublimatniederschlägen

Durchführung:

1. Gewebe/ Schnitte bis in den 70%igen Alkohol führen
2. Waschen in Jod-Kaliumiodid- Alkohol. Die Lösung wird durch Vorhandensein von Sublimat entfärbt. Behält der Alkohol die bräunlich - gelbe Farbe, ist kein Sublimat mehr vorhanden und der Waschvorgang abgeschlossen.
3. Absteigende Alkoholreihe bis Wasser
4. Entfernung der durch das Jod entstandenen Färbung mit 0,25%iger Natriumthiosulfatlösung (mikroskopische Kontrolle)

Jod-Kaliumiodid-Alkohol: 100 ml 70%iges Ethanol + 5 Tropfen Lugol'scher Lösung

### Entfernung von Formolniederschlägen

Durchführung:

1. Gewebe bis in den 70%igen Alkohol führen
2. Waschen in Ammoniakalkohol
3. Waschen in 70%igem Alkohol

Ammoniakalkohol: 1,5% Ammoniak (NH<sub>4</sub>OH) in 70% Ethanol.

### Entfernung von Pikrinsäureniederschlägen

Durchführung:

Auswaschen in 70%igem Alkohol, bis das Objekt keine gelbe Farbe mehr abgibt. Beschleunigung des Auswaschens, durch die Zugabe von 1 Tropfen Ammoniak je 100 ml Alkohol.

### **Entfernung von chromhaltigen Substanzen**

Durchführung:  
12-24 h fließend wässern

### **Entfernung von Kaliumdichromat/ Kaliumbichromat**

Durchführung:  
1. Waschen in 0,5%iger Chromsäure  
2. 12-24 h fließend wässern

## **7. Auswaschen des Fixierungsmittels**

Nach abgeschlossener Fixierung wird das Fixativ aus dem Gewebe ausgewaschen. Ob hierfür Alkohol oder Wasser verwendet wird, richtet sich nach der jeweiligen Fixierungsmethode. Das Waschen mit Alkohol erfolgt in Gefäßen auf dem Schüttler, bei dem die Lösung mehrfach gewechselt wird.. Beim Waschen mit Wasser wird in der Regel fließendes, kaltes Leitungswasser verwendet. Hierfür werden die Proben in ein Gefäß gegeben und für 30 bis 60 min bei schwachem Wasserdurchlauf gespült.

# Querverweis zur Broschüre Diffusion/Osmose

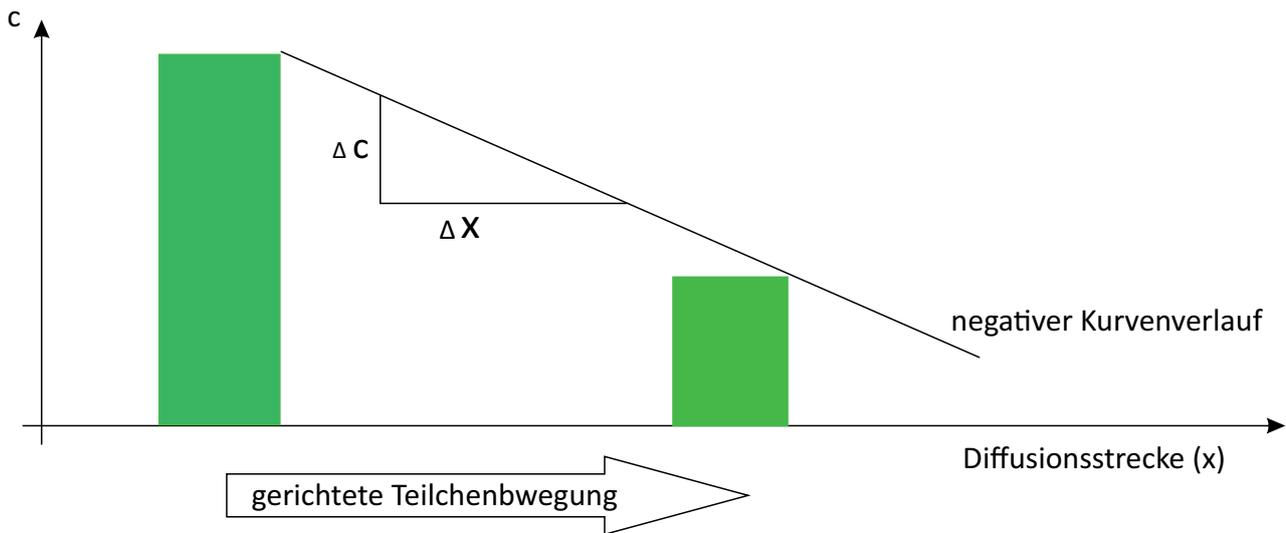


Diffusionsweg ( $\Delta x$ ) des Formalins nach 24 Stunden bei Raumtemperatur.

## Diffusionsgesetz

$$\frac{dn}{dt A} = -D \left( \frac{\Delta c}{\Delta x} \right)$$

$dn$  : Diffundierte Stoffmenge (mol)  
 $dt$  : betrachteter Zeitraum (s)  
 $A$  : Diffusionsfläche ( $m^2$ )  
 $D$  : Diffusionskoeffizient  $m^2 \cdot s^{-1}$   
 $dc$  : Konzentrationsunterschied ( $mol \cdot m^{-3}$ )  
 $dx$  : Strecke, über die  $\Delta c$  anliegt (m)



Gleichung für den Diffusionskoeffizienten

$$D = k \frac{T}{r \eta}$$

- $D \sim T$  mit steigender Temperatur steigt die Beweglichkeit der Teilchen
- $D \sim k$  die Stoffkonstante (chemische Eigenschaft)
- $D \sim \frac{1}{r \eta}$  r- Radius des Teilchens  
 $\eta$ - Viskosität (innere Reibung)

Radius und Viskosität sind indirekt proportional, wenn sie größer werden, dann wird (D) kleiner.

## Kontrollfragen

1. Welche Zersetzungsprozesse werden durch die Fixierung verhindert?

2. Welche positiven Effekte hat die Fixierung für den histologischen Arbeitsprozess?

- a)
- b)
- c)
- d)

3. Um welches Vielfache soll das Volumen des Fixierungsmittels größer sein als das der Probe?

Das Volumen soll -mal größer sein.

4. Es gibt vier Wirkungsmechanismen der Fixation! Wie werden diese unterteilt?

- a)
- b)
- c)
- d)

5. Die Fixierungsmittel zu den genannten Wirkungen ordnen !

Vernetzung

Wasserentzug

Salzbildung

Änderung des Quellungszustandes

Formaldehyd, Ethanol, Butanol, Essigsäure, Glutaraldehyd, Aceton, Quecksilbersalze, Pikrinsäure, Trichloressigsäure

6. Was ist Gegenstand der Histochemie?

6.1 Mit welcher histochemischen Reaktion erfolgt der Nachweis des Eisens?

6.2 Mit welcher histochemischen Reaktion erfolgt der Nachweis von Kohlenhydraten?

6.3 Mit welcher histochemischen Reaktion erfolgt der Nachweis von sauren Mucopolysacchariden?

Färbung mit

7. Welches Fixierungsmittel ist für die Histochemie am besten geeignet?