

Untersuchungen zur immunhistologischen Darstellung
von CD8⁺ T-Lymphozyten in paraffineingebettetem,
lymphatischem Gewebe der Katze

Gisa Almut Juliane Althoff



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**Untersuchungen zur immunhistologischen Darstellung von
CD8⁺ T-Lymphozyten in paraffineingebettetem, lymphatischem Gewebe
der Katze**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Gisa Almut Juliane Althoff

Tierärztin aus Krefeld

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. C. Staszuk

Tag der Disputation: 7. August 2012

Meinen Eltern

und

in memoriam

Ingrid Karber

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze der wissenschaftlichen Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Immunhistologie	2
2.1.1 Bedeutung und Einsatzgebiete	2
2.1.2 Leukozytendifferenzierungsantigene	3
2.1.3 CD8 - Charakterisierung und Bedeutung des immunhistologischen Nachweises.....	5
2.2 Gewebefixierung.....	7
2.2.1 Grundlagen	7
2.2.2 Herkömmliche Fixierungsmethoden	8
2.2.2.1 Formalinfixierung.....	8
2.2.2.1.1 Einführung.....	8
2.2.2.1.2 Maskierung von Antigenen - chemische Grundlagen.....	9
2.2.2.1.3 Antigen Retrieval	11
2.2.2.2 Gefrierschnitttechnik.....	14
2.2.3 Interessenkonflikt bei der Gewebefixierung	15
2.2.4 Alternative Fixierungsmethoden	16
2.2.4.1 Zielsetzung	16
2.2.4.2 Lösungsansätze.....	16
2.2.4.3 ZSF-Fixierung	19
2.2.4.3.1 Einführung.....	19
2.2.4.3.2 Wirkungsprinzip.....	20
2.2.4.3.3 Literaturübersicht über die Verwendung der ZSF-Fixierung.....	21
2.2.4.3.3.1 Immunhistologie.....	21
2.2.4.3.3.1.1 Probenspektrum.....	21
2.2.4.3.3.1.2 Nachweis von Leukozytenoberflächenantigenen	21
2.2.4.3.3.1.3 Nachweis von CD8.....	22
2.2.4.3.3.1.4 Antigen-Retrieval	24
2.2.4.3.3.2 Zytologie	24
2.2.4.3.3.3 Histologie	25
2.2.4.3.3.3.1 Morphologieerhalt.....	25
2.2.4.3.3.3.2 Spezialfärbungen.....	25
2.2.4.3.3.4 Molekularbiologie	25

2.2.4.3.3.5 Modifizierung der Methode	26
2.2.4.4 HOPE [®] -Fixierung.....	27
2.2.4.4.1 Einführung.....	27
2.2.4.4.2 Wirkungsprinzip.....	27
2.2.4.4.3 Literaturübersicht über die Verwendung der HOPE [®] - Fixierung	28
2.2.4.4.3.1 Immunhistologie.....	28
2.2.4.4.3.1.1 Probenspektrum.....	28
2.2.4.4.3.1.2 Nachweis von Leukozytenoberflächen- antigenen	28
2.2.4.4.3.1.3 Nachweis von CD8.....	28
2.2.4.4.3.1.4 Antigen-Retrieval	29
2.2.4.4.3.2 Zytologie	29
2.2.4.4.3.3 Histologie	30
2.2.4.4.3.3.1 Morphologieerhalt.....	30
2.2.4.4.3.3.2 Spezialfärbungen.....	30
2.2.4.4.3.4 Molekularbiologie	30
3 Material und Methoden.....	32
3.1 Untersuchungsmaterial.....	32
3.2 Vorberichte	32
3.3 Herstellung von Gewebeblöcken.....	33
3.3.1 Herstellung von Gefrierblöcken	33
3.3.2 Herstellung von formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material	34
3.3.3 Herstellung von HOPE [®] -fixiertem, paraffineingebettetem Material	34
3.3.3.1 Fixierung	34
3.3.3.2 Prozessierung	36
3.3.4 Herstellung von ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Material.....	36
3.3.4.1 Fixierung	36
3.3.4.2 Prozessierung	38
3.3.4.2.1 Modifizierung des von Beckstead (1994) publizierten Protokolls	38
3.3.4.2.2 Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten nach modifiziertem Protokoll	39

3.3.4.2.3 Manuelle Prozessierung nach dem Protokoll von Beckstead (1994).....	39
3.4 Immunhistologische Untersuchung	42
3.4.1 Aufbereitung der Gewebelöcke für die immunhistologische Untersuchung	42
3.4.1.1 Gefrierlöcke.....	42
3.4.1.2 Paraffinlöcke mit formalinfixiertem Material	42
3.4.1.3 Paraffinlöcke mit HOPE [®] -fixiertem Material	43
3.4.1.4 Paraffinlöcke mit ZSF-fixiertem Material.....	44
3.4.1.4.1 Im Gewebeeinbettungsautomaten prozessierte Proben.....	44
3.4.1.4.2 Manuell prozessierte Proben (ZSF-M).....	44
3.4.2 Seren und Antiseren	45
3.4.2.1 Seren.....	45
3.4.2.2 Antiseren	45
3.4.2.2.1 Primärantikörper.....	45
3.4.2.2.2 Sekundärantikörper	46
3.4.2.2.3 Tertiärantikörper.....	47
3.4.3 Immunhistologischer Nachweis von CD8.....	47
3.4.3.1 Immunhistologischer Nachweis von CD8 in Gefriermaterial.....	47
3.4.3.2 Immunhistologischer Nachweis von CD8 in formalinfixiertem Material	49
3.4.3.3 Immunhistologischer Nachweis von CD8 in HOPE [®] -fixiertem Material	49
3.4.3.4 Immunhistologischer Nachweis von CD8 in ZSF-fixiertem Material	51
3.4.4 Immunhistologische Kontrollen.....	51
3.4.5 Auswertung	51
3.4.5.1 Immunhistologischer Nachweis von CD8.....	51
3.4.5.2 Beurteilungsverfahren	52
3.4.5.2.1 Ermittlung der optimalen Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers in Abhängigkeit von der jeweiligen Fixierungstechnik	52
3.4.5.2.2 Vergleich von Formalin-, HOPE [®] - und ZSF-fixiertem Gewebe mit Gefriermaterial hinsichtlich der immunhistologischen Darstellung von CD8	53

3.4.5.2.3 Einfluss der Fixierungsdauer auf den Antigenerhalt in HOPE [®] - und ZSF-fixiertem Material.....	54
3.4.5.2.4 Einfluss der Modifizierung des Prozessierungsprotokolls auf den Antigenerhalt bei der ZSF-Fixierung	55
3.4.5.2.4.1 Vergleich von nach modifiziertem Protokoll im Gewebeeinbettungsautomaten prozessiertem, ZSF-fixiertem Material mit manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessiertem ZSF-M Material.....	55
3.4.5.2.4.2 Vergleich von manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessiertem ZSF-M Material unterschiedlicher Paraffinierungsdauer	55
3.4.5.2.5 Einfluss der Entparaffinierung und Rehydrierung auf den Antigenerhalt in HOPE [®] -fixiertem Material.....	55
4 Ergebnisse	57
4.1 Immunhistologie	57
4.1.1 Ermittlung der optimalen Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers in Abhängigkeit von der jeweiligen Fixierungstechnik	57
4.1.1.1 Gefriermaterial	57
4.1.1.2 Formalinfixiertes Material.....	60
4.1.1.3 HOPE [®] -fixiertes Material	62
4.1.1.4 ZSF-fixiertes Material	64
4.1.2 Bewertung des immunhistologischen Nachweises von CD8 ⁺ T-Lymphozyten in Formalin-, HOPE [®] - und ZSF-fixiertem Material im Vergleich zu Gefriermaterial	66
4.1.2.1 Gefriermaterial	66
4.1.2.2 Formalinfixiertes Material.....	68
4.1.2.3 HOPE [®] -fixiertes Material	69
4.1.2.4 ZSF-fixiertes Material	74
4.1.3 Bewertung des Einflusses der Fixierungsdauer auf den Antigenerhalt bei den alternativen Fixierungstechniken	77
4.1.3.1 HOPE [®] -fixiertes Material	77
4.1.3.2 ZSF-fixiertes Material	79

4.1.4 Bewertung des Einflusses der Modifizierung des Prozessierungsprotokolls auf den Antigenerhalt bei der ZSF-Fixierung	81
4.1.4.1 Einfluss der Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten nach modifiziertem Protokoll.....	81
4.1.4.2 Einfluss der Paraffinierungsdauer bei der manuellen Prozessierung nach dem Protokoll von Beckstead (1994).....	82
4.1.5 Bewertung des Einflusses der Entparaffinierung und Rehydrierung auf den Antigenerhalt in HOPE [®] -fixiertem Material	84
4.1.6 Immunhistologische Kontrollen.....	85
4.2 Morphologieerhalt.....	87
4.2.1 Gefriermaterial	87
4.2.2 Formalinfixiertes Material.....	87
4.2.3 HOPE [®] -fixiertes Material	87
4.2.4 ZSF-fixiertes Material	88
5 Diskussion	90
5.1 Immunhistologie	90
5.1.1 Eignung der Fixierungsmethoden für die immunhistologische Darstellung von CD8 ⁺ T-Lymphozyten in felinem, lymphatischem Gewebe.....	90
5.1.1.1 Herkömmliche Methoden.....	90
5.1.1.1.1 Gefrierschnitttechnik.....	90
5.1.1.1.1.1 Ergebnisse der Reihenuntersuchung	90
5.1.1.1.1.1.1 Analyse negativer Nachweise	90
5.1.1.1.1.1.2 Erhaltungszustand Ausgangsmaterial	91
5.1.1.1.1.2 Antigenerhalt.....	91
5.1.1.1.1.3 Fazit.....	92
5.1.1.1.2 Formalinfixierung.....	92
5.1.1.1.2.1 Ergebnisse der Reihenuntersuchung	92
5.1.1.1.2.1.1 Analyse negativer Nachweise	92
5.1.1.1.2.1.2 Erhaltungszustand Ausgangsmaterial	93
5.1.1.1.2.2 Antigenerhalt.....	93
5.1.1.1.2.3 Fazit.....	93
5.1.1.2 Alternative Fixierungsmethoden	94
5.1.1.2.1 HOPE [®] -Fixierung.....	94
5.1.1.2.1.1 Ergebnisse der Reihenuntersuchung	94

5.1.1.2.1.1.1 Analyse negativer Nachweise	94
5.1.1.2.1.1.2 Erhaltungszustand Ausgangsmaterial	95
5.1.1.2.1.2 Einfluss der Fixierungsdauer.....	96
5.1.1.2.1.3 Einfluss der Entparaffinierung und Rehydrierung	98
5.1.1.2.1.4 Antigenerhalt	99
5.1.1.2.1.5 Fazit.....	100
5.1.1.2.2 ZSF-Fixierung	101
5.1.1.2.2.1 Ergebnisse der Reihenuntersuchung	101
5.1.1.2.2.1.1 Analyse negativer Nachweise	101
5.1.1.2.2.1.2 Erhaltungszustand Ausgangsmaterial	102
5.1.1.2.2.1.3 Uneinheitliche Anfärbung	103
5.1.1.2.2.2 Einfluss der Fixierungsdauer.....	105
5.1.1.2.2.3 Einfluss des Prozessierungsprotokolls	106
5.1.1.2.2.3.1 Einfluss der modifizierten Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten	106
5.1.1.2.2.3.2 Einfluss der Paraffinierungsdauer	109
5.1.1.2.2.4 Antigenerhalt.....	110
5.1.1.2.2.5 Fazit.....	111
5.1.2 Immunhistologische Kontrollen.....	111
5.2 Morphologierhalt	113
5.2.1 Herkömmliche Methoden.....	113
5.2.1.1 Gefrierschnitttechnik.....	113
5.2.1.2 Formalinfixierung.....	113
5.2.2 Alternative Methoden.....	114
5.2.2.1 HOPE®-Fixierung.....	114
5.2.2.2 ZSF-Fixierung	114
6 Zusammenfassung / Summary	115
6.1 Zusammenfassung	115
6.2 Summary	117
7 Literaturverzeichnis.....	118
8 Anhang	139
8.1 Tabellen	139
8.2 Lösungen, Puffer und Bezugsquellen	150
8.2.1 Lösungen und Puffer	150

8.2.2 Bezugsquellen für Chemikalien, Seren, Antiseren und Geräte	152
9 Abkürzungsverzeichnis.....	154

1 Einleitung

Die immunhistologische Darstellung einiger für die histopathologische Diagnostik und Forschung bedeutsamer Gewebsantigene (sogenannter fixierungs- und prozessierungssensitiver Antigene (Hicks et al., 2006)) ist in routinefixiertem und paraffineingebettetem Material nicht möglich, sodass zu diesem Zweck auf die Gefrierschnitttechnik zurückgegriffen werden muss (Blaschitz et al., 2008; Harley et al., 2011; Kiupel et al., 1999; Kunder et al., 2007; Waly et al., 2001). Diese gilt zwar nach wie vor als Goldstandard für den immunhistologischen Nachweis von Antigenen (Goldmann et al., 2012), ist allerdings mit einigen praktischen und logistischen Nachteilen behaftet und oftmals mit einem schlechteren Morphologieerhalt des Gewebes verbunden (Blaschitz et al., 2008; Braun et al., 2011; Breugelmans et al., 2011c; Gonzalez et al., 2001; Hadler-Olsen et al., 2010a; Kähler et al., 2010; Kothmaier et al., 2011; Leong et al., 2010; Löhler et al., 2009; Paavilainen et al., 2010; Preusser et al., 2010).

Erstrebenswert wäre daher die Etablierung eines Fixierungsverfahrens, das einen zuverlässigen immunhistologischen Nachweis auch formalin- und prozessierungssensitiver Epitope wie des Leukozytenoberflächenantigens CD8 gestattet und dabei gleichzeitig aufgrund guter morphologischer Detailerkennbarkeit eine zufriedenstellende histologische Beurteilung des Untersuchungsmaterials ermöglicht (Collings et al., 1984; Paavilainen et al., 2010; Wester et al., 2003). Zudem sollte es sich im Idealfall durch ein einfaches und flexibles Anwendungsprotokoll möglichst reibungslos in die zeitlichen Abläufe eines histodiagnostischen Routinelabors einfügen.

Ziel dieser Arbeit war, unter Verwendung des Zinksalzfixans (ZSF) nach Beckstead (1994) und der kommerziellen H_epes-Glutamic Acid Buffer-Mediated Organic Solvent Protection Effect (HOPE[®])-Fixierung (Olert et al., 2001) die Eignung dieser beiden aldehydfreien Fixierungsmethoden für den zuverlässigen immunhistologischen Nachweis des fixierungs- und prozessierungssensitiven T-Lymphozytendifferenzierungsantigens CD8 in paraffineingebettetem, lymphatischem Gewebe der Katze zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Immunhistologie

2.1.1 Bedeutung und Einsatzgebiete

Immunhistologische Verfahren sind auf dem Gebiet der Pathologie sowohl in der Forschung als auch in der Diagnostik von entscheidender Bedeutung für die Darstellung bestimmter Antigene (Dapson, 2007b; Goldstein et al., 2007; Leong und Wright, 1987; Werner et al., 2000). Seit ihrer Einführung Mitte des letzten Jahrhunderts immer wieder modifiziert und optimiert, finden sie in der Human- und Veterinärmedizin u. a. bei der Erforschung physiologischer hormoneller, enzymatischer und immunologischer Zusammenhänge, beim Nachweis von Infektions- und Autoimmunerkrankungen und genetischen Aberrationen sowie bei der Diagnose und Prognose von Tumoren und hier beim Menschen sogar bei der Therapiewahl vielfältige Anwendung (Blaschitz et al., 2008; Coons et al., 1942; Dapson, 1993; De Marzo et al., 2002; Fitzgibbons et al., 2000; Haines und West, 2005; Jambhekar et al., 2008; Leong und Wright, 1987; Leong und Leong, 2006; Leong et al., 2010; Ponce et al., 2004; Ramos-Vara et al., 2008; Sanchez-Cordon et al., 2005; Tammer et al., 1995; Valli et al., 2011; Van Alstine et al., 2002; Webster et al., 2009, 2010; Werner et al., 2000). Der Grund hierfür liegt darin, dass die Immunhistologie die Sensitivität und Spezifität eines immunologischen Nachweisverfahrens mit der Möglichkeit einer gleichzeitigen histologischen Beurteilung des Untersuchungsmaterials kombiniert und so eine Aussage über das Vorhandensein des gesuchten Antigens und dessen genauer Lokalisation im Gewebe und sogar auf zellulärer Ebene zulässt (Coons et al., 1942; Gonzalez et al., 2001; Haines und West, 2005; Leong et al., 2010; Ramos-Vara et al., 2008; Webster et al., 2009).

In der überwiegenden Zahl histopathologischer Labore wird für die Routinediagnostik formalinfixiertes, paraffineingebettetes Material verwendet (Blaschitz et al., 2008; Hewitt et al., 2008; Preusser et al., 2010; Srinivasan et al., 2002; Vollmer und Goldmann, 2011). Dieses ist jedoch im Folgenden für eine weiterführende immunhistologische Untersuchung nicht immer geeignet, da manche für die angestrebte Zelldifferenzierung bedeutsame Epitope durch die Fixierung und Prozessierung so stark verändert werden, dass sie von den jeweiligen Antikörpern nicht mehr gebunden werden (Barranco et al., 2011; Brenes et al., 1986; Breugelmans et al., 2011c; Collings et al., 1984; Dapson, 1993, 2007b; Fivenson et al., 1992; Gutierrez et al., 1999; Leong und Milios, 1993; Mephram, 1982; Meyer und Hornickel, 2010; Rathkolb et al.,

1997; Salguero et al., 2001; Shetye et al., 1996). Insbesondere viele Leukozytenoberflächenantigene werden als auffällig schwer nachweisbar angesehen (Engelhardt et al., 2002).

Für die immunhistologische Darstellung sogenannter fixierungs- und prozessierungssensitiver Antigene (Beckstead, 1994; Hicks et al., 2006), die in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material nicht nachweisbar sind (wie z. B. einige Leukozytenoberflächenantigene), muss auf die Gefrierschnitttechnik zurückgegriffen werden (Blaschitz et al., 2008; Harley et al., 2011; Kunder et al., 2007; Waly et al., 2001).

2.1.2 Leukozytendifferenzierungsantigene

Der Nachweis von bestimmten Antigenen auf der Oberfläche von Leukozyten (sogenannte Cluster of Differentiation oder CD-Antigene) ermöglicht deren genaue Unterteilung in funktionelle Subpopulationen sowie die Differenzierung in unterschiedliche Aktivitäts- und Reifestadien (Abbas et al., 2007b; Monteith et al., 1996; Tizard, 2009a). Diese sogenannte Immunphänotypisierung spielt sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin vor allem bei der Diagnose und Erforschung pathologischer Prozesse des Immunsystems eine bedeutende Rolle. Anwendung findet sie z. B. bei der Einteilung von Entzündungs- und Infektionsgeschehen und Autoimmunerkrankungen, bei Toxizitätsstudien und Untersuchungen zur Pathogenese von Tumoren, bei der Erkennung und Erforschung von Immundefizienzkrankheiten und bei der Diagnose, Klassifizierung, Prognose sowie beim Menschen auch bei der Auswahl der Therapie von Neoplasien des lympho-haematopoetischen Gewebes (Anderson et al., 2007; Berg et al., 2002; Buxton et al., 2002; Callanan et al., 1996; Ferrero et al., 2000; Fragkou et al., 2010; Gulbahar et al., 2006; Haines und West, 2005; Harley et al., 2011; Huntley et al., 2005; Joehrens et al., 2006; Keresztes et al., 1996; Kunder et al., 2007; Lara-Garcia et al., 2008; Leong et al., 2010; Liebana et al., 2007; Maley et al., 2006; Matthews et al., 2007; Paltrinieri et al., 1998; Ponce et al., 2004; Randall und Pearse, 2008; Rios-de Alvarez et al., 2008; Roccabianca et al., 2000; Roccabianca et al., 2006; Roosje et al., 1998; Roosje et al., 2004; Sanchez-Cordon et al., 2005; Spinardi-Barbisan et al., 2004; Swerdlow et al., 2008; Valli et al., 2002; Valli et al., 2011; van den Broek et al., 2005; Waly et al., 2001; Waly et al., 2004; Waly et al., 2005).

Mit der Verfügbarkeit hochaffiner Antikörper, der Einführung immer sensitiverer Detektionssysteme und der Anwendung von Antigen-Retrieval-Verfahren erhöhte sich die Anzahl von Antigenen, die in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material zuverlässig nachweisbar

waren, in den letzten 20 Jahren deutlich (Bos et al., 2000; Gown, 2004; Haines und West, 2005; Kunder et al., 2007; Leong und Leong, 2006; Malisius et al., 1997; Paavilainen et al., 2010; Ramos-Vara et al., 2008). Das Angebot von Antikörpern, die in der Humanmedizin zur Darstellung von Leukozytendifferenzierungsantigenen auf formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material eingesetzt werden können, ist umfangreich (Boenisch, 2005; Cattoretti et al., 1993; Leong und Milios, 1993; Namimatsu et al., 2005; Pileri et al., 1997; Taylor et al., 1996). So ist z. B. der immunhistologische Nachweis des Leukozytendifferenzierungsantigens CD8 in humanem Gewebe inzwischen auch in routinefixiertem Material möglich (Boenisch, 2002; Cuevas et al., 1994).

Hingegen ist die Verfügbarkeit von qualitativ hochwertigen Antikörpern mit hoher Sensitivität und Spezifität in der Veterinärmedizin insbesondere im Hinblick auf Zelldifferenzierungsmarker bei den Haustierarten deutlich begrenzter (Chianini et al., 2001; Keresztes et al., 1996; Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara et al., 2008; Tingstedt et al., 2003; Ward et al., 2006). Zwar hat sich auch hier das Angebot an Antikörpern, die auf routinefixiertem Paraffinmaterial eingesetzt werden können (sogenannte paraffingängige Antikörper), in den letzten Jahren deutlich vergrößert. Für die Darstellung einiger Leukozytenoberflächenmarker, wie z. B. CD8, musste allerdings bei tierischen Geweben - trotz aller Fortschritte auf dem Gebiet der Immunhistologie - z. T. auf die Gefrierschnitttechnik zurückgegriffen werden (Arzi et al., 2011; Chianini et al., 2001; Fivenson et al., 1992; Fournel-Fleury et al., 2002; Harley et al., 2011; Keresztes et al., 1996; Kiupel et al., 1999; Kunder et al., 2007; Waly et al., 2001). Derartiges Ausgangsmaterial steht jedoch nicht immer zur Verfügung (Waly et al., 2004). Dies gilt insbesondere für postalisch eingesandte Proben. So kann u. U. beispielsweise zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs noch gar kein Verdacht auf eine Erkrankung, deren Diagnose ein immunhistologisches Nachweisverfahren erfordert, bestanden haben, und somit lag vorerst keine Notwendigkeit vor, ein anderes Verfahren als die herkömmliche Formalinfixierung zu wählen (Williamson et al., 1998). An dieser Stelle wird die praktische Relevanz eines Fixans deutlich, das nachfolgend sowohl eine aussagekräftige morphologische als auch eine immunhistologische Untersuchung erlaubt, da sich oftmals die Notwendigkeit eines gesonderten immunhistologischen Nachweises erst im Anschluss an eine histopathologische Beurteilung des Gewebes ergibt (Collings et al., 1984; Mueller et al., 2011; Paavilainen et al., 2010).

Die erschwerte immunhistologische Nachweisbarkeit von Zelloberflächenantigenen wird auf ihre besondere Empfindlichkeit gegenüber den nachteiligen Einflüssen der Fixierungs- und

Prozessierungsvorgänge zurückgeführt, die auf ihrer Lokalisation in der Phospholipidmembran beruht. Diese Antigene stehen innerhalb der Zellmembran neben Lipiden auch mit Glycoproteinen in Kontakt, und diese Interaktion ist für die Epitopintegrität von entscheidender Bedeutung. Viele Fixantien greifen aber sowohl an der Lipidstruktur als auch an Proteinelementen an, sodass membranständige Antigene von den Einflüssen der Fixiermedien in sehr viel stärkerem Maße betroffen werden als andere (Pollard et al., 1987).

2.1.3 CD8 – Charakterisierung und Bedeutung des immunhistologischen Nachweises

Bei CD8 handelt es sich um ein in der Zellmembran verankertes Glykoprotein, das zur Immunglobulinsuperfamilie gehört (Abbas et al., 2007a; Tizard, 2009b). CD8 fungiert auch bei der Katze als Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors, bindet spezifisch an den Klasse-I-Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I) und wird abgesehen von verschiedenen Thymozytenstadien auch von zytotoxischen und regulatorischen T-Zellen exprimiert (Tizard, 2009a, b). Das feline CD8 ist aus α - und β -Ketten aufgebaut und liegt entweder als Homodimer ($\alpha\alpha$) oder als Heterodimer ($\alpha\beta$) vor (Shimojima et al., 1998b). Bei der Katze findet sich CD8 auf zytotoxischen T-Zellen in den peripheren lymphatischen Einrichtungen vornehmlich in Form des Heterodimers ($\alpha\beta$) (Roccabianca et al., 2006).

Während die immunhistologische Darstellung einiger Leukozytenoberflächenantigene wie z. B. CD3 (Beebe et al., 1994) und CD45R (Monteith et al., 1996) in formalinfixiertem, paraffineingebettetem, feline Gewebe möglich ist, wird der Nachweis des T-Lymphozytensubtypmarkers CD8 in paraffineingebetteten Geweben spezieübergreifend allgemein als schwierig beschrieben (Breugelmans et al., 2011c; Gutierrez et al., 1999; Hicks et al., 2006; Hofman, 2002; Holgate et al., 1986; Kunder et al., 2007; Leong und Milios, 1993; Pollard et al., 1987; Randall und Pearse, 2008; Rathkolb et al., 1997; Taylor et al., 1996; Tingstedt et al., 2003; Whiteland et al., 1995) und erfolgt daher bei der Katze an Gefrierschnitten (Harley et al., 2011; Paltrinieri et al., 1998; Roccabianca et al., 2006; Roosje et al., 1998; Roosje et al., 2004; Waly et al., 2001; Waly et al., 2004). Somit kann bei der Katze immunhistologisch innerhalb der Gesamtleukozytenpopulation eine Unterteilung in B- und T-Lymphozyten mittels der Lymphozytenoberflächenmarker CD45R und CD3 an routinefixiertem, paraffineingebettetem Gewebe durchgeführt werden (Beebe et al., 1994; Monteith et al., 1996). Für eine weitere Differenzierung in T-Zell-Subpopulationen wie z. B. CD8⁺ zytotoxische/regulatorische T-Zellen anhand des Markers CD8 (Tizard, 2009a, b; Tompkins et al.,

1990) muss hingegen auf die Gefrierschnitttechnik zurückgegriffen werden (Harley et al., 2011; Roccabianca et al., 2006; Waly et al., 2001; Waly et al., 2004).

Bei der Katze spielt der Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten u. a. bei der Pathogeneseforschung von durch feline Retroviren induzierten Immundefizienzkrankungen (z. B. Felines Immundefizienz Virus, FIV) im Rahmen der Differenzierung der betroffenen Leukozytensubpopulationen eine Rolle (Beebe et al., 1994; Rideout et al., 1992; Shimojima et al., 1998a; Shimojima et al., 2004). An dieser Thematik besteht auch seitens der Humanmedizin ein erhöhtes Interesse, da feline Formen der lentivirusinduzierten Immundefizienz aufgrund ähnlicher immunpathologischer Vorgänge als Studienmodell für Forschungen auf dem Gebiet der Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) Verwendung finden (Crawford et al., 2001; Howard und Burkhard, 2007; Howard et al., 2010; Novotney et al., 1990; Reche et al., 2010). Weitere Einsatzgebiete für die Phänotypisierung von CD8⁺ T-Lymphozyten bei der Katze sind Studien über die Pathogenese der Inflammatory Bowel Disease (Marsilio, 2007; Waly et al., 2001; Waly et al., 2004) und allergisch bedingter Dermatitiden (Roosje et al., 1998; Roosje et al., 2004). Anwendung findet dieses Verfahren auch bei der Diagnose und Erforschung von Tumoren (Lara-Garcia et al., 2008; Roccabianca et al., 2006).

2.2 Gewebefixierung

2.2.1 Grundlagen

Ziel eines jeden Fixierungsverfahrens ist es, die Strukturen des Gewebes möglichst dauerhaft zu konservieren und die einzelnen Bestandteile dabei idealerweise hinsichtlich Aufbau, Größe und Lokalisation so nah wie möglich am nativen Zustand *in vivo* zu erhalten, um eine zuverlässige pathologische Untersuchung des Gewebes zu gewährleisten (Kothmaier et al., 2011; Meyer und Hornickel, 2010; Mulisch und Welsch, 2010; Prento und Lyon, 1997). Dies soll erreicht werden, indem der Zellstoffwechsel zum Stillstand gebracht und die Zersetzung des Gewebes durch Autolyse und Fäulnisprozesse auf ein Minimum reduziert wird. Zudem soll der Fixierungsvorgang das Gewebe vor dem Verlust von Gewebestandteilen und den schädlichen Einflüssen während der nachfolgenden Prozessierung und Einbettung schützen sowie anschließende Schneidvorgänge und Färbungsmaßnahmen erleichtern (Dapson, 1993; Mulisch und Welsch, 2010; O'Leary et al., 2009; Prento und Lyon, 1997; Srinivasan et al., 2002; Titford und Horenstein, 2005; Vollmer und Goldmann, 2011). Allerdings muss bei jedem Fixierungsverfahren unabhängig vom eingesetzten Fixans grundsätzlich von der Möglichkeit der Artefaktbildung sowie der chemischen Modifizierung von Gewebestandteilen und damit auch von einer verminderten Verfügbarkeit reaktiver Epitope ausgegangen werden (Dapson, 1993; Srinivasan et al., 2002; Titford und Horenstein, 2005; Vollmer et al., 2006; Werner et al., 2000). Da sich die verschiedenen Komponenten von Zellen und Geweben in ihren Eigenschaften unterscheiden und daher sehr unterschiedlich auf die jeweiligen Fixierungsbedingungen reagieren können, hängt die Wahl einer geeigneten Fixierungsmethode von dem jeweiligen Untersuchungsziel ab (Larsson, 1993; Mulisch und Welsch, 2010; Titford und Horenstein, 2005).

Die Wirkungsweise der verschiedenen Fixierungsverfahren kann auf physikalischen Effekten wie Trocknung, Hitzeeinwirkung und Frost oder der gezielten Initiierung chemischer Prozesse durch Einsatz bestimmter Substanzen beruhen (Mulisch und Welsch, 2010; Prento und Lyon, 1997). Die Vielfalt dieser sogenannten Fixantien ist groß. Häufig finden koagulierende oder additive Fixantien Anwendung (Larsson, 1993). Erstere (z. B. Ethanol, Methanol, Aceton) führen zu einer Präzipitation von Proteinen, während letztere (z. B. Formalin) chemische Bindungen mit Proteinen eingehen und so stabilisierend wirken (Ramos-Vara et al., 2008; Srinivasan et al., 2002; Zhao et al., 2011). Um die Vor- und Nachteile der einzelnen Komponenten auszugleichen, werden auch häufig kombinierte Fixantien verwendet (Mulisch und Welsch,

2010; Prento und Lyon, 1997). Im Anschluss an die Fixierung werden die Proben üblicherweise entwässert und einer Paraffineinbettung unterzogen (Hewitt et al., 2008; Werner et al., 2000).

Bei der Gefrierschnitttechnik findet hingegen keine Prozessierung und Paraffineinbettung statt. Allerdings werden auch bis dahin unbehandelte Gefrierschnitte vor ihrer weiteren Verwendung im Rahmen der immunhistologischen Färbung in der Regel einer kurzen Fixierung (z. B. mit Aceton) unterworfen. Auch bei dieser Methode befindet sich das Gewebe zum Zeitpunkt der Untersuchung also nicht in einem völlig nativen Zustand, gleichwohl die Einwirkung möglicherweise modifizierender chemischer Substanzen hier im Vergleich zu den anderen Fixierungsmethoden auf ein Minimum reduziert werden kann (Daneshtalab et al., 2010).

Mit Einsatz des Lichtmikroskops in der Medizin und dem Beginn der histopathologischen Forschung und Diagnostik in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts lag bei der Entwicklung von Fixierungsverfahren zunächst ein möglichst detaillierter Morphologieerhalt im Fokus des Interesses (Vollmer und Goldman, 2011). In der modernen Pathologie wird an einer fixierten Gewebeprobe je nach Fragestellung neben einer histologischen Beurteilung allerdings oftmals auch die Durchführung von histochemischen, immunhistologischen oder molekularbiologischen Untersuchungen notwendig. Hierdurch haben sich die Ansprüche, die an eine Fixierungstechnik im Hinblick auf den zu leistenden Erhalt einzelner Gewebekomponenten wie Proteine und Nucleinsäuren gestellt werden, enorm erhöht (Dapson, 1993; Leong und Milios, 1993; Nadji et al., 2005; Srinivasan et al., 2002; Wester et al., 2003). Über den rein morphologischen Strukturverlust hinaus wird nun eine bestmögliche Konservierung aller Gewebestrukturen bis auf molekularer Ebene angestrebt (Hewitt et al., 2008; Moelans et al., 2011; Mueller et al., 2011; Paavilainen et al., 2010; van Essen et al., 2010; Wester et al., 2003).

2.2.2 Herkömmliche Fixierungsmethoden

2.2.2.1 Formalinfixierung

2.2.2.1.1 Einführung

Formalin gehört zur chemischen Gruppe der Aldehyde. Die Herstellung erfolgt aus einer konzentrierten 37 - 40%igen Formaldehydlösung, wobei üblicherweise nach Verdünnung mit Wasser eine 10%ige Formalin-Gebrauchslösung verwendet wird (Manoonkitiwongsa und Schultz, 2002). Der komplexe Fixierungsvorgang beruht auf einer schnellen Gewebepenetration, die Autolyse und Fäulnisvorgänge stoppt, gefolgt von einer langsameren kovalenten

Bindung an Gewebestrukturen und schließlich im dritten Schritt der Ausbildung von Quervernetzungen (Buesa, 2008).

Der hervorragende nukleäre sowie zytoplasmatische Strukturert, die Eignung für nachfolgende Spezialfärbungen, die unkomplizierte Prozessierung sowie eine gewebeunabhängige Einsatzmöglichkeit, die einfache und kostengünstige Herstellung, Lagerung und Anwendung der Gebrauchslösung und die desinfizierende Begleitwirkung (Fox et al., 1985; Grizzle, 2009; Hewitt et al., 2008; Moelans et al., 2011; Preusser et al., 2010; Su et al., 2004; Titford und Horenstein, 2005; Werner et al., 1996; Werner et al., 2000) haben Formalin seit seiner Vorstellung im Jahre 1893 zu dem am häufigsten verwendeten Fixans in der histopathologischen Routinediagnostik werden lassen (Blum, 1893, 1894; Buesa, 2008; Kothmaier et al., 2011; Leong et al., 2010; Moelans et al., 2011; Paavilainen et al., 2010; Preusser et al., 2010; Srinivasan et al., 2002; Vollmer und Goldmann, 2011). In den aktuellen Leitlinien des American College of Veterinary Pathologist' Oncology Committee für die Einsendung chirurgischer Proben in der Veterinärmedizin wird explizit 10%iges Formalin als Standardfixans empfohlen (Kamstock et al., 2011). Die Möglichkeit der unkomplizierten Aufbewahrung der Paraffinblöcke erlaubt zudem auch nach mehreren Jahren Lagerzeit noch retrospektive Studien ohne großen Kostenaufwand (Hewitt et al., 2008; Preusser et al., 2010; Su et al., 2004). Doch trotz der guten Übereinstimmung mit den praktischen Erfordernissen eines histopathologischen Diagnostiklabors beinhaltet der Einsatz von Formalin den für immunhistologische Untersuchungen entscheidenden Nachteil, dass die immunologische Integrität von Molekülen im Verlauf der Fixierung stark beeinträchtigt werden kann (Dapson, 1993, 2007b; Leong und Gilham, 1989; Mephram, 1982; von Wasielewski et al., 1998; Werner et al., 2000).

2.2.2.1.2 Maskierung von Antigenen - chemische Grundlagen

Der dem sogenannten „Phänomen der Maskierung“ zugrunde liegende Mechanismus beruht nach gegenwärtigem Wissensstand größtenteils auf der Kreuzvernetzung von extra- und intrazellulären Proteinen durch Methylenbrückenbindungen. Das Formaldehydmolekül reagiert zunächst mit ungeladenen hydrophilen Gruppen (v. a. Aminogruppen) von Proteinen und anderen Makromolekülen, wodurch hochreaktive Hydroxymethylgruppen entstehen, die sich wiederum unter Bildung von Methylenbrücken mit anderen funktionellen Gruppen desselben oder eines anderen Makromoleküls verbinden können. So entsteht im Verlauf der Fixierung eine immer dichter werdende intra- und intermolekulare Quervernetzung von Proteinen, Gly-

coproteinen, Nukleinsäuren und Polysacchariden (Boenisch, 2002; Dapson, 2007c; Fox et al., 1985; O'Leary et al., 2009; Puchtler und Meloan, 1985; Werner et al., 2000).

Das Ausmaß dieser Prozesse hängt dabei maßgeblich von dem pH-Wert und der Dauer der Fixierung ab (Leong et al., 2010; Pollard et al., 1987; Puchtler und Meloan, 1985). Durch das relativ starre Methylenbrückennetzwerk zwischen den Seitenketten der Aminosäuren können Proteine in ihrer nativen Tertiär- und Quartärstruktur verändert werden, was in Abhängigkeit von Ladung und Lage der reaktiven Gruppen im Molekül zu einer mehr oder weniger starken Konformationsänderung relevanter Antigenabschnitte führen kann (Dapson, 2007c; Leong und Leong, 2007; Paavilainen et al., 2010; Pollard et al., 1987; Wester et al., 2003). Deshalb werden diese dann auch als „maskierte“ Epitope bezeichnet (Mephram, 1982). Es wird zudem vermutet, dass Formalin auch Wasserstoffbrückenbindungen auflösen und elektrostatische Interaktionen sowie Ladungen von Proteinabschnitten beeinflussen kann, was ebenfalls in einer Destabilisierung der Proteinkonfiguration und einer reduzierten Avidität von Epitopen resultieren kann (Boenisch, 2002, 2006; Dapson, 1993; Leong und Leong, 2007; Leong et al., 2010).

Auch wenn der Verlust der antigenen Strukturen auf der Kombination einer Vielzahl von Effekten während der Fixierung, Prozessierung und Paraffineinbettung wie z. B. auch einer erhöhten Temperatur und verlängerten Prozessierungsdauer beruht (Arnold et al., 1996; Collings et al., 1984; Larsson, 1993; Pollard et al., 1987), so wird letztlich doch der Einfluss des Formalins während der Fixierung als besonders entscheidend hierfür angesehen. Insbesondere eine verlängerte Immersionszeit im Fixans wird kritisch beurteilt (Goldstein et al., 2007; Stein et al., 1984; Werner et al., 2000). Letzteres wird als Phänomen der Überfixierung bezeichnet (Werner et al., 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine verlängerte Inkubationsdauer in Formalin je nach Empfindlichkeit des jeweiligen Antigens zu einem deutlichen Verlust dessen immunhistologischer Nachweisbarkeit und damit auch zu falsch negativen Ergebnissen führen kann (Cattoretti et al., 1993; Coons et al., 1942; Dapson, 1993; Leong und Gilham, 1989; Leong et al., 2010; Ott, 2008; von Wasielewski et al., 1998; Werner et al., 2000).

Manche Antigene erfahren bei der Fixierung je nach ihrer Lokalisation und Ladung hingegen lediglich so geringe Konformationsänderungen, dass sie von den jeweiligen Antikörpern weiterhin gebunden werden können (Boenisch, 2002, 2005; Cattoretti et al., 1993; Daneshtalab et al., 2010; Ramos-Vara und Beissenherz, 2000; Shi et al., 1991; Werner et al., 1996; Wester et

al., 2003). Sie werden als resistente Antigene bezeichnet (Hicks et al., 2006; Larsson, 1993). Dies würde auch die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Nachweisbarkeit verschiedener Antigene in einheitlich fixiertem Gewebe erklären (Fivenson et al., 1992; Leong und Gilham, 1989; Leong und Milios, 1993; von Wasielewski et al., 1998).

Die herkömmliche Formalinfixierung ist neben der schlechten Konservierung von Antigenen auch mit einer Degradierung und dem Verlust hochmolekularer DNA und RNA verbunden. Dies kann die Eignung von routinefixiertem Material für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen, die in der modernen pathologischen Diagnostik zunehmend an Bedeutung gewonnen haben, stark limitieren (Braun et al., 2011; Cox et al., 2006; Hewitt et al., 2008; Marwitz et al., 2011; Mc Sherry et al., 2007; Sen Gupta et al., 2003; Srinivasan et al., 2002; Su et al., 2004; Wester et al., 2003; Williams et al., 1999; Witchell et al., 2008).

2.2.2.1.3 Antigen Retrieval

Mit der Erkenntnis, dass maskierte Epitope durch die Formalinfixierung nicht zwangsläufig irreversibel zerstört, sondern infolge der Konformationsänderung auch lediglich vorübergehend verdeckt sein können, suchte man nach Methoden, diese entsprechenden Antigenabschnitte vor der immunhistologischen Färbung wiederherzustellen (Puchtler und Meloan, 1985). Dieser Vorgang wird als „Antigen Retrieval“ bezeichnet (Shi et al., 1991). In der Literatur ist eine beträchtliche Vielfalt dieser Antigen-Retrieval-Verfahren beschrieben (Cattoretti et al., 1993; D'Amico et al., 2009; Dapson, 2007c; Emoto et al., 2005; Gown et al., 1993; Lang et al., 2007; Leong und Milios, 1993; Leong und Leong, 2007; Leong et al., 2010; Ordonez et al., 1988; Pileri et al., 1997; Ramos-Vara, 2005; Shi et al., 1991; Shi et al., 1995; Shi et al., 2011; Taylor et al., 1996; van den Berg et al., 1993; Ward et al., 2006). Neben der Verwendung von unspezifisch wirkenden proteolytischen Enzymen wird hauptsächlich eine Inkubation in heißen Pufferlösungen (auch in Kombination mit Mikrowellen und Druckverfahren) durchgeführt, um die maskierten Epitope den Antikörpern wieder zugänglich zu machen (Cattoretti et al., 1993; D'Amico et al., 2009; Dapson, 2007c; Kim et al., 2004; Mepham, 1982; Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara et al., 2008). Über die dem Effekt des Antigen Retrieval zugrunde liegenden Mechanismen wurden viele Theorien aufgestellt, die jedoch bislang letztlich alle als spekulativ angesehen werden (D'Amico et al., 2009; Gown, 2004; Leong und Leong, 2007; Leong et al., 2010).

Prinzipiell bedeutete die Einführung der Antigen-Retrieval-Methoden aufgrund der erzielten Sensitivitätserhöhung einen enormen Fortschritt für den immunhistologischen Nachweis von Antigenen in formalinfixierten Paraffinschnitten (Leong und Leong, 2006; Leong et al., 2010; Paavilainen et al., 2010; Ramos-Vara, 2005; Shi et al., 2011; Taylor et al., 1996). Neben einer Verstärkung der Färbeintensität, der Verkürzung von Inkubationszeiten und der Herabsetzung der notwendigen Antikörperkonzentrationen wurde auch der Nachweis von Antigenen ermöglicht, die bis dahin nur in Gefrierschnitten darstellbar waren (Boenisch, 2006; Cattoretti et al., 1993; Cuevas et al., 1994; Gown et al., 1993; Leong und Gilham, 1989; Leong und Milios, 1993; Namimatsu et al., 2005; Ordonez et al., 1988; Shi et al., 1991; Taylor et al., 1996). Es gelang die Darstellung vieler als sehr sensitiv angesehener humaner Leukozytendifferenzierungsantigene in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material, darunter auch CD8 (Boenisch, 2005; Cuevas et al., 1994; Kim et al., 2004; Leong und Milios, 1993; Namimatsu et al., 2005; Pileri et al., 1997; Williamson et al., 1998). Auch in der Veterinärpathologie konnte durch die Anwendung von Antigen-Retrieval-Verfahren die Anzahl nachweisbarer Antigene enorm gesteigert werden (Ramos-Vara und Beissenherz, 2000).

Einschränkend ist bei der Beurteilung dieser Antigen-Retrieval-Verfahren jedoch zu berücksichtigen, dass kein universell einsetzbares Verfahren verfügbar ist, sondern die Ergebnisse je nach Antikörper, Typus und Lokalisation des nachzuweisenden Antigens, Gewebe, Art und pH-Wert des verwendeten Fixans, Fixierungsdauer und Art des eingesetzten Antigen-Retrieval-Verfahrens z. T. erhebliche Unterschiede aufweisen können (Barranco et al., 2011; Brandtzaeg und Rognum, 1983; Cattoretti et al., 1993; D'Amico et al., 2009; Dapson, 2007b; Emoto et al., 2005; Goldstein et al., 2007; Gown et al., 1993; Kim et al., 2004; Leong und Gilham, 1989; Leong und Milios, 1993; Löhler et al., 2009; Mengel et al., 2002; Moelans et al., 2011; Namimatsu et al., 2005; Ordonez et al., 1988; Ramos-Vara und Beissenherz, 2000; Salguero et al., 2001; Shi et al., 1995; van der Loos, 2007). Die optimale Methode ist somit zunächst für jedes Antigen empirisch mittels Versuchsreihen unter Variation der eingesetzten Pufferlösung und deren pH-Wert oder dem eingesetzten Enzym sowie der Inkubationsdauer und -temperatur zu ermitteln, wobei die Parameter für das gleiche Antigen auch durchaus bei verschiedenen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern differieren können (Gonzalez et al., 2001; Gutierrez et al., 1999; Kim et al., 2004; Leong und Gilham, 1989; Leong und Milios, 1993; Leong und Leong, 2007; Leong et al., 2010; Löhler et al., 2009; Ramos-Vara und Beissenherz, 2000; van der Loos, 2007).

Und trotz Applikation einer breiten Palette von Antigen-Retrieval-Verfahren gab es Antigene (insbesondere die als sehr sensitiv eingestuften Zelloberflächenmarker), die in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material nicht nachgewiesen werden konnten (Breugelmans et al., 2011c; Cattoretti et al., 1993; Fivenson et al., 1992; Gutierrez et al., 1999; Hicks et al., 2006; Keresztes et al., 1996; Randall und Pearse, 2008; Rathkolb et al., 1997; Salguero et al., 2001; Shi et al., 1997). Zudem kann auch trotz Auswahl einer sonst geeigneten Antigen-Retrieval-Methode und Etablierung eines sonst funktionierenden immunhistologischen Protokolls das Phänomen der Überfixierung dazu führen, dass ab Überschreitung einer gewissen Immersionsdauer in Formalin einzelne Antigene unter Einsatz der entsprechenden Antigen-Retrieval-Maßnahme nicht mehr nachweisbar sind (Boenisch, 2005; Leong und Gilham, 1989; Monteith et al., 1996; Van Alstine et al., 2002; Webster et al., 2009).

Bei manchen Antigenen hingegen wurde eine reduzierte Färbeintensität beobachtet, wenn eine bestimmte Fixierungsdauer unterschritten wurde (Phänomen der Unterfixierung) (De Marzo et al., 2002). Unterschiede hinsichtlich der Fixierungsdauer, die gerade bei Diagnostiklaboren oftmals außerhalb ihres Einflussbereichs liegen, können somit bei immunhistologischen Untersuchungen zu inkonsistenten Ergebnissen führen (Leong et al., 2010). Diese hohe, auch schon präanalytisch bedingte Variabilität der Färbeergebnisse nach Anwendung von Antigen-Retrieval-Verfahren bei formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material ließ immer wieder die Notwendigkeit einer Standardisierung immunhistologischer Verfahren insbesondere bei der Beurteilung prognostischer und für die Therapieauswahl relevanter Marker deutlich werden (Goldstein et al., 2007; Hammond et al., 2010; Leong et al., 2010; Mengel et al., 2002; Taylor und Shi, 2000).

Im Hinblick auf die Gewebemorphologie ist anzumerken, dass die Erhitzungs- und Abkühlungsprozesse bei temperaturabhängigen und der unspezifische Gewebeerddau bei enzymatischen Antigen-Retrieval-Verfahren durchaus zu einem Verlust der histologischen Detaillierbarkeit oder sogar zum Probenverlust durch Abschwimmen des Schnittes führen können (Cuevas et al., 1994; Daneshtalab et al., 2010; Goldstein et al., 2007; Leong und Leong, 2007; Vince et al., 1997). Auch eine Zunahme der unspezifischen Hintergrundfärbung, ein abweichendes Expressionsmuster und sogar das Auftreten falsch positiver und falsch negativer Färbeergebnisse konnten beobachtet werden, weshalb für jeden Antikörper im Rahmen der Etablierung eines Protokolls zunächst ein Abgleich mit parallel inkubierten Gefrierschnitten indiziert ist (Cattoretti et al., 1993; Cuevas et al., 1994; Goldstein et al., 2007; Hartmannsberger et

al., 2011; Hunt et al., 1996; Leong und Leong, 2007; Ordonez et al., 1988; Ramos-Vara et al., 2008; Shi et al., 1991; Tingstedt et al., 2003).

2.2.2.2 Gefrierschnitttechnik

Für die Darstellung von fixierungs- bzw. prozessierungssensitiven Antigenen muss oftmals auf die Gefrierschnitttechnik zurückgegriffen werden (Blaschitz et al., 2008; Kunder et al., 2007; Waly et al., 2001). Diese gilt zwar aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität als Goldstandard für den Antigennachweis in Geweben, ist jedoch mit einigen nicht unwesentlichen Nachteilen verbunden (Breugelmans et al., 2011c; Collings et al., 1984; Daneshtalab et al., 2010; Goldmann et al., 2012; Ismail et al., 2003; Kothmaier et al., 2011; Paavilainen et al., 2010; Tingstedt et al., 2003).

Hier ist zunächst die von vielen Autoren bemängelte, im Vergleich zu herkömmlichen Paraffinschnitten verminderte morphologische Auswertbarkeit von Gefrierschnitten zu nennen (Blaschitz et al., 2008; Bos et al., 2000; Braun et al., 2011; Brenes et al., 1986; Breugelmans et al., 2011c; Casey et al., 1988; Collings et al., 1984; Gonzalez et al., 2001; Hadler-Olsen et al., 2010a; Hicks et al., 2006; Holgate et al., 1983; Kähler et al., 2010; Kim et al., 2004; Kunder et al., 2007; Leong et al., 2010; Linder, 1991; Löhler et al., 2009; Mueller et al., 2011; Paavilainen et al., 2010; Rathkolb et al., 1997; Shi et al., 2008; Stein et al., 1984; Vincek et al., 2005; Vollmer et al., 2006; Whiteland et al., 1995; Williamson et al., 1998). Diese beruht zum einen auf der verminderten Anfärbbarkeit (Kothmaier et al., 2011) sowie zum anderen auf der Zerstörung der Gewebsstruktur durch die häufige Bildung von Eiskristallen (Ismail et al., 2003; Mueller et al., 2011) und lässt oftmals lediglich eine eingeschränkte Beurteilung einzelner Zellen oder intrazellulärer Abläufe zu (Cox et al., 2006; Whiteland et al., 1995). Häufig ist insbesondere in zellreichen Arealen die exakte topographische Lokalisation des Farbstoffniederschlags nicht erkennbar, sodass eine genaue Differenzierung der markierten Antigen-exprimierenden Zelle im Gewebe schwierig ist (Casey et al., 1988; Gonzalez et al., 2001; Shi et al., 2008; Tanaka et al., 1984; Whiteland et al., 1995). Eine im Zuge von Auftauvorgängen stattfindende Diffusion löslicher Antigene kann zudem zu einer Verfälschung ihrer Lokalisation führen (Collings et al., 1984; Larsson, 1993). Die Anfertigung von Serienschnitten mit akzeptablem Morphologieerhalt, insbesondere von fragilen oder härteren Geweben, wird als schwierig beurteilt (Bos et al., 2000; Bourque et al., 1993; Chilosi et al., 1983; Whiteland et al., 1995).

Ein bedeutsamer Nachteil ergibt sich auch unter rein praktischen und logistischen Aspekten (Holgate et al., 1983). Die Herstellung und Lagerung von Gefrierblöcken sowie die Anfertigung von Gefrierschnitten setzt die Verfügbarkeit von flüssigem Stickstoff und das Vorhandensein spezieller Apparaturen und gesonderter Kühllagerkapazitäten voraus, was mit hohen Anschaffungs- und Unterhaltskosten verbunden ist (Braun et al., 2011; Brenes et al., 1986; Cox et al., 2006; Gonzalez et al., 2001; Hewitt et al., 2008; Kähler et al., 2010; Mueller et al., 2011; Preusser et al., 2010; Sato et al., 1986; Stein et al., 1984; Wester et al., 2003). So sind zumindest im tiermedizinischen Bereich im Hinblick auf die hierfür nötige Ausstattung die Möglichkeiten der Gewinnung von Gefriermaterial auf Forschungsinstitute und im diagnostischen Bereich auf gut ausgestattete Labore und große Kliniken beschränkt (Keresztes et al., 1996). Hinzu kommt noch, dass der Transport von Gefrierproben mit einem sehr hohen Aufwand verbunden ist (Rathkolb et al., 1997), sodass diese Technik überwiegend bei Probeentnahmen vor Ort im Zuge von Sektionen und nicht bei Einsendungsproben Anwendung findet. Zudem ist der Umgang mit Gefriermaterial unter Gesichtspunkten des Infektionsschutzes nicht unbedenklich, da es sich wie bei jeder Gewebeprobe um potenziell infektiöses Material handelt, welches im Unterschied zur Formalinfixierung jedoch keiner keimabtötenden Behandlung unterzogen wurde (Collings et al., 1984; Gonzalez et al., 2001; Hicks et al., 2006; Rathkolb et al., 1997; Sanchez-Cordon et al., 2010; Williamson et al., 1998).

2.2.3 Interessenkonflikt bei der Gewebefixierung

Somit besteht bei der Gewebefixierung ein bislang nicht zufrieden stellend lösbarer Interessenkonflikt: Die Formalinfixierung mit nachfolgender Paraffineinbettung stellt aufgrund der hervorragenden Detailerkennbarkeit die Methode der Wahl für die histopathologische Untersuchung von Gewebeproben dar (Buesa, 2008; Leong et al., 2010; Moelans et al., 2011; Ramos-Vara, 2005; Titford und Horenstein, 2005). Allerdings sind diese infolge des schlechten Antigenerhalts als Ausgangsmaterial für immunhistologische Verfahren in manchen Fällen ungeeignet (Boenisch, 2006; Breugelmans et al., 2011c; Grizzle, 2009; Leong und Gilham, 1989; Paavilainen et al., 2010). Demgegenüber ermöglicht die Gefrierschnitttechnik zwar den Nachweis vieler besonders sensitiver Antigene (Blaschitz et al., 2008; Breugelmans et al., 2011c; Leong und Gilham, 1989; Tingstedt et al., 2003; Waly et al., 2001), ein Einsatz in der histopathologischen Routinediagnostik ist aber aufgrund des schlechten Morphologieerhalts unbefriedigend (Bos et al., 2000; Collings et al., 1984; Hewitt et al., 2008; Kunder et al., 2007; Mueller et al., 2011).

Die von manchen Instituten gewählte Praxis, bei einer pathologischen Untersuchung sicherheitshalber sowohl Gefriermaterial als auch formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe zu archivieren, birgt neben dem erheblichen logistischen Mehraufwand den Nachteil der schlechten direkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da die Untersuchungen nicht an derselben Gewebeprobe erfolgen und die potentielle Inhomogenität einer Gewebeprobe unberücksichtigt bleibt (Collings et al., 1984; Hewitt et al., 2008; Mueller et al., 2011; Preusser et al., 2010; Waly et al., 2001; Waly et al., 2004). Insbesondere bei kleineren Proben wie z. B. Biopsien ist zudem von einer Teilung der Probe abzusehen, da für eine adäquate Diagnosestellung die gesamte Gewebeprobe für die histologische Beurteilung zur Verfügung stehen sollte (Hewitt et al., 2008).

2.2.4 Alternative Fixierungsmethoden

2.2.4.1 Zielsetzung

In der Vergangenheit gab es verschiedene Versuche, ein Fixierungsverfahren zu entwickeln, das den Erhalt sensitiver Antigene mit einer guten morphologischen Detailerkennbarkeit kombiniert und zudem so einfach durchführbar ist, dass es sich gut in den labordiagnostischen Routineablauf integrieren lässt (Collings et al., 1984; Dapson, 1993; Ramos-Vara, 2005; Tingstedt et al., 2003). Dies würde die histopathologische Untersuchung ebenso wie eine sich in deren Verlauf eventuell als nötig erweisende immunhistologische Färbung von paraffineingebettetem Material vereinfachen (Dapson, 1993; Preto und Lyon, 1997). Nicht zuletzt beweist das vielfältige Literaturangebot zu diesem Thema dessen Praxisrelevanz (Brenes et al., 1986; Buesa, 2008; Collings et al., 1984; Dapson, 1993; Holgate et al., 1986; Larsson, 1993; Löhler et al., 2009; Lykidis et al., 2007; Moelans et al., 2011; Mueller et al., 2011; Paavilainen et al., 2010; Pollard et al., 1987; Preto und Lyon, 1997; Shi et al., 1997; Titford und Horenstein, 2005; Vince et al., 1997). Im Folgenden soll lediglich ein kurzer Überblick über die Vielzahl von Lösungsstrategien mit besonderem Schwerpunkt auf dem immunhistologischen Nachweis von Leukozytenoberflächenantigenen, insbesondere CD8, gegeben werden.

2.2.4.2 Lösungsansätze

Ein Ansatz, einen besseren Antigenhalt in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material zu erzielen, bestand in der Modifikation herkömmlicher Fixierungs- und Prozessierungsverfahren. Hierbei konnten im Einzelnen beim Nachweis sensitiver Leukozytenoberflächenmarker positive Ergebnisse erzielt werden. Insbesondere eine Herabsetzung der Prozessierungstemperatur, eine Verkürzung der Inkubationsdauer in Xylol und den Ethanolstufen sowie die

Verwendung von Paraffinwachsen mit einem niedrigen Schmelzpunkt wurden im Hinblick auf einen besseren Antigenerhalt als förderlich angesehen (Collings et al., 1984; Pollard et al., 1987). Durch eine Absenkung der Temperatur während des Fixierungsprozesses gelang u. a. die Darstellung von CD8 in porzinem Gewebe (Tingstedt et al., 2003).

Die Verwendung zusätzlicher Komponenten bei der Aldehydfixierung ermöglichte (meist in Verbindung mit einer modifizierten Prozessierung und Einbettung) in Einzelfällen den Nachweis sensitiver Leukozytenoberflächenmarker, wie z. B. CD8, in Paraffinschnitten von Ratten und Mäusen unter Verwendung von Periodat-Lysin-Paraformaldehyd sowie von Formalin-Dichromat in Paraffinmaterial von Rindern (Gendelman et al., 1983; Gutierrez et al., 1999; Rathkolb et al., 1997; Whiteland et al., 1995). Der Einsatz von Bouinscher-Lösung gestattete u. a. den Nachweis von CD8 in porzinem, paraffineingebettetem Gewebe (Sanchez-Cordon et al., 2005).

Ein weiterer Ansatz, die Problematik der maskierenden Effekte der Formalinfixierung zu umgehen, lag in der Verwendung aldehydfreier Fixierungsverfahren, die aber möglichst einen vergleichbaren morphologischen Strukturerehalt des Gewebes bewirken sollten (Collings et al., 1984; Leong et al., 2010; Preto und Lyon, 1997). In zahlreichen Studien mit diesem Ziel wurde für die Darstellung sensitiver Leukozytenoberflächenmarker u. a. die Verwendung von Aceton, z. T. auch in Verbindung mit nachfolgender Plastikeinbettung, propagiert (Casey et al., 1988; Tanaka et al., 1984). Mittels der Aceton-basierten AMeX (Aceton, Methylbenzoat, Xylol)-Methode und der modifizierten ModAMeX-Methode gelang u. a. die Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in humanem Gewebe (Delsol et al., 1989; Sato et al., 1986). Durch Gefriertrocknung mit anschließender Paraffineinbettung konnte neben anderen sensitiven Leukozytenoberflächenmarkern ebenfalls CD8 in humanem Gewebe nachgewiesen werden (Stein et al., 1984).

Auch der Einsatz von Zinkkomponenten hat bei der Gewebefixierung bereits eine längere Tradition. Seit Anfang der 30er Jahre des vergangenen Jahrhunderts findet der Zusatz von Zinkkomponenten zu herkömmlichen Fixantien in der Literatur Erwähnung (Dapson, 1993; Mugnaini und Dahl, 1983; Sheinin und Davenport, 1931). Es wurden verschiedene kommerzielle und nicht kommerzielle Fixantien auf Alkohol- wie auch auf Aldehydbasis vorgestellt, die Zinksalze enthielten und unter Hinweis auf eine geringe Toxizität und einen guten Morphologie- und Antigenerhalt empfohlen wurden (Bonds et al., 2005; Dapson, 1993). Die Ver-

wendung von mit Zinkkomponenten versetztem Formalin bot abgesehen von einem verbesserten Antigenerhalt zudem den Vorteil, dass das Problem der Überfixierung nicht beobachtet wurde (Ott, 2008; Tome et al., 1990).

In den letzten Jahren hat sich zudem das Angebot kommerzieller sowohl aldehydhaltiger wie auch aldehydfreier Fixantien stark vergrößert (Buesa, 2008; Dapson, 2007a; Leong et al., 2010; Löhler et al., 2009; Moelans et al., 2011; van Essen et al., 2010; Vince et al., 1997; Vincek et al., 2003).

Allerdings hat sich die Anwendung keines dieser alternativen Verfahren allgemein durchgesetzt (Buesa, 2008; Gonzalez et al., 2001; Hewitt et al., 2008; Leong et al., 2010; Moelans et al., 2011; Vincek et al., 2005). Ein Grund hierfür ist, dass aufwändige und streng zu befolgende Fixierungs- und Prozessierungsprotokolle oder eine mangelnde Haltbarkeit des Fixans eine in der Routinediagnostik unabdingbare Verfahrensflexibilität und ein hohes Probenaufkommen nicht gewährleisten (Beckstead, 1994; Gonzalez et al., 2001; Randall und Pearse, 2008; Vincek et al., 2005). Zudem waren die Methoden z. T. aufwändig oder mit der Anschaffung von speziellen Geräten verbunden (Sato et al., 1986; Stein et al., 1984) und die mit ihnen erzielten Verbesserungen nicht so überzeugend, dass ein derartiger Mehraufwand für den diagnostischen Routinelaborbetrieb gerechtfertigt wäre (Moelans et al., 2011). Meist waren die im Hinblick auf den Antigenerhalt erzielten Verbesserungen auch nicht universell sondern auf bestimmte Antigene beschränkt, während die Nachweisbarkeit anderer Antigene abnahm oder sogar nicht mehr gegeben war (Arnold et al., 1996; Beckstead, 1985; Collings et al., 1984; Delsol et al., 1989; Gonzalez et al., 2001; Gutierrez et al., 1999; Holgate et al., 1986; Löhler et al., 2009; Moelans et al., 2011; Nadji et al., 2005; Pollard et al., 1987; Rathkolb et al., 1997; Whiteland et al., 1995). Zudem sind die Verfahren im Fall von kommerziellen Fixantien häufig mit deutlich höheren Kosten verbunden (Moelans et al., 2011; Nadji et al., 2005). Auch erfüllten die Verfahren oftmals die für diese Einsatzmöglichkeit nötige Anforderung einer hervorragenden morphologischen Detailerkennbarkeit nicht (Buesa, 2008; Dapson, 1993; Gutierrez et al., 1999; Holgate et al., 1986; Leong et al., 2010; Moelans et al., 2011; Nadji et al., 2005; Prento und Lyon, 1997; Randall und Pearse, 2008; Rathkolb et al., 1997; Shi et al., 1997; Tingstedt et al., 2003; Werner et al., 2000; Wester et al., 2003).

2.2.4.3 ZSF-Fixierung

2.2.4.3.1 Einführung

Beckstead publizierte 1994 ein aldehydfreies, zinksalzhaltiges Fixans, mit dem der Nachweis mehrerer sensitiver humaner Leukozytenoberflächenantigene in paraffineingebettetem Gewebe gelang (Beckstead, 1994). Die Herstellung dieses Zinksalzfixans (ZSF) erfolgt über einen 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) unter Zugabe von 0,05 % Kalziumacetat sowie 0,5 % Zinkacetat und 0,5 % Zinkchlorid (endgültiger pH-Wert 6,5-7,0). Detaillierte Angaben bezüglich der Herstellung von ZSF sind im Anhang zu finden (siehe unter 8.2.1).

Unter Verwendung von ZSF konnten in bei Raumtemperatur fixierten und anschließend herkömmlich prozessierten Proben aus humanen Tonsillen u. a. auch die sonst nur in Gefrierschnitten darstellbaren Leukozytendifferenzierungsantigene CD1, CD4, CD7, CD8 und CD19 nachgewiesen werden, ohne dass hierfür der Einsatz eines Antigen-Retrieval-Verfahrens notwendig war.

Im Rahmen dieser Studie (Beckstead, 1994) wurden verschiedene zinksalzhaltige Fixantien mit herkömmlichen, routinemäßig verwendeten Fixantien (u. a. Formalin) und kommerziell erhältlichen Produkten sowie Gefrierschnitten im Hinblick auf die Nachweisbarkeit sensitiver Antigene in paraffineingebettetem Gewebe verglichen. Die mit den selbst hergestellten, zinksalzhaltigen Pufferlösungen fixierten Gewebeproben zeigten dabei überwiegend den gleichen exzellenten Antigenerhalt wie die parallel immunhistologisch gefärbten Gefrierschnitte, und das über eine weite Spannbreite von Immersionszeiten (4 h - 10 d), Temperaturen und Konzentrationen. Allerdings wies nur ZSF bei allen in der Studie untersuchten Antigenen Resultate auf, die in Anzahl und Intensität der markierten Zellen durchweg mit denen der Gefrierschnitte vergleichbar waren. Zugleich ermöglichte dieses Fixans im Vergleich zu den Gefrierschnitten eine präzisere Lokalisierung des immunhistologischen Signals im Gewebe, da die erzielte morphologische Detailerkennbarkeit abgesehen von einer geringgradigen zytoplasmatischen Schrumpfung derjenigen der formalinfixierten Proben entsprach. Die Zinksalzlösung erwies sich als bei Raumtemperatur stabil und war auch drei Monate nach Ansatz noch verwendbar, ohne dass eine erkennbare Beeinträchtigung der Resultate vorgelegen hätte. Des Weiteren zeigten die Paraffinblöcke auch nach einer Lagerungsdauer von drei Jahren keinen Antigenverlust.

2.2.4.3.2 Wirkungsprinzip

Auf welchem molekularen Mechanismus die epitopbewahrende Wirkung von zinkhaltigen Fixiermedien genau beruht, ist nicht bekannt (Hadler-Olsen et al., 2010a; Hermo et al., 2008; Jensen et al., 2010; Naresh et al., 2006; Ott, 2008; Titford und Horenstein, 2005; Zhao et al., 2011). Grundsätzlich wird Fixantien zugesetzten Metallionen ein stabilisierender Effekt zugeschrieben (Pollard et al., 1987).

Dapson (1993) vermutete, dass Zinkionen, die Formalin zugegeben werden, Antigene in ihrer dreidimensionalen Struktur stabilisieren und sie damit vor Konformationsänderungen während der Formaldehydfixierung schützen. Er nahm an, dass Zinkionen eine Bindung der Seitenketten der Aminosäuren durch das Formaldehydmolekül und ihre Einbeziehung in das Methylenbrückennetzwerk verhindern und dass dies auf der Bildung von sogenannten Koordinationskomplexen beruhen könnte. Hierbei bindet ein Zinkatom an vier Liganden (zumeist Bestandteile von Aminosäuren) auf demselben Makromolekül, wodurch die Makromoleküle in ihrer ursprünglichen Konformation gehalten werden. Aufgrund der hohen Affinität der Zinkionen zu diesen Gruppen hielt Dapson einen Vorteil dieser gegenüber den Formaldehydmolekülen bei der Konkurrenz um die Besetzung der Bindungsstellen für möglich. Von einem fixierenden Effekt der Zinkionen selber ging er nicht aus.

Ergebnisse ihrer Studie ließen Pajak et al. (2000) vermuten, dass eine Inkubation von Gewebeproben in aldehydfreien Zinksalzlösungen eine Stabilisierung der Proteinstrukturen bewirkt und die Proteine so vor einer Denaturierung während des nachfolgenden Dehydratations- und Einbettungsprozesses weitestgehend bewahrt werden. Sie beobachteten, dass CD8 in murinem Gewebe nach einer sechsstündigen Inkubationszeit in Aceton nicht nachweisbar war. Wurde das Material zuvor jedoch einer mehrtägigen Immersion in einer aldehydfreien Zinksalzlösung unterzogen, gelang die immunhistologische Darstellung von CD8. Diesen Effekt führten sie ebenfalls auf die Fähigkeit von Zinkionen zurück, Bindungen mit bestimmten Aminosäuren einzugehen und so Proteine in ihrer Struktur zu stabilisieren.

Im Hinblick auf das von Beckstead (1994) entwickelte ZSF postulierten Jensen et al. (2010), dass die in der Lösung enthaltenen Zinkionen die destabilisierenden Effekte der chaotropen Azetationen möglicherweise ausgleichen und deren Zusammenspiel zu einer Stabilisierung der Zellmembran sowie der darin enthaltenen Antigene führen könnte.

2.2.4.3.3 Literaturübersicht über die Verwendung der ZSF-Fixierung

2.2.4.3.3.1 Immunhistologie

2.2.4.3.3.1.1 Probenspektrum

Die ZSF-Fixierung hat in der Folge bei vielen immunhistologischen Studien an humanem Organmaterial Verwendung gefunden (Baker und Southgate, 2008; Jennings und Carroll, 2010; Pineda et al., 2011; Rojo-Botello et al., 2012; Wester et al., 2003). Sie wurde zudem auch an zahlreichen Geweben verschiedener Spezies wie Ratten (Caluwaerts et al., 2005; Geusens et al., 2008; Geusens et al., 2010; Sueda et al., 2000), Mäusen (Ismail et al., 2003; Lang et al., 2000; Löhler et al., 2009; Longhi et al., 2007; Taylor et al., 2011), Kaninchen (Anderson et al., 2007; Richter et al., 2000; Sai et al., 2001; Wenneras et al., 2000), Hühnern (Kilarski et al., 2005; Nowak-Sliwinska et al., 2010), Katzen (Champion et al., 2004; Shirahata et al., 2004), Schafen (Athanasiadou et al., 2008; Benavides et al., 2006; Breugelmans et al., 2011b; Breugelmans et al., 2011c; Buxton et al., 2002; Fragkou et al., 2010; Gonzalez et al., 2001; Matthews et al., 2007; Stanley et al., 2001), Rindern (Breugelmans et al., 2011a; Casteleyn et al., 2008; Cocquyt et al., 2008; Liebana et al., 2007; Mahajan et al., 2005; Maley et al., 2006), Ziegen (Breugelmans et al., 2011a), Schweinen (De Spiegelaere et al., 2010a; De Spiegelaere et al., 2010b; De Spiegelaere et al., 2010c), Rhesusaffen (Levin et al., 1997) und Großen Achatschnecken (Martynova et al., 2007) eingesetzt. Die ZSF-Methode hat sich auch bei immunhistologischen Untersuchungen an knöchernen und im Anschluss an die Fixierung entkalkten Geweben bewährt (Löhler et al., 2009; Wong et al., 2009; Wong et al., 2010).

2.2.4.3.3.1.2 Nachweis von Leukozytenoberflächenantigenen

Der gute Antigenerhalt der ZSF-Fixierung wurde in verschiedenen Studien bestätigt (Geusens et al., 2008; Gonzalez et al., 2001; Gulbahar et al., 2006; Rojo-Botello et al., 2012; Rundle et al., 2008; Vercruysse et al., 2006; Wester et al., 2003). ZSF erwies sich hierbei insbesondere im Bezug auf Zelloberflächenantigene gegenüber aldehydhaltigen Fixantien als deutlich überlegen (Bouzeghrane et al., 2004; Breugelmans et al., 2011c; van den Broek et al., 2005; Wang et al., 1996). Mehrere Arbeitsgruppen beobachteten, dass sich in ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Gewebe Zelloberflächenantigene nachweisen ließen, die in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe, z. T. auch unter Einsatz verschiedener Antigen-Retrieval-Maßnahmen, nicht darstellbar waren (Ismail et al., 2003; Johansson et al., 2000; Wang et al., 1996).

Die ZSF-Fixierung wurde zudem erfolgreich für den immunhistologischen Nachweis von verschiedenen Leukozytenoberflächenantigenen in paraffineingebetteten, humanen und tierischen Geweben eingesetzt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über den immunhistologischen Nachweis von Leukozytenoberflächenantigenen in ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Gewebe verschiedener Spezies

Spezies	Literaturquelle
Kaninchen	Anderson et al., 2007; Anderson et al., 2008
Maus	Berg et al., 2002; Corona et al., 2011; Elson et al., 2003; Elson et al., 2004a; Elson et al., 2004b; Ferrero et al., 2000; Hattori et al., 2009; Havouis et al., 2000; Hicks et al., 2006; Kimura et al., 2005b; Lang et al., 2000
Mensch	Bingle et al., 2006
Ratte	Bezuidenhout et al., 2010; Bouzeghrane et al., 2004; Nayak et al., 2009; Spinardi-Barbisan et al., 2004
Rind	Breugelmans et al., 2011a; Casteleyn et al., 2008; Cocquyt et al., 2008; Liebana et al., 2007; Mahajan et al., 2005; Maley et al., 2006
Schaf	Breugelmans et al., 2011a; Breugelmans et al., 2011b; Breugelmans et al., 2011c; Buxton et al., 2002; Fragkou et al., 2010; Gonzalez et al., 2001; Gulbahar et al., 2006; Huntley et al., 2005; Matthews et al., 2007; Rios-de Alvarez et al., 2008; Stanley et al., 2001; Summers et al., 2005; van den Broek et al., 2005
Ziege	Breugelmans et al., 2011a

2.2.4.3.3.1.3 Nachweis von CD8

Nach Beckstead (1994) gelang auch Wang et al. (1996) unter Anwendung der ZSF-Fixierung die immunhistologische Darstellung von CD8 in humanem, paraffineingebettetem Gewebe. Darüber hinaus wurde der immunhistologische Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Material bei mehreren tierischen Spezies beschrieben (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über den immunhistologischen Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Organmaterial verschiedener Spezies

Spezies	Organ	Literaturquelle
Kaninchen	Leber	Anderson et al., 2007; Anderson et al., 2008
	Lunge	
	Lymphknoten	
	Milz	
	Niere	
	Zäkum	
Maus	Darm	Berg et al., 2002; Hicks et al., 2006
	Leber	Hicks et al., 2006
	Lymphknoten	
	Milz	
	Thymus	
Mensch	Mamma	Wang et al., 1996
Ratte	Darm	Nayak et al., 2009; Spinardi-Barbisan et al., 2004
	Leber	Spinardi-Barbisan et al., 2004
	Lunge	
	Milz	Nayak et al., 2009; Spinardi-Barbisan et al., 2004
	Niere	Spinardi-Barbisan et al., 2004
	Thymus	
Rind	Lymphknoten	Casteleyn et al., 2008; Cocquyt et al., 2008; Liebana et al., 2007
	Plazenta	Maley et al., 2006
	Rektum	Mahajan et al., 2005
Schaf	Haut	Gulbahar et al., 2006; Matthews et al., 2007; van den Broek et al., 2005
	Lunge	Gulbahar et al., 2006; Summers et al., 2005
	Lymphknoten	Fragkou et al., 2010; Gonzalez et al., 2001
	Nasenschleimhaut	Stanley et al., 2001
	Plazenta	Buxton et al., 2002
	Tonsille	Breugelmans et al., 2011b; Breugelmans et al., 2011c
	Zitze	Fragkou et al., 2010

2.2.4.3.3.1.4 Antigen-Retrieval

In der überwiegenden Zahl der Studien, in denen ZSF-fixiertes, paraffineingebettetes Gewebe verwendet wurde, wurde für die immunhistologische Untersuchung keine Antigen-Retrieval-Maßnahme beschrieben. Hierbei ist hervorzuheben, dass bei keiner der unter 2.2.4.3.3.1.3 genannten Studien für den Nachweis von CD8 der Einsatz einer Antigen-Retrieval-Maßnahme beschrieben wurde oder ein solcher sogar explizit verneint wurde (Breugelmans et al., 2011c; Gonzalez et al., 2001; Liebana et al., 2007).

Gonzalez et al. (2001) und Hicks et al. (2006) sahen genau hierin einen großen Vorteil gegenüber der Formalinfixierung. Hicks et al. (2006) gelang ohne Antigen-Retrieval-Maßnahmen der Nachweis mehrerer Leukozytenoberflächenmarker in murinem, ZSF-fixiertem Gewebe, die in formalinfixiertem Material z. T. nur unter Anwendung von Antigen-Retrieval-Maßnahmen, z. T. jedoch selbst dann nicht nachweisbar waren, wie z. B. CD8. Ähnliche Beobachtungen machten Breugelmans et al. (2011c) an ovinem Gewebe.

Manche Autorengruppen hingegen geben an, ein Antigen-Retrieval-Verfahren durchgeführt zu haben, ohne allerdings näher auf den Grund hierfür einzugehen (Benavides et al., 2006; Croke et al., 2007; Ericsson et al., 2005; Ismail et al., 2003; Johansson et al., 2000; Johansson et al., 2002; Johansson et al., 2004; Löhler et al., 2009; Nowak-Sliwinska et al., 2010; Paavilainen et al., 2010; Richards et al., 2010; Rojo-Botello et al., 2012; Shirahata et al., 2004; Shynlova et al., 2007; Spinardi-Barbisan et al., 2004; Taylor et al., 2011; Williams et al., 2005; Williams et al., 2010; Yamaguchi et al., 2003). Lediglich Wester et al. (2003) erklären explizit, dass bei 3 von 9 Antigenen für deren immunhistologische Darstellung in ZSF-fixiertem Material auf Antigen-Retrieval-Verfahren zurückgegriffen werden musste.

2.2.4.3.3.2 Zytologie

Der Einsatz von ZSF hat sich auch für immunzytologische Untersuchungen als geeignet erwiesen (Higashi et al., 2003; Ocklind, 1998; Westbroek et al., 2001; Zhao et al., 2011). Des Weiteren zeigten Jensen et al. (2010) und Zhao et al. (2011), dass an ZSF-fixierten Zellen sowohl Durchflusszytometrie wie auch bildgebende Zytometrie (Laser Scanning Cytometry) durchgeführt werden konnte. Zhao et al. (2011) wiesen zudem nach, dass die morphometrischen Eigenschaften der ZSF-fixierten Zellen hierbei in Bezug auf den Grad der Chromatin-kondensation vergleichbar mit den von formalinfixierten Zellen waren.

2.2.4.3.3 Histologie

2.2.4.3.3.1 Morphologieerhalt

Der gute Morphologieerhalt, den die ZSF-Fixierung neben dem guten Antigenerhalt bietet, wurde in mehreren Arbeiten bestätigt (Benavides et al., 2006; Ferrero et al., 2000; Hicks et al., 2006; Ismail et al., 2003; Nagai et al., 2002) und sogar als vergleichbar mit formalinfixiertem Gewebe bewertet (Hadler-Olsen et al., 2010a). Lediglich eine gegenüber formalinfixiertem Material leicht vermehrte Schrumpfung des Gewebes wurde beobachtet (Benavides et al., 2006; Gonzalez et al., 2001).

In mehreren Studien wurde bei histologischen Untersuchungen ZSF als vollständiger Ersatz für Formalin eingesetzt (Anderson et al., 2007; Caturegli et al., 2003; Coxon et al., 2010; Ferrero et al., 2000; Gerard und Doillon, 2010; Hadler-Olsen et al., 2010b; Hattori et al., 2009; Kimura et al., 2005a; Kimura et al., 2005b; Lateef et al., 2009; Liebana et al., 2007; Longhi et al., 2007; Manenti et al., 2005; Nagai et al., 2002; Nowak-Sliwinska et al., 2010; Richards et al., 2010; Spinardi-Barbisan et al., 2004; Stanley et al., 2001; Taylor et al., 2011; Wong et al., 2009; Zargham und Thibault, 2005).

2.2.4.3.3.2 Spezialfärbungen

ZSF-fixiertes Material wurde auch erfolgreich für verschiedene Spezialfärbungen wie die Picrosiriusrot-Färbung (Gerard und Doillon, 2010), die Elastica-van-Gieson-Färbung (Hattori et al., 2009), die Trichrom-Masson-Färbung (Benavides et al., 2006) und die Perjodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion (Caluwaerts et al., 2005; Dechend et al., 2005; Geusens et al., 2010; Trzpis et al., 2008; Vercruyse et al., 2006) verwendet.

2.2.4.3.3.4 Molekularbiologie

An ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Gewebe fanden auch molekularbiologische Methoden wie PCR, z. T. auch nach vorheriger Laser-Mikrodissektion, Anwendung (Lykidis et al., 2007; Wester et al., 2003). Wester et al. (2003) stellten fest, dass der Gehalt an isolierbarer DNA in ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Material deutlich höher war als in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material. Er lag allerdings unter dem von Gefriermaterial. Der Gehalt an intakter RNA in ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Gewebe war hingegen gering. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Rojo-Botello et al. (2012), wonach sich ZSF-fixiertes, paraffineingebettetes Gewebe für die Analyse von RNA als ungeeignet erwies.

2.2.4.3.3.5 Modifizierung der Methode

In der Literatur ist eine gewisse Variabilität hinsichtlich der Anwendung der Fixierungsmethode zu beobachten. Einige Arbeitsgruppen führten z. B. den Fixierungsvorgang nicht wie von Beckstead (1994) vorgeschlagen bei Raumtemperatur, sondern bei 4 °C durch (Champion et al., 2004; Johansson et al., 2004; Lang et al., 2000; Levin et al., 1997; Nayak et al., 2009; Taylor et al., 2011; Wong et al., 2009; Wong et al., 2010). Andere wechselten das Fixans nach einer gewissen Zeit (Anderson et al., 2007; Buxton et al., 2002; Gonzalez et al., 2001; Hicks et al., 2006; Pineda et al., 2011; Rojo-Botello et al., 2012). In wieder anderen Studien wurden die Gewebeproben nach dem eigentlichen Fixierungsvorgang Waschschritten unterzogen (Caluwaerts et al., 2005; Johansson et al., 2000; Johansson et al., 2002; Lang et al., 2000; Vercruyse et al., 2006; Williams et al., 2005).

Zudem ist anzumerken, dass einigen Studien hinsichtlich der weiteren Verfahrensweise bezüglich des Prozessierungsvorgangs oftmals keine präzisen Angaben zu entnehmen waren (Anderson et al., 2007; Benavides et al., 2006; Caturegli et al., 2003; De Spiegelaere et al., 2010a; Ismail et al., 2003; Jennings und Carroll, 2010; Johansson et al., 2000; Johansson et al., 2004; Kimura et al., 2005b; Longhi et al., 2007; Nowak-Sliwinska et al., 2010). Bei anderen wurde an dieser Stelle auf nicht näher erläuterte interne Standardprotokolle verwiesen (Breugelmans et al., 2011a; Buxton et al., 2002; Caluwaerts et al., 2005; Casteleyn et al., 2008; Cocquyt et al., 2008; Fragkou et al., 2010; Geusens et al., 2008; Hicks et al., 2006; Stanley et al., 2001; Trzpis et al., 2008; Vercruyse et al., 2006; Wester et al., 2003). In manchen Studien wichen die angegebenen Inkubationsschritte (Dauer und Temperatur, Konzentration und z. T. auch Art der eingesetzten Dehydrierungs- und Clearingsubstanzen) sogar explizit von der von Beckstead (1994) ursprünglich beschriebenen Methode ab (Breugelmans et al., 2011b; Gonzalez et al., 2001; Lang et al., 2000; Löhler et al., 2009; Lykidis et al., 2007; Paavilainen et al., 2010; Pineda et al., 2011; Rojo-Botello et al., 2012; Sai et al., 2001; Suraud et al., 2007; Taylor et al., 2011; van den Broek et al., 2005).

2.2.4.4 HOPE[®]-Fixierung

2.2.4.4.1 Einführung

Bei der von Olert et. al. (2001) publizierten HOPE[®] (**H**epes-**G**lutamic Acid Buffer-Mediated **O**rganic Solvent **P**rotection **E**ffect)-Fixierung handelt es sich um ein patentiertes (Patentschrift DE 10021390 C2), aldehydfreies Fixierungsverfahren mit anschließender Paraffineinbettung, das von einer Firma (DCS Innovative Diagnostik Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg) kommerziell vertrieben wird. Den Entwicklern zufolge gewährleistet es neben einer hervorragenden Konservierung von Nukleinsäuren einen exzellenten Erhalt von Antigenen. Es soll für deren immunhistologischen Nachweis sogar ohne Antigen-Retrieval-Maßnahmen den Einsatz sogenannter kryogängiger, eigentlich nur für die Verwendung auf Gefriermaterial vorgesehener Antikörper an paraffineingebettetem Material erlauben. Der mit der HOPE[®]-Technik erzielte Morphologieerhalt soll dabei vergleichbar mit dem formalinfixierter, paraffineingebetteter Proben sein und die Methode somit eine umfassende histopathologische Untersuchung sämtlicher humaner Weichteilgewebe ermöglichen (Olert et al., 2001).

Hinsichtlich der Zusammensetzung der kommerziellen wässrigen Protektionslösung HOPE[®] I geben die Autoren lediglich an, dass es sich um einen hyperosmolaren organischen Puffer handelt, der verschiedene Aminosäuren in Konzentrationen von 10-100 mM enthält und einen pH-Wert von 5,8-6,4 bei Raumtemperatur aufweist (Olert et al., 2001).

2.2.4.4.2 Wirkungsprinzip

Das gewebeschonende Prinzip der HOPE[®]-Methode beruht auf der Kombination einer Inkubation der Proben in einer kommerziellen organischen Pufferlösung (der sogenannten Protektionslösung HOPE[®] I) bei 0-4 °C, einer ausschließlichen Verwendung von Aceton als dehydrierendes Agens und einer schonenden Einbettung mit reinem Paraffin mit einem niedrigen Schmelzpunkt bei 52-54 °C (Olert et al., 2001).

Der genaue zugrunde liegende Mechanismus des protektiven Effekts der HOPE[®]-Fixierung ist in der Literatur nicht näher beschrieben. Die Entwickler geben lediglich an, dass die antigenen Gewebestrukturen durch die Protektionslösung stabilisiert werden, was sie auf den Verbleib von präzipitierten Komponenten der Protektionslösung im Gewebe zurückführen, die im Zuge des Entwässerungsvorgangs mit Aceton ausgefällt werden (Olert et al., 2001). Die Denaturierung von Proteinen durch die im Verlauf der Prozessierung und Einbettung

verwendeten Substanzen (insbesondere organische Lösungsmittel) wird so auf ein Minimum reduziert, ohne dass es dabei zur Quervernetzung von Molekülstrukturen durch chemische Bindungen kommt. Des Weiteren soll die Protektionslösung eine Öffnung des Kapillarsystems bewirken, was im Folgenden eine bessere Durchdringung des Gewebes mit Aceton und damit eine schnellere Dehydratation ermöglichen soll.

2.2.4.4.3 Literaturübersicht über die Verwendung der HOPE[®]-Fixierung

2.2.4.4.3.1. Immunhistologie

2.2.4.4.3.1.1 Probenspektrum

Die HOPE[®]-Fixierung wurde bei zahlreichen immunhistologischen Studien an verschiedenen humanen Geweben eingesetzt (Anderle et al., 2008; Braun et al., 2011; Droemann et al., 2007; Goldmann et al., 2003; Grzmil et al., 2006). Verwendung fand sie auch an Geweben verschiedener tierischer Spezies wie z. B. Maus (Bergthaler et al., 2007; Pinschewer et al., 2010), Ratte (Hornickel et al., 2011a, 2011b; Merkler et al., 2006; Uhlig et al., 2002), Pferd, Ziege, Rind, Schwein, Hund und Katze (Hornickel et al., 2011a, 2011b).

2.2.4.4.3.1.2 Nachweis von Leukozytenoberflächenantigenen

Unter Einsatz der HOPE[®]-Fixierung gelang u. a. der immunhistologische Nachweis von verschiedenen Leukozytenoberflächenantigenen in paraffineingebetteten, humanen Geweben (Blaschitz et al., 2008; Esendagli et al., 2008; Middel et al., 2006; Nikitina et al., 2011; Pilling et al., 2009; Xu et al., 2008). Hierbei wurden z. T. sogenannte kryogängige Antikörper verwendet, die laut Hersteller nur für den Gebrauch auf Gefriermaterial vorgesehen waren (Blaschitz et al., 2008; Middel et al., 2006). Die Verwendung dieser Antikörper an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material verlief hingegen auch unter Einsatz von Antigen-Retrieval-Methoden mit negativem Ergebnis (Blaschitz et al., 2008). Leukozytenoberflächenantigene wurden zudem in HOPE[®]-fixiertem, paraffineingebettetem Gewebe von Ratten immunhistologisch dargestellt (Merkler et al., 2006).

2.2.4.4.3.1.3 Nachweis von CD8

Die immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten konnte unter Einsatz der HOPE[®]-Fixierung in paraffineingebettetem Lebergewebe von Mäusen (Bergthaler et al., 2007) sowie Gehirnmaterial von Mäusen (Pinschewer et al., 2010) und Ratten (Merkler et al., 2006) erzielt werden. Zudem gelang der immunzytologische Nachweis von CD8⁺ T-Lympho-

zyten in HOPE[®]-fixierten, paraffineingebetteten Zellpellets aus humanen Lungenspülproben (Marwitz et al., 2011).

2.2.4.4.3.1.4 Antigen-Retrieval

Im Hinblick auf den Nachweis von CD8 und anderen Leukozytenoberflächenmarkern in HOPE[®]-fixiertem Gewebe ist zu betonen, dass bei den unter 2.2.4.4.3.1.2 und 2.2.4.4.3.1.3 genannten Arbeiten die Durchführung einer Antigen-Retrieval-Maßnahme entweder nicht beschrieben (Esendagli et al., 2008; Merkler et al., 2006; Pilling et al., 2009; Pinschewer et al., 2010; Xu et al., 2008) oder sogar explizit verneint wurde (Blaschitz et al., 2008; Marwitz et al., 2011; Middel et al., 2006; Nikitina et al., 2011). Bei der Studie von Bergthaler et al. (2007) bleibt unklar, ob die beschriebene Antigen-Retrieval-Maßnahme nur auf das formalinfixierte Material oder auch auf das HOPE[®]-fixierte Material angewendet wurde.

Bereits bei der Erstbeschreibung wurde der Aspekt betont, dass bei der HOPE[®]-Fixierung aufgrund des guten Antigenerhalts und der fehlenden Quervernetzung im Unterschied zur Formalinfixierung die Notwendigkeit der dort oftmals unabdingbaren Antigen-Retrieval-Maßnahmen entfällt (Olert et al., 2001). Die These wurde auch durch Studien von Braun et al. (2011) und Goldmann et al. (2003) gestützt, bei denen für die Darstellung der jeweiligen Antigene in HOPE[®]-fixiertem Material im Unterschied zu parallel inkubiertem, formalinfixiertem Material keine Antigen-Retrieval-Methoden notwendig waren.

2.2.4.4.3.2 Zytologie

Die HOPE[®]-Methode hat sich auch für die Fixierung zytologischer Proben als geeignet erwiesen. So wurde an HOPE[®]-fixierten Zytozentrifugenpräparaten die erfolgreiche Durchführung von immunzytologischen Untersuchungen (Abdullah et al., 2012; Blumenthal et al., 2006; Coupland et al., 2005; Droemann et al., 2005a; Lang et al., 2007; Marwitz et al., 2009; Umland et al., 2003) sowie von *in situ*-Hybridisierung (Blumenthal et al., 2006; Droemann et al., 2005b; Fricke et al., 2006; Umland et al., 2003) beschrieben. Wiederholt wurde hierbei der hervorragende Morphologieerhalt der HOPE[®]-fixierten Proben betont (Coupland et al., 2005; Droemann et al., 2005b; Umland et al., 2003). Coupland et al. (2005) beurteilten HOPE[®]-fixierte Zytozentrifugenpräparate hinsichtlich Zellularität, Morphologie und Antigenerhalt als vergleichbar mit standardmäßig verwendeten nativen Präparaten.

Die HOPE[®]-Fixierung und nachfolgende Paraffineinbettung von mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnener Zellpellets gestattete sowohl eine immunzytologische Untersuchung als auch den Einsatz von *in situ*-Hybridisierung, quantitativer RT-PCR, Transkriptionsanalyse sowie zweidimensionaler Gelelektrophorese und erlaubte außerdem die bislang problematische langfristige Archivierung und retrospektive Untersuchung des Materials (Marwitz et al., 2011).

2.2.4.4.3 Histologie

2.2.4.4.3.1 Morphologieerhalt

Die gute morphologische Detailerkennbarkeit von HOPE[®]-fixiertem Gewebe wurde wiederholt bestätigt (Anderle et al., 2008; Droemann et al., 2003; Droemann et al., 2005a; Kothmaier et al., 2011; Marwitz et al., 2011; Meyer et al., 2007; Middel et al., 2006). Sie wurde im direkten Vergleich mit Gefrierschnitten als deutlich überlegen beurteilt (Anderle et al., 2008; Blaschitz et al., 2008). Der Morphologieerhalt wurde von manchen Arbeitsgruppen sogar als vergleichbar mit dem von formalinfixiertem Material eingestuft (Blaschitz et al., 2008; Braun et al., 2011; Goldmann et al., 2002; Goldmann et al., 2003; Goldmann et al., 2006; Kähler et al., 2010; Schewe et al., 2005; Sen Gupta et al., 2003). In einigen Studien erfolgte die histopathologische Beurteilung vollständig an HOPE[®]-fixiertem Gewebe (Esendagli et al., 2008; Merkler et al., 2006; Meyer et al., 2007).

2.2.4.4.3.2 Spezialfärbungen

Auch Spezialfärbungen wie die Silberimprägnierung nach Bielschowsky, die Markscheidenfärbung mit Luxol Fast Blue und die Perjodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion (Merkler et al., 2006), die Ziehl-Neelsen-Färbung (Schewe et al., 2005; Sen Gupta et al., 2003), Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (Hornickel et al., 2011a), Movat-Pentachrom-Färbung (Kothmaier et al., 2011) sowie die Auramin-Rhodamin-Fluoreszenzfärbung (Schewe et al., 2005) wurden an HOPE[®]-fixiertem Material durchgeführt.

2.2.4.4.3.4 Molekularbiologie

Zahlreiche Studien belegen, dass die HOPE[®]-Fixierung neben einer guten Konservierung von Antigenen (Blaschitz et al., 2008; Goldmann et al., 2003; Kähler et al., 2010) auch einen exzellenten Erhalt von Nukleinsäuren bietet und so den Nachweis von Proteinen sowie die Extraktion von hochmolekularer, intakter DNA (bis zu 24 kbp) und sogar mRNA (bis zu 2462 Nukleotide) aus paraffineingebettetem Gewebe über einen Zeitraum von mindestens acht Jah-

ren ermöglicht (Vollmer et al., 2006; Wiedorn et al., 2002). HOPE[®]-fixiertes Paraffinmaterial erwies sich hierbei gegenüber formalinfixiertem Paraffinmaterial im Hinblick auf Quantität und Qualität der isolierten DNA und RNA als deutlich überlegen (Braun et al., 2011; Goldmann et al., 2006; Mc Sherry et al., 2007; Sen Gupta et al., 2003; Wiedorn et al., 2002; Wittchell et al., 2008).

Zahlreiche Publikationen haben die hervorragende Eignung von HOPE[®]-fixiertem, paraffin-eingebettetem Material für die Anwendung moderner molekularbiologischer Techniken wie PCR (Braun et al., 2011; Schewe et al., 2005; Sen Gupta et al., 2003; Wiedorn et al., 2002), RT-PCR (Droemann et al., 2003; Droemann et al., 2005a; Radtke et al., 2010; Wiedorn et al., 2002), Real-Time RT-PCR (Boddu-Jasmine et al., 2008; Braun et al., 2011; Wittchell et al., 2008), Western Blot (Abdullah et al., 2009; Abdullah et al., 2012; Braun et al., 2011; Kähler et al., 2010; Kothmaier et al., 2011; Uhlig et al., 2004b), Northern Blot (Goldmann et al., 2004), Transkriptionsarray (Droemann et al., 2010; Goldmann et al., 2004), Laser-Mikrodissektion mit nachfolgender Real-Time RT-PCR (Goldmann et al., 2006), zweidimensionale Gelelektrophorese mit nachfolgender Massenspektroskopie (Kähler et al., 2010) und *in situ*-Hybridisierung (DNA und mRNA) (Abdullah et al., 2009; Blumenthal et al., 2006; Braun et al., 2011; Droemann et al., 2003; Droemann et al., 2005a; Droemann et al., 2005c; Droemann, 2006; Droemann et al., 2007; Droemann et al., 2010; Goldmann et al., 2002; Pechkovsky et al., 2006; Prasse et al., 2006; Radtke et al., 2010; Rupp et al., 2004; Schultz et al., 2008; Uhlig et al., 2004a; Xu et al., 2008) an humanen, murinen und bovinen Geweben demonstriert.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Die Untersuchung erfolgte an Milz und Mesenteriallymphknoten von zwölf Katzen aus dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Katzen wurden dem Institut im Rahmen der Routinediagnostik zwischen 2006 und 2010 zum Zwecke der Feststellung der Todesursache übergeben. Bei der Auswahl geeigneter Tiere wurde darauf geachtet, dass bei der makroskopischen Untersuchung im Rahmen der Sektion und auch bei der nachfolgenden histopathologischen Untersuchung keine Hinweise auf eine Erkrankung vorlagen, die mit einer Depletion von T-Lymphozyten einhergeht wie zum Beispiel die feline infektiöse Panleukopenie.

Auf die Lagerungsdauer (Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Beginn der Sektion), Lagerungsart und den Erhaltungszustand des Tierkörpers hat das untersuchende Institut bis zum Erhalt des Tierkörpers naturgemäß keinen Einfluss. Hinzu kommt, dass neben der persönlichen Übergabe häufig auch eine postalische Zustellung der Tierkörper erfolgt, deren Dauer sich über mehrere Tage erstrecken kann. Überdies muss berücksichtigt werden, dass Tierkörper vor Abgabe bzw. Versendung nicht selten eingefroren werden. Neben besonders frischen Tieren wurden so bewusst auch Tiere mit einer längeren Lagerungsdauer untersucht sowie Proben von zuvor gefrorenen Tierkörpern gewonnen, um zu gewährleisten, dass das Probenmaterial das in einem Routinediagnostiklabor real vorkommende Probenspektrum widerspiegelt. Angaben bezüglich der Lagerungsdauer (unter Kennzeichnung postalisch zugestellter oder gefrorener Tierkörper) finden sich im Anhang in Tabelle 8.1.1.

3.2 Vorberichte

Alle Angaben bezüglich Rasse, Alter, Geschlecht, Lagerungsdauer, Lagerungsart, Tagebuchnummer und pathologischer Gesamtdiagnose wurden den Tagebüchern des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommen und sind in Tabelle 8.1.1 im Anhang aufgeführt. Auf dem Vorbericht unvollständig vorhandene Angaben wurden durch telefonische Nachfrage bei dem Besitzer oder dem behandelnden Tierarzt soweit wie möglich vervollständigt.

3.3 Herstellung von Gewebelöcken

Von den im Rahmen der Sektion entnommenen Gewebeproben von Milz und Mesenteriallymphknoten wurden jeweils Gefrierlöcke sowie Paraffinlöcke von Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixiertem Material angefertigt. Hierzu wurde jede der Gewebeproben zunächst mehrfach geteilt und anschließend parallel zu Gefrierlöcken weiterverarbeitet oder dem Protokoll der jeweiligen Fixierungsmethode unterzogen (siehe Abb. 1). Eine Zusammenstellung des Probenmaterials unter Angabe von Tagebuchnummer, Fixierungsart, -dauer und Gewebetyp findet sich in Tabelle 8.1.2 im Anhang.

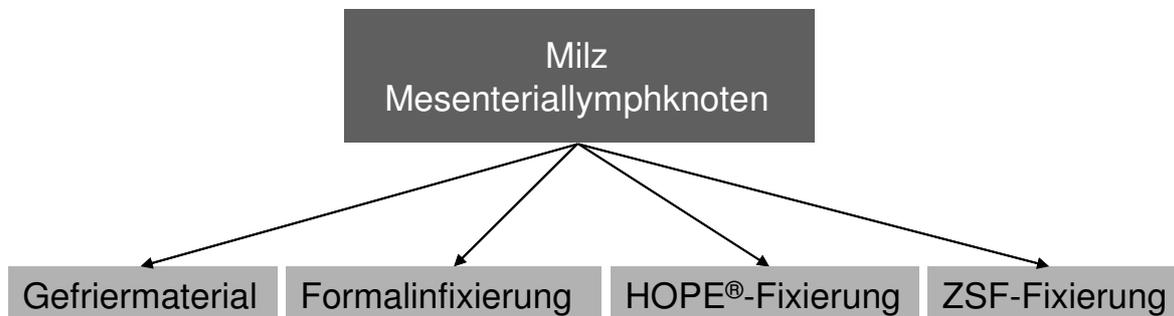


Abbildung 1: Parallele Aufbereitung des Probenmaterials zu Gewebelöcken

3.3.1 Herstellung von Gefrierlöcken

Die Proben wurden in kleine Stücke von maximal 0,8 x 0,8 x 0,8 cm Kantenlänge geteilt und diese wurden jeweils einzeln in einen aus Aluminiumfolie geformten zylinderförmigen Behälter mit einem Durchmesser von 1,5 cm verbracht. Anschließend wurden sie mit O.C.T.TM Einbettmedium (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) überschichtet. Das Einfrieren erfolgte mittels eines flüssigen Stickstoff enthaltenden Styroporbehälters, in den ein mit 2-Methylbutan gefüllter Metallbecher gestellt wurde. Die Aluminiumbehälter wurden in das vorgekühlte, als Kältevermittler fungierende 2-Methylbutan verbracht und dort bis zum Aushärten des Einbettmediums belassen. Die Gefrierlöcke wurden in Aluminiumfolie eingewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.3.2 Herstellung von formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material

Die Proben wurden in Scheiben von maximal 3 mm Dicke geschnitten. Anschließend wurden sie für 24-49 h in 10%igem Formalin bei Raumtemperatur in einem Glas mit Schraubverschluss fixiert, routinemäßig im Gewebereinbettungsautomaten (Tissue-Tek[®] VIP[™] 5 Jr., Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) prozessiert und danach an einer Ausgießstation (Tissue-Tek[®] TEC[™] 5, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) bei 65 °C in Paraffin (Roti[®]-Plast, Schmelzpunkt 56-58 °C, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in den üblichen Metallformen ausgegossen. Milz und Mesenteriallymphknoten desselben Tieres wurden jeweils zusammen in eine gemeinsame Form ausgegossen. Die jeweilige Verweildauer der Proben im Fixans (Fixierungsdauer) ist Tabelle 8.1.2 im Anhang zu entnehmen. Das Prozessierungsprotokoll, das standardmäßig auch bei der Aufbereitung der routinediagnostischen Gewebeproben des Instituts Anwendung findet, ist in Tabelle 8.1.3 im Anhang aufgeführt.

Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.3 Herstellung von HOPE[®]-fixiertem, paraffineingebettetem Material

Die Herstellung von HOPE[®]-fixiertem, paraffineingebettetem Material erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH und Co. KG, Hamburg.

3.3.3.1 Fixierung

1. Die Gewebeproben wurden auf eine Kantenlänge von maximal 0,8 x 0,8 x 0,8 cm zugeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, möglichst keine bekapselten, sondern angeschnittene Organscheiben zu verwenden, um eine möglichst große Diffusionsfläche zu schaffen.
2. Die Gewebeproben wurden in ein Reagenzglas mit 5 ml vorgekühlter Protektionslösung HOPE[®] I (DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH und Co. KG, Hamburg) verbracht und für 17 h bis 10 d auf zerstoßenem Eis im Kühlschrank inkubiert. Die Protektionslösung wurde anschließend verworfen.

Anmerkung zu Schritt 2:

Der Hersteller gibt in der Gebrauchsanweisung eine Verweildauer von 12-72 h in der Protektionslösung HOPE[®] I vor. Für „dicht gepackte“ Gewebe, wie z. B. Lymphknoten, wird explizit eine Fixierungsdauer von mindestens 40 h empfohlen. Um die Eignung der Fixierungsme-

thode für die Anwendung in einem Routinediagnostiklabor zu testen, wo es aufgrund von postalischen Teileinsendungsproben und eingeschränktem Wochenendbetrieb zwangsläufig zu einer unterschiedlichen Fixierungsdauer der einzelnen Proben kommt, sollte überprüft werden, ob die Fixierungsdauer - sowohl innerhalb als auch außerhalb des seitens des Herstellers empfohlenen Zeitrahmens - einen Einfluss auf den Antigenerhalt hat. Hierzu wurden, soweit dies in Anbetracht der Menge des jeweils vorhandenen Organmaterials möglich war, von Milz und Mesenteriallymphknoten desselben Tieres jeweils mehrere Proben gleichzeitig in die Protektionslösung HOPE[®] I verbracht, dort unterschiedlich lange inkubiert und anschließend dem Protokoll entsprechend weiterprozessiert. Die jeweilige Verweildauer der Gewebeproben in der Protektionslösung ist Tabelle 8.1.2 im Anhang zu entnehmen. Paraffinblöcke mit unterschiedlich lange fixiertem Material derselben Tagebuchnummer wurden entsprechend der jeweiligen Fixierungsdauer (FD) mit dem Zusatz FD und Angabe der Fixierungsdauer gekennzeichnet (z. B. Tgb.-Nr. S161/10 (HOPE[®], FD 40 h). Da es sich bei Tgb.-Nr. S606/10 um einen sehr frischen Tierkörper handelte und zudem ausreichend Material zur Verfügung stand, wurden von diesem Tier zur Klärung dieser Frage von HOPE[®]-fixiertem Material über eine weite Spanne unterschiedlicher Fixierungszeiträume Paraffinblöcke angelegt (siehe Abb. 2).

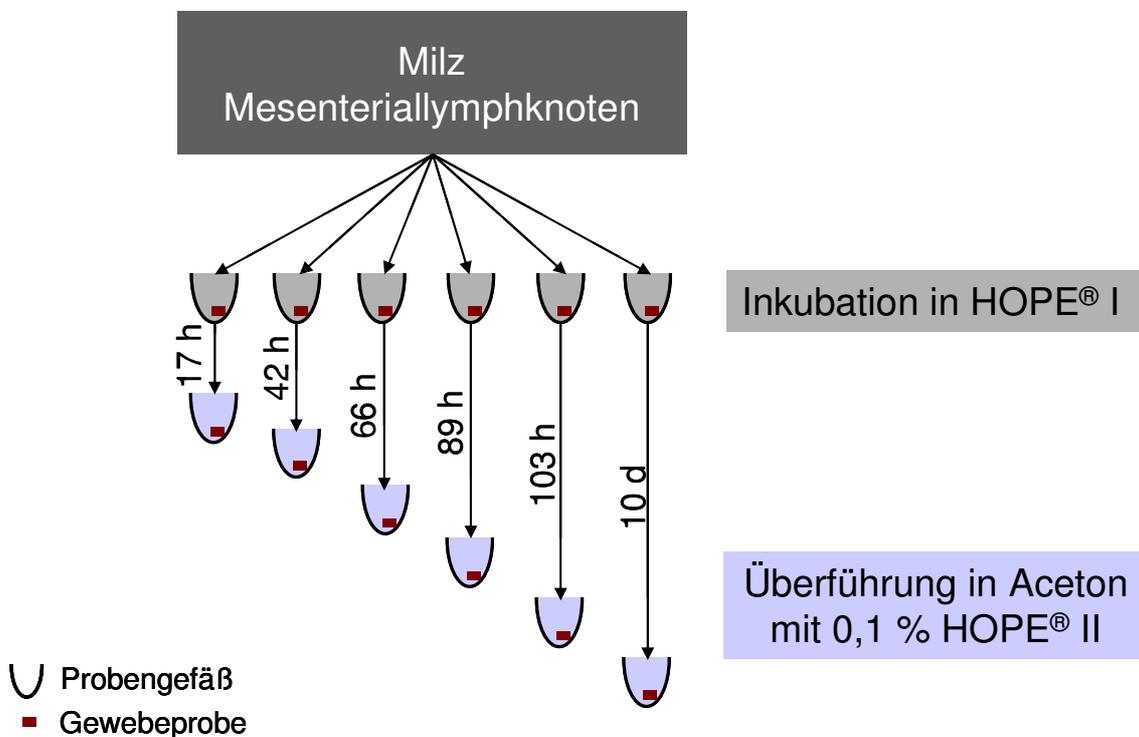


Abbildung 2: Gewinnung von HOPE[®]-fixiertem Material unterschiedlicher Fixierungsdauer von Tgb.-Nr. S606/10

3.3.3.2 Prozessierung

1. Die Proben wurden mit einer vorgekühlten Lösung aus 5 ml reinem Aceton versetzt mit 5 µl HOPE[®] II-Lösung (DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH und Co. KG, Hamburg) überschichtet und für 2 h auf zerstoßenem Eis im Kühlschrank inkubiert. Die Lösung wurde anschließend verworfen.
2. Den Proben wurde 5 ml vorgekühltes, reines Aceton zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 2 h auf zerstoßenem Eis im Kühlschrank.
3. Das Aceton wurde entfernt und durch frisches, ebenfalls vorgekühltes, reines Aceton ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubation für 2 h auf zerstoßenem Eis im Kühlschrank.
4. Schritt 3 wurde wiederholt.
5. Das Aceton wurde entfernt und die Proben wurden unverzüglich in ein Glasschälchen mit vorgewärmtem, flüssigem Paraffin (Low Melting Paraffin, Schmelzpunkt: 52-54 °C, DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH und Co. KG, Hamburg) verbracht und bei 54-55 °C über Nacht in einen Wärmeschrank gestellt.
6. Die Gewebeproben wurden am nächsten Morgen im geöffneten Wärmeschrank mit frischem, vorgewärmtem Paraffin (Low Melting Paraffin, Schmelzpunkt: 52-54 °C, DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH und Co. KG, Hamburg) in den üblichen Metallformen ausgegossen und anschließend wie gewohnt auf der Kühlplatte einer Paraffinausgießstation (Tissue-Tek[®] TEC[™] 5, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) weiterbearbeitet. Milz und Mesenteriallymphknoten desselben Tieres wurden jeweils in einen gemeinsamen Block eingebettet.
7. Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

3.3.4 Herstellung von ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Material

Die Herstellung von ZSF-fixiertem, paraffineingebettetem Material erfolgte auf Grundlage der von Beckstead (1994) beschriebenen Methode, die allerdings hinsichtlich des Prozessierungsvorgangs den automatisierten Abläufen des institutseigenen Routinediagnostiklabors entsprechend modifiziert wurde (siehe unter 3.3.4.2.1).

3.3.4.1 Fixierung

Die Gewebeproben wurden in Scheiben von maximal 3 mm Dicke geschnitten. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 24 h bis 41 d bei Raumtemperatur in der zuvor angesetzten ZSF-Lösung nach Beckstead (1994). Das Protokoll zur Anfertigung der ZSF-Lösung findet sich im Anhang unter 8.2.1).

Beckstead (1994) empfiehlt eine Fixierungsdauer von 24-48 h. Aus den unter 3.3.3.1 genannten Gründen sollte im Hinblick auf die Eignung der Methode für den Einsatz in einem Routinediagnostiklabor auch bei dieser Fixierungsmethode überprüft werden, ob die Fixierungsdauer einen Einfluss auf den Antigenerhalt hat. Hierzu wurden, wie unter 3.3.3.1 für die Gewinnung der HOPE[®]-fixierten Proben beschrieben, in Abhängigkeit von der Menge des ja naturgemäß nur begrenzt zur Verfügung stehenden Organmaterials, jeweils mehrere Proben von Milz und Mesenteriallymphknoten desselben Tieres gleichzeitig in ZSF-Lösung verbracht und nach unterschiedlich langer Inkubationszeit weiter prozessiert. Die jeweilige Fixierungsdauer der Gewebeproben ist Tabelle 8.1.2 im Anhang zu entnehmen. Die Kennzeichnung von Paraffinblöcken mit unterschiedlich lange fixiertem Material der gleichen Tagebuchnummer erfolgte entsprechend der jeweiligen Fixierungsdauer durch den Zusatz FD und Angabe der Fixierungsdauer (z. B.: Tgb.-Nr. S161/10 (ZSF, FD 46 h). Wie unter 3.3.3.1 für die Herstellung der HOPE[®]-fixierten Proben angegeben, wurden von der außergewöhnlich frischen, viel Probenmaterial bietenden Tgb.-Nr. S606/10 auch von ZSF-fixiertem Material über eine weite Spanne unterschiedlicher Fixierungszeiträume Paraffinblöcke angelegt (siehe Abb. 3).

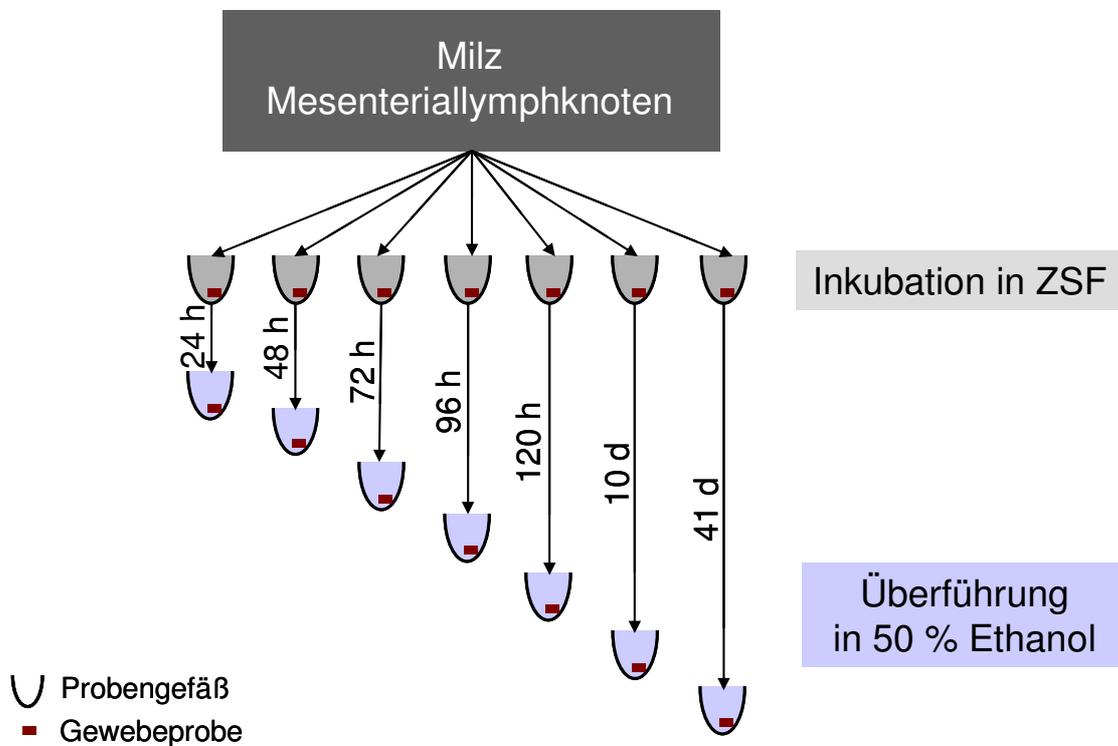


Abbildung 3: Herstellung von ZSF-fixiertem Material unterschiedlicher Fixierungsdauer von Tgb.-Nr. S606/10

3.3.4.2 Prozessierung

3.3.4.2.1 Modifizierung des von Beckstead (1994) publizierten Protokolls

Das von Beckstead (1994) angegebene Prozessierungsprotokoll unterschied sich hinsichtlich Prozessierungstemperatur und -dauer von dem institutsinternen Protokollablauf, nach dem sämtliche routinediagnostischen Proben des Instituts im dementsprechend programmierten Gewebereinbettungsautomaten prozessiert werden (siehe Tabelle 8.1.3 im Anhang). Theoretisch wäre eine Prozessierung im Automaten nach Programmierung eines gesonderten Protokollablaufs gemäß der Methode von Beckstead (1994) in Erwägung zu ziehen gewesen. Diese Möglichkeit erwies sich jedoch aufgrund der langen Dauer des programmierten Routineprozessierungsprotokolls samt nachfolgendem Reinigungsgang und der Enge der zeitlichen Abläufe im Routinediagnostiklabor als nicht durchführbar. In Ermangelung eines zweiten Gewebereinbettungsautomaten wäre eine manuelle Prozessierung die einzige Alternative gewesen wäre. Um zu überprüfen, ob nicht eine Angleichung der Methode nach Beckstead (1994) an die bestehenden, institutsinternen Routinelaborabläufe möglich wäre, wurden ZSF-fixierte Proben zunächst versuchsweise dem Routineprozessierungsprotokoll im Gewebereinbettungsautomaten unterzogen. Da in Vorversuchen in diesen Proben trotz höherer Prozessierungstemperaturen und längerer Prozessierungsdauer der immunhistologische Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten gelang, wurden in der Folge auch die übrigen Proben nach der Fixierung in ZSF nach dem institutsinternen Protokoll im Gewebereinbettungsautomaten prozessiert (siehe unter 3.3.4.2.2).

Es sollte allerdings überprüft werden, ob sich bei Einhaltung des von Beckstead (1994) publizierten Prozessierungsprotokolls ein erkennbar besserer Antigenerhalt erzielen ließ als bei der modifizierten, den institutsinternen Gegebenheiten angepassten Prozessierung bei höheren Temperaturen und längerer Dauer im Gewebereinbettungsautomaten. Hierzu wurden Gewebeproben von einem sehr frischen Tierkörper (Tgb.-Nr. S359/07) nach der Fixierung in ZSF jeweils der automatisierten Prozessierung im Entwässerungsautomaten unterzogen (siehe unter 3.3.4.2.2) und gleichartige Proben parallel dazu von Hand entsprechend dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessiert (siehe unter 3.3.4.2.3). Dieser Vorgang der parallelen Prozessierung ist in Abbildung 4 unter 3.3.4.2.3 schematisch veranschaulicht. Eine Aufstellung der unterschiedlich prozessierten ZSF-fixierten Proben von Tgb.-Nr. S359/07 findet sich in Tabelle 8.1.2 im Anhang.

3.3.4.2.2 Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten nach modifiziertem Protokoll

Um eine Kontamination der ZSF-fixierten Proben mit möglicherweise im Gewebeeinbettungsautomaten in den ersten beiden Alkoholstufen noch in niedriger Konzentration vorhandenem Formalin zu vermeiden, wurden die Proben erst zur dritten Alkoholstufe (80 % Ethanol) in den Automaten nachgelegt. Der Entwässerungsvorgang in den ersten beiden Alkoholstufen wurde zeitgleich parallel zu den Abläufen im Automaten manuell ausgeführt.

Die Gewebeprobe wurden hierzu nach der Fixierung in eine Küvette mit 50 % Ethanol verbracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben in eine Küvette mit 70 % Ethanol umgesetzt und die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur darin belassen. Beide Entwässerungsschritte wurden auf einem Rüttler durchgeführt, um durch die Agitation eine höhere Diffusionsrate des Alkohols zu erzielen. Anschließend wurden die Proben zur dritten Entwässerungsstufe (80 % Ethanol) in den Gewebeeinbettungsautomaten (Tissue-Tek[®] VIP[™] 5 Jr., Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) nachgelegt und routinemäßig weiterprozessiert (siehe Abb. 4). Das Protokoll des automatisierten Prozessierungsvorgangs ist in Tabelle 8.1.3 im Anhang aufgeführt.

Nach Beendigung des automatisierten Prozessierungsvorgangs wurden die Proben an einer Ausgießstation (Tissue-Tek[®] TEC[™] 5, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) bei 65 °C in Paraffin (Roti[®]-Plast, Schmelzpunkt 56-58 °C, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in der üblichen Weise ausgegossen. Sofern von beiden Geweben ausreichend Material zur Verfügung stand, wurden von jedem Tier Milz und Mesenteriallymphknoten der gleichen Fixierungsdauer jeweils in ein gemeinsames Blöckchen verbracht.

Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.4.2.3 Manuelle Prozessierung nach dem Protokoll von Beckstead (1994)

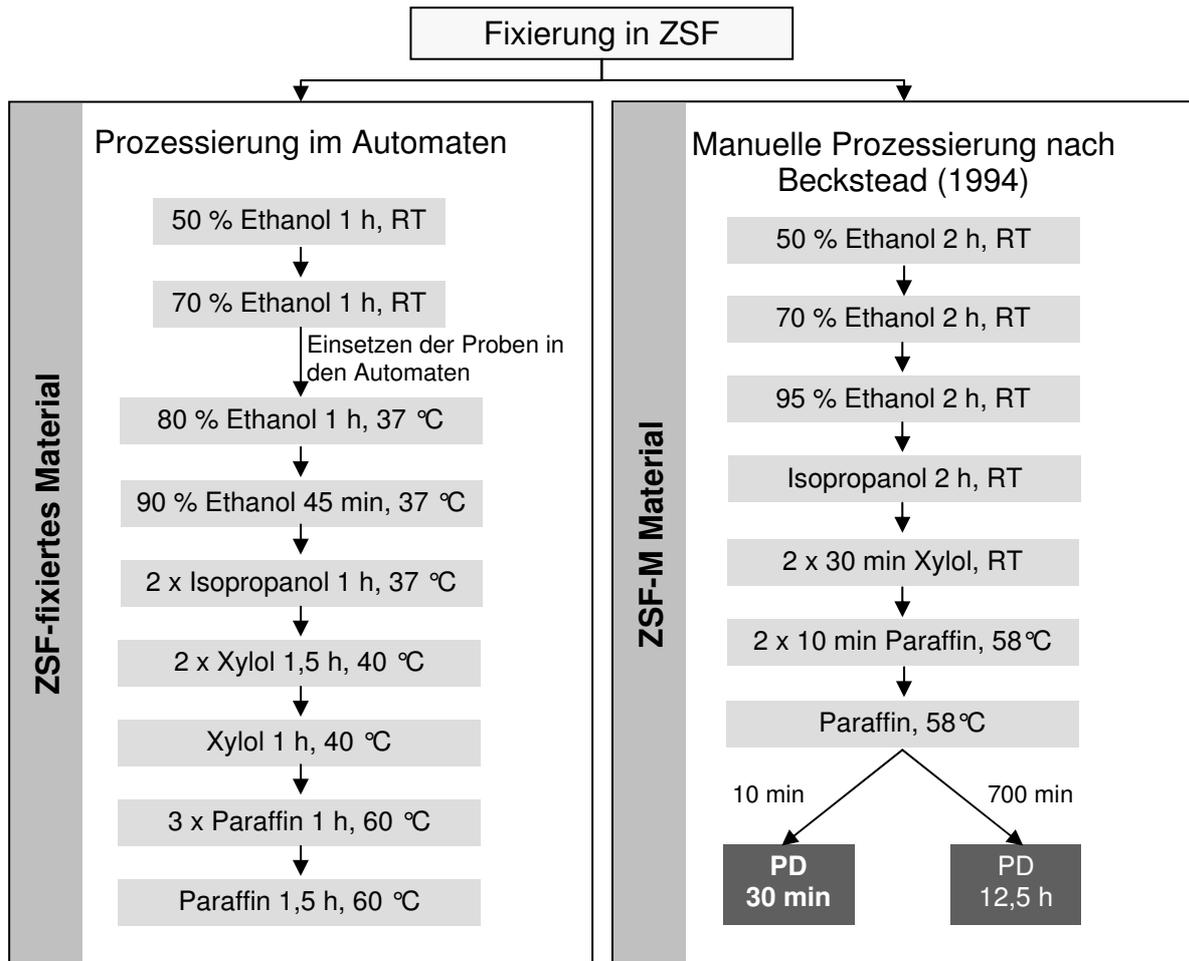
Die Proben, die nach der Fixierung in ZSF gemäß dem Protokoll von Beckstead (1994) manuell prozessiert wurden, werden nachfolgend mit „ZSF-M“ bezeichnet.

1. Die Proben wurden in einer Glasküvette mit 50 % Ethanol für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Die Proben wurden in eine Küvette mit 70 % Ethanol verbracht und für 2 h bei Raumtemperatur darin belassen.

3. Es folgte eine Inkubation in 95 % Ethanol für 2 h bei Raumtemperatur.
4. Die Proben wurden in eine Küvette mit 100 % Isopropanol gegeben und hierin für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Die Proben wurden in eine Küvette mit Xylol überführt, worin sie für 30 min bei Raumtemperatur verblieben.
6. Schritt 5 wurde wiederholt.
7. Die Proben wurden in ein Glasschälchen mit vorgewärmtem, flüssigem Paraffin (Schmelzpunkt: 50-52 °C, SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn) überführt und 10 min in einem Wärmeschrank bei 58 °C inkubiert.
8. Schritt 7 wurde wiederholt.
9. Schritt 7 wurde wiederholt.
10. Die Gewebeproben wurden im geöffneten Wärmeschrank mit frischem, vorgewärmtem Paraffin (Schmelzpunkt: 50-52 °C, SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn) in den üblichen Metallformen ausgegossen und anschließend wie gewohnt auf der Kühlplatte einer Paraffinausgießstation (Tissue-Tek® TEC™ 5, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) weiterbearbeitet.
11. Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Um zu überprüfen, ob eine verlängerte Inkubation in Paraffin über die empfohlenen 30 Minuten hinaus, wie von Beckstead (1994) beobachtet, zu einem wahrnehmbaren Antigenverlust führt, wurden einige Gewebeproben (aufgrund begrenzten Probenmaterials ausschließlich Mesenteriallymphknoten) länger als 30 Minuten im warmen Paraffin belassen und erst nach einer Gesamtinkubationsdauer von 12,5 h in der unter Schritt 10 beschriebenen Weise ausgebettet. Entsprechend der jeweiligen Gesamtinkubationsdauer in Paraffin (Paraffinierungsdauer, PD) wurden die ZSF-M Blöcke der Tgb.-Nr. S359/07 mit der Bezeichnung PD 30 min bzw. PD 12,5 h belegt.

Die Abläufe der manuellen Prozessierung sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.



PD: Paraffinierungsdauer (Gesamtinkubationsdauer der ZSF-M Proben von Tgb.-Nr. S359/07 in Paraffin); RT: Raumtemperatur

Abbildung 4: Schema der parallelen Prozessierung der in ZSF fixierten Gewebeproben von Tgb.-Nr. S359/07 nach der modifizierten Methode im Gewebeeinbettungsautomaten (ZSF-fixiertes Material; linke Spalte) und manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) (ZSF-M Material; rechte Spalte). Zudem Darstellung der Gewinnung von ZSF-M Material unterschiedlicher Paraffinierungsdauer (von Beckstead (1994) empfohlene Paraffinierungsdauer von 30 Minuten durch Fettdruck hervorgehoben)

3.4 Immunhistologische Untersuchung

3.4.1 Aufbereitung der Gewebelöcke für die immunhistologische Untersuchung

3.4.1.1 Gefrierlöcke

Die Anfertigung der Gefrierschnitte erfolgte immer am Morgen des Tages, an dem die immunhistologische Untersuchung durchgeführt wurde.

1. Die Gefrierlöcke wurden zur Temperaturangleichung bereits 1 Stunde vor Beginn des Schneideprozesses bei einer Kammertemperatur von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ein Kryomikrotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung, Nußloch) gelegt.
2. Danach wurden die Gefrierlöcke auf dem Probenblock angefroren.
3. Bei einer Blocktemperatur von -8 bis $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden möglichst dünne Schnitte erzeugt und unverzüglich auf Objektträger (SuperFrost[®]Plus-Objektträger, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig; nach Lieferantenwechsel: SuperFrost[®]Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen) aufgeschmolzen. Milz und Mesenteriallymphknoten eines Tieres wurden hierbei jeweils auf denselben Objektträger aufgebracht.
4. Die Objektträger wurden bis zur Beendigung des gesamten Schneideprozesses bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Für den zuletzt angefertigten Schnitt wurde eine Trocknungszeit von mindestens 10 min eingehalten.
5. Es folgte eine Fixierung der Schnitte in Aceton für 10 min bei Raumtemperatur.
6. Anschließend wurden die Schnitte bis zum Beginn der immunhistologischen Untersuchung 1 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

3.4.1.2 Paraffinlöcke mit formalinfixiertem Material

Die Paraffinschnitte von formalinfixiertem Material wurden immer am Vortag der immunhistologischen Untersuchung angefertigt.

1. Die Paraffinlöcke wurden zur besseren Schneidbarkeit bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min in einem Eisschrank auf einer mit Eis gefüllten Schale vorgekühlt.
2. An einem Rotationsmikrotom (je nach Verfügbarkeit Rotationsmikrotom RM 2255, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch oder Rotationsmikrotom HM 335E, Microm International GmbH, Walldorf) wurden möglichst dünne Paraffinschnitte angefertigt. (Welches Rotationsmikrotom verwendet wurde, richtete sich jeweils nach der Bele-

gung der Geräte durch die Routinediagnostik. Alle Schnitte eines immunhistologischen Inkubationsansatzes wurden jeweils am gleichen Gerät angefertigt.)

3. Die Paraffinschnitte wurden anschließend auf der Oberfläche einer mit Leitungswasser gefüllten Glasschale bei Raumtemperatur gesammelt. Eventuell vorhandene Falten wurden mit Hilfe eines Pinsels vorsichtig geglättet.
4. Die Paraffinschnitte wurden jeweils mit einem Objektträger (SuperFrost®Plus-Objektträger, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig; nach Lieferantenwechsel: SuperFrost®Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen) aufgenommen, in einem beheizten Streckbad bestehend aus 42-45 °C warmem Leitungswasser kurz gestreckt und auf den Objektträger aufgezogen.
5. Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

3.4.1.3 Paraffinblöcke mit HOPE®-fixiertem Material

Die Paraffinschnitte aus HOPE®-fixiertem Material wurden immer am Tag vor der immunhistologischen Untersuchung gemäß den Herstellervorgaben angefertigt.

1. - 2. Wie unter 3.4.1.2 beschrieben.
3. Die Paraffinschnitte wurden zunächst auf der Oberfläche einer mit destilliertem Wasser gefüllten Glasschale bei Raumtemperatur gesammelt. Eventuell vorhandene Falten wurden mit Hilfe eines Pinsels vorsichtig geglättet.
4. Die Paraffinschnitte wurden jeweils mit einem Objektträger (SuperFrost®Plus-Objektträger, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig; nach Lieferantenwechsel: SuperFrost®Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen) aufgenommen, in einem beheizten Streckbad bestehend aus 35-39 °C warmem destillierten Wasser kurz gestreckt und möglichst rasch auf den Objektträger aufgezogen. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Verweildauer auf der Oberfläche des warmen Wasserbades so kurz wie möglich gehalten wird, um ein Auseinanderstreben der Schnitte zu vermeiden.
5. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank getrocknet.

3.4.1.4 Paraffinblöcke mit ZSF-fixiertem Material

Die Paraffinschnitte von ZSF-fixiertem Material wurden immer am Vortag der immunhistologischen Untersuchung hergestellt.

3.4.1.4.1 Im Gewebereinbettungsautomaten prozessierte Proben

Die Herstellung der Paraffinschnitte entsprach den unter 3.4.1.2 beschriebenen Abläufen.

3.4.1.4.2 Manuell prozessierte Proben (ZSF-M)

Das Vorgehen zur Anfertigung der Paraffinschnitte unterschied sich lediglich im Bezug auf Schritt 4 von den unter 3.4.1.2 genannten Abläufen. Da die ZSF-M Blöcke von der Tgb.-Nr. S359/07 aus einem Paraffin mit niedrigerem Schmelzpunkt (Schmelzpunkt: 50-52 °C, SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn) hergestellt wurden, betrug die Wassertemperatur des beheizten Streckbades 35-39 °C.

3.4.2 Seren und Antiseren

3.4.2.1 Seren

Vollblut von gesunden Ratten wurde nach einer Standzeit von 2-4 h bei Raumtemperatur bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abgesaugt. Nach Portionierung wurde das Serum bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.2.2 Antiseren

3.4.2.2.1 Primärantikörper

Das verwendete Antiserum und seine Bezugsquelle sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Primärantikörper und Bezugsquelle, Nachweismethode

Antikörper/Klon	Bezugsquelle [Bestellnummer]	Methode	Blocken
Maus anti-Katze CD8 (α - und β -Kette des CD8) Klon vpg 9	Serotec, Kidlington, UK [MCA1347]	PAP	10 % Rattenserum

PAP: Peroxidase anti-Peroxidase

Um für das Gefriermaterial sowie die Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixierten Proben die jeweils optimale Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers zu ermitteln, wurden zunächst folgende, in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe angesetzten Antikörperkonzentrationen auf die Gefrierschnitte bzw. die HOPE[®]- und ZSF-fixierten Proben der relativ frischen Tgb.-Nr. S161/10 aufgetragen: 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000). Da bei dem formalinfixierten Material aller Voraussicht nach keine positive immunhistologische Reaktion zu erwarten war, wurden hier lediglich die niedrigen Verdünnungsstufen 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 und 1:500 eingesetzt. Aus den ermittelten optimalen Verdünnungsstufen (siehe unter 4.1.1), die im Folgenden für die Reihenuntersuchungen an den jeweils unterschiedlich fixierten Gewebeproben der übrigen Katzen eingesetzt wurden, ergaben sich die in Tabelle 4 dargestellten Gebrauchsverdünnungen des Primärantikörpers. Wie zu erwarten war, konnte bei dem formalinfixierten Material der Tgb.-Nr. S161/10 mit keiner der eingesetzten Primärantikörperkonzentrationen eine positive Reaktion erzielt werden. So wurde für die Reihenuntersuchungen an formalinfixiertem Material die auch bei HOPE[®]- und ZSF-fixierten Proben verwendete Verdünnungsstufe 1:50 ausgewählt, um zu überprüfen, ob sich hiermit mögli-

cherweise bei einer der anderen Tagebuchnummern ein positives Ergebnis in formalinfixiertem Gewebe erzielen ließ.

Die Herstellung sämtlicher Verdünnungsstufen erfolgte immer über die Anfertigung einer aufsteigenden Verdünnungsreihe, wobei als Verdünnungsmedium Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) eingesetzt wurde.

Tabelle 4: Verdünnung des Primärantikörpers in Abhängigkeit von der jeweiligen Fixierungsmethode

Fixierungsmethode	Verdünnung
GF	1: 50
	1:500
Formalin	1:50
HOPE [®]	1:50
ZSF	1:50

GF: Gefrierschnitttechnik

3.4.2.2.2 Sekundärantikörper

Der verwendete Sekundärantikörper und seine Bezugsquelle sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Sekundärantikörper, Bezugsquelle und Verdünnung

Antikörper	Bezugsquelle [Bestellnummer]	Verdünnung
Ratte anti-Maus IgG (H+L)	Dianova GmbH, Hamburg [415005166]	1:100 in TBS

Ig: Immunglobulin; TBS: Tris-buffered saline

3.4.2.2.3 Tertiärantikörper

Der verwendete Tertiärantikörper und seine Bezugsquelle sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Tertiärantikörper, Bezugsquelle und Verdünnung

Antikörper	Bezugsquelle [Bestellnummer]	Verdünnung
PAP von der Maus	Dianova GmbH, Hamburg [223005024]	1:500 in TBS

PAP: Peroxidase anti-Peroxidase; TBS: Tris-buffered saline

3.4.3 Immunhistologischer Nachweis von CD8

Der immunhistologische Nachweis von CD8 erfolgte mit dem kommerziell hergestellten, monoklonalen Antikörper gegen die α - und β -Kette des felines CD8-Moleküls (Shimojima et al., 1998b; Willett und Callanan, 1995). Es wurde die Peroxidase-anti-Peroxidase-(PAP)-Methode angewandt (Sternberger et al., 1970). Um eine angemessene Vergleichbarkeit des immunhistologischen Färbeergebnisses der Gefrierschnitte und des jeweils unterschiedlich fixierten, paraffineingebetteten Materials zu gewährleisten, wurden das Gefriermaterial sowie die Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixierten Proben der einzelnen Tagebuchnummern immer parallel zueinander im selben Inkubationsansatz immunhistologisch gefärbt.

3.4.3.1 Immunhistologischer Nachweis von CD8 in Gefriermaterial

1. Die Schnitte wurden 5 min bei Raumtemperatur in TBS (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) inkubiert.
2. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase in TBS mit 0,05 % frisch zugesetztem H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p. a., Merck KGaA, Darmstadt) bei Raumtemperatur für 10 min.
3. Die Schnitte wurden 5 min bei Raumtemperatur in TBS gewaschen.
4. Die Objektträger wurden auf mit TBS benetzte CoverplatesTM (Life Science International, Frankfurt am Main) aufgebracht und diese anschließend in die zugehörige Halterung eingesetzt.

5. Zum Blocken unspezifischer Bindungen folgte eine Inkubation mit 10 % Rattenserum in TBS für 10 min bei Raumtemperatur.
6. Der Primärantikörper Maus anti-Katze CD8 oder der Kontrollantikörper T1 wurden in den jeweiligen Verdünnungsstufen aufgetragen (siehe unter 3.4.2.2.1 bzw. 3.4.4), wobei die Verdünnung des Kontrollantikörpers der jeweils niedrigsten der verwendeten Verdünnungsstufen des Primärantikörpers entsprach. Als Verdünnungsmedium wurde jeweils TBS eingesetzt. Die Schnitte wurden anschließend für 12-18 h bei 4 °C inkubiert.
7. Die Schnitte wurden durch das Einbringen von 2 ml TBS in den Spalt zwischen CoverplateTM und Objektträger bei Raumtemperatur für 5 min gewaschen.
8. Schritt 7 wurde zweimal wiederholt.
9. Der Sekundärantikörper Ratte anti-Maus IgG (1:100 in TBS) wurde auf die Schnitte aufgetragen und diese wurden anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
10. Die Schnitte wurden wie unter Schritt 7 beschrieben dreimal mit TBS gewaschen.
11. Der Maus-PAP-Komplex (1:500 in TBS) wurde aufgetragen und die Schnitte wurden anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
12. Die Schnitte wurden wie unter Schritt 7 beschrieben zweimal mit TBS gewaschen.
13. Die CoverplatesTM wurden aus der Halterung genommen, die Objektträger anschließend abgelöst, in eine Küvette mit frischem TBS überführt und dort für 5 min bei Raumtemperatur belassen.
14. Es folgte eine Inkubation in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit frisch zugesetztem 0,01 % H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p. a., Merck KGaA, Darmstadt) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; siehe unter 8.2.1 im Anhang) unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührers für 10 min bei Raumtemperatur.
15. Die Schnitte wurden 5 min bei Raumtemperatur dreimal in TBS gewaschen.
16. Die Schnitte wurden in eine Küvette mit Aqua dest. verbracht und dort für 5 min bei Raumtemperatur belassen.
17. Es folgte eine Gegenfärbung mit Papanicolaous Hämatoxylin (1:10 in Aqua dest., Papanicolaous Lösung 1b Hämatoxylinlösung S, Merck KGaA, Darmstadt) für ca. 20 s bei Raumtemperatur.
18. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min bei Raumtemperatur in lauwarmem Leitungswasser gebläut.

19. Die Schnitte wurden in eine Küvette mit Aqua dest. verbracht und dort für 5 min bei Raumtemperatur belassen.
20. Die Schnitte wurden in der aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 50 % Ethanol, 1 x 70 % Ethanol, 1 x 80 % Ethanol, 1 x 96 % Ethanol, 2 x Isopropanol) für jeweils 3 min bei Raumtemperatur entwässert und 3 x 3 min bei Raumtemperatur in Xylol-Ersatz (Roti[®]-Histol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) geklärt.
21. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol verbracht und in einem Eindeckautomaten (Tissue-Tek[®], Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) mit Folie (Tissue-Tek[®] SCA[™] Eindeckfilm, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) überzogen.

3.4.3.2 Immunhistologischer Nachweis von CD8 in formalinfixiertem Material

1. Die Schnitte wurden 3 x 3 min bei Raumtemperatur in Xylol-Ersatz (Roti[®]-Histol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) entparaffiniert.
2. Es folgte eine Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (2 x Isopropanol, 1 x 96 % Ethanol, 1 x 80 % Ethanol) für jeweils 3 min bei Raumtemperatur.
3. Die Schnitte wurden 5 min bei Raumtemperatur in TBS (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) inkubiert.
4. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase in TBS mit 0,5 % frisch zugesetztem H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p. a., Merck KGaA, Darmstadt) bei Raumtemperatur für 10 min.
5. - 18. Es wurde verfahren wie unter 3.4.3.1 unter den Schritten 3 - 16 beschrieben.
19. Zur Entfernung des Formalinpigments wurden die Schnitte 5 min bei Raumtemperatur in Kardasewitsch (siehe unter 8.2.1 im Anhang) inkubiert.
20. Die Schnitte wurden durch Schwenken in einem mit Aqua dest. gefüllten Plastikbecher gründlich gewaschen und anschließend in eine Küvette mit Aqua dest. verbracht und dort für 5 min bei Raumtemperatur belassen.
21. - 25. Es wurde verfahren wie unter 3.4.3.1 unter den Schritten 17 - 21 beschrieben.

3.4.3.3 Immunhistologischer Nachweis von CD8 in HOPE[®]-fixiertem Material

1. Die Schnitte wurden in einer Küvette mit vorgewärmtem Isopropanol bei 60 °C im Wärmeschrank für 10 min inkubiert.
2. Die Schnitte wurden in frischem, 60 °C warmem Isopropanol gewaschen.
3. Es folgte ein kurzer Abtropfvorgang bei Raumtemperatur.

4. Die Schnitte wurden in vorgekühltes 70 % Aceton verbracht und bei 2-8 °C für 10 min inkubiert.
5. Schritt 4 wurde wiederholt.
6. Schritt 3 wurde wiederholt.
7. Die Schnitte wurden zweimal kurz in Aqua dest. bei Raumtemperatur gewaschen.
8. Die Schnitte wurden in eine Küvette mit Aqua dest. überführt und darin 5 min belassen.
9. Die Schnitte wurden in TBS (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) verbracht und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
10. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase in TBS mit 0,5 % frisch zugesetztem H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p. a., Merck KGaA, Darmstadt) bei Raumtemperatur für 10 min.
11. - 29. Es wurde weiter verfahren wie unter 3.4.3.1 unter den Schritten 3 - 21 beschrieben.

Anmerkung zu den Schritten 1-8

In den Herstellerangaben wird explizit darauf hingewiesen, dass eine herkömmliche Entparaffinierung mit Xylol und eine Rehydrierung über die Ethanolreihe zu einem verminderten Antigenerhalt in HOPE[®]-fixiertem Material führen kann. Deshalb wird bei der Verwendung des HOPE[®]-fixierten Materials für immunhistologische Untersuchungen ausdrücklich die in diesem Abschnitt unter den Schritten 1-8 beschriebene Entparaffinierung und Rehydrierung mit Isopropanol und 70 % Aceton empfohlen. Anhand Tgb.-Nr. S359/07 sollte überprüft werden, ob die Verwendung der herkömmlichen Entparaffinierungs- und Rehydrierungsweise wirklich einen wahrnehmbaren Verlust des Antigenerhalts zur Folge hätte. Hierzu wurden a) Paraffinschnitte von Tgb.-Nr. S359/07 (HOPE[®]) wie unter 1-8 beschrieben entsprechend den Herstellerangaben inkubiert und b) Folgeschnitte desselben Paraffinblocks parallel dazu wie in den Schritten 1 und 2 unter 3.4.3.2 beschrieben der herkömmlichen Entparaffinierung und Rehydrierung mit Xylolersatz und Ethanol unterworfen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass im Labor des Instituts aus Aspekten der Gesundheitsgefährdung heraus bei allen manuell ausgeführten Schritten grundsätzlich wann immer möglich statt Xylol Xylolersatz (Roti[®]-Histol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) verwendet wird, was auch auf den Entparaffinierungsvorgang zutrifft. Anschließend erfolgte eine parallele immunhistologische Inkubation der Proben in einem Ansatz gemäß den Schritten 9-29 in diesem Abschnitt.

3.4.3.4 Immunhistologischer Nachweis von CD8 in ZSF-fixiertem Material

1. Die Schnitte wurden 3 x 3 min bei Raumtemperatur in Xylol-Ersatz (Roti[®]-Histol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) entparaffiniert.
2. Es folgte eine Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (2 x Isopropanol, 1 x 96 % Ethanol, 1 x 80 % Ethanol) für jeweils 3 min bei Raumtemperatur.
3. Die Schnitte wurden 5 min bei Raumtemperatur in TBS (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) inkubiert.
4. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase in TBS mit 0,5 % frisch zugesetztem H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p. a., Merck KGaA, Darmstadt) bei Raumtemperatur für 10 min.
5. - 23. Es wurde verfahren wie unter 3.4.3.1 unter den Schritten 3 - 21 beschrieben.

3.4.4 Immunhistologische Kontrollen

Im Hinblick auf den Nachweis von CD8 in Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixiertem Material dienten die parallel inkubierten Gefrierschnitte des jeweiligen Tieres als immunhistologische Positivkontrollen (Gefrierschnittkontrolle).

Als immunhistologische Negativkontrollen wurden Folgeschnitte des Gefriermaterials sowie der Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixierten Paraffinblöcke verwendet, die jeweils parallel mit einem nicht reagierenden Antikörper inkubiert wurden (T1, gegen ein Oberflächenantigen von Thymus-Lymphozyten von Hühnern gerichtet (Hirschberger, 1987)). In Abhängigkeit von der jeweiligen Fixierungsmethode entsprach die eingesetzte Verdünnungsstufe des Kontrollantikörpers T1 bei jeder Inkubation der jeweils niedrigsten der bei dieser Probenart verwendeten Verdünnungsstufen des Primärantikörpers (siehe unter 3.4.2.2.1).

3.4.5 Auswertung

3.4.5.1 Immunhistologischer Nachweis von CD8

Beim Nachweis von CD8 war die positive Reaktion an einer zellassozierten, diffusen, mäßig starken bis starken, mittelbraunen, zytoplasmatischen, im Bereich der Zellmembran deutlich intensiver ausgeprägten Anfärbung von Lymphozyten zu erkennen, die bei einer Inkubation mit dem Kontrollantikörper T1 nicht zu beobachten war.

Zur Beurteilung wurden jeweils nur wellen-, riss- und faltenfreie Areale eines Schnittes herangezogen, sodass ein zufrieden stellender morphologischer Strukturerehalt gewährleistet war.

3.4.5.2 Beurteilungsverfahren

3.4.5.2.1 Ermittlung der optimalen Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers in Abhängigkeit von der jeweiligen Fixierungstechnik

Als optimale Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers wurde aus der hergestellten Verdünnungsreihe (siehe unter 3.4.2.2.1) für die unterschiedlich fixierten Gewebeproben von Tgb.-Nr. S161/10 jeweils diejenige definiert, die bei maximalem Signal-Rausch-Verhältnis die höchstmögliche Verdünnung des Primärantikörpers erlaubte, ohne dass im Vergleich zur nächstniedrigeren Verdünnungsstufe ein Verlust der Färbeintensität (Intensität des braunen Farbniederschlags und Anzahl der eindeutig markierten Zellen) auftrat. Hierzu wurden die verschiedenen Verdünnungsstufen der jeweiligen Fixierungsmethode miteinander verglichen, entsprechend den Kriterien des in Tabelle 7 dargestellten Beurteilungsschemas in Bezug zu einander gesetzt und absteigend sortiert.

Tabelle 7: Kriterien zur Beurteilung der Färbeintensität bei Ermittlung der Gebrauchsverdünnung

Symbol	Bedeutung
=	Kein Unterschied hinsichtlich der Intensität des Signals und der Anzahl der eindeutig markierten Zellen im Vergleich zur vorhergehenden Probe
(>)	Geringgradige Abnahme der Intensität des Signals, kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl der eindeutig markierten Zellen im Vergleich zur vorhergehenden Probe
>	Geringgradige Abnahme der Intensität des Signals und der Anzahl der eindeutig markierten Zellen im Vergleich zur vorhergehenden Probe
>>	Deutliche Abnahme Intensität des Signals und der Anzahl der eindeutig markierten Zellen im Vergleich zur vorhergehenden Probe
-	Keine eindeutig markierten Zellen erkennbar

3.4.5.2.2 Vergleich von Formalin-, HOPE[®] - und ZSF-fixiertem Gewebe mit Gefriermaterial hinsichtlich der immunhistologischen Darstellung von CD8

Die Färbeintensität des paraffineingebetteten Formalin-, HOPE[®] - und ZSF-fixierten Materials wurde jeweils mit der des parallel immunhistologisch inkubierten Gefriermaterials verglichen, wobei dieses als Standard diente und Milz sowie Mesenteriallymphknoten im Falle einer eindeutigen Markierung von CD8⁺ T-Lymphozyten stets die Färbeintensität „+++“ zugewiesen wurde. Gefrierschnitte, in denen keine eindeutig markierten Zellen nachgewiesen werden konnten, wurden mit „-“ belegt. Mit „+++“ wurden Formalin-, HOPE[®] - und ZSF-fixierte Proben bewertet, wenn sie eine dem zugehörigen Gefrierschnitt vergleichbare Färbeintensität aufwiesen. Mit „(+++)“ wurden die Schnitte beurteilt, die im Vergleich zum Gefriermaterial lediglich eine etwas geringere Intensität des Signals aber keine verminderte Anzahl eindeutig markierter Zellen aufwiesen. „++“ bedeutete einen geringgradigen Verlust der Intensität des Signals und eine geringgradige Abnahme der Zahl eindeutig markierter Zellen. Mit „+“ wurden Schnitte belegt, die eine deutlich schwächere Intensität des Signals und eine deutliche geringere Anzahl eindeutig markierter Zellen zeigten. Wurden im gesamten Schnitt keine eindeutig markierten Zellen gefunden, so wurde dieser mit „-“ bewertet. Die Einteilungskriterien und die verwendeten Symbole sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Um eine angemessene Vergleichbarkeit zwischen Paraffin- und Gefriermaterial zu gewährleisten, wurden die als Standard dienenden Gefrierschnitte mit der gleichen Verdünnungsstufe des Primärantikörpers (1:50) inkubiert wie die Formalin-, HOPE[®] - und ZSF-fixiertem Gewebe, auch wenn dies insbesondere im Milzgewebe zu einer hohen Hintergrundfärbung in den Gefrierschnitten führte (siehe unter 4.1.1.1). Allerdings wurde bei jeder Tagebuchnummer zusätzlich auch ein Gefrierschnitt mit der zuvor als optimal ermittelten Verdünnungsstufe 1:500 inkubiert (siehe unter 4.1.1.1), um zu überprüfen, ob an Gefriermaterial der Einsatz einer im Vergleich zum paraffineingebetteten Gewebe zehnfach höheren Verdünnung durchgehend möglich gewesen wäre.

Tabelle 8: Beurteilung der Färbeintensität des Formalin-, HOPE[®] -und ZSF-fixierten Gewebes im Vergleich zu dem jeweils parallel inkubierten Gefrierschnitt (Gefrierschnittkontrolle)

Symbol	Bedeutung
+++	Kein Unterschied hinsichtlich der Intensität des Signals und der Anzahl der eindeutig markierten Zellen im Vergleich zur Gefrierschnittkontrolle
(+++)	Geringgradige Abnahme der Intensität des Signals, kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl der eindeutig markierten Zellen im Vergleich zur Gefrierschnittkontrolle
++	Geringgradige Abnahme der Intensität des Signals und der Anzahl der eindeutig markierten Zellen im Vergleich zur Gefrierschnittkontrolle
+	Deutliche Abnahme der Intensität des Signals und der Anzahl der eindeutig markierten Zellen im Vergleich zur Gefrierschnittkontrolle
-	Keine eindeutig markierten Zellen erkennbar

3.4.5.2.3 Einfluss der Fixierungsdauer auf den Antigenerhalt in HOPE[®] - und ZSF-fixiertem Material

Um den Einfluss der Fixierungsdauer auf den Antigenerhalt zu untersuchen, wurden die unterschiedlich lange im jeweiligen Fixans belassenen HOPE[®] - und ZSF-fixierten Proben der Tgb.-Nr. S606/10 (siehe Tabelle 8.1.2 im Anhang) parallel immunhistologisch gefärbt, anschließend jeweils hinsichtlich der Färbeintensität miteinander verglichen und absteigend sortiert. Dies erfolgte nach dem in Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1 dargestellten Beurteilungsschema. Zusätzlich wurden die Proben hinsichtlich der Färbeintensität mit der zugehörigen Gefrierschnittkontrolle verglichen und gemäß den in Tabelle 8 unter 3.4.5.2.2 genannten Kriterien beurteilt. Um einen eventuell vorhandenen Unterschied im Antigenerhalt anhand der Färbeintensität stärker hervortreten zu lassen, wurde bei diesem Versuchsansatz, anders als unter 3.4.2.2.1 beschrieben, nicht die für HOPE[®]- und ZSF-Material als optimal ermittelte Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers von 1:50 eingesetzt, sondern die nächsthöhere Verdünnungsstufe 1:100.

3.4.5.2.4 Einfluss der Modifizierung des Prozessierungsprotokolls auf den Antigenerhalt bei der ZSF-Fixierung

3.4.5.2.4.1 Vergleich von nach modifiziertem Protokoll im Gewebereinbettungsautomaten prozessiertem, ZSF-fixiertem Material mit manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessiertem ZSF-M Material

Es sollte beurteilt werden, ob sich die aus den unter 3.3.4.2 genannten Gründen durchgeführte Modifizierung des von Beckstead (1994) vorgegebenen Prozessierungsprotokolls bei der ZSF-Fixierung auf den immunhistologischen Nachweis von CD8 auswirkt. Hierzu wurden die nach dem Routineprotokoll im Gewebereinbettungsautomaten prozessierten ZSF-fixierten Proben (Tgb.-Nr. S359/07 (ZSF)) mit den manuell nach den Vorgaben von Beckstead (1994) prozessierten ZSF-M Proben (Tgb.-Nr. S359/07 (ZSF-M, PD 30 min)) nach paralleler immunhistologischer Inkubation jeweils hinsichtlich des Färbeergebnisses miteinander verglichen. Aus den unter 3.4.5.2.3 genannten Gründen wurde bei diesem Versuchsansatz der Primärantikörper in der Verdünnung 1:100 verwendet.

3.4.5.2.4.2 Vergleich von manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessiertem ZSF-M Material unterschiedlicher Paraffinierungsdauer

Um zu überprüfen, ob eine verlängerte Paraffinierungsdauer einen Einfluss auf den immunhistologischen Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessiertem ZSF-M Material hat, wurden die unterschiedlich lange in Paraffin inkubierten ZSF-M Proben von Tgb.-Nr. S359/07 (siehe unter 3.3.4.2.3 sowie Tabelle 8.1.2 im Anhang) in einem Inkubationsansatz immunhistologisch gefärbt. Anschließend wurden sie bezüglich ihrer Färbeintensität miteinander verglichen und entsprechend den in Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1 genannten Kriterien beurteilt. Aus den unter 3.4.5.2.3 erläuterten Gründen wurde bei diesem Versuchsansatz der Primärantikörper in der Verdünnung 1:100 eingesetzt.

3.4.5.2.5 Einfluss der Entparaffinierung und Rehydrierung auf den Antigenerhalt in HOPE[®]-fixiertem Material

Es sollte überprüft werden, ob sich bei HOPE[®]-fixiertem Material eine herkömmliche Entparaffinierung und Rehydrierung mit Xylolersatz und Ethanol wie in den Herstellerangaben beschrieben nachteilig auf den Antigenerhalt auswirken würde (siehe unter 3.4.3.3). Hierzu wurden die jeweils unterschiedlich entparaffinierten und rehydrierten sowie anschließend parallel immunhistologisch gefärbten Schnitte von Tgb.-Nr. S359/07 (HOPE[®]) hinsichtlich der

Färbeintensität miteinander verglichen und gemäß dem in Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1 aufgeführten Beurteilungsschema bewertet. Der Primärantikörper wurde bei diesem Inkubationsansatz aus den unter 3.4.5.2.3 dargelegten Gründen in der Verdünnung 1:100 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistologie

4.1.1 Ermittlung der optimalen Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers in Abhängigkeit von der jeweiligen Fixierungstechnik

Anhand der in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe angesetzten Antikörperkonzentrationen ergaben sich für die verschiedenen Fixierungsmethoden nachstehende optimale Gebrauchsverdünnungen.

4.1.1.1 Gefriermaterial

Als optimale Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers für die Gefrierschnitte wurde anhand von Tgb.-Nr. S161/10 die Verdünnungsstufe 1:500 ermittelt. Zwar war bei den niedrigeren Verdünnungsstufen bei gleicher Anzahl eindeutig markierter Zellen eine geringfügig höhere Intensität des Signals zu beobachten, doch trat hier gleichzeitig insbesondere im Milzgewebe eine wesentlich höhere Hintergrundfärbung auf. So wurde im Hinblick auf ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis die Verdünnungsstufe 1:500 gewählt.

Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Ermittlung der optimalen Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers für Gefriermaterial anhand Tgb.-Nr. S161/10

Verdünnungsstufe	Bewertung der Färbeintensität	
	LK	Milz
1:25	=	=
1:50	(>)	(>)
1:100	=	=
1:250	(>)	(>)
1:500	>	>
1:1000	>>	>>
1:2000	-	-
1:4000	-	-

LK: Mesenteriallymphknoten; Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1

Die positive immunhistologische Reaktion stellte sich als starke mittel- bis dunkelbraune diffuse zytoplasmatische Anfärbung der Zellen dar, die im Bereich der Zellmembran deutlich intensiver ausgeprägt war (siehe Abb. 5).

Um Unterschiede zwischen den Ergebnissen hinsichtlich der Färbeintensität nicht zu verwischen, wurde bei allen nachfolgenden fotografischen Abbildungen auf eine digitale Bildbearbeitung der Gewebeareale durch elektronische Programme zur Verbesserung der optischen Struktur- und Reaktionsdarstellung verzichtet. Da dadurch beim Ausdruck der Abbildungen ihre Qualität nicht im üblichen Ausmaß zu erkennen ist, sind die Abbildungen bei den DIN A4-Exemplaren zusätzlich als Datei auf einem Datenträger beigelegt.

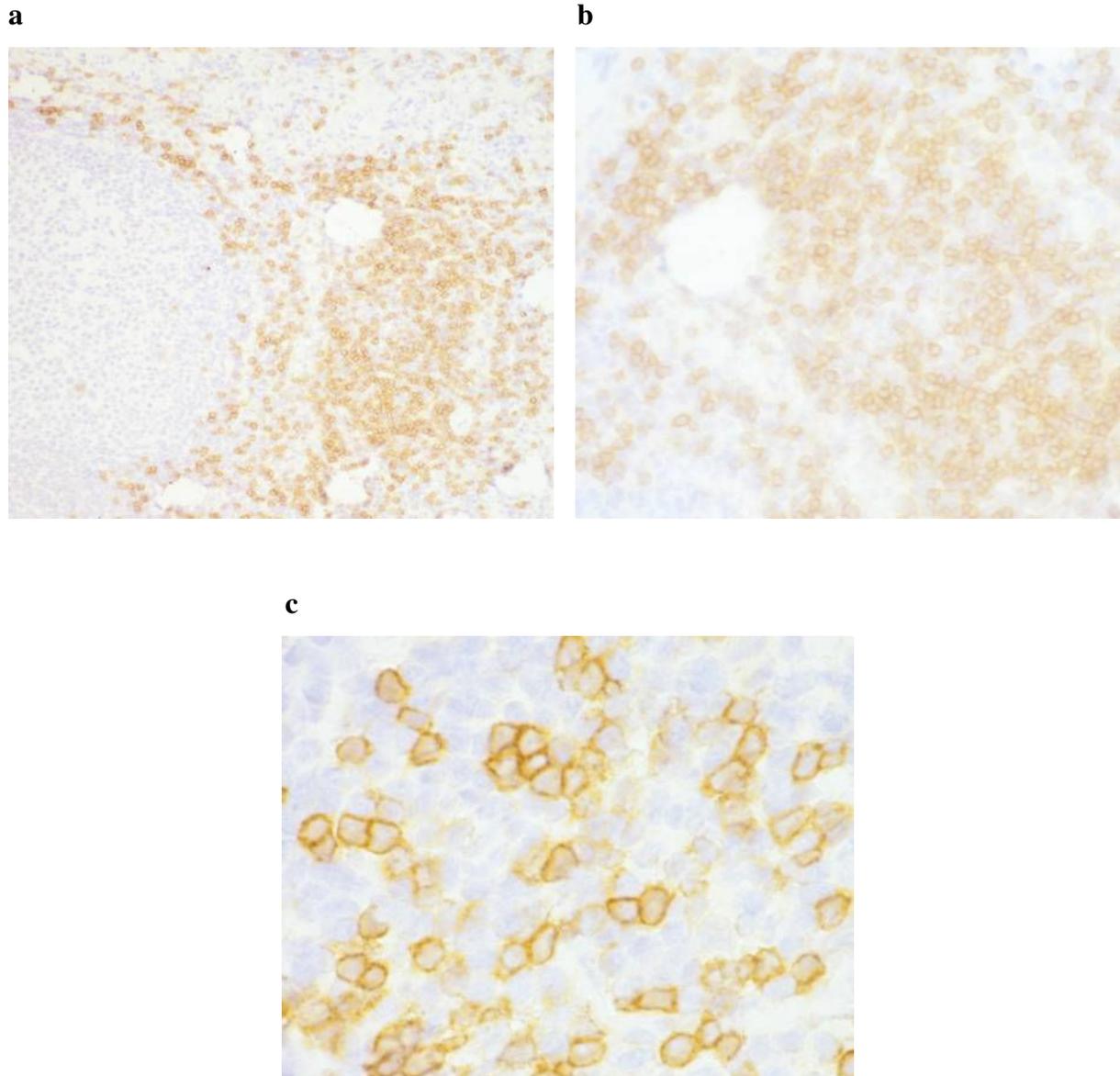


Abbildung 5: a, b und c: Immunhistologischer Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in Gefriermaterial unter Verwendung der optimalen Verdünnungsstufe 1:500. Diffuse zytoplasmatische Anfärbung mit deutlicher membranassoziierter Betonung. LK, Tgb.-Nr. S161/10 (GF); a: Obj. x 20, b: Obj. x 40, c: Obj. x 100. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.1.2 Formalinfixiertes Material

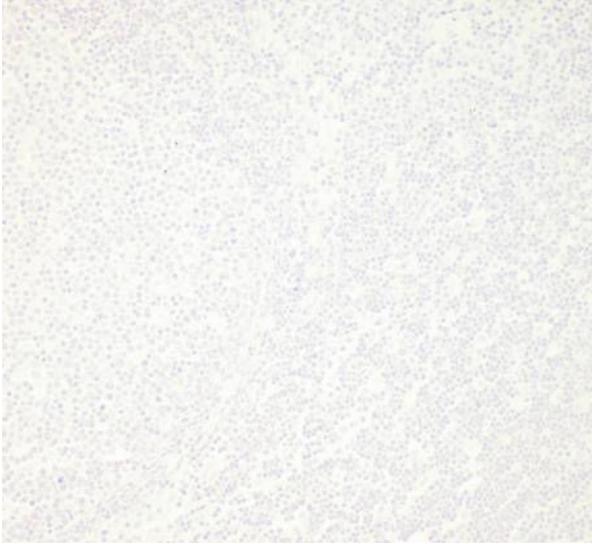
In formalinfixiertem Material von Tgb.-Nr. S161/10 konnte mit keiner der eingesetzten Verdünnungsstufen eine positive immunhistologische Reaktion erzielt werden (siehe Tabelle 10 und Abb. 6). Die parallel inkubierten Gefrierschnitte, die gleichzeitig auch als Positivkontrollen dienten, zeigten hingegen bei allen hier getesteten Verdünnungsstufen (siehe Tabelle 10) eine positive immunhistologische Reaktion (siehe Tabelle 9 unter 4.1.1.1). Um zu überprüfen, ob sich CD8 möglicherweise in formalinfixiertem Gewebe einer anderen Tagebuchnummern darstellen ließe, wurde für die folgenden Reihenuntersuchungen an formalinfixiertem Material die auch bei HOPE[®]- und ZSF-fixierten Proben verwendete Verdünnungsstufe 1:50 ausgewählt (siehe unter 4.1.2.2).

Tabelle 10: Ermittlung der optimalen Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers für formalinfixiertes Material anhand Tgb.-Nr. S161/10

Verdünnungsstufe	Bewertung der Färbeintensität	
	LK	Milz
1:25	-	-
1:50	-	-
1:100	-	-
1:250	-	-
1:500	-	-

LK: Mesenteriallymphknoten; -: keine eindeutig markierten Zellen erkennbar

a



b

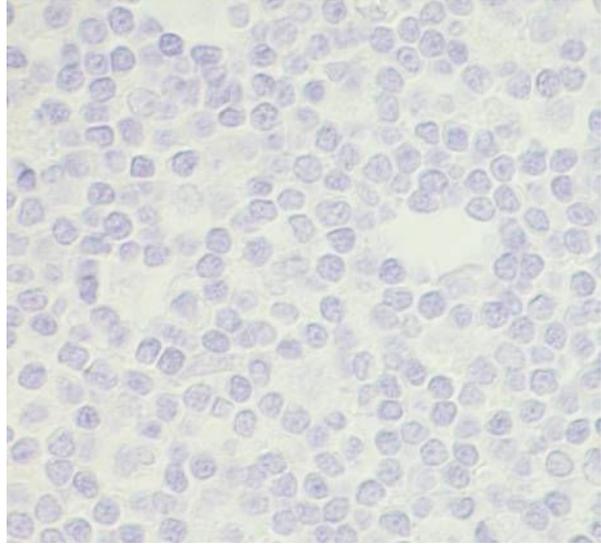


Abbildung 6: a und b: Ausbleibende immunhistologische Anfärbung von Zellen in formalinfixiertem Material (Verdünnungsstufe 1:50). LK, Tgb.-Nr. S161/10 (Formalin); a: Obj. x 10, b: Obj. x 100. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.1.3 HOPE[®]-fixiertes Material

Für HOPE[®]-fixiertes Material wurde anhand von Tgb.-Nr. S161/10 (HOPE[®], FD 40 h) als optimale Gebrauchsverdünnung die Verdünnungsstufe 1:50 festgelegt. Die ausführlichen Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Ermittlung der optimalen Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers für HOPE[®]-fixiertes Material anhand Tgb.-Nr. S161/10 (HOPE[®], FD 40 h)

Verdünnungsstufe	Bewertung der Färbeintensität	
	LK	Milz
1:25	=	=
1:50	(>)	>
1:100	>	>>
1:250	>	(>)
1:500	>>	>>
1:1000	-	-
1:2000	-	-
1:4000	-	-

LK: Mesenteriallymphknoten; Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1

Die immunhistologische Markierung der CD8⁺ T-Lymphozyten war an einer mäßigen bis mittelstarken, mittelbraunen, diffusen, zytoplasmatischen Anfärbung zu erkennen, welche im zellmembranassoziierten Randbereich der Zelle intensiver ausgeprägt war (siehe Abb. 7).

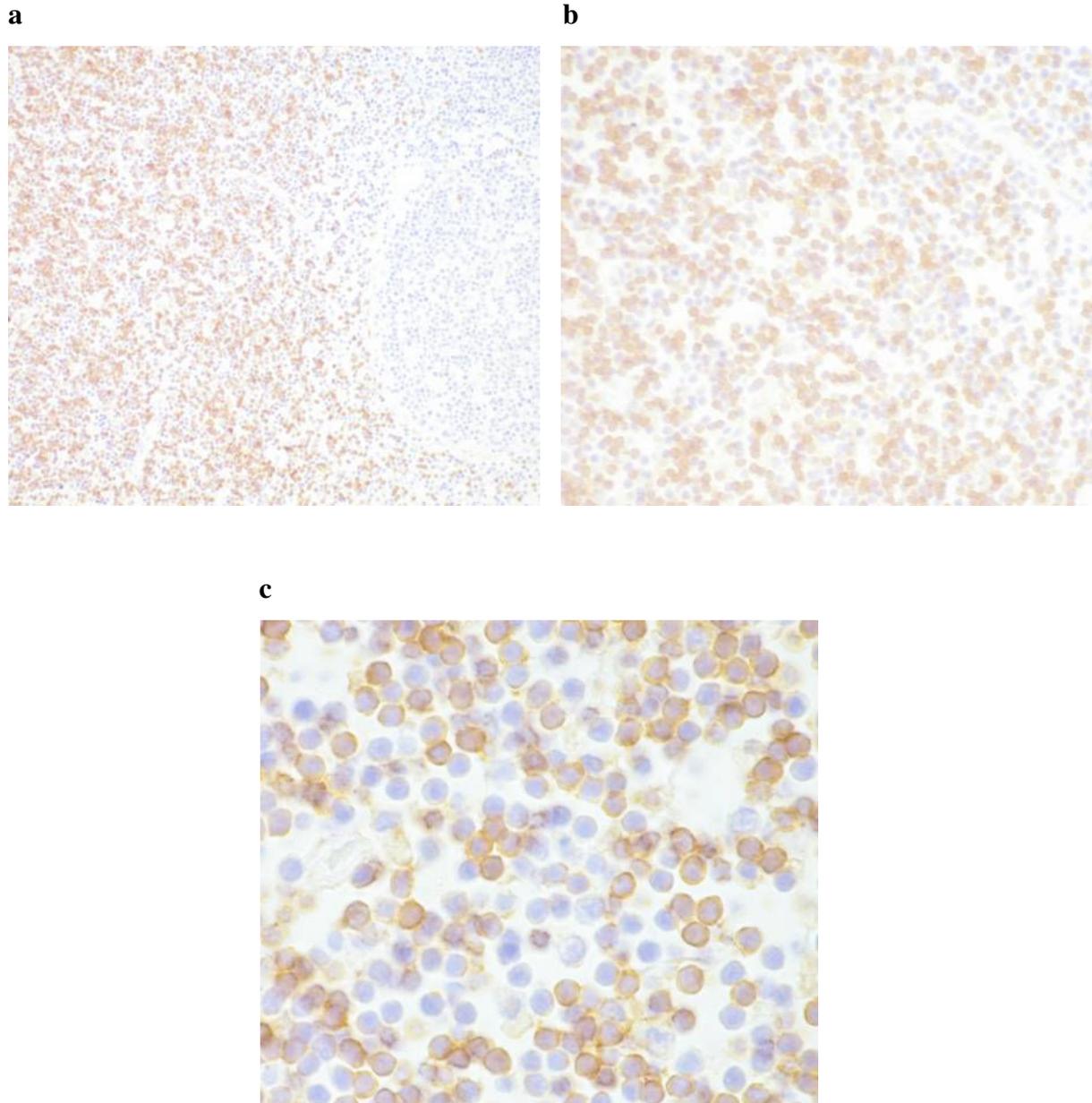


Abbildung 7: a, b und c: Immunhistologischer Nachweis von CD8⁺T-Lymphozyten in HOPE[®]-fixiertem Material unter Verwendung der optimalen Verdünnungsstufe 1:50. Diffuse zytoplasmatische Anfärbung mit membranassoziierter Akzentuierung. LK, Tgb.-Nr. S161/10 (HOPE[®], FD 40 h); a: Obj. x 20, b: Obj. x 40, c: Obj. x 100. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.1.4 ZSF-fixiertes Material

Anhand von Tgb.-Nr. S161/10 (ZSF, FD 46 h) wurde für ZSF-fixiertes Gewebe die Verdünnungsstufe 1:50 als optimale Gebrauchsverdünnung ermittelt. Es fiel auf, dass die Färbeintensität innerhalb des Schnittes nicht in allen Arealen von einheitlicher Stärke war. Allerdings war diesbezüglich zwischen den Verdünnungsstufen 1:25 und 1:50 kein Unterschied festzustellen, sodass die höhere Verdünnungsstufe gewählt wurde. Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

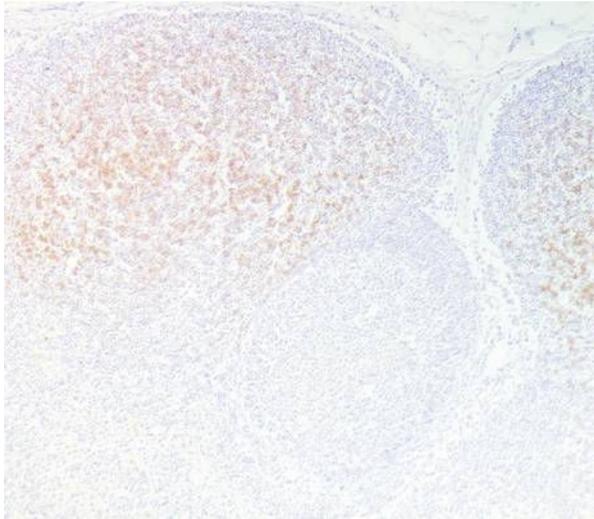
Tabelle 12: Ermittlung der optimalen Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers für ZSF-fixiertes Material anhand Tgb.-Nr. S161/10 (ZSF, FD 46 h)

Verdünnungsstufe	Bewertung der Färbeintensität	
	LK	Milz
1:25	=	=
1:50	>	>
1:100	>	>
1:250	>	=
1:500	>>	>>
1:1000	-	-
1:2000	-	-
1:4000	-	-

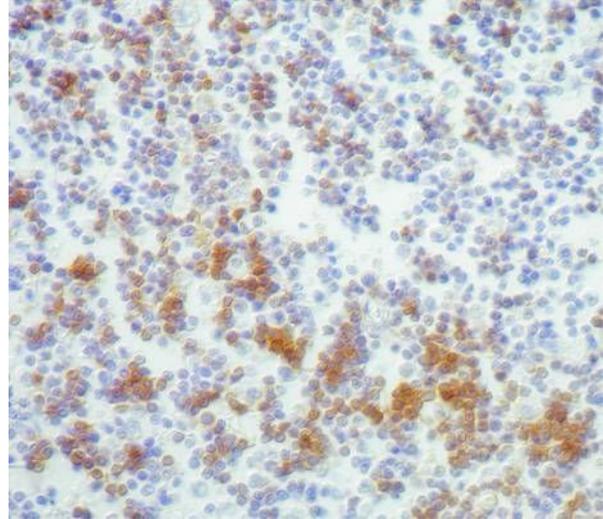
LK: Mesenteriallymphknoten; Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1

In ZSF-fixiertem Material stellte sich die immunhistologische Reaktion als mäßige bis mittelstarke, diffuse, hell- bis mittelbraune, zytoplasmatische Markierung dar, die in Nähe der Zellmembran deutlich intensiver ausfiel (siehe Abb. 8).

a



b



c

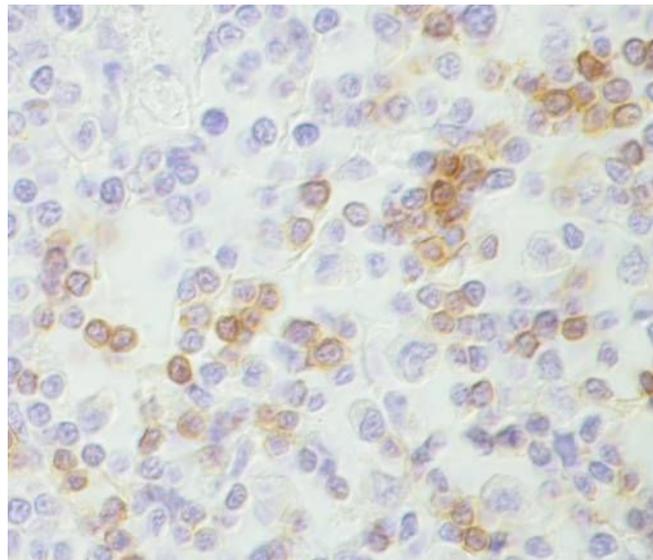


Abbildung 8: a, b und c: Immunhistologischer Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-fixiertem Material unter Verwendung der optimalen Verdünnungsstufe 1:50. Diffuse zytoplasmatische Anfärbung mit deutlicher Intensivierung in Nähe der Zellmembran. LK, Tgb.-Nr. S161/10 (ZSF, FD 46 h); a: Obj. x 10, b: Obj. x 40, c: Obj. x 100. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.2 Bewertung des immunhistologischen Nachweises von CD8⁺ T-Lymphozyten in Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixiertem Material im Vergleich zu Gefriermaterial

4.1.2.1 Gefriermaterial

Bei den Reihenuntersuchungen an Gefriermaterial gelang bei zehn von elf Tagebuchnummern in beiden untersuchten lymphatischen Organen die immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten. Lediglich in der Milz von Tgb.-Nr. S180/10, die infolge fortgeschrittener postmortaler Veränderungen einen vollständigen Verlust der morphologischen Strukturen über die gesamte Probe hinweg aufwies, konnte kein Nachweis von CD8 erzielt werden.

Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 8.1.4 im Anhang aufgeführt.

Sofern man von Arealen absah, an denen aufgrund technisch bedingter Riss- und Faltenbildung (siehe auch unter 4.2.1) oder morphologischen Strukturverlusts infolge fortgeschrittener postmortaler Veränderungen (Milz von Tgb.-Nr. S179/10) keine Auswertung möglich war, wiesen die als positiv beurteilten Gefrierschnitte durchgehend eine einheitliche Färbeintensität über den ganzen Schnitt hinweg auf (siehe Abb. 9).

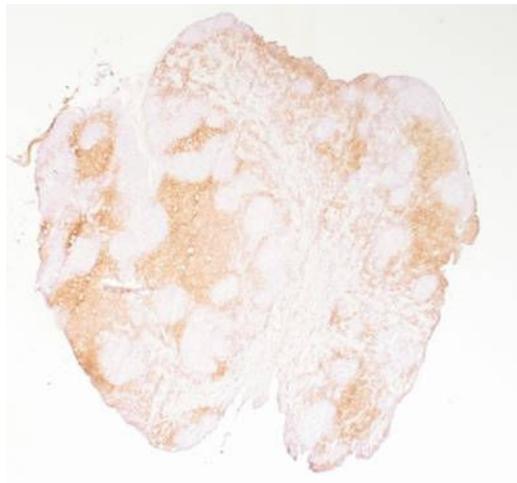


Abbildung 9: Gefrierschnitt. Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten. Färbeintensität über den ganzen Schnitt einheitlich stark. LK, Tgb.-Nr. S193/10 (GF); Obj. x 1,25. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

Die Gefrierschnitte dienten jeweils als Positivkontrolle sowie als Standard für den Vergleich mit dem parallel inkubierten paraffineingebetteten Material. Die Färbeintensität im Falle eines immunhistologischen Nachweises von CD8⁺ T-Lymphozyten wurde folglich immer mit

„+++“ bewertet (siehe unter 3.4.5.2.2). Diese Bewertung erfolgte auch für das Milzgewebe von Tgb.-Nr. S179/10, obwohl dies überwiegend einen hochgradigen Verlust der morphologischen Strukturen infolge postmortalen Veränderungen aufwies und lediglich in den verbliebenen kleinen Arealen mit erhaltener Gewebestruktur einzelne positive CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten.

Grundsätzlich war festzustellen, dass bei Proben, die histologisch Areale mit einem morphologischen Strukturverlust infolge postmortalen Veränderungen aufwiesen (Tgb.-Nr. S179/10 und Tgb.-Nr. S180/10), die immunhistologische Markierung anders als unter 4.1.1.1 beschrieben granulärer erschien und nicht mehr so präzise lokalisierbar war (siehe Abb. 10). In Verbindung mit einer gleichzeitig deutlich vermehrten Hintergrundfärbung erschwerte dies die Beurteilung der spezifischen Anfärbung von Zellen in diesen Schnitten, was letztlich zu einer niedrigeren Anzahl der als eindeutig positiv zu bewertenden Zellen führte. Aus oben genannten Gründen wurden diese Proben trotzdem mit der Färbeintensität „+++“ belegt, solange sich im Schnitt überhaupt eindeutig positiv zu beurteilende Zellen fanden.

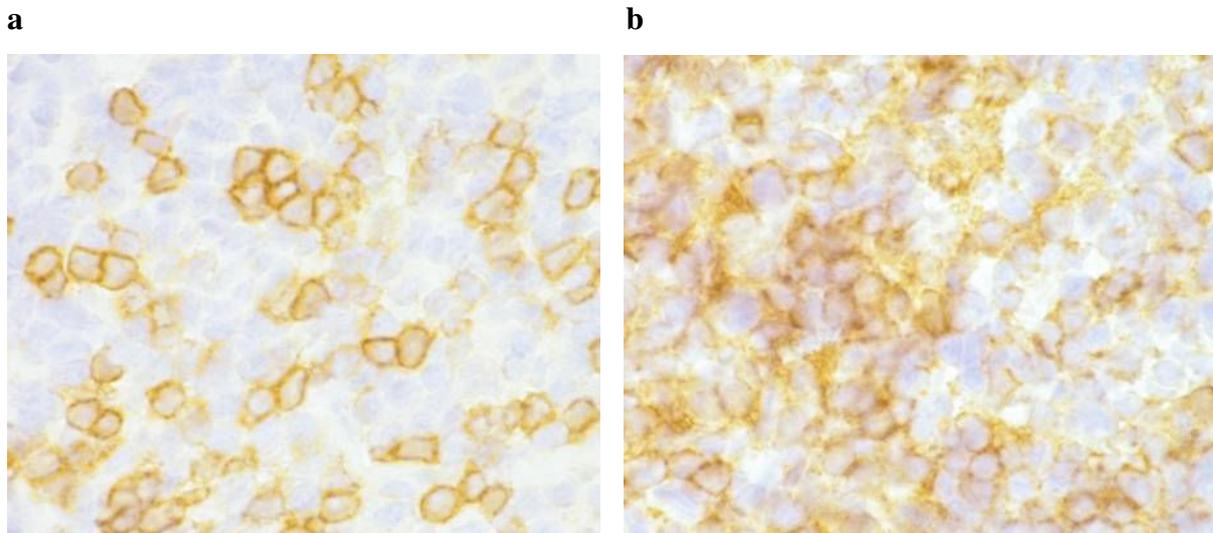


Abbildung 10: Gefriermaterial. **a:** Frisches Gewebe. Präzise lokalisierbare Markierung der CD8⁺ T-Lymphozyten. Tgb.-Nr. S161/10 (GF); **b:** Gewebe mit fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen. Signal wesentlich unschärfer begrenzt und schlechter lokalisierbar. Höhere Hintergrundfärbung. Beurteilung eindeutig positiver Zellen deutlich erschwert. Tgb.-Nr. S179/10 (GF). a und b: LK, Obj. x 100. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

Wie bereits unter 3.4.5.2.2 und 4.1.1.1 erläutert, war die Hintergrundfärbung in den mit der Verdünnungsstufe 1:50 inkubierten Gefrierschnitten, die jeweils als Positivkontrolle und Standard für das Paraffinmaterial dienten, insbesondere im Milzgewebe in einigen Proben hoch. Die jeweils parallel mitinkubierte, zuvor anhand von Tgb.-Nr. S161/10 als optimal ermittelte Verdünnungsstufe 1:500 wies bei jeder Tagebuchnummer bei deutlich geringerer Hintergrundfärbung eine vergleichbare Färbeintensität wie die zehnfach konzentriertere Verdünnungsstufe auf. In einigen Fällen war lediglich eine geringgradige Abnahme der Intensität des Signals zu verzeichnen, das aber immer noch sehr stark war. Eine Abnahme der Anzahl der eindeutig markierten Zellen konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte Folgendes festgestellt werden. Solange im Hinblick auf den Grad der durch Autolyse- und Fäulnisprozesse bedingten postmortalen Veränderungen noch ein morphologischer Strukturerehalt des Gewebes gegeben war, konnte in den Gefrierschnitten unabhängig von Erhaltungszustand, Lagerungsart und -dauer der Tierkörper stets eine immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgen. Es gelang der Nachweis auch an zuvor gefrorenen und über den Postweg eingesendeten Proben (z. B. Tgb.-Nr. S179/10 und S174/10). Anhand von den Proben der Tagebuchnummern S176/06 und S1525/06 zeigte sich, dass ein immunhistologischer Nachweis des Antigens auch nach einer Einlagerungsdauer der Gefrierblöcke von über 5 Jahren möglich war.

4.1.2.2 Formalinfixiertes Material

Bei keiner Tagebuchnummer gelang die immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in formalinfixiertem Material. Die jeweils parallel inkubierten Gefrierschnitte, die als Positivkontrollen dienten, zeigten hingegen bis auf eine Ausnahme in allen Fällen eine positive immunhistologische Reaktion. Lediglich in Milzgewebe von Tgb.-Nr. S180/10 konnte im Gefrierschnitt aufgrund des Verlusts der morphologischen Strukturdetails infolge hochgradiger fortgeschrittener postmortalen Veränderungen kein immunhistologisches Signal erzielt werden (siehe unter 4.1.2.1).

Eine detaillierte Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 8.1.5 im Anhang zusammengestellt.

4.1.2.3 HOPE[®]-fixiertes Material

Bei den Reihenuntersuchungen an HOPE[®]-fixiertem Material konnte abgesehen von einer Ausnahme bei allen Proben, die in den Gefrierschnittkontrollen eine positive Reaktion zeigten, auch eine immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten erzielt werden. Lediglich in Milzgewebe von Tgb.-Nr. S179/10, das aufgrund fortgeschrittener postmortaler Veränderungen überwiegend einen hochgradigen Verlust der morphologischen Strukturen aufwies, gelang in HOPE[®]-fixiertem Material kein Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten. Hierbei ist anzumerken, dass auch die zugehörige Gefrierschnittkontrolle infolge fortgeschrittener postmortaler Veränderungen überwiegend einen hochgradigen morphologischen Strukturverlust aufwies und nur in den verbliebenen kleinen Arealen mit erhaltener Gewebestruktur einzelne wenige CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten (siehe unter 4.1.2.1). In HOPE[®]-fixiertem Milzgewebe von Tgb.-Nr. S180/10 war ebenfalls keine immunhistologische Markierung von CD8⁺ T-Lymphozyten zu beobachten. Jedoch war in diesem Fall auch die Gefrierschnittkontrolle negativ, die gleichfalls über die gesamte Probe hinweg einen vollständigen Verlust der morphologischen Strukturen infolge fortgeschrittener postmortaler Veränderungen aufwies (siehe unter 4.1.2.1).

Die Färbeintensität der immunhistologischen Reaktion lag in dem HOPE[®]-fixierten Material durchgehend unter der des als Standard dienenden Gefriermaterials. Mit Ausnahme des Milzgewebes von Tgb.-Nr. S179/10 wiesen alle HOPE[®]-fixierten Proben eine geringfügig (mit „++“ bewertete Proben, siehe Abb. 11) oder deutlich (mit „+“ bewertete Proben, siehe Abb. 12) niedrigere Färbeintensität als die zugehörigen Gefrierschnittkontrollen auf. In keiner der HOPE[®]-fixierten Proben war eine identische oder höhere Färbeintensität als in der Gefrierschnittkontrolle zu beobachten.

Eine detaillierte Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 8.1.6 im Anhang zu finden.

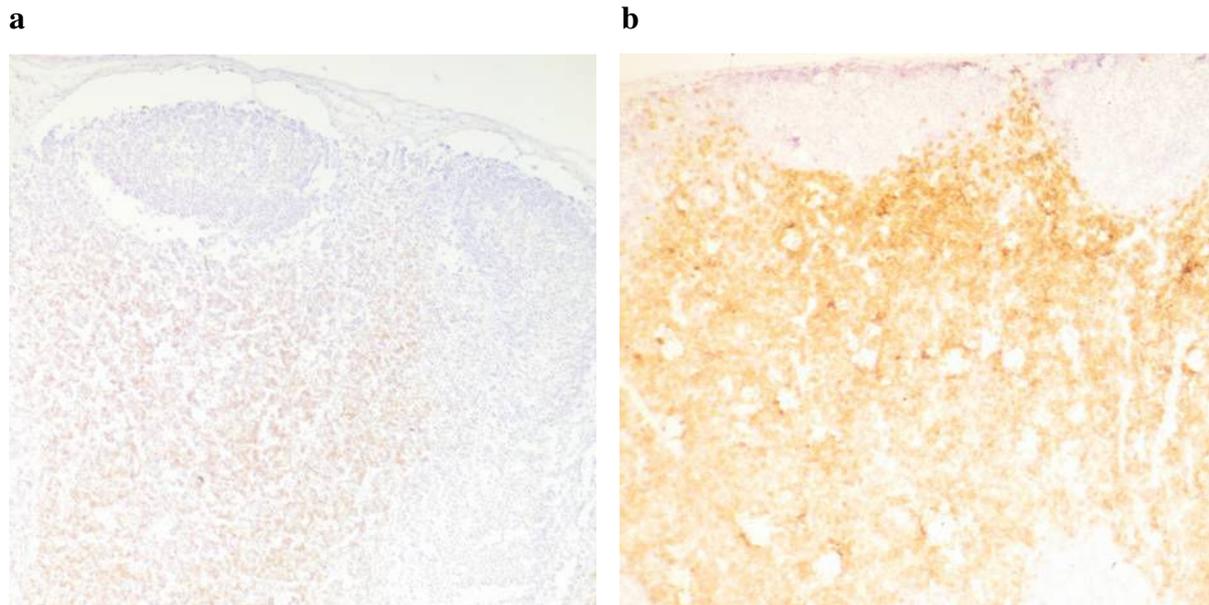


Abbildung 11: **a:** Färbeintensität in dem HOPE[®]-fixierten Material geringfügig niedriger als in der zugehörigen Gefrierschnittkontrolle (b). Tgb.-Nr. S176/06 (HOPE[®]); **b:** Gefrierschnittkontrolle. Tgb.-Nr. S176/06 (GF); a und b: LK, Obj. x 10, Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

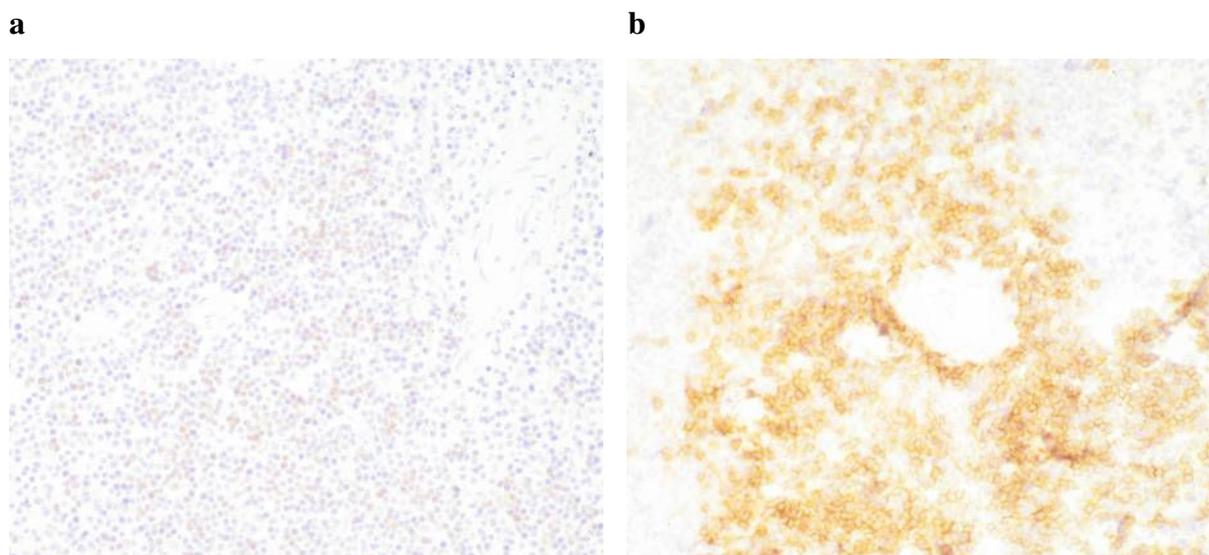


Abbildung 12: **a:** Färbeintensität in dem HOPE[®]-fixierten Material deutlich niedriger als in der zugehörigen Gefrierschnittkontrolle (b). Tgb.-Nr. S176/06 (HOPE[®]); **b:** Gefrierschnittkontrolle. Tgb.-Nr. S176/06 (GF); a und b: Milz, Obj. x 20, Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

Solange der Strukturhalt des Gewebes nicht durch schnittbedingte Artefakte (z. B. Rissbildung) und fortgeschrittene postmortale Veränderungen beeinträchtigt war, wiesen die als positiv beurteilten HOPE[®]-fixierten Proben durchgehend eine einheitliche Färbeintensität über den ganzen Schnitt hinweg auf (siehe Abb. 13). Aufgrund der durchgehend schwächeren Intensität des immunhistologischen Signals ließen sich einzeln (und nicht in Gruppen) liegende positive CD8⁺ T-Lymphozyten, z. B. im Markbereich des Mesenteriallymphknotens, deutlich schwieriger ausmachen als in den Gefrierschnittkontrollen.

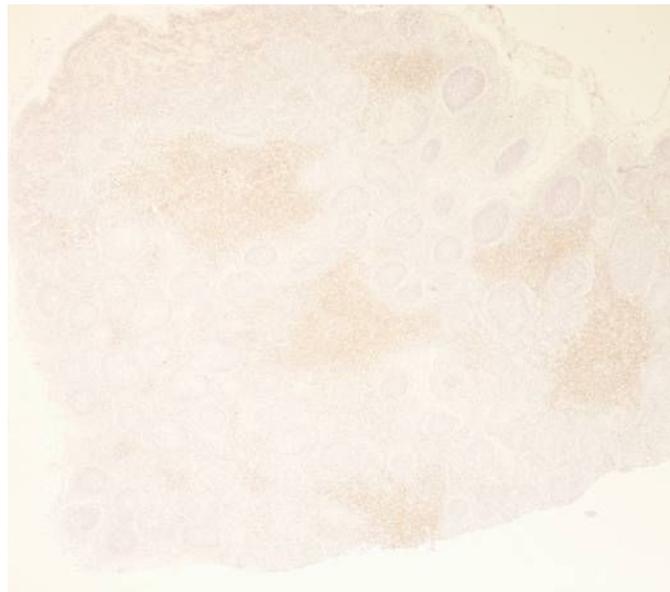


Abbildung 13: Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in HOPE[®]-fixiertem Material. Färbeintensität über den ganzen Schnitt einheitlich stark. Tgb.-Nr. S193/10 (HOPE[®], FD 44 h), LK, Obj. x 2,5. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

Im Hinblick auf den erforderlichen Erhaltungszustand des Ausgangsmaterials war festzustellen, dass der Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten an frischen und nicht mehr frischen Geweben gelang, deren Lagerungsdauer von einer Stunde (Tgb.-Nr. S359/07) bis drei Tage (Tgb.-Nr. S111/10) reichte und die z. T. auch über den Postweg eingesendet worden waren. Bei Tgb.-Nr. S180/10 und Tgb.-Nr. S179/10 erfolgte der Nachweis sogar an zuvor eingefrorenem Material.

Anhand der Tagebuchnummern S359/07, S176/06 und S1525/06 ließ sich nachweisen, dass die immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in HOPE[®]-fixiertem Material auch nach einer Einlagerungsdauer der Paraffinblöcke von 4 bzw. 5 Jahren gelang.

Es sollte im Hinblick auf die Eignung der Fixierungsmethode für den Einsatz in einem Routinelabor zudem überprüft werden, ob die Fixierungsdauer einen Einfluss auf den Antigenerhalt von CD8 in HOPE[®]-fixiertem Gewebe hat (siehe unter 3.3.3). Hierzu wurden die bei manchen Tagebuchnummern gewonnenen Proben mit unterschiedlicher Fixierungsdauer bei den Reihenuntersuchungen mitinkubiert und ebenfalls im Hinblick auf die Färbeintensität mit den jeweiligen Kontrollgefrierschnitten verglichen. Die in Tabelle 8.1.6 im Anhang zusammengefassten Ergebnisse lassen gewisse Unterschiede hinsichtlich der Färbeintensität zwischen den Proben mit unterschiedlicher Fixierungsdauer erkennen. In den kürzer fixierten Proben einer Tagebuchnummer konnte im Vergleich zu den länger fixierten Proben derselben Tagebuchnummer stets eine mindestens gleichstarke oder höhere Färbeintensität beobachtet werden. In keinem Fall wies die länger fixierte Probe eine höhere Färbeintensität auf. Grundsätzlich konnte hierbei aber festgestellt werden, dass trotz der beobachteten Schwankungen hinsichtlich der Färbeintensität die Nachweisbarkeit des Antigens auch in den länger fixierten Proben stets erhalten blieb, wobei die untersuchte Zeitspanne die für Einsendungen relevante Fixierungsdauer von 40 h bis 67 h umfasste.

Um den Einfluss der Fixierungsdauer auf den Antigenerhalt genauer zu überprüfen, wurde wie unter 3.3.3 ausführlich beschrieben anhand der sehr frischen Tagebuchnummer S606/10 ein gesonderter Fixierungsversuch über eine wesentlich weitere Spanne von Fixierungszeiten durchgeführt (siehe unter 4.1.3.1).

Analog zum Gefriermaterial zeigte sich, dass die Lokalisierbarkeit des immunhistologischen Signals von dem Grad der postmortalen Veränderungen des Gewebes abhing. Bei dem Mesenteriallymphknotengewebe von Tgb.-Nr. S179/10 und Tgb.-Nr. S180/10, das in beiden Fällen Areale mit fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen aufwies, fiel auf, dass das immunhistologische Signal auch in HOPE[®]-fixiertem Gewebe wesentlich weniger präzise lokalisierbar war als dies bei den anderen HOPE[®]-fixierten Proben der Fall war. Vorherrschend fand sich hier anders als unter 4.1.1.3 beschrieben eine granuläre Braunfärbung in der Peripherie der einzelnen Zellen, die diesen nicht präzise zuzuordnen war, sodass diese nicht als eindeutig positiv anzusprechen waren (siehe Abb. 14). Erschwerend kam noch eine deutlich

erhöhte Hintergrundfärbung hinzu. Beim Vergleich der beiden Mesenteriallymphknotenproben von Tgb.-Nr. S179/10 fiel auf, dass dieses Phänomen in der Probe mit der Fixierungsdauer von 67 h deutlich stärker ausgeprägt war als bei der Probe mit der kürzeren Fixierungsdauer von 43 h, wodurch sich im direkten Vergleich auch eine schlechtere Färbeintensität der länger fixierten Probe ergab.

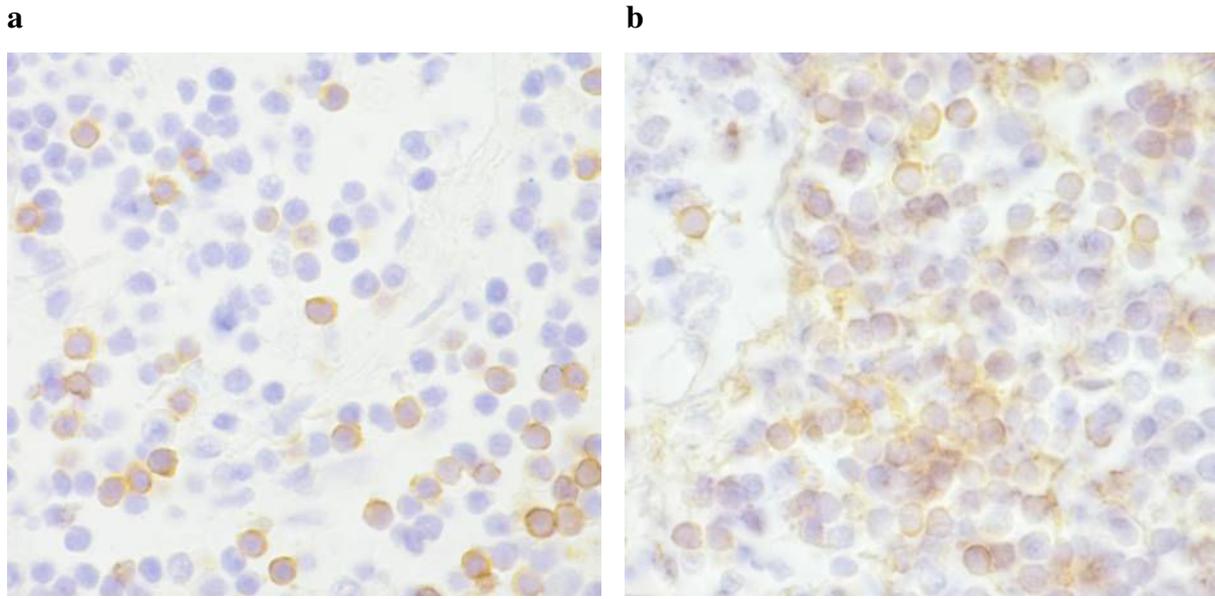


Abbildung 14: HOPE[®]-fixiertes Material. **a:** Frisches Gewebe. Präzise zu lokalisierende Markierung der CD8⁺ T-Lymphozyten. Tgb.-Nr. S161/10 (HOPE[®], FD 40 h); **b:** Gewebe mit fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen. Signal wesentlich unschärfer begrenzt und schlechter lokalisierbar. Höhere Hintergrundfärbung. Beurteilung eindeutig positiver Zellen deutlich erschwert. Tgb.-Nr. S179/10 (HOPE[®], FD 43 h); a und b: LK, Obj. x 100. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.2.4 ZSF-fixiertes Material

Bei den Reihenuntersuchungen an ZSF-fixiertem Material konnte lediglich bei zwei von elf untersuchten Tieren (Tgb.-Nr. S161/10 und Tgb.-Nr. S193/10) eine immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten erzielt werden. Die sowohl als Positivkontrollen als auch als Standard für die Färbeintensität dienenden, jeweils parallel inkubierten Gefrierschnitte (Gefrierschnittkontrollen) zeigten bis auf eine Ausnahme in allen Fällen eine positive immunhistologische Reaktion. Lediglich in Milzgewebe von Tgb.-Nr. S180/10 konnte auch im Gefrierschnitt kein positives immunhistologisches Signal erzielt werden, wobei das Gewebe einen vollständigen morphologischen Strukturverlust infolge fortgeschrittener postmortaler Veränderungen aufwies.

Bei den ZSF-fixierten Proben der beiden Tagebuchnummern, in denen eine positive Reaktion verzeichnet werden konnte, wurde die Färbeintensität im Vergleich zur zugehörigen Gefrierschnittkontrolle durchgehend deutlich niedriger eingestuft. Eine detaillierte Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 8.1.7 im Anhang zu finden.

Auffällig war, dass die ZSF-fixierten Proben im Falle einer positiven immunhistologischen Reaktion im Unterschied zu den Gefrierschnittkontrollen überwiegend keine einheitliche Färbeintensität über einen Schnitt hinweg aufwiesen (siehe Abb. 15 und 16). Die einzige Ausnahme hiervon war das Milzgewebe von Tgb.-Nr. S193/10, das über alle Fixierungszeiten eine einheitliche Färbeintensität zeigte. Bei den übrigen Proben waren in jedem Schnitt Areale zu finden, die eine hohe Anzahl eindeutig markierter CD8⁺ T-Lymphozyten mit einer hohen Intensität des Signals aufwiesen, und für sich genommen im Vergleich zur Gefrierschnittkontrolle durchaus mit „++“ beurteilt werden konnten. Allerdings war dieses gute Färbeargebnis nicht einheitlich über den ganzen Schnitt hinweg zu beobachten. Vielmehr fielen in allen Proben dieser Tagebuchnummer auch große T-Zellareale auf, in denen deutlich weniger oder keine eindeutig positiven Zellen beobachtet wurden. Ein Morphologieverlust oder eine sonstige Beeinträchtigung durch Schnittartefakte war in diesen Bereichen nicht zu erkennen. Die mangelnde Einheitlichkeit der Färbeintensität wurde bei der Beurteilung dergestalt berücksichtigt, dass der Schnitt trotz der Bereiche mit der intensiven Anfärbung insgesamt mit „+“ bewertet wurde.

Im Hinblick auf die unterschiedlichen Fixierungszeiten der Gewebeproben war zu beobachten, dass die ZSF-fixierten Gewebeproben bei längerer Fixierungsdauer eine Abnahme der

Intensität des Signals und der Anzahl der eindeutig markierten Zellen sowie auch eine Verstärkung des oben beschriebenen Phänomens der uneinheitlichen Färbeintensität aufwiesen. So war bei beiden Organen von Tgb.-Nr. S161/10 und bei Milzgewebe von Tgb.-Nr. S193/10 bei längerer Fixierungsdauer im direkten Vergleich eine geringgradige bis deutliche Abnahme der Färbeintensität zu beobachten. Bei Milzgewebe von Tgb.-Nr. S161/10 konnte nach einer Fixierungsdauer von 70 h kein positives Signal mehr erzielt werden. Um den Einfluss der Fixierungsdauer auf den Antigenerhalt bei der ZSF-Fixierung genauer zu überprüfen, wurde, wie unter 3.3.4.1 ausführlich beschrieben, anhand der sehr frischen Tagebuchnummer S606/10 ein gesonderter Fixierungsversuch über eine wesentlich weitere Spanne von Fixierungszeiten angelegt (siehe unter 4.1.3.1).

Aufgrund der durchgehend schwächeren Intensität des immunhistologischen Signals an sich ließen sich in ZSF-fixiertem Gewebe einzeln (und nicht in Gruppen) liegende positive CD8⁺ T-Lymphozyten, z. B. im Markbereich des Mesenteriallymphknotens, deutlich schwieriger ausmachen als in den zugehörigen Gefrierschnittkontrollen.

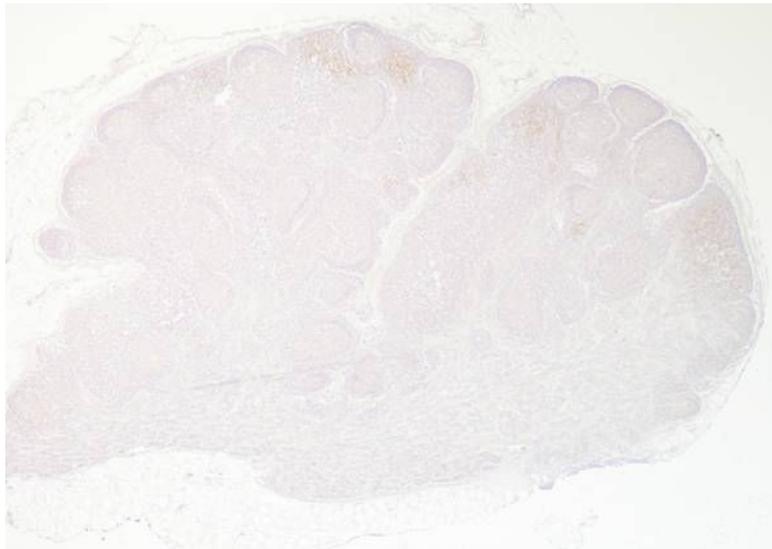


Abbildung 15: Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-fixiertem Material. Lediglich sehr schwache immunhistologische Anfärbung. Färbeintensität über den Schnitt hinweg nicht einheitlich. Tgb.-Nr. S161/10 (ZSF, FD 46 h), LK, Obj. x 2,5. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

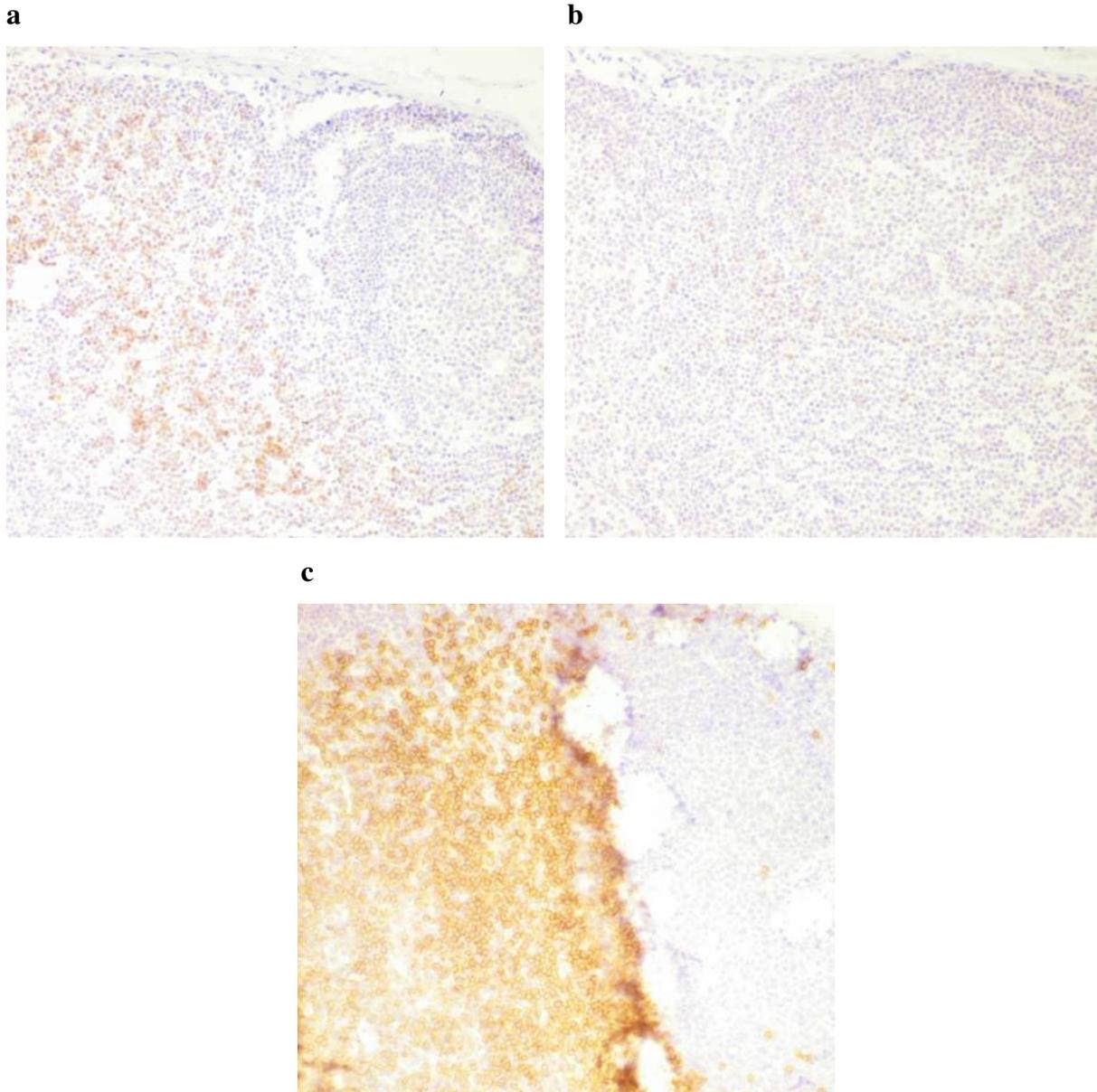


Abbildung 16: **a:** Bereich von ZSF-fixiertem Mesenteriallymphknoten mit starker Färbeintensität; **b:** Anderes Areal desselben Schnitts, das eine deutlich niedrigere Färbeintensität aufweist; **c:** Gefrierschnittkontrolle. Beeinträchtigung der Gewebemorphologie durch in Gefrierschnitten häufig zu beobachtende Rissbildung. a und b: Tgb.-Nr. S161/10 (ZSF, FD 46 h), c: Tgb.-Nr. S161/10 (GF); a, b und c: LK, Obj. x 20. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.3 Bewertung des Einflusses der Fixierungsdauer auf den Antigenerhalt bei den alternativen Fixierungstechniken

Im Hinblick auf die Eignung der HOPE[®]- und ZSF-Fixierungsmethode für den Einsatz in einem Routinediagnostiklabor, in dem zwangsläufig eine uneinheitliche Fixierungsdauer für die einzelnen Proben auftritt, sollte überprüft werden, innerhalb welcher Zeitspanne die Nachweisbarkeit des Antigens gegeben bleibt sowie ob und in welchem Rahmen die Fixierungsdauer einen Einfluss auf den Antigenerhalt hat. Die Klärung dieser Frage gewann zudem im Hinblick auf die Ergebnisse der Reihenuntersuchungen der ZSF-fixierten Proben mit unterschiedlicher Fixierungsdauer an Bedeutung (siehe unter 4.1.2.3 und 4.1.2.4). Diese ließen es notwendig werden, auszuschließen, dass möglicherweise die gewählte Zeitspanne der Fixierungsdauer für die fehlende oder nicht zufrieden stellende Nachweisbarkeit von CD8⁺ T-Lymphozyten verantwortlich war. Proben von Tgb.-Nr. S606/10 wurden unterschiedlich lange im jeweiligen Fixans inkubiert, anschließend parallel immunhistologisch gefärbt und hinsichtlich der Färbeintensität miteinander verglichen (siehe unter 3.3.3.1 bzw 3.3.4.1).

4.1.3.1 HOPE[®]-fixiertes Material

Im Milzgewebe gelang bis auf eine Ausnahme in allen HOPE[®]-fixierten Proben die Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten. Lediglich in der Milzprobe mit der Fixierungsdauer von 89 h konnte keine positive Reaktion erzielt werden. Die Zeitspanne der Fixierungsdauer reichte hierbei von 17 h bis 10 d. Alle Proben, die eine positive Reaktion aufwiesen, zeigten lediglich eine geringfügig geringere Färbeintensität als die jeweilige Gefrierschnittkontrolle.

Im Mesenteriallymphknoten erbrachten alle Proben ein positives Färbeergebnis. Im Vergleich zur jeweiligen Gefrierschnittkontrolle konnte in den Proben mit einer Fixierungsdauer von 17 h, 66 h, 103 h und 10 d lediglich eine geringfügig herabgesetzte Färbeintensität festgestellt werden. Hingegen wiesen die Proben mit der Fixierungsdauer von 89 h und 42 h eine deutlich geringere Färbeintensität als die Gefrierschnittkontrolle auf. Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensität in HOPE[®]-fixiertem Material mit unterschiedlicher Fixierungsdauer anhand Tgb.-Nr. S606/10

Bewertung der Färbeintensität					
LK			Milz		
Vergleich zu GF	FD	Vergleich untereinander	Vergleich zu GF	FD	Vergleich untereinander
++	17 h	=	++	42 h	=
++	103 h		++	103 h	=
++	66 h	>	++	17 h	>
++	10 d	=	++	66 h	>
++	10 d	>>	++	66 h	>
+	89 h	>>	++	10 d	>
+	42 h	>>	-	89 h	-

GF: Gefrierschnitttechnik; FD: Fixierungsdauer; LK: Mesenteriallymphknoten; Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1 und Tabelle 8 unter 3.4.5.2.2

4.1.3.2 ZSF-fixiertes Material

In ZSF-fixiertem Milzgewebe wurde über eine Zeitspanne von 24 h bis 10 d eine Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten erzielt. Die Proben mit einer Fixierungsdauer von 72 h, 96 h und 120 h wiesen eine deutlich geringere Färbeintensität auf als die übrigen positiv beurteilten Proben. In der Probe mit der Fixierungsdauer von 41 d konnte keine positive Reaktion beobachtet werden. Bei der Probe mit der Fixierungsdauer von 24 h fiel eine uneinheitliche Färbeintensität auf. In manchen Arealen dieser Probe konnten zahlreiche, intensiv angefarbte Zellen beobachtet werden. Diese Areale hätten für sich genommen im Vergleich zur Gefrierschnittkontrolle mit „++“ beurteilt werden können. In anderen T-Zellarealen waren hingegen lediglich vereinzelte oder keine positiven Zellen zu erkennen. Die mangelnde Einheitlichkeit der Färbeintensität wurde bei der Beurteilung dergestalt berücksichtigt, dass der Schnitt trotz der Bereiche mit der intensiven Anfärbung insgesamt mit „+“ bzw. „>“ bewertet wurde. Alle anderen positiv beurteilten Proben zeigten hingegen über den ganzen Schnitt hinweg eine einheitliche Färbeintensität.

Im Vergleich mit der zugehörigen Gefrierschnittkontrolle wiesen die Proben mit der Fixierungsdauer von 48 h und 10 d die beste Färbeintensität auf.

In keiner der Proben vom Mesenteriallymphknoten konnte ein Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten erzielt werden. Der im gleichen Inkubationsansatz gefärbte, als Positivkontrolle dienende Gefrierschnitt zeigte in beiden Organen das übliche positive immunhistologische Signal.

Eine detaillierte Übersicht der Ergebnisse findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Ergebnisse des Vergleichs der Färbeintensität in ZSF-fixiertem Material mit unterschiedlicher Fixierungsdauer anhand Tgb.-Nr. S606/10

Bewertung der Färbeintensität					
LK			Milz		
Vergleich zu GF	FD	Vergleich untereinander	Vergleich zu GF	FD	Vergleich untereinander
-	24 h	-	++	48 h	>
-	48 h	-	++	10 d	>>
-	72 h	-	+	24 h	>
-	96 h	-	+	72 h	>>
-	120 h	-	+	96 h	=
-	10 d	-	+	120 h	
-	41 d	-	-	41 d	-

GF: Gefrierschnitttechnik; FD: Fixierungsdauer; LK: Mesenteriallymphknoten; Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1 und Tabelle 8 unter 3.4.5.2.2

4.1.4 Bewertung des Einflusses der Modifizierung des Prozessierungsprotokolls auf den Antigenerhalt bei der ZSF-Fixierung

4.1.4.1 Einfluss der Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten nach modifiziertem Protokoll

Vorversuche hatten ergeben, dass auch bei einer Angleichung des von Beckstead (1994) publizierten Prozessierungsprotokolls an die institutsinternen Abläufe ein Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-fixiertem Material möglich war. Es gab somit keinen Grund, von der gewählten Vorgehensweise der Prozessierung der Proben im Gewebeeinbettungsautomaten nach dem modifizierten Protokoll abzuweichen. In den Reihenuntersuchungen stellte sich allerdings unerwartet heraus, dass der Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in den ZSF-fixierten, lymphatischen Organen bei der überwiegenden Anzahl der untersuchten Katzen nicht gelang (siehe unter 4.1.2.4).

Deshalb sollte anhand von parallel nach beiden Verfahrensweisen prozessierten Proben von Tgb.-Nr. S359/07 überprüft werden, ob sich bei manueller Prozessierung der Proben gemäß des von Beckstead (1994) publizierten Protokolls ein besserer Antigenerhalt als bei der modifizierten Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten erzielen lässt (siehe unter 3.3.4.2).

In den nach dem modifizierten Protokoll im Gewebeeinbettungsautomaten prozessierten ZSF-fixierten Proben (Tgb.-Nr. S359/07 (ZSF)) konnte weder in der Milz noch im Mesenteriallymphknoten eine immunhistologische Markierung von CD8⁺ T-Lymphozyten beobachtet werden (siehe Abb. 17a).

In ZSF-M Material derselben Tagebuchnummer, das nach der Fixierung in ZSF parallel entsprechend den Vorgaben von Beckstead (1994) einer manuellen Prozessierung unterzogen wurde (S359/07 (ZSF-M, PD 30 min); siehe unter 3.3.4.2), konnte hingegen in beiden Organen eine positive immunhistologische Reaktion erzielt werden. In der Milz fanden sich vereinzelt CD8⁺ T-Lymphozyten, die eine nur schwach erkennbare Markierung aufwiesen (siehe Abb. 17b). Auch im Mesenteriallymphknoten fanden sich einzelne positive Zellen, wobei die Intensität der Anfärbung sehr schwach war. In beiden Organen waren die markierten Zellen nicht gleichmäßig über den gesamten Schnitt verteilt, sondern ihr Vorkommen war auf wenige Areale begrenzt.

Die Anzahl der als eindeutig positiv zu beurteilenden Zellen und die Intensität des Signals in Milz und Mesenteriallymphknoten des ZSF-M Materials lagen deutlich unter der des jeweiligen, als Positivkontrolle dienenden, parallel inkubierten Gefrierschnitts, der sowohl im Mesenteriallymphknoten als auch in der Milz über den ganzen Schnitt hinweg eine starke positive immunhistologische Reaktion zeigte (siehe Abb. 17c).

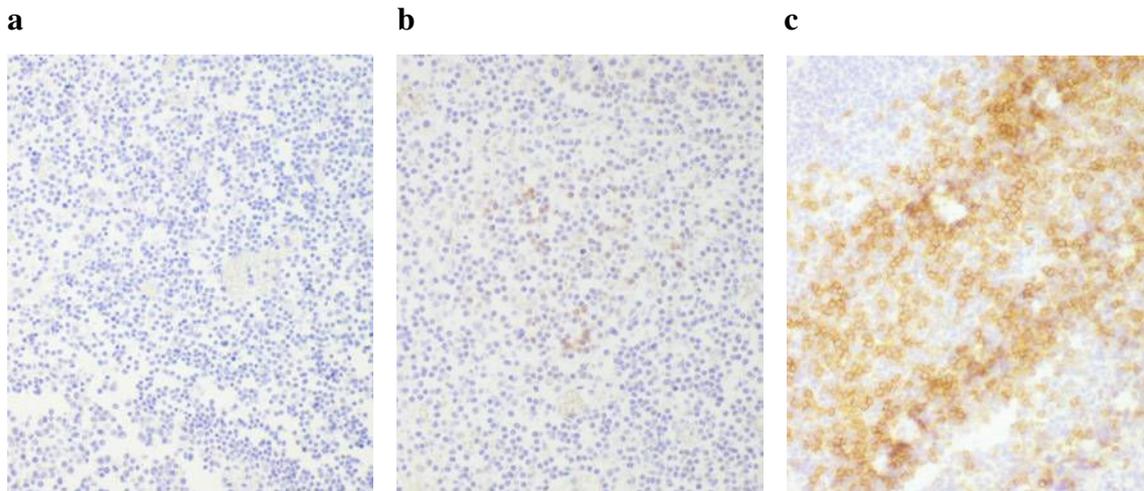


Abbildung 17: **a:** Fehlender Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-fixiertem Material nach modifizierter Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten. Tgb.-Nr. S359/07 (ZSF); **b:** Einzelne schwach angefärbte Zellen in ZSF-M Material. Tgb.-Nr. S359/07 (ZSF-M, PD 30 min); **c:** Zahlreiche stark angefärbte Zellen im Gefrierschnitt. Tgb.-Nr. S359/07 (GF); a, b und c: Milz; Obj. x 20, Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.4.2 Einfluss der Paraffinierungsdauer bei der manuellen Prozessierung nach dem Protokoll von Beckstead (1994)

Zwischen den unterschiedlich lange in Paraffin eingebetteten, manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessierten ZSF-M Proben von Tgb.-Nr. S359/07 konnte nach paralleler immunhistologischer Inkubation hinsichtlich der Färbeintensität kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 18; siehe unter 3.3.4.2.3 und 3.4.5.2.4.2). Der parallel inkubierte Gefrierschnitt, der als Positivkontrolle diente, zeigte eine positive immunhistologische Reaktion.

Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Daten zur Bewertung des Vergleichs der Färbeintensität der immunhistologischen Reaktion in ZSF-M Proben mit unterschiedlicher Paraffinierungsdauer anhand Tgb.-Nr. S359/07

Paraffinierungsdauer	Bewertung der Färbeintensität	
	LK	Milz
30 min	=	nv
12,5 h		

LK: Mesenteriallymphknoten; nv: nicht vorhanden; Symbole:
zur Erläuterung siehe Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1

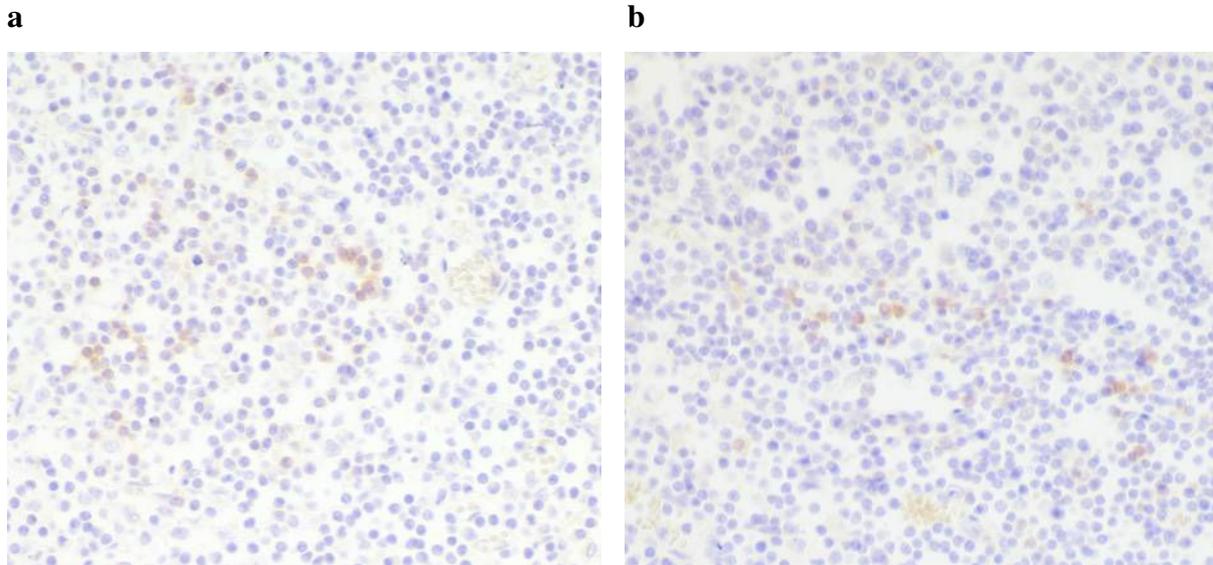


Abbildung 18: a und b: Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-M Material unterschiedlicher Paraffinierungsdauer. Kein Unterschied in der Färbeintensität erkennbar; **a:** Tgb.-Nr. S359/07 (ZSF-M, PD 30 min); **b:** Tgb.-Nr. S359/07 (ZSF-M, PD 12,5 h). a und b: LK; Obj. x 20, Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.5 Bewertung des Einflusses der Entparaffinierung und Rehydrierung auf den Antigenhalt in HOPE[®]-fixiertem Material

Der mit Xylolersatz entparaffinierte und über die Ethanolreihe rehydrierte HOPE[®]-fixierte Paraffinschnitt von Tgb.-Nr. S359/07 wies eine geringfügig (Mesenteriallymphknoten) bis deutlich (Milz) höhere Färbeintensität auf als der im gleichen Inkubationsansatz gefärbte Folgeschnitt desselben Paraffinblocks, dessen Entparaffinierung und Rehydrierung gemäß den Herstellerangaben mittels warmem Isopropanol und eiskaltem Aceton erfolgte (siehe Abb. 19; siehe unter 3.4.3.3 und 3.4.5.2.5). Der parallel inkubierte, als Positivkontrolle dienende Gefrierschnitt derselben Tagebuchnummer wies in Milz und Mesenteriallymphknoten eine positive immunhistologische Reaktion auf. Eine Aufstellung der detaillierten Ergebnisse findet sich in Tabelle 16.

Tabelle 16: Daten zur Bewertung der Färbeintensität der immunhistologischen Reaktion in gemäß den Herstellerangaben entparaffinierten und rehydrierten HOPE[®]-fixierten Proben (HOPE[®] Regulär) im Vergleich zu HOPE[®]-fixierten Proben, die mit Xylolersatz entparaffiniert und über die Ethanolreihe rehydriert wurden (HOPE[®] Xylolersatz), anhand Tgb.-Nr. S359/07

Entparaffinierung/Rehydrierung	Bewertung der Färbeintensität	
	LK	Milz
HOPE [®] Xylolersatz	>	>>
HOPE [®] Regulär		

LK: Mesenteriallymphknoten; Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 7 unter 3.4.5.2.1

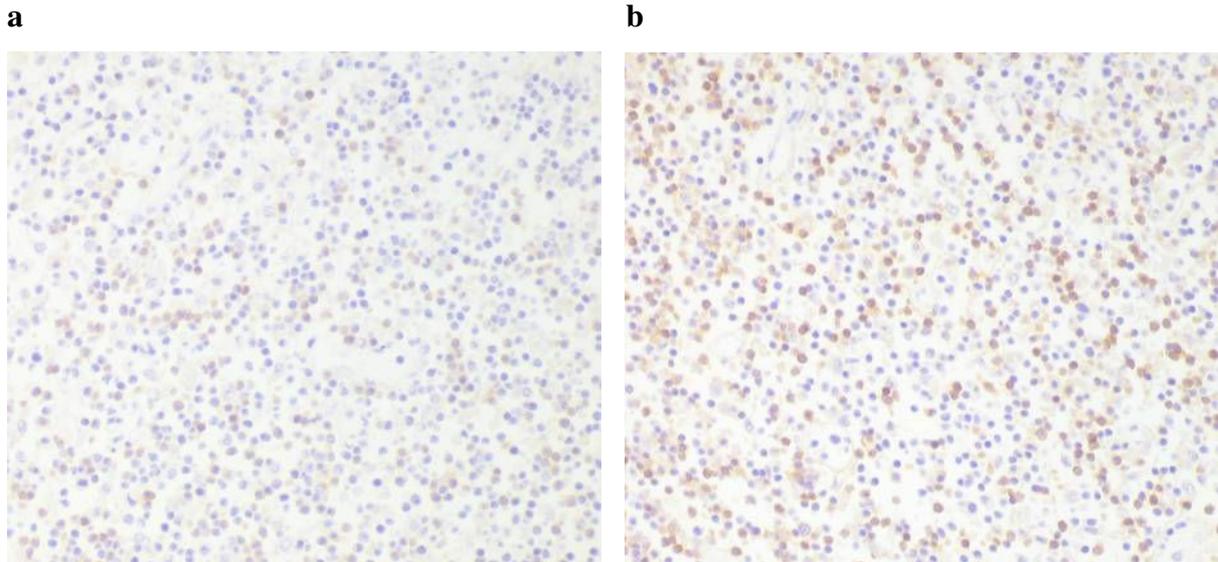


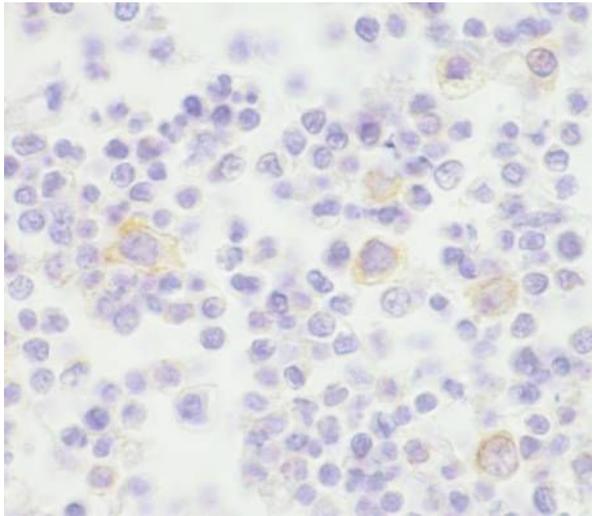
Abbildung 19: Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in HOPE[®]-fixiertem Material nach Entparaffinierung und Rehydrierung mit **a:** Isopropanol und Aceton gemäß den Herstellerempfehlungen und **b:** Xylolersatz und Ethanol. Hier höhere Färbeintensität als bei a zu beobachten. a und b: Tgb.-Nr. S359/07 (HOPE[®]), LK; Obj. x 20, Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.1.6 Immunhistologische Kontrollen

In Geweben aller Fixierungsmethoden fanden sich vereinzelt zytoplasmareiche Zellen von makrophagenartigem Erscheinungsbild, deren Zytoplasma eine hauchzarte, hellbraune, feingranuläre teils diffuse, teils lokal begrenzte Anfärbung aufwies (siehe Abb. 20). Im Mesenteriallymphknoten fanden sich derartige Zellen vor allem im Bereich des Parakortex, seltener auch in den Follikeln und im Markbereich. In der Milz waren sie eher selten zu erkennen. Die Anfärbung wurde sowohl in den Negativkontrollen als auch in mit dem Primärantikörper inkubierten Schnitten beobachtet und zeigte auch bei höherer Verdünnung keinen Intensitätsunterschied. In manchen Tagebuchnummern war die Anfärbung in einigen Schnittarealen vermehrt zu beobachten (z. B. S606/10, S161/10), während sie bei anderen Tagebuchnummern gar nicht auftrat.

Bei sukzessiver Auslassung des Primärantikörpers, des nicht reagierenden Antikörpers T1 und des Sekundärantikörpers blieb die Anfärbung erhalten. Erst bei Auslassung des Tertiärantikörpers (PAP-Komplex) war die zytoplasmatische Anfärbung in den jeweiligen Zellen nicht mehr zu beobachten (siehe Abb. 20).

a



b

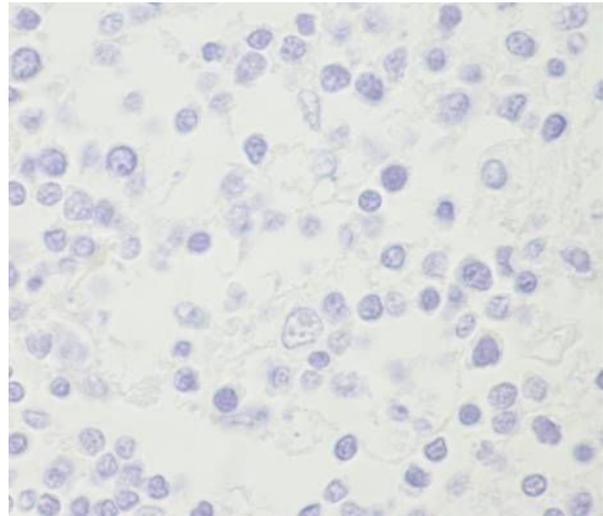


Abbildung 20: **a:** Hellbraune, feingranuläre, zytoplasmatische Anfärbung von Zellen mit makrophagenartigem Erscheinungsbild am Beispiel von ZSF-fixiertem Gewebe. T1 1:50, PAP; **b:** Nach Auslassung des Tertiärantikörpers (PAP) keine Anfärbung mehr zu erkennen. a und b: Tgb.-S606/10 (ZSF, FD 48 h), LK, Obj. x 100. Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

4.2 Morphologieerhalt

Die nachstehenden Ergebnisse beziehen sich naturgemäß nur auf Proben von Tagebuchnummern, die im Hinblick auf postmortale Veränderungen einen Erhaltungszustand aufwiesen, bei dem ein Erhalt der Gewebestruktur grundsätzlich gewahrt war.

4.2.1 Gefriermaterial

Trotz Einhaltung höchster Sorgfalt bei der Aufbereitung der Gefrierblöcke für die immunhistologische Untersuchung zeigten die Gefrierschnitte oftmals Areale mit ausgeprägter Wellen-, Riss- und Faltenbildung, an denen keine Auswertung erfolgen konnte.

Zudem fiel durchgehend auf, dass der Morphologieerhalt des Gewebes sowohl im Hinblick auf die Organstruktur als auch auf einzelne Zellen (Detailerkennbarkeit von Zellgrenzen, Zytoplasma, Kernmembran und Chromatinstruktur) in den Gefrierschnitten im Vergleich zu dem parallel inkubierten Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixierten Paraffinmaterial derselben Tagebuchnummer deutlich schlechter war. Eine morphologische Beurteilung einzelner Zellen und deren Strukturen war aufgrund der schlechten Detailerkennbarkeit in Gefrierschnitten überwiegend nicht möglich (siehe Abb. 21a).

4.2.2 Formalinfixiertes Material

Der Morphologieerhalt von formalinfixiertem Material war hinsichtlich der Organstruktur und der einzelnen Zellen durchgehend gut. Formalinfixiertes Material erwies sich diesbezüglich gegenüber dem parallel inkubierten Gefriermaterial derselben Tagebuchnummer als deutlich überlegen. Bei der überwiegenden Anzahl der Zellen waren die zellulären Strukturen (Detailerkennbarkeit von Zellgrenzen, Zytoplasma, Kernmembran und Chromatinstruktur) aufgrund der hohen Detailerkennbarkeit gut zu beurteilen (siehe Abb. 21 b).

4.2.3 HOPE[®]-fixiertes Material

Das HOPE[®]-fixierte Material wies grundsätzlich einen guten Erhalt der Organstrukturen auf, der überwiegend mit dem von formalinfixiertem Material vergleichbar war. Bei zu langer Verweildauer der Paraffinschnitte auf der Oberfläche des warmen Wasserbades vor dem Aufziehen auf den Objektträger neigten diese jedoch dazu, auseinander zu streben (siehe unter 3.4.1.3), was sich histologisch in einer verstärkten Spaltenbildung und Ausfransung im Randbereich der Schnitte niederschlug. Bei zügiger Durchführung dieses Arbeitsschrittes ließ sich dieses Problem jedoch weitgehend vermeiden.

Der Morphologieerhalt auf zellulärer Ebene war bei HOPE[®]-fixiertem Material schlechter als bei formalinfixiertem Material. Bei der überwiegenden Anzahl der Zellen in HOPE[®]-fixiertem Gewebe waren die Zellgrenzen nicht so deutlich sichtbar wie in formalinfixiertem Material. Auch die Detailerkennbarkeit der nukleären Strukturen (Kernmembran und Chromatinstruktur) war im Vergleich zu formalinfixiertem Material überwiegend herabgesetzt (siehe Abb. 21c).

Der Morphologieerhalt des HOPE[®]-fixierten Materials erwies sich gegenüber dem der parallel inkubierten Gefrierschnitte derselben Tagebuchnummer hinsichtlich Zell- und Organstruktur durchgehend als überlegen.

4.2.4 ZSF-fixiertes Material

Das ZSF-fixierte Material wies hinsichtlich der Zell- und Organstruktur durchgehend einen guten Morphologieerhalt auf. Die Detailerkennbarkeit der zellulären Strukturen war gut und ließ bei der überwiegenden Anzahl von Zellen eine Beurteilung von Zellgrenzen, Zytoplasma, Kernmembran und Chromatinstruktur zu (siehe Abb. 21d).

Der Morphologieerhalt des ZSF-fixierten Materials konnte als durchaus vergleichbar mit dem von formalinfixiertem Material bewertet werden. In ZSF-fixiertem Material erschienen lediglich die Zwischenräume zwischen den Zellen etwas größer und die Kerne wiesen ein geringfügig kompakteres Erscheinungsbild auf als bei formalinfixiertem Material.

Im Vergleich zu dem Morphologieerhalt der parallel inkubierten Gefrierschnitte derselben Tagebuchnummer konnte der Morphologieerhalt des ZSF-fixierten Materials hinsichtlich Zell- und Organstruktur insgesamt durchgehend als deutlich überlegen bezeichnet werden.

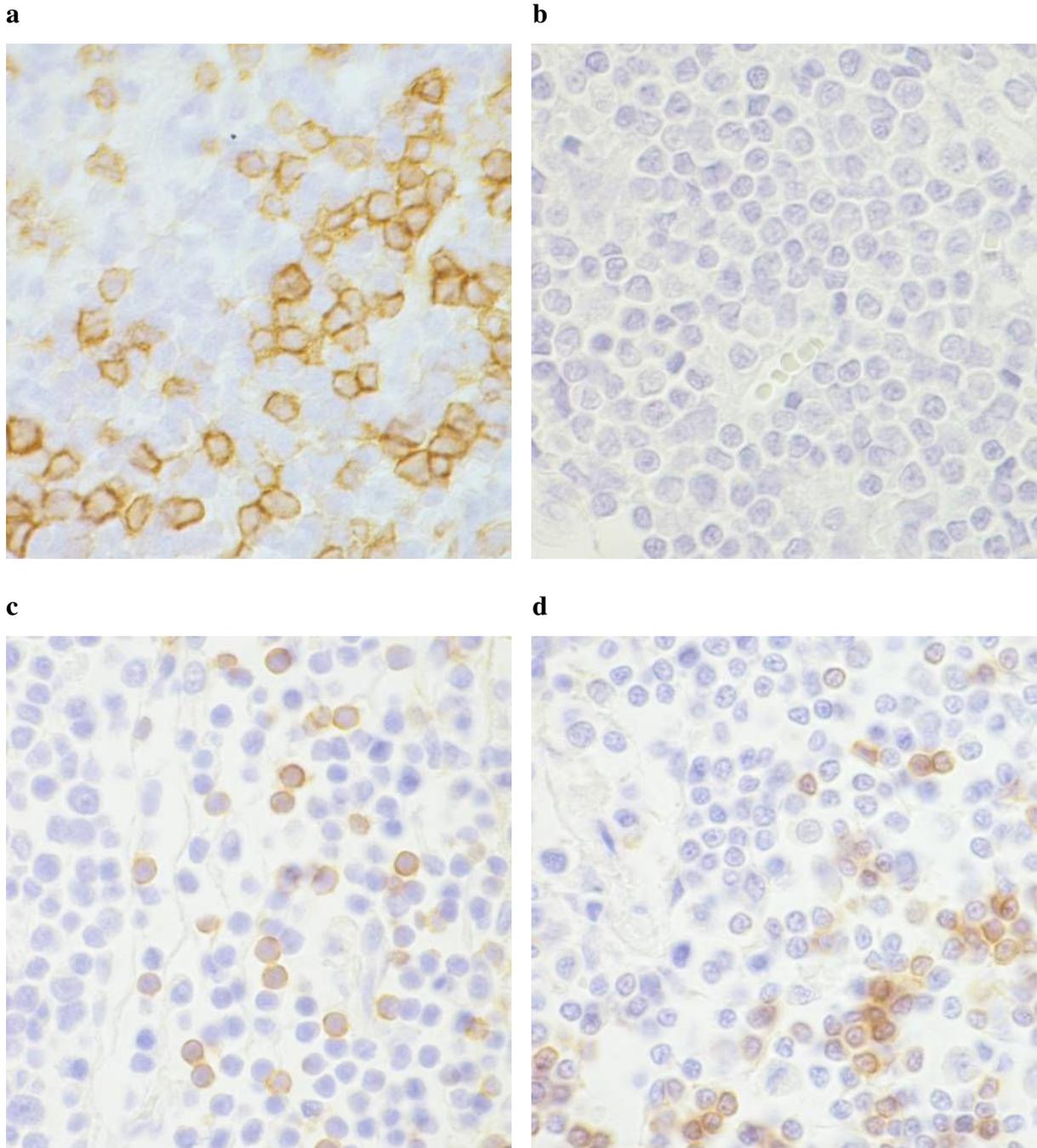


Abbildung 21: Morphologieerhalt in Abhängigkeit vom verwendeten Fixierungsverfahren. **a:** GF. Beurteilung zellulärer Strukturen nicht möglich; **b:** Formalin. Gute Detailerkennbarkeit zellulärer Strukturen. Zellgrenzen, Zytoplasmasaum, Kernmembran und Chromatinstruktur deutlich erkennbar; **c:** HOPE[®]. Zellgrenzen und Chromatinstruktur meist undeutlicher als in formalinfixiertem Material (b); **d:** ZSF. Detailerkennbarkeit zellulärer Strukturen vergleichbar mit formalinfixiertem Material (b). a, b, c und d: LK, Tgb.-Nr. S161/10; Obj. x 100. Maus anti-Katze CD8, PAP, Papanicolaous Hämatoxylin Gegenfärbung

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die beiden alternativen aldehydfreien Verfahren der HOPE[®]- und der ZSF-Fixierung auf ihre Eignung für die immunhistologische Darstellung des fixierungs- und prozessierungssensitiven T-Lymphozytendifferenzierungsantigens CD8 in paraffineingebettetem, lymphatischem Gewebe der Katze zu untersuchen. Als ein Nebenaspekt war dabei auch der mit der jeweiligen Methode erzielte Morphologieerhalt zu beurteilen. Zudem sollte die Handhabbarkeit der beiden Methoden insbesondere im Hinblick auf die zeitlichen Abläufe eines Routinediagnostiklabors bewertet werden.

5.1 Immunhistologie

5.1.1 Eignung der Fixierungsmethoden für die immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in felinem, lymphatischem Gewebe

5.1.1.1 Herkömmliche Methoden

5.1.1.1.1 Gefrierschnitttechnik

5.1.1.1.1.1 Ergebnisse der Reihenuntersuchung

Mittels der Gefrierschnitttechnik konnte bei allen untersuchten Proben ein zuverlässiger immunhistologischer Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgen, solange der morphologische Strukturertalt des Gewebes hinsichtlich postmortaler Veränderungen gegeben war (siehe unter 4.1.2.1).

5.1.1.1.1.1.1 Analyse negativer Nachweise

Bei den Reihenuntersuchungen an Gefriermaterial stellte das Milzgewebe von Tgb.-Nr. S180/10 die einzige Ausnahme dar, da in dieser Probe kein immunhistologischer Nachweis von CD8 gelang (siehe unter 4.1.2.1). Da das auf demselben Objektträger inkubierte Lymphknotenmaterial eine positive Reaktion aufwies, kann ein Verfahrensfehler bei der immunhistologischen Inkubation als Ursache für die fehlende Anfärbung ausgeschlossen werden.

Im Hinblick auf den vollständigen morphologischen Strukturverlust der gesamten Probe, der histologisch charakteristisch für den Zustand von Geweben nach fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen ist, kann man von einem Zusammenhang bezüglich des schlechten Erhaltungszustands des Gewebes und der fehlenden Nachweisbarkeit von CD8 ausgehen. Studien mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern an humanen Geweben haben ergeben, dass

unter den Leukozytenoberflächenantigenen insbesondere CD8 sehr empfindlich gegen Autolyse und Fäulnisprozesse war (Pollard et al., 1987). Pallesen und Knudsen (1985) konnten bis zu 72 h post mortem einen stetig nachlassenden Antigenerhalt beobachten, wobei der Verlust der Nachweisbarkeit in Milzgewebe stärker ausgeprägt war als im zervikalen Lymphknoten. Ähnlich empfindlich gegenüber postmortalen Veränderungen zeigte sich CD8 auch in porzinem Gewebe. Auch hier wies die Milz einen deutlich schlechteren Antigenerhalt bezüglich CD8 auf als die anderen lymphatischen Vergleichsgewebe (Wintzer et al., 1988). Die Autoren führen dies auf den relativ hohen Gehalt an neutrophilen Granulozyten in der Milz zurück, was durch freiwerdende lysosomale Enzyme zu einer Verstärkung der postmortalen Auflösungsprozesse führt. Diese Beobachtungen decken sich mit den in dieser Studie erzielten Ergebnissen hinsichtlich Tgb.-Nr. S180/10, bei der CD8 in Milzgewebe nicht nachgewiesen werden konnte, während der Nachweis im Mesenteriallymphknoten jedoch gegeben war.

5.1.1.1.1.2 Erhaltungszustand Ausgangsmaterial

Unter Verwendung der Gefrierschnitttechnik gelang der Nachweis in allen Proben unabhängig von Lagerungsart (postalisch zugesandtes sowie zuvor gefrorenes Material) und Lagerungsdauer (eine Stunde (Tgb.-Nr. S359/07) bis drei Tage (Tgb.-Nr. S111/10)) solange der morphologische Strukturhalt hinsichtlich postmortaler Veränderungen noch gewahrt war (siehe unter 4.1.2.1). Die Methode hat sich damit als geeignet erwiesen für die Anwendung an einem bezüglich des Erhaltungszustands sehr heterogenen Probenspektrum, das in einem Routinediagnostiklabor zwangsläufig auftritt.

5.1.1.1.1.2 Antigenerhalt

Die in der jeweiligen Gefrierschnittkontrolle ermittelte immunhistologische Färbeintensität erwies sich ausnahmslos in allen Fällen als überlegen gegenüber Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixiertem Gewebe. Zudem erlaubte die für Gefriermaterial als optimal ermittelte Gebrauchsverdünnungsstufe von 1:500 durchgehend eine zehnfach höhere Verdünnung des Primäantikörpers als bei der Anwendung an paraffineingebettetem Material nach HOPE[®]- oder ZSF-Fixierung (siehe unter 4.1.1.1).

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Gefrierschnitttechnik von den vier untersuchten Fixierungsmethoden im Hinblick auf den immunhistologischen Nachweis von CD8 in lymphatischem Gewebe der Katze den höchsten Grad des Antigenerhalts gewährleistete.

Diese Beobachtungen entsprechen der Einstufung der Gefrierschnitttechnik in den Status des Goldstandards für den immunhistologischen Nachweis von Antigenen, der dieser Methode nach wie vor zuerkannt wird (Goldmann et al., 2012).

5.1.1.1.3 Fazit

Die Gefrierschnitttechnik kann als sehr gut geeignet für den immunhistologischen Nachweis des fixierungs- und prozessierungssensitiven T-Lymphozytenmarkers CD8 an lymphatischem Gewebe der Katze beurteilt werden.

5.1.1.1.2 Formalinfixierung

5.1.1.1.2.1 Ergebnisse der Reihenuntersuchung

Bei keiner der untersuchten Proben gelang die immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in formalinfixiertem Material (siehe unter 4.1.2.2).

5.1.1.1.2.1.1 Analyse negativer Nachweise

Da die bei jeder Inkubation mitgeführte jeweilige Gefrierschnittkontrolle stets eine positive immunhistologische Reaktion zeigte und die fehlende Anfärbung in formalinfixiertem Gewebe bei verschiedenen Inkubationsansätzen auftrat (siehe unter 4.1.2.1 und 5.1.1.1.1), kann ein verfahrensbedingter Fehler während der Inkubation als Ursache für die fehlende Anfärbung in den formalinfixierten Proben mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden.

Vielmehr ist davon auszugehen, dass das Ergebnis, dass bei keiner der untersuchten formalinfixierten Gewebeproben eine immunhistologische Darstellung von CD8 erzielt werden konnte, auf dessen Status eines fixierungs- und prozessierungssensitiven Antigens zurückzuführen ist. Diese Folgerung deckt sich mit der in der Literatur verbreiteten Einschätzung, wonach der Nachweis von CD8 in paraffineingebettetem Gewebe speziesübergreifend als schwierig angegeben wird (Breugelmans et al., 2011c; Gutierrez et al., 1999; Hicks et al., 2006; Holgate et al., 1986; Kunder et al., 2007; Randall und Pearse, 2008; Rathkolb et al., 1997; Tingstedt et al., 2003; Whiteland et al., 1995) und hierfür bei der Katze auf die Gefrierschnitttechnik zurückgegriffen werden muss (Harley et al., 2011; Roccabianca et al., 2006; Waly et al., 2001; Waly et al., 2004).

5.1.1.1.2.1.2 Erhaltungszustand Ausgangsmaterial

Im Hinblick auf die fehlende Nachweisbarkeit von CD8 in den untersuchten formalinfixierten Gewebeproben konnte kein Zusammenhang mit dem Erhaltungszustand des Ausgangsmaterials festgestellt werden, da auch in sehr frischem Material (Tagebuchnummern S1525/06, S359/07, S161/10, S606/10) kein Nachweis erfolgte. Der fehlende Nachweis ist vielmehr auf die Tatsache zurückzuführen, dass es sich bei felinem CD8 um ein fixierungs- und prozessierungssensitives Antigen handelt, dessen Darstellung in formalinfixiertem Material nicht möglich ist (siehe unter 5.1.1.1.2.1.1).

5.1.1.1.2.2 Antigenerhalt

Da im Unterschied zur Gefrierschnitttechnik sowie den HOPE[®]- und ZSF-fixierten Proben in formalinfixiertem Material bei keiner der untersuchten Proben ein Nachweis von CD8 gelang, kann die Methode hinsichtlich des erzielten Antigenerhalts - zumindest bezogen auf die Nachweisbarkeit von CD8 in felinem, lymphatischem Gewebe - im Vergleich zu den drei anderen Methoden als unbrauchbar beurteilt werden.

Der bei den Untersuchungen verwendete Antikörper ist laut Herstellerempfehlungen explizit nur für den Gebrauch an Gefriermaterial, nicht aber an formalinfixiertem Material vorgesehen. Es kann sicherlich nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich möglicherweise unter Verwendung eines Antigen-Retrieval-Verfahrens oder eines sensitiveren Detektionsverfahrens auch in formalinfixiertem Gewebe ein immunhistologischer Nachweis von CD8 erzielen ließe. Allerdings ist dies sehr unwahrscheinlich, da davon auszugehen ist, dass Antikörper von kommerziellen Anbietern aus finanziellem Interesse im Hinblick auf ein möglichst breites Einsatzspektrum des Antikörpers im Vorfeld auf ihre mögliche Eignung für formalinfixiertes Material ausgiebig getestet werden (Blaschitz et al., 2008).

5.1.1.1.2.3 Fazit

Die Formalinfixierung kann somit als ungeeignet für den immunhistologischen Nachweis des fixierungs- und prozessierungssensitiven T-Lymphozytenmarkes CD8 in lymphatischem Gewebe der Katze beurteilt werden.

5.1.1.2 Alternative Fixierungsmethoden

5.1.1.2.1 HOPE[®]-Fixierung

5.1.1.2.1.1 Ergebnisse der Reihenuntersuchung

Unter Verwendung der HOPE[®]-Fixierung konnte, von einer Ausnahme abgesehen, bei allen untersuchten Proben, die in den jeweils parallel inkubierten Gefrierschnittkontrollen eine positive Reaktion zeigten, eine immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten erzielt werden.

5.1.1.2.1.1.1 Analyse negativer Nachweise

Als einzige Ausnahme bei den Reihenuntersuchungen an HOPE[®]-fixiertem Material konnte in Milzgewebe von Tgb.-Nr. S179/10 kein Nachweis von CD8 erbracht werden, wobei die zugehörige Gefrierschnittkontrolle positiv war (siehe unter 4.1.2.3). Dies galt sowohl für die Probe mit einer Fixierungsdauer von 43 h (Tgb.-Nr. S179/10 (HOPE[®], FD 43 h)) als auch von 67 h (Tgb.-Nr. S179/10 (HOPE[®], FD 67 h)). Da das auf demselben Objektträger mitinkubierte Lymphknotengewebe jeweils eine positive Reaktion aufwies, kann ein Verfahrensfehler während der immunhistologischen Inkubation als Ursache für die fehlende Anfärbung ausgeschlossen werden.

Es ist jedoch anzumerken, dass das Milzgewebe dieser Tagebuchnummer überwiegend einen infolge fortgeschrittener postmortalen Veränderungen hochgradigen morphologischen Strukturverlust aufwies und auch in der Gefrierschnittkontrolle nur in den verbliebenen kleinen Arealen mit erhaltener Gewebestruktur einzelne wenige positive CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten (siehe unter 4.1.2.1). Es ist somit davon auszugehen, dass die fehlende immunhistologische Reaktion in HOPE[®]-fixiertem Gewebe auf die fortgeschrittenen postmortalen Veränderungen zurückzuführen ist. Da die Proben einer Tagebuchnummer jeweils parallel und bis auf einen Unterschied von wenigen Minuten fast zeitgleich der jeweiligen Fixierungsmethode unterworfen oder zu Gefrierblöcken verarbeitet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass alle Proben zu Beginn der Fixierung hinsichtlich des Grades der postmortalen Veränderungen den gleichen Erhaltungszustand hatten. Zudem wurden die einzelnen Probenstücke jeweils aus direkt benachbarten Arealen des Organs entnommen, um die Heterogenität zwischen diesen auch in Hinblick auf äußere Einflüsse wie z. B. einen unterschiedlichen Erhaltungszustand möglichst gering zu halten. Der Unterschied des Färbeergebnisses zwischen HOPE[®]-fixiertem Gewebe und Gefriermaterial in der Milz von Tgb.-Nr. S179/10 ist also vermutlich nicht auf einen uneinheitlichen Erhaltungszustand zu-

rückzuführen. Es ist somit anzunehmen, dass die im Hinblick auf den Grad postmortalen Veränderungen „längere“ Nachweisbarkeit des Antigens in Gefriermaterial auf die grundsätzlich höhere Sensitivität dieser Methode zurückzuführen ist, die sich eben auch in Bezug auf den Antigenerhalt in postmortal verändertem Gewebe als überlegen äußert (Pelstring et al., 1991).

Der fehlende Nachweis von CD8 in HOPE[®]-fixiertem Milzgewebe von Tgb.-Nr. S180/10 ist zu vernachlässigen, da in diesem Fall aufgrund fortgeschrittener postmortalen Veränderungen auch in der zugehörigen Gefrierschnittkontrolle kein positives Signal erzielt wurde (siehe unter 4.1.2.3 und 5.1.1.1.1).

Analog zu den Beobachtungen bei Gefriermaterial (5.1.1.1.1.1) war anhand von Tgb.-Nr. S179/10 und Tgb.-Nr. S180/10 auch bei HOPE[®]-fixiertem Material zu bemerken, dass der Antigenerhalt von CD8 in Milzgewebe offensichtlich durch postmortale Veränderungen stärker beeinträchtigt wird als im Mesenteriallymphknoten, was auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Pallesen und Knudsen, 1985; Wintzer et al., 1988).

5.1.1.2.1.1.2 Erhaltungszustand Ausgangsmaterial

Unter Verwendung der HOPE[®]-Fixierung gelang der Nachweis von CD8 in allen untersuchten Proben unabhängig von Lagerungsart (postalisch zugesandtes und somit nicht gekühltes sowie zuvor gefrorenes Material) und Lagerungsdauer (eine Stunde (Tgb.-Nr. S359/07) bis drei Tage (Tgb.-Nr. S111/10)), solange der morphologische Strukturverlust durch postmortale Veränderungen nicht zu weit fortgeschritten war (siehe unter 4.1.2.3).

Da in den Herstellerempfehlungen der HOPE[®]-Fixierung explizit darauf hingewiesen wird, dass zuvor gefrorene Proben vor Inkubation in der Protektionslösung HOPE[®] I keinesfalls auftauen dürfen, ist der erfolgreiche immunhistologische Nachweis von CD8 an Lymphknotenmaterial der zuvor eingefrorenen und während der postalischen Beförderung wieder aufgetauten Tagebuchnummern S179/10 und S180/10 um so bemerkenswerter, auch wenn der morphologische Erhaltungszustand dieser beiden Proben im Vergleich zu den übrigen untersuchten Proben deutlich herabgesetzt war. Da der herabgesetzte morphologische Strukturerehalt auch in den Proben der anderen Fixierungsarten zu beobachten war, ist allerdings eher davon auszugehen, dass dieser auf den schlechten Erhaltungszustand des Ausgangsmaterials an sich zurückzuführen ist.

Die HOPE[®]-Fixierung hat sich im Hinblick auf den Nachweis von CD8 für Proben mit unterschiedlichem Erhaltungszustand als geeignet erwiesen. Lediglich bei Proben im Zustand fortgeschrittener postmortalen Veränderungen erbrachte sie ein unzureichendes Fixierungsergebnis, was zu vernachlässigen ist, da die Untersuchungsmöglichkeiten an derartigem Material ohnehin beschränkt sind. Sie wäre demnach auf das diesbezüglich heterogene Probenspektrum eines Routinediagnostiklabors anwendbar.

Naturgemäß ist ein für die humanmedizinische Diagnostik und Forschung entwickeltes Fixierungsverfahren wie die HOPE[®]-Technik grundsätzlich für den Einsatz unter optimalen Bedingungen an frischen, erst kurz zuvor entnommenen Gewebeproben vorgesehen. Auf die Veterinärpathologie übertragen bedeutet dies, dass die Zeitspanne zwischen dem Eintritt des Todes des Tieres, der Probenentnahme und dem Fixierungsbeginn idealerweise so kurz wie möglich zu halten ist, um ein bestmögliches Fixierungsergebnis zu erhalten. Andernfalls ist im Hinblick auf immunhistologische Untersuchungen die Gefahr von Antigenverlust und Artefaktbildung nicht auszuschließen (Meyer und Hornickel, 2010). Während diese zeitlichen Restriktionen bei chirurgisch entnommenen Gewebeproben und bei Studien an Versuchstieren sehr gut einzuhalten sind, liegt dies allerdings in der routinediagnostischen veterinärpathologischen Praxis hinsichtlich der Verfügbarkeit der Tierleichen und deren Lagerungsbedingungen ausserhalb des Einflussbereichs des Pathologen. In der täglichen Routine eines veterinärpathologischen Untersuchungsinstituts muss zwangsläufig mit Gewebematerial unterschiedlicher Frischegrade gearbeitet werden (Meyer und Hornickel, 2010). Es ist somit bei der Beurteilung zu berücksichtigen, dass die realen Bedingungen in der veterinärpathologischen Diagnostik nicht die Gegebenheiten widerspiegeln, unter denen das Fixierungsverfahren entwickelt wurde. Umso mehr ist die gute Fixierungsleistung der HOPE[®]-Technik gerade im Hinblick auf nicht mehr frisches Ausgangsmaterial hervorzuheben .

5.1.1.2.1.2 Einfluss der Fixierungsdauer

Anhand von Tgb.-Nr. S606/10 konnte nach Gewinnung von HOPE[®]-fixierten Proben unterschiedlicher Fixierungsdauer (siehe unter 3.3.3.1 und 3.4.5.2.3) festgestellt werden, dass grundsätzlich über einen Fixierungszeitraum von 17 Stunden bis zehn Tagen in den untersuchten Proben ein Nachweis von CD8 möglich war (siehe unter 4.1.3.1).

Das Ergebnis des Teilversuchs ist insbesondere im Hinblick auf die in den Milz- und Lymphknotenproben mit einer Fixierungsdauer von 17 h erzielte gute Färbeintensität bemerkenswert,

da in den Herstelleranweisungen für Lymphknoten als „zellreiches“ Gewebe explizit eine Fixierungsdauer von mindestens 40 h empfohlen wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch eine Überschreitung der dort angegebenen Kernfixierungsdauer von 12 - 72 h nicht zu einem Verlust der Nachweisbarkeit des Antigens führte.

Die beobachteten Schwankungen hinsichtlich der Färbeintensität beim internen Vergleich zwischen den HOPE[®]-fixierten Proben mit unterschiedlicher Fixierungsdauer sind im Hinblick auf die Gesamtaussage des Versuchs zu vernachlässigen. Dieser hatte die grundsätzliche Festlegung eines Zeitrahmens für die Fixierungsdauer zum Ziel, innerhalb dessen der Antigenerhalt von CD8 gewahrt bleibt. Die Schwankungen sind möglicherweise durch die Verwendung des Primärantikörpers in der eigentlich zu hohen Verdünnungsstufe 1:100 (statt der üblichen 1:50) erklärbar. Diese Verdünnung wurde absichtlich gewählt, um einen eventuell vorhandenen tendenziellen Abfall des Antigenitätserhalts eher erkennen zu können.

Worauf der fehlende Nachweis von CD8 in Milzgewebe nach einer Fixierungsdauer von 89 h zurückzuführen ist, bleibt unklar. Eine fehlerhafte Ausführung des Fixierungs- und Prozessierungsprozesses kann ausgeschlossen werden, da die stets parallel bearbeitete und während aller Prozessschritte in demselben Probengefäß inkubierte Probe vom Lymphknoten mit derselben Fixierungsdauer eine positive Reaktion aufwies. Somit ist mit der gleichen Sicherheit ein Fehler im Rahmen der immunhistologischen Inkubation zu verneinen, da sich das Lymphknotenmaterial auf demselben Objektträger wie das Milzgewebe befand und somit als interne Positivkontrolle angesehen werden kann.

Im Hinblick auf die eigentliche Aussage des Versuchsansatzes entscheidend ist jedoch die Tatsache, dass in sämtlichen länger fixierten Milzproben (Tgb.-Nr. S606/10 (HOPE[®], FD 103 h) und Tgb.-Nr. S606/10 (HOPE[®], FD 10 d)) der Nachweis von CD8 weiterhin gegeben war. Daher kann ausgeschlossen werden, dass der fehlende Nachweis von CD8 nach einer Fixierungsdauer von 89 h auf eine in der Länge der Fixierungsdauer begründete Abnahme des Antigenerhalts zurückzuführen ist. Da auch in allen Proben der Milz mit einer kürzeren Fixierungsdauer ein Nachweis von CD8 erfolgte, kann auch eine ungenügend lange Fixierungsdauer als Ursache verneint werden. Ein punktueller Abfall des Antigenerhalts um den Zeitraum einer Fixierungsdauer von 89 h ist als sehr unwahrscheinlich anzusehen und auch das Untersuchungsergebnis vom Lymphknotenmaterial spricht dagegen. Somit ist davon auszugehen, dass der Grund für die fehlende Nachweisbarkeit des Antigens möglicherweise in dem

Ausgangsmaterial selbst lag, auch wenn sich die Probe zumindest morphologisch nicht von den anderen unterschied und alle Proben stets in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander am jeweiligen Organ entnommen wurden (siehe unter 5.1.1.2.1.1.1).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die HOPE[®]-Fixierung - bezogen auf das untersuchte Antigen CD8 - grundsätzlich eine flexible Fixierungsdauer über einen Zeitraum von 17 h bis zehn Tagen ermöglichte, ohne dass ein Verlust der Nachweisbarkeit eintrat. Damit erfüllt die HOPE[®]-Fixierung die Anforderungen, die in der Routinediagnostik an ein Fixierungsverfahren gestellt werden, da dort im Hinblick auf eingeschränkte Arbeitszeiten der Mitarbeiter an Wochenenden und postalisch eingesandter, bereits fixierter Proben mit unterschiedlich langen Transportwegen zwangsläufig erhebliche Schwankungen in der Fixierungsdauer hingenommen werden müssen. Zudem kann sich eine verlängerte Fixierungsdauer auch durch eine Rückstellung und längere Aufbewahrung der Probe im Labor zwecks einer eventuell notwendigen Nacheinbettung ergeben (Moelans et al., 2011).

Vergleichbare Untersuchungen über den Einfluss der Fixierungsdauer auf den Erhalt von Antigenen bei der HOPE[®]-Fixierung sind in der Literatur nicht beschrieben. Dieser Aspekt wurde bislang lediglich hinsichtlich des Qualitätserhalts von RNA untersucht (Wiedorn et al., 2002). Dieser Studie zufolge hatte eine Fixierungsdauer von zehn Tagen auch im Hinblick auf RNA keinen wahrnehmbaren Qualitätsverlust zur Folge.

5.1.1.2.1.3 Einfluss der Entparaffinierung und Rehydrierung

Die anhand Tgb.-Nr. S359/07 erhobenen Ergebnisse belegen, dass auch nach einer von den Herstellerempfehlungen abweichenden Entparaffinierung und Rehydrierung mit Xylolersatz und Ethanol eine immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in HOPE[®]-fixiertem Material gelang (siehe unter 4.1.5).

Hiernach bestätigte sich die in den Empfehlungen des Herstellers enthaltene Einschränkung nicht, dass es bei Verwendung des herkömmlichen Entparaffinierungs- und Rehydrierungsverfahrens zu einem deutlichen Verlust des Antigenerhalts in HOPE[®]-fixiertem Gewebe kommen kann. Überraschenderweise lag die Färbintensität dieser Proben sogar über derjenigen der gemäß den Herstellerangaben behandelten Proben. Diese Beobachtung wurde hingegen in der Studie von Blaschitz et. al (2008), die HOPE[®]-fixiertes, humanes Plazentamaterial ebenfalls beiden Verfahrensweisen unterzogen, nicht gemacht. Im Gegenteil bemerkten die Auto-

ren bei einem von vier kryogängigen Antikörpern (Maus anti-human HLA-G1 und HLA-G5; clone MEM-G/9) eine Abnahme der Signalstärke in den mit Xylol entparaffinierten Schnitten.

Das herkömmliche Entparaffinierungs- und Rehydrierungsverfahren wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bei immunhistologischen Studien an HOPE[®]-fixiertem Gewebe angewendet, wobei u. a. auch Leukozytenoberflächenmarker nachgewiesen wurden (Boddu-Jasmine et al., 2008; Nikitina et al., 2011; Schultz et al., 2008).

5.1.1.2.1.4 Antigenerhalt

Die in den HOPE[®]-fixierten Proben mit positiver Reaktion ermittelte Färbeintensität lag in allen Fällen geringfügig oder deutlich niedriger als in der jeweiligen Gefrierschnittkontrolle. In Verbindung mit der Tatsache, dass die optimale Gebrauchsverdünnung im Vergleich zum Gefrierschnitt eine zehnfach höhere Konzentration erforderte, kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die HOPE[®]-Fixierung mit nachfolgender Paraffineinbettung hinsichtlich CD8 einen etwas schlechteren Antigenerhalt aufweist als die Gefrierschnitttechnik.

Im Unterschied zur Formalinfixierung ermöglichte die HOPE[®]-Fixierung die immunhistologische Darstellung des fixierungs- und prozessierungssensitiven T-Lymphozytenmarkers CD8 in paraffineingebettetem Gewebe unter Verwendung eines Antikörpers, der nach den Herstellerempfehlungen nur für den Gebrauch auf Gefriermaterial vorgesehen war. Somit ist die HOPE[®]-Fixierung der Formalinfixierung hinsichtlich des Antigenerhalts von CD8 in felinem, lymphatischem Gewebe deutlich überlegen.

Wie bereits beschrieben, lag die Färbeintensität in manchen HOPE[®]-fixierten Proben deutlich niedriger als in der jeweiligen Gefrierschnittkontrolle. Allerdings ließe sich diese Einschränkung bei routinemäßigem, diagnostischem Gebrauch eventuell durch die Verwendung eines Detektionssystems mit einer höheren Sensitivität als PAP ausgleichen (Ramos-Vara, 2005).

5.1.1.2.1.5 Fazit

Die HOPE[®]-Fixierung kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit als grundsätzlich geeignet für die immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in paraffineingebettetem, lymphatischem Gewebe der Katze beurteilt werden.

Solange im Bezug auf postmortale Veränderungen ein morphologischer Strukturhalt des Ausgangsmaterials gegeben war, konnte bei allen Tieren in allen untersuchten Organen ein Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten erbracht werden, ohne dass hierfür die Durchführung eines Antigen-Retrieval-Verfahrens notwendig war. Einschränkend muss allerdings bemerkt werden, dass die Färbeintensität bei manchen Proben deutlich schwächer war als bei der Gefrierschnitttechnik. Dem stehen wiederum die Vorteile gegenüber, die die Verwendung von paraffineingebettetem Material im Vergleich zu Gefriermaterial im Hinblick auf den Morphologieerhalt sowie hinsichtlich logistischer und praktischer Aspekte mit sich bringt. Außerdem ließe sich die Färbeintensität durch den Einsatz eines sensitiveren Detektionssystems vermutlich deutlich erhöhen (Ramos-Vara, 2005).

5.1.1.2.2 ZSF-Fixierung

5.1.1.2.2.1 Ergebnisse der Reihenuntersuchung

Unter Verwendung der ZSF-Fixierung mit anschließender modifizierter Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten konnte lediglich bei zwei der elf Tagebuchnummern in den untersuchten Proben eine immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten erzielt werden (Tgb.-Nr. S161/10 und Tgb.-Nr. S193/10). Hierbei fiel überwiegend eine uneinheitliche Färbeintensität innerhalb des Paraffinschnitts auf (siehe unter 4.1.2.4).

5.1.1.2.2.1.1 Analyse negativer Nachweise

Bei neun Tagebuchnummern konnte in keinem der beiden untersuchten ZSF-fixierten, lymphatischen Gewebe eine positive immunhistologische Reaktion erzielt werden.

Da die jeweiligen Gefrierschnittkontrollen stets eine positive Reaktion aufwiesen, ist ein grundsätzlicher Verfahrensfehler während der immunhistologischen Inkubation als Ursache für die fehlende Anfärbung mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Zudem wurde in denselben Inkubationsansätzen jeweils auch der positive Nachweis von CD8 in den ZSF-fixierten Geweben von Tgb.-Nr. S161/10 und Tgb.-Nr. S193/10 erzielt. Somit können diese als zusätzliche Positivkontrollen für diejenigen Prozessschritte zu Beginn der immunhistologischen Inkubation gewertet werden, bei denen sich die ZSF-fixierten Gewebe von den Gefrierschnittkontrollen unterschieden (Entparaffinierung und Rehydrierung und Hemmung der endogenen Peroxidase, siehe unter 3.4.3.1 und 3.4.3.4).

Unwahrscheinlich erscheint auch, dass der ausbleibende Nachweis von CD8 auf eine fehlerhafte Ausführung des Fixierungs- oder Prozessierungsverfahren bei diesen Proben zurückzuführen ist, da die von Beckstead (1994) geforderte maximale Probengröße eingehalten wurde und sämtliche Prozessschritte stets einheitlich durchgeführt wurden. Diese Möglichkeit kann als Ursache für den inkonstanten Nachweis des Antigens in ZSF-fixiertem Gewebe bei einigen Fällen sogar sicher ausgeschlossen werden. Denn auch bei Tagebuchnummern, deren Proben jeweils parallel mit denen der einzigen beiden Tagebuchnummern, bei denen ein positiver Nachweis erzielt werden konnte (Tgb.-Nr. S161/10 und Tgb.-Nr. S193/10), im selben Ansatz fixiert und prozessiert wurden und somit denselben Abläufen unterworfen waren, gelang der immunhistologische Nachweis von CD8 nicht. So wurden z. B. die Proben von Tgb.-Nr. S158/10 mit denen von Tgb.-Nr. S161/10 in einem gemeinsamen Ansatz fixiert und

prozessiert. Dies galt ebenso für Tgb.-Nr. S174/10, S176/10, S180/10 und S193/10. Für Proben eines gemeinsamen Fixierungsdurchgangs wurde stets eine demselben Ansatz entstammende ZSF-Lösung verwendet. Die Dauer der Fixierung war für diese Proben ebenfalls exakt gleich, und die Prozessierung erfolgte mit Ausnahme der zwei manuellen Dehydrierungsschritte, die ebenfalls an allen Proben parallel in einer gemeinsamen Küvette durchgeführt wurden, im Gewebereinbettungsautomaten.

Da Unterschiede hinsichtlich der Abläufe während der Fixierung, Prozessierung, Einbettung sowie immunhistologischen Inkubation als Begründung für den inkonstanten Nachweis von CD8 in ZSF-fixiertem Gewebe weitestgehend ausgeschlossen werden konnten, bleibt noch die Möglichkeit einer intrinsischen Ursache zu beleuchten, was unter 5.1.1.2.1.2 erfolgt.

5.1.1.2.2.1.2 Erhaltungszustand Ausgangsmaterial

Im Hinblick auf den inkonstanten immunhistologischen Nachweis von CD8 in ZSF-fixiertem Material ist auch an einen möglichen Einfluss des Erhaltungszustands des jeweiligen Ausgangsmaterials zu denken. So wäre zu überlegen, ob der Frischegrad des Ausgangsmaterials für die Wirksamkeit der Fixierung von Bedeutung sein könnte.

Mit Tgb.-Nr. S161/10 wies eine der beiden Tagebuchnummern, bei denen ein Nachweis von CD8 erzielt werden konnte, tatsächlich nur eine kurze Lagerungsdauer von zwölf Stunden auf (siehe Tabelle 8.1.1 im Anhang). Hingegen konnte in den übrigen Proben mit einer sehr kurzen Lagerungsdauer von nur einer Stunde (Tgb.-Nr. S359/07) oder von vier Stunden (Tgb.-Nr. S1525/06) keine positive Reaktion erzielt werden. Bei der zweiten durch einen positiven Nachweis von CD8 aufgefallenen Tagebuchnummer S193/10 handelte es sich um eine postalisch versandte Probe mit einer Lagerungsdauer von einem Tag. Diese Beobachtungen sprechen gegen die Möglichkeit, dass der Erhaltungszustand des Ausgangsmaterials im Hinblick auf den Frischegrad eine maßgebliche Rolle für den erfolgreichen Verlauf der ZSF-Fixierung spielt.

Mit Ausnahme von Tgb.-Nr. S179/10 und Tgb.-Nr. S180/10, die analog zu den jeweiligen Gefrierschnittkontrollen einen morphologischen Strukturverlust infolge fortgeschrittener postmortalen Veränderungen aufwiesen, zeigten die ZSF-fixierten Proben, in denen kein positiver Nachweis erzielt werden konnte, keinerlei morphologische Veränderungen, die auf eine Ursache für die fehlende Nachweisbarkeit von CD8 hindeuten.

Aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit von CD8 in der überwiegenden Anzahl der untersuchten ZSF-fixierten Proben erübrigt sich eine Wertung, inwieweit sich die Fixierungsmethode hinsichtlich des Erhaltungszustands des untersuchten Probenspektrums für den Einsatz in einem routinediagnostischen Labor eignet.

5.1.1.2.2.1.3 Uneinheitliche Anfärbung

In den ZSF-fixierten Proben der beiden Tagebuchnummern (Tgb.-Nr. S161/10 und Tgb.-Nr. S193/10), bei denen im Rahmen der Reihenuntersuchungen ein positiver immunhistologischer Nachweis von CD8 gelang, war überwiegend eine uneinheitliche Färbeintensität zu beobachten. Wie schon unter 4.1.2.4 erläutert wurde, konnte in den Arealen mit schwacher oder fehlender Anfärbung keine morphologische oder technisch bedingte Ursache für das schwächere Färbeverhalten beobachtet werden.

Derartige Unterschiede in der Färbeintensität innerhalb des gleichen Schnittes fielen bei den jeweils parallel immunhistologisch inkubierten HOPE[®]-fixierten Proben sowie den Gefrierschnittkontrollen der beiden Tagebuchnummern nicht auf. Somit erscheint ein grundsätzlicher Verfahrensfehler beim immunhistologischen Färbeprotokoll unwahrscheinlich. Dies umso mehr, als alle Inkubationsschritte nach dem Blockieren der endogenen Peroxidase (Wasserstoffperoxidkonzentration bei Gefrierschnitten zehnfach niedriger als bei Paraffinschnitten) bis zum Ende der enzymatischen Reaktion in der DAB-Lösung bei HOPE[®]- und ZSF-fixierten Proben sowie bei den Gefrierschnitten identisch waren. Somit bleibt vor allem der Prozess der Entparaffinierung und Rehydrierung, der im Fall der ZSF-fixierten Proben mit Xylolersatz und Ethanol erfolgte (siehe unter 3.4.3), um diese Unterschiede zu erklären.

Whiteland et al. (1995) beobachteten bei ihren Versuchen zum Nachweis von CD8⁺ T-Zellen in murinem Milzgewebe unter Verwendung der Periodat-Lysin-Paraformaldehyd-Methode ebenfalls eine uneinheitliche Färbeintensität innerhalb der Paraffinschnitte. Parallel inkubierte Gefrierschnitte zeigten hingegen auch bei dieser Forschungsgruppe eine einheitliche Anfärbung. Die Autoren vermuteten eine ungenügende Entparaffinierung durch zu häufig benutzten Xylolersatz als Ursache. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Entparaffinierung und Rehydrierung explizit auf die Verwendung frischer Reagenzien geachtet, sodass dieser Erklärungsansatz zwar nicht völlig ausgeschlossen werden kann, aber nicht als sehr wahrscheinlich anzusehen ist.

Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass die ZSF-Fixierung nicht in angemessener Zeit eine vollständige Durchdringung des Gewebes bewirkt, sodass es in den Arealen, in denen keine ausreichende Fixierung stattfand, zu einem Antigenverlust kommen kann. Die immunhistologische Nachweisbarkeit mancher Antigene hängt stark von ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Zersetzungsprozessen ab, sodass ein verzögerter Fixierungsbeginn durchaus zu einem fortschreitendem Verlust der Immunreaktivität eines Antigens bis hin zu dessen fehlender Nachweisbarkeit führen kann (Ramos-Vara et al., 2008; von Wasielewski et al., 1998; Webster et al., 2009; Werner et al., 2000). So führten Webster et al. (2009) ein uneinheitliches immunhistologisches Färbeverhalten innerhalb eines Schnittes auf unterschiedlich weit fortgeschrittene Autolyse- und Fäulnisprozesse zurück. Sie stützten ihre These mit der Beobachtung, dass die Färbeintensität in den peripheren Bezirken deutlich höher war als im Zentrum, was sie auf eine mangelnde Fixierung im Inneren der Probe zurückführten.

Allerdings konnte bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten ZSF-fixierten Proben diese Beobachtung nicht gemacht werden. Hier war die Verteilung der angefärbten Areale, die eine positive Reaktion aufwiesen, unregelmäßig und es gab auch immer wieder in zentralen Schnittanteilen Regionen mit starker Anfärbung. Diese Beobachtung spricht auch gegen die Möglichkeit, dass sich die Bekapselung der Organe oder die Probengröße nachteilig auf die Fixierung auswirken könnten, wobei auch stets darauf geachtet wurde, die von Beckstead (1994) vorgegebene Probenbreite von 3 mm einzuhalten und die Proben an mehreren Seiten anzuschneiden, um möglichst große und hindernisfreie Diffusionsflächen zu schaffen. Ferner fiel bei Durchsicht der Schnitte auf, dass kleinere Proben kein besseres Färbeverhalten aufwiesen als solche mit einer größeren Kantenlänge.

Gegen die Theorie einer letztlich unzureichenden Fixierungsleistung von ZSF infolge einer mangelnden Durchdringung des Gewebes spricht zudem die bei den Reihenuntersuchungen anhand von Tgb.-Nr. S161/10 und Tgb.-Nr. S193/10 gemachte Beobachtung, dass das Phänomen der ungleichmäßigen Anfärbung bei längerer Fixierungsdauer zunahm und die Färbeintensität insgesamt abnahm (siehe unter 4.1.2.4).

Die Tatsache, dass bei allen untersuchten ZSF-fixierten Proben mit entsprechend frischem Ausgangszustand auch im Zentrum stets ein hervorragender Morphologieerhalt beobachtet werden konnte (siehe unter 4.2.4), spricht ebenfalls gegen diesen Erklärungsansatz. Bei ungenügender Fixierungsleistung wäre nämlich im Zentrum der jeweiligen Probe ein verstärktes

Auftreten von morphologischem Strukturverlust infolge von Fäulnis und Autolyseprozessen zu erwarten gewesen.

Es ist daher davon auszugehen, dass die ungleichmäßige Anfärbung innerhalb der Proben als Anzeichen dafür zu werten ist, dass der mit der ZSF-Fixierung erzielte Antigenerhalt im Hinblick auf das eingesetzte Detektionssystem (PAP) zu niedrig ist und offensichtlich dessen Nachweisgrenze unterschritten wird.

5.1.1.2.2 Einfluss der Fixierungsdauer

Analog zu den Beobachtungen bei den Reihenuntersuchungen fiel auch bei den Untersuchungen zum Einfluss der Fixierungsdauer auf den Antigenerhalt anhand von Tgb.-Nr. S606/10 die inkonstante Nachweisbarkeit von CD8 in ZSF-fixiertem Gewebe auf, da lediglich im Milzgewebe ein Nachweis von CD8 zu erzielen war (siehe unter 4.1.3.2). Hingegen konnte das Antigen in keiner der unterschiedlich lange fixierten Proben des Lymphknotens nachgewiesen werden. Da beide Proben gemeinsam auf demselben Objektträger inkubiert wurden, kann ein Verfahrensfehler während des immunhistologischen Inkubationsansatzes als Ursache für den fehlenden Nachweis im Lymphknoten sicher ausgeschlossen werden. Da auch der Fixierungs- und Prozessierungsvorgang für beide Proben parallel ablief, kann auch hierin keine mögliche Begründung für den offensichtlich eingetretenen Verlust der Nachweisbarkeit des Antigens im Sinne einer fehlerhaften Behandlung der Probe gefunden werden. Worauf der fehlende Nachweis im ZSF-fixierten Lymphknotenmaterial zurückgeführt werden kann, bleibt auch in diesem Fall unklar. Wiederum muss an eine intrinsische, im Ausgangsmaterial selber liegende Ursache gedacht werden. Allerdings konnte auch bei diesem Versuch analog zu den Reihenuntersuchungen bei keiner der Proben eine morphologische Veränderung oder eine schnittbedingte Artefaktbildung beobachtet werden, die auf eine Ursache für die fehlende Anfärbbarkeit im Hinblick auf CD8 hindeuten würde.

Hinsichtlich der Fixierungsdauer konnte anhand der Milzproben festgestellt werden, dass grundsätzlich über einen Fixierungszeitraum von 24 Stunden bis zehn Tagen in den untersuchten Proben ein Nachweis von CD8 möglich war (siehe unter 4.1.3.2). Dies entsprach den Aussagen von Beckstead (1994) und wurde auch von Benavides et al. (2006) in einer ähnlichen Studie beschrieben. Die beobachteten Schwankungen hinsichtlich der Färbeintensität beim internen Vergleich zwischen den ZSF-fixierten Milzproben mit unterschiedlicher Fixierungsdauer sind im Hinblick auf die Gesamtaussage des Versuchs zu vernachlässigen. Bei

diesem Vergleich sollte der Zeitrahmen der Fixierungsdauer festgelegt werden, in dem grundsätzlich der Antigenerhalt von CD8 gewahrt blieb. Die Schwankungen sind möglicherweise durch die Verwendung des Primärantikörpers in der eigentlich zu hohen Verdünnungsstufe 1:100 (statt der üblichen 1:50) erklärbar, die absichtlich gewählt wurde, um einen eventuell vorhandenen tendenziellen Abfall des Antigenitätserhalts eher erkennen zu können.

Im Unterschied zu den Reihenuntersuchungen konnte bei diesem Teilversuch lediglich bei einer ZSF-fixierten Probe eine uneinheitliche Färbeintensität beobachtet werden. Allerdings ist im Hinblick auf diese Diskrepanz zu den Ergebnissen der Reihenuntersuchungen anzumerken, dass es sich bei den für diesen Teilversuch entnommenen Proben jeweils um sehr kleine Proben handelte, um genügend Material für alle Fixierungszeiten zur Verfügung zu haben. Somit konnte anders als bei den Reihenuntersuchungen, bei denen stets ganze Organscheiben verwendet wurden, kein Querschnitt über das ganze Organ beurteilt werden.

Des Weiteren ist zu anzumerken, dass das Phänomen der uneinheitlichen Anfärbung auch bei den Reihenuntersuchungen im Lymphknoten deutlich stärker ausgeprägt war als in der Milz (siehe unter 4.1.3.2). Lymphknotenmaterial lag allerdings aufgrund der fehlenden positiven Reaktion bei diesem Versuch gar nicht zur Beurteilung vor.

Anhand der Ergebnisse dieses Teilversuchs konnte zumindest ausgeschlossen werden, dass die in den Reihenuntersuchungen aufgefallene inkonstante Nachweisbarkeit von CD8 auf die Wahl einer falschen Fixierungsdauer zurückzuführen war. Denn im Milzgewebe war der Nachweis von CD8 über eine weite Spanne von Fixierungszeiten gegeben. Hingegen war im Lymphknotengewebe zu keinem untersuchten Zeitpunkt der Fixierungsdauer ein Nachweis von CD8 möglich, was eher für eine intrinsische Ursache bei dieser Probe spricht.

5.1.1.2.2.3 Einfluss des Prozessierungsprotokolls

5.1.1.2.2.3.1 Einfluss der modifizierten Prozessierung im Gewebeeinbettungsautomaten

Für die fehlende Nachweisbarkeit von CD8 bei der Mehrzahl der im Rahmen der Reihenuntersuchungen betrachteten ZSF-fixierten Proben konnte keine stichhaltige Erklärung gefunden werden (siehe unter 5.1.1.2.2.1.1). Da diese Ergebnisse der Aussage der Studie von Beckstead (1994) bezüglich des hervorragenden Antigenerhalts bei der ZSF-Fixierung widersprachen, sollte überprüft werden, ob durch Einhaltung des von Beckstead in seiner Publikation angege-

benen Prozessierungsprotokolls ein besserer Antigenerhalt in den ZSF-fixierten Proben erzielt werden konnte (siehe unter 3.3.4.2 und 3.4.5.2.4.1).

Hierzu ist vorab anzumerken, dass vor der Probengewinnung für die Reihenuntersuchung anhand von Vorversuchen überprüft worden war, ob sich auch nach Angleichung des von Beckstead (1994) beschriebenen Prozessierungsprotokolls an die insitutsinternen Abläufe ein Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten in den ZSF-fixierten, lymphatischen Organen der Katze erzielen ließ. Da sich dies im Rahmen der Vorversuche bestätigte, bestand kein Grund, von der gewählten modifizierten Vorgehensweise der Prozessierung im Gewebereinbettungsautomaten abzuweichen.

Zudem konnten zahlreiche Studien gefunden werden, die eine erfolgreiche Verwendung der ZSF-Fixierung, z. T. auch für den immunhistologischen Nachweis von Leukozytenoberflächenantigenen, unter Einsatz von nicht näher erläuterten internen Standardprotokollen (Breugelmans et al., 2011a; Buxton et al., 2002; Caluwaerts et al., 2005; Casteleyn et al., 2008; Cocquyt et al., 2008; Fragkou et al., 2010; Geusens et al., 2008; Hicks et al., 2006; Stanley et al., 2001; Trzpis et al., 2008; Vercruyse et al., 2006; Wester et al., 2003) oder sogar eines explizit von den Vorgaben von Beckstead (1994) abweichenden Prozessierungsprotokolls belegten (Breugelmans et al., 2011b; Gonzalez et al., 2001; Lang et al., 2000; Löhler et al., 2009; Lykidis et al., 2007; Paavilainen et al., 2010; Pineda et al., 2011; Rojo-Botello et al., 2012; Sai et al., 2001; Suraud et al., 2007; Taylor et al., 2011; van den Broek et al., 2005). Bei den Studien von Breugelmans et al. (2011b), Gonzalez et al. (2001) und van den Broek et al. (2005) gelang trotz Abweichung vom Prozessierungsprotokoll nach Beckstead (1994) sogar die erfolgreiche immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in ovinen Geweben.

Die Ergebnisse des Vergleichs der manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessierten ZSF-M Proben mit den nach dem modifizierten Protokoll im Gewebereinbettungsautomaten prozessierten ZSF-fixierten Proben anhand von Tgb.-Nr. S359/07 deuten darauf hin, dass die Wahl des Prozessierungsverfahrens bei der ZSF-Fixierung offensichtlich einen Einfluss auf den Antigenerhalt von CD8⁺ T-Lymphozyten in lymphatischen Geweben der Katze hat (siehe unter 4.1.4.1). Während in den nach dem modifizierten Protokoll im Gewebereinbettungsautomaten prozessierten Proben in beiden Organen kein Nachweis von CD8 erzielt werden konnte, gelang bei Einhaltung des von Beckstead (1994) publizierten Prozessierungspro-

tokolls in den ZSF-M Proben ein Nachweis von CD8. Hieraus kann geschlossen werden, dass im Rahmen der ZSF-Fixierung durch manuelle Prozessierung nach dem Protokoll von Beckstead (1994) im Hinblick auf die Nachweisbarkeit von CD8⁺ T-Lymphozyten in feinem Gewebe offensichtlich ein besserer Antigenerhalt erzielt werden kann.

Diese Beobachtung deckt sich mit der von Beckstead (1994) im Rahmen seiner Studie gewonnenen Einschätzung, wonach sich insbesondere eine Erhöhung der Prozesstemperatur auf 37 °C, eine Ausdehnung der Inkubationszeit in Xylol auf mehr als eine Stunde und eine Verlängerung der Paraffinierungsdauer über die von ihm empfohlenen 30 Minuten hinaus negativ auf den Antigenerhalt der von ihm untersuchten Leukozytenoberflächenmarker auswirkten. In dem insitutsinternen Prozessierungsprotokoll werden alle drei Bedingungen erfüllt (siehe Tabelle 8.1.3 im Anhang). Durch die in diesem Teilversuch gemachten Beobachtungen ließe sich unter Berücksichtigung der Erkenntnisse von Beckstead (1994) ein nach der Anwendung des modifizierten Protokolls in allen Proben gleichmäßig herabgesetzter Antigenerhalt zufriedenstellend erklären.

Allerdings lassen sich mit diesem Erklärungsansatz nicht die bei den Reihenuntersuchungen beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren hinsichtlich des erzielten Nachweises von CD8 begründen (siehe unter 4.1.2.4). Denn alle ZSF-fixierten Proben wurden (bis auf die manuell ausgeführten ersten beiden Dehydrierungsstufen in 50%igem und 70%igem Ethanol) einem automatisierten Prozessierungsverfahren unterzogen und waren damit denselben Prozessbedingungen unterworfen. Hinzu kommt noch die bereits unter 5.1.1.2.2.1.1 dargelegte Tatsache, dass diese Unterschiede in Bezug auf die Nachweisbarkeit von CD8 sogar bei Proben beobachtet wurden, die gemeinsam im selben Ansatz prozessiert wurden.

Grundsätzlich muss bei jedem Fixierungsverfahren von einer möglichen Reduzierung der reaktiven antigenen Bindungsstellen im Gewebe ausgegangen werden, wobei dies sowohl auf das Fixans selber als auch auf die im Rahmen der Fixierung und Prozessierung eingesetzten Substanzen zurückgeführt werden kann (Daneshtalab et al., 2010; Dapson, 1993, 2007c; Srinivasan et al., 2002; Titford und Horenstein, 2005; Vollmer et al., 2006; Werner et al., 2000). Diese Einschätzung wird auch von Dapson (1993) gestützt, demzufolge jedes Molekül, das mit einem Makromolekül im Gewebe eine chemische Bindung eingeht, potenziell eine Veränderung von dessen Tertiär- und Quartiärstruktur auslösen kann. Danach ist also nicht auszuschließen, dass im Zuge des ZSF-Fixierungs- und Prozessierungsvorgangs eine wie auch im-

mer geartete Maskierung des feline T-Lymphozytenmarkers CD8 auftritt und somit ein im Vergleich zur Gefrierschnittkontrolle herabgesetzter Antigenerhalt auftreten kann. Jedoch lassen sich auch mit diesem Erklärungsansatz nicht die beobachteten Abweichungen zwischen den ZSF-fixierten Proben hinsichtlich des Nachweises von CD8 erklären.

Auch wenn durch den Einsatz der manuellen Prozessierung nach Beckstead (1994) eine Verbesserung des Antigenerhalts erzielt werden konnte, so muss doch einschränkend gesagt werden, dass die hierbei erreichte Färbeintensität in den ZSF-Proben beider Organe jeweils so schwach war, dass sie keinesfalls als zufriedenstellend bezeichnet werden kann. Sie war in beiden Proben im Vergleich zur Gefrierschnittkontrolle deutlich herabgesetzt. Damit stehen die Ergebnisse dieses Versuchsteils im Widerspruch zu den Ergebnissen von Beckstead (1994), der in seiner Arbeit in den ZSF-fixierten Proben einen vergleichbar guten Antigenerhalt wie in den Gefrierschnitten beobachtete.

5.1.1.2.2.3.2 Einfluss der Paraffinierungsdauer

Ein Nachteil des von Beckstead (1994) beschriebenen Prozessierungsprotokolls bestand darin, dass es - auch bei Verwendung eines Gewebeeinbettungsautomaten mit Laufzeit über Nacht - aufgrund der Limitierung der Paraffinierungsdauer auf 30 Minuten eine Bearbeitung der Proben innerhalb der üblichen Tagesarbeitszeiten in einem Routinelabor nicht ermöglichte. Eine andere Beurteilung wäre jedoch dann geboten, wenn eine Ausdehnung der Paraffinierungsdauer durchführbar wäre, ohne dass ein wahrnehmbarer Antigenverlust aufträte. Vor diesem Hintergrund der Integrierbarkeit der Methode in die Abläufe in einem Routinediagnostiklabor wurde dieser Teilversuch durchgeführt. Allerdings erbrachte die Anwendung des Prozessierungsprotokolls nach Beckstead (1994) zwar eine Verbesserung des Antigenerhalts, jedoch war dieser nur so unwesentlich, dass auch die hiermit erzielte Färbeintensität nicht als zufriedenstellend gewertet werden konnte (siehe unter 5.1.1.2.2.3.1).

Damit lassen sich aus den unter 4.1.4.2 gewonnenen Ergebnissen keine Anhaltspunkte dafür erkennen, dass sich bei einer Prozessierung der Proben nach dem Protokoll von Beckstead (1994) eine Verlängerung der Paraffinierungsdauer auf bis zu 12,5 h nachteilig auf den Antigenerhalt auswirkt, wenngleich Beckstead (1994) in seiner Studie gegenteilige Ergebnisse erzielte.

5.1.1.2.2.4 Antigenerhalt

Der unter Verwendung der ZSF-Fixierung erzielte Antigenerhalt von CD8 ist im Vergleich zu Gefriermaterial als deutlich unterlegen anzusehen, da lediglich bei drei von zwölf untersuchten Katzen ein immunhistologischer Nachweis von CD8 gelang. Im Falle eines positiven Nachweises lag die ermittelte Färbeintensität des ZSF-fixierten Materials dabei immer geringfügig oder deutlich unter derjenigen der jeweiligen Gefrierschnittkontrolle. Die Färbeintensität war zudem bei der überwiegenden Zahl der ZSF-fixierten Proben innerhalb eines Schnittes uneinheitlich.

In Verbindung mit der Tatsache, dass die optimale Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers im Vergleich zur Gefrierschnitttechnik eine zehnfach höhere Konzentration erforderte, kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die ZSF-Fixierung bei lymphatischem Gewebe der Katze hinsichtlich CD8 einen deutlich schlechteren Antigenerhalt gewährleistet als die Gefrierschnitttechnik.

Die Notwendigkeit einer niedrigeren Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers für den Einsatz auf ZSF-fixiertem Gewebe im Vergleich zu Gefriermaterial deckt sich mit Beobachtungen von Breugelmans et al. (2011c), wonach die Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers für den Nachweis von CD8 an Gefriermaterial im Vergleich zu ZSF-fixiertem Material sogar um das 1000fache erhöht werden konnte.

Da im Unterschied zur Formalinfixierung immerhin bei drei Tagebuchnummern ein positiver immunhistologischer Nachweis des fixierungs- und prozessierungssensitiven T-Lymphozytenmarkers CD8 in paraffineingebettetem Gewebe gelang, ist der Antigenerhalt von ZSF-fixiertem Gewebe im Vergleich zu formalinfixiertem Material als besser einzustufen, zumal der verwendete Antikörper nur für den Gebrauch auf Gefriermaterial vorgesehen war. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Studie von Hicks et al. (2006) überein, in der ebenfalls ohne Antigen-Retrieval-Maßnahmen der Nachweis von CD8 in murinem, ZSF-fixiertem Gewebe gelang, während dies in formalinfixiertem Material auch unter Anwendung von Antigen-Retrieval-Verfahren nicht möglich war. Ähnliche Beobachtungen machten Breugelmans et al. (2011c) an ovinem Gewebe. Auch Ihnen gelang neben drei anderen Lymphozytenmarkern die Darstellung von CD8 in ZSF-fixiertem Gewebe, während in formalinfixiertem Gewebe auch nach Anwendung von Antigen-Retrieval-Methoden für kein Antigen ein positives

Ergebnis erzielt werden konnte. Allerdings wurde in diesen Studien kein inkonstanter Nachweis von CD8 beschrieben.

5.1.1.2.2.5 Fazit

Da unter Verwendung der ZSF-Fixierung mit modifizierter Prozessierung im Gewebereinbettungsautomaten eine immunhistologische Darstellung von CD8 nur inkonstant in ZSF-fixiertem Gewebe gelang, ist das Fixierungsverfahren für den Nachweis dieses Antigens in feline, lymphatischem Gewebe im Rahmen der Routinediagnostik nicht geeignet.

Auch eine manuelle Prozessierung nach dem Originalprotokoll von Beckstead (1994) führte nicht zu zufrieden stellenden Ergebnissen, die einen verlässlichen Antigennachweis von CD8 in feline, lymphatischem Gewebe belegen.

5.1.2 Immunhistologische Kontrollen

Wie unter 4.1.6 beschrieben, konnte in Geweben aller Fixierungsmethoden nach erfolgter immunhistologischer Inkubation vereinzelt eine unerwünschte, nicht antigenspezifische, zytoplasmatische Anfärbung von mononukleären, makrophagenartigen, zytoplasmareichen Zellen beobachtet werden.

Aufgrund des charakteristischen Erscheinungsbildes dieser Zellen und ihrer Lokalisation (im Mesenteriallymphknoten vor allem im Bereich des Parakortex, seltener auch im Follikel- und Markbereich, sowie in der Milz in der roten Pulpa) handelt es sich bei den von der unerwünschten Anfärbung betroffenen Zellen vermutlich um Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems (MPS) (Abbas et al., 2007b; Tizard, 2009c, d).

Das Auftreten der Anfärbung in Negativ- und Positivkontrolle sowie die fehlende Abnahme der Intensität des Signals bei der Verwendung höherer Verdünnungsstufen des Primärantikörpers und des nicht reagierenden Antikörpers T1 ließen bereits vermuten, dass die beschriebene Anfärbung nicht auf einer alleinigen spezifischen Bindung durch einen dieser beiden Antikörper beruhte. Die Tatsache, dass die unerwünschte Färbung erst verschwand, wenn der Tertiärkörper (PAP) ausgelassen wurde, und auch bei Auslassung der beiden anderen Antikörper nicht wahrnehmbar abnahm, spricht dafür, dass die Anfärbung zumindest hauptsächlich auf den Tertiärantikörper zurückzuführen war. In der Literatur wurde das Auftreten einer uner-

wünschten, nicht antigenspezifischen Anfärbung von Zellen im Zusammenhang mit der Verwendung von PAP auch von anderen beschrieben (van der Beek et al., 1992).

Ein Erklärungsansatz liegt in einer möglichen Bindung der Fc-Region des Tertiärantikörpers (PAP) durch Fc-Rezeptoren auf den Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems. Allerdings ist dieses Phänomen, von Ausnahmen abgesehen (van der Beek et al., 1992), vor allem bei nativen Geweben zu beobachten, während es bei fixierten und paraffineingebetteten Gewebeproben und acetonfixierten Gefrierschnitten aktuellen Untersuchungen zufolge kaum von Bedeutung ist, da Fc-Rezeptoren üblicherweise im Rahmen der Fixierung und Prozessierung zerstört werden (Buchwalow et al., 2011; Ramos-Vara, 2005). Im vorliegenden Fall sprechen sowohl die Tatsache, dass alle von der unerwünschten Anfärbung betroffenen Gewebe (auch die Gefrierschnitte) einem Fixierungsprozess unterzogen wurden sowie das uneinheitliche Verteilungsmuster der angefärbten Zellen gegen eine Fc-Rezeptor-vermittelte Bindung des Tertiärantikörpers. Denn insbesondere in der Milz wäre aufgrund der hohen Anzahl von mononukleären Zellen des MPS eine zumindest gleich starke Ausprägung der Anfärbung wie im Lymphknoten zu erwarten gewesen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in der hohen Affinität, die bestimmte bakterielle Proteine wie z. B. die Zellwandbestandteile Protein A (*Staphylococcus aureus*) und Protein G (*Streptococcus* sp.) für die Fc-Region vieler Immunglobuline G (IgG) und damit auch für den PAP-Komplex aufweisen (Akerström et al., 1985; Björck und Kronvall, 1981; Hsu und Raine, 1981). Dieses Phänomen ist in der Literatur mehrfach beschrieben und wurde beispielsweise auch im Rahmen von immunhistologischen Nachweisverfahren sowie zur Verringerung nicht antigenspezifischer Bindungen durch Blockierung der Fc-Region der verwendeten Antikörper genutzt (Akerström et al., 1985; Hsu und Raine, 1981; van der Beek et al., 1992).

Es ist somit nicht auszuschließen, dass im vorliegenden Fall die Fc-Region des Tertiärantikörpers (PAP) an Zellbestandteile mit ähnlichen Eigenschaften wie Protein A und G von Bakterien bindet, die nach agonaler Passage der Darmschranke von Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems phagozytiert wurden, wodurch die beobachtete feingranuläre, z. T. lokal begrenzte zytoplasmatische Anfärbung von makrophagenartigen Zellen in den beschriebenen Arealen auftreten könnte. Dieser Erklärungsansatz würde gleichzeitig begründen, warum die angefärbten Zellen häufiger im Mesenteriallymphknoten (und hier vor allem im Bereich des Parakortex) und seltener in der Milz zu beobachten waren.

Aufgrund ihres lediglich vereinzelt auftretens sowie ihrer granulären Struktur und hauchzarten hellbraunen Farbe ließ sich die unerwünschte spezifische Anfärbung gut von der beabsichtigten immunhistologischen Markierung der CD8⁺ T-Lymphozyten, der eigentlichen Zielzellen, abgrenzen. Zudem unterschieden sich die von der unerwünschten Anfärbung betroffenen makrophagenartigen Zellen hinsichtlich ihrer charakteristischen Morphologie stark von CD8⁺ T-Lymphozyten, sodass stets eine eindeutige Ansprache der positiven CD8⁺ T-Lymphozyten möglich war. Die unerwünschte Anfärbung stellte somit hinsichtlich der Auswertbarkeit der immunhistologischen Reaktion keine Einschränkung dar.

5.2 Morphologieerhalt

5.2.1 Herkömmliche Methoden

5.2.1.1 Gefrierschnitttechnik

Die Gefrierschnitttechnik bot im Hinblick auf den Morphologieerhalt von Organ- und Zellstrukturen eine lediglich eingeschränkte Detaillierbarkeit (siehe unter 4.2.1), was mit der allgemein in der Literatur vorherrschenden Einschätzung diesbezüglich übereinstimmt (Blaschitz et al., 2008; Bos et al., 2000; Braun et al., 2011; Brenes et al., 1986; Breugelmans et al., 2011c; Casey et al., 1988; Collings et al., 1984; Gonzalez et al., 2001; Hadler-Olsen et al., 2010a; Hewitt et al., 2008; Hicks et al., 2006; Holgate et al., 1983; Kähler et al., 2010; Kim et al., 2004; Kunder et al., 2007; Leong et al., 2010; Linder, 1991; Löhler et al., 2009; Mueller et al., 2011; Paavilainen et al., 2010; Rathkolb et al., 1997; Shi et al., 2008; Stein et al., 1984; Vincek et al., 2005; Vollmer et al., 2006; Whiteland et al., 1995; Williamson et al., 1998).

5.2.1.2 Formalinfixierung

Der unter Verwendung der Formalinfixierung erzielte Morphologieerhalt konnte als sehr gut beurteilt werden (siehe unter 4.2.2). Dies entsprach dem Anspruch, den Formalin als Standardfixans für die histopathologische Beurteilung von Geweben erfüllt (Blum, 1893, 1894; Buesa, 2008; Kothmaier et al., 2011; Leong et al., 2010; Moelans et al., 2011; Paavilainen et al., 2010; Preusser et al., 2010; Srinivasan et al., 2002; Vollmer und Goldmann, 2011).

5.2.2 Alternative Methoden

5.2.2.1 HOPE[®]-Fixierung

Der Morphologieerhalt von HOPE[®]-fixiertem Gewebe war bezüglich der Detailerkennbarkeit der zellulären Strukturen geringfügig schlechter als der von formalinfixiertem Material (siehe unter 4.2.3). Damit entsprachen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht der Einschätzung einiger Forschungsgruppen, welche den Morphologieerhalt von HOPE[®]-fixiertem Gewebe als vergleichbar mit dem von formalinfixiertem Material beurteilten (Blaschitz et al., 2008; Braun et al., 2011; Goldmann et al., 2002; Goldmann et al., 2003; Goldmann et al., 2006; Kähler et al., 2010; Schewe et al., 2005; Sen Gupta et al., 2003).

In Übereinstimmung mit Anderle et al. (2008), Blaschitz et al. (2008), Braun et al. (2011) und Kähler et al. (2010) konnte der Morphologieerhalt von HOPE[®]-fixiertem Gewebe gegenüber Gefriermaterial als deutlich überlegen eingestuft werden.

Lediglich in einer Studie wurde eine erhöhte Neigung zur Spaltbildung in HOPE[®]-fixiertem Ösophagusgewebe bei verschiedenen Tierarten bemängelt (Hornickel et al., 2011a). Die Möglichkeit des Auftretens dieses Phänomens wurde allerdings bereits von den Entwicklern des Fixierungsverfahrens insbesondere bei zelldichten Geweben wie Lymphknoten beschrieben (Olert et al., 2001) und im Rahmen dieser Arbeit nicht als beeinträchtigend wahrgenommen.

5.2.2.2 ZSF-Fixierung

Der unter Verwendung der ZSF-Fixierung erzielte Morphologieerhalt konnte im Vergleich mit Gefriermaterial als deutlich überlegen eingestuft werden (siehe unter 4.2.4). Hinsichtlich der Formalinfixierung konnte in ZSF-fixiertem Gewebe ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden. Zu diesem Ergebnis kam auch die Studie von Hadler-Olsen et al. (2010a). Dem widersprach die Auffassung von Löhler et al. (2009), wonach der Morphologieerhalt in ZSF-fixiertem Material deutlich schlechter als der in formalinfixiertem Gewebe war.

Die unter 4.2.4 beschriebene Beobachtung, dass bei ZSF-fixiertem Material die Zellzwischenräume geringfügig größer und die Kernstrukturen kompakter erschienen als bei formalinfixiertem Material, wurde auch von der Arbeitsgruppe um Wester (2003) gemacht. Sie führte diese Phänomene auf eine im Vergleich zu formalinfixiertem Material um 37 % erhöhte Schrumpfung des Gewebes zurück

6 Zusammenfassung / Summary

6.1 Zusammenfassung

1. Ziel dieser Arbeit war es, unter Verwendung der ZSF-Fixierung nach Beckstead (1994) und der kommerziellen HOPE[®]-Fixierung die Eignung dieser beiden alternativen aldehydfreien Fixierungsverfahren für die immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in paraffineingebettetem, lymphatischem Gewebe der Katze zu untersuchen.
2. In der Literaturübersicht wird zunächst die Problematik der immunhistologischen Darstellung von fixierungs- und prozessierungssensitiven Antigenen am Beispiel des T-Lymphozytendifferenzierungsantigens CD8 erläutert. Im Anschluss werden die beiden alternativen Fixierungsverfahren vorgestellt und ein kurzer Überblick über ihren bisherigen Einsatz in der Forschung unter besonderer Berücksichtigung des immunhistologischen Nachweises von CD8⁺ T-Lymphozyten in diversen Geweben verschiedener Spezies gegeben.
3. Milz und Mesenteriallymphknoten von zwölf Katzen wurden jeweils parallel der Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-Fixierung unterzogen, prozessiert und in Paraffin eingebettet. Zusätzlich wurden jeweils Gefrierblöcke angefertigt, die als Positivkontrollen und als Standard für die Beurteilung der Färbeintensität dienten. Bei der ZSF-Fixierung erfolgte die Prozessierung nach einem institutsinternen modifizierten Protokoll, nachdem in Vorversuchen in dem auf diese Weise prozessierten Gewebe ein positiver Nachweis des T-Zelldifferenzierungsantigens CD8 hatte erzielt werden können. Die unterschiedlich fixierten Proben eines Tieres wurden jeweils parallel in einem Inkubationsansatz gefärbt und die Formalin-, HOPE[®]- und ZSF-fixierten Proben hinsichtlich ihrer Färbeintensität (Intensität des Signals und Anzahl der eindeutig positiven Zellen) mit der jeweiligen Gefrierschnittkontrolle verglichen.
4. Eine immunhistologische Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in formalinfixiertem Material war bei keiner Probe möglich.
5. Unter Verwendung der HOPE[®]-Fixierung gelang bei allen Proben der Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten, sofern im Hinblick auf postmortale Veränderungen ein mor-

phologischer Strukturertalt des Ausgangsmaterials gegeben war. Die Gefrierschnittkontrollen wiesen jedoch gegenüber den HOPE[®]-fixierten Proben in allen Fällen einen überlegenen Antigenerhalt auf; hingegen zeigten sie einen deutlich schlechteren Morphologieerhalt als diese. Im Vergleich zu formalinfixiertem Material war der Morphologieerhalt von HOPE[®]-fixiertem Gewebe geringfügig herabgesetzt.

6. In ZSF-fixiertem Material gelang lediglich bei drei von zwölf Tieren ein Nachweis von CD8⁺ T-Lymphozyten. Der Morphologieerhalt in ZSF-fixiertem Material wurde als vergleichbar mit formalinfixiertem Material beurteilt und war dem von Gefrierschnitten deutlich überlegen.

6.2 Summary

1. The aim of the study was the immunohistological demonstration of CD8⁺ T cells in paraffin-embedded feline lymphoid tissues by using two alternative aldehyde-free fixation methods: the ZSF-fixation published by Beckstead (1994) and the commercial HOPE[®]-fixation.
2. Using the example of the CD8-antigen of T-cells, the problem of the immunohistological detection of fixation- and processing-sensitive antigens is briefly outlined. The two alternative fixation methods are introduced and a short review on their previous fields of application is given with particular regard to the immunohistological demonstration of CD8⁺ T-cells in tissues of various species.
3. Specimens of spleen and mesenterial lymph nodes of twelve cats were fixed with formalin, HOPE[®] and ZSF, processed and subsequently embedded in paraffin respectively. A portion of each tissue was snap-frozen for comparison. Regarding ZSF-fixation, a modified in-house protocol was used after preceding experiments had shown that the T-cell marker CD8 could be detected in specimens processed according to this modified protocol. The paraffin-embedded as well as the frozen sections were stained immunohistologically in parallel. Finally, the formalin-, HOPE[®]- and ZSF-fixed sections were compared to the frozen section control with regard to number of cells staining and intensity of staining.
4. CD8⁺ T cells could not be demonstrated in any of the formalin-fixed specimens.
5. CD8⁺ T cells could be detected in all HOPE[®]-fixed specimens provided that structural preservation of tissue was given with regard to postmortal changes. Frozen sections showed superior antigen preservation but reduced morphological preservation compared to HOPE[®]-fixed sections. Compared to formalin-fixed material morphological preservation of HOPE[®]-fixed tissue was slightly inferior.
6. Positive labelling of CD8⁺ T-cells could be found in ZSF-fixed tissues of only three of twelve cats. Morphological preservation of ZSF-fixed specimens was comparable to formalin-fixed material and considerably superior to frozen sections.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2007a. Antigen Receptors And Accessory Molecules Of T-Lymphocytes. In: Cellular and Molecular Immunology, 6. Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, 137-152.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2007b. Cells And Tissues Of The Adaptive Immune System. In: Cellular and Molecular Immunology, 6. Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, 47-74.
- Abdullah, M., Schultz, H., Kahler, D., Branscheid, D., Dalhoff, K., Zabel, P., Vollmer, E., Goldmann, T., 2009. Expression of the acute phase protein haptoglobin in human lung cancer and tumor-free lung tissues. *Pathol Res Pract* 205, 639-647.
- Abdullah, M., Kahler, D., Vock, C., Reiling, N., Kugler, C., Dromann, D., Rupp, J., Hauber, H.P., Fehrenbach, H., Zabel, P., Vollmer, E., Dalhoff, K., Goldmann, T., 2012. Pulmonary Haptoglobin and CD163 Are Functional Immunoregulatory Elements in the Human Lung. *Respiration* 83, 61-73.
- Akerström, B., Brodin, T., Reis, K., Bjorck, L., 1985. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol* 135, 2589-2592.
- Anderle, C., Hammer, A., Polgar, B., Hartmann, M., Wintersteiger, R., Blaschitz, A., Dohr, G., Desoye, G., Szekeres-Bartho, J., Sedlmayr, P., 2008. Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *J Reprod Immunol* 79, 26-36.
- Anderson, I.E., Buxton, D., Campbell, I., Russell, G., Davis, W.C., Hamilton, M.J., Haig, D.M., 2007. Immunohistochemical study of experimental malignant catarrhal fever in rabbits. *J Comp Pathol* 136, 156-166.
- Anderson, I.E., Deane, D., Swa, S., Thomson, J., Campbell, I., Buxton, D., Wei, X.Q., Stewart, J., Russell, G., Haig, D.M., 2008. Production and utilization of interleukin-15 in malignant catarrhal fever. *J Comp Pathol* 138, 131-144.
- Arnold, M.M., Srivastava, S., Fredenburgh, J., Stockard, C.R., Myers, R.B., Grizzle, W.E., 1996. Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotech Histochem* 71, 224-230.
- Arzi, B., Murphy, B., Baumgarth, N., Vapniarsky, N., Nemeč, A., Naydan, D.K., Cox, D.P., Verstraete, F.J., 2011. Analysis of immune cells within the healthy oral mucosa of specific pathogen-free cats. *Anat Histol Embryol* 40, 1-10.
- Athanasiadou, S., Pemberton, A., Jackson, F., Inglis, N., Miller, H.R., Thevenod, F., Mackellar, A., Huntley, J.F., 2008. Proteomic approach to identify candidate effector molecules during the in vitro immune exclusion of infective *Teladorsagia circumcincta* in the abomasum of sheep. *Vet Res* 39, 58.
- Baker, S.C., Southgate, J., 2008. Towards control of smooth muscle cell differentiation in synthetic 3D scaffolds. *Biomaterials* 29, 3357-3366.
- Barranco, I., Gomez-Laguna, J., Rodriguez-Gomez, I.M., Salguero, F.J., Pallares, F.J., Bernabe, A., Carrasco, L., 2011. Immunohistochemical detection of extrinsic and intrinsic mediators of apoptosis in porcine paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 139, 210-216.
- Beckstead, J.H., 1985. Optimal antigen localization in human tissues using aldehyde-fixed plastic-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 33, 954-958.
- Beckstead, J.H., 1994. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 42, 1127-1134.
- Beebe, A.M., Dua, N., Faith, T.G., Moore, P.F., Pedersen, N.C., Dandekar, S., 1994. Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J Virol* 68, 3080-3091.

- Benavides, J., Garcia-Pariente, C., Gelmetti, D., Fuertes, M., Ferreras, M.C., Garcia-Marin, J.F., Perez, V., 2006. Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples. *J Virol Methods* 137, 317-324.
- Berg, D.J., Zhang, J., Weinstock, J.V., Ismail, H.F., Earle, K.A., Alila, H., Pamukcu, R., Moore, S., Lynch, R.G., 2002. Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology* 123, 1527-1542.
- Bergthaler, A., Merkle, D., Horvath, E., Bestmann, L., Pinschewer, D.D., 2007. Contributions of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein and polymerase to strain-specific differences in murine liver pathogenicity. *J Gen Virol* 88, 592-603.
- Bezuidenhout, D., Davies, N., Black, M., Schmidt, C., Oosthuysen, A., Zilla, P., 2010. Covalent surface heparinization potentiates porous polyurethane scaffold vascularization. *J Biomater Appl* 24, 401-418.
- Bingle, L., Lewis, C.E., Corke, K.P., Reed, M.W., Brown, N.J., 2006. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br J Cancer* 94, 101-107.
- Björck, L., Kronvall, G., 1981. Analysis of bacterial cell wall proteins and human serum proteins bound to bacterial cell surfaces. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 89, 1-6.
- Blaschitz, A., Gauster, M., Dohr, G., 2008. Application of cryo-compatible antibodies to human placenta paraffin sections. *Histochem Cell Biol* 130, 595-599.
- Blum, F., 1893. Das Formaldehyd als Härtungsmittel. *Z Wiss Mikrosk* 10, 314-315.
- Blum, F., 1894. Notiz über die Anwendung des Formaldehyds (Formol) als Härtungs- und Conservierungsmittel. *Anat Anz* 9, 229-231.
- Blumenthal, A., Ehlers, S., Lauber, J., Buer, J., Lange, C., Goldmann, T., Heine, H., Brandt, E., Reiling, N., 2006. The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108, 965-973.
- Boddu-Jasmine, H.C., Witchell, J., Vordermeier, M., Wangoo, A., Goyal, M., 2008. Cytokine mRNA expression in cattle infected with different dosages of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)* 88, 610-615.
- Boenisch, T., 2002. Heat-induced antigen retrieval restores electrostatic forces: prolonging the antibody incubation as an alternative. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10, 363-367.
- Boenisch, T., 2005. Effect of heat-induced antigen retrieval following inconsistent formalin fixation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13, 283-286.
- Boenisch, T., 2006. Heat-induced antigen retrieval: what are we retrieving? *J Histochem Cytochem* 54, 961-964.
- Bonds, L.A., Barnes, P., Foucar, K., Sever, C.E., 2005. Acetic acid-zinc-formalin: a safe alternative to B-5 fixative. *Am J Clin Pathol* 124, 205-211.
- Bos, P.K., van Osch, G.J., van der Kwast, T., Verwoerd-Verhoef, H.L., Verhaar, J.A., 2000. Fixation-dependent immunolocalization shift and immunoreactivity of intracellular growth factors in cartilage. *Histochem J* 32, 391-396.
- Bourque, W.T., Gross, M., Hall, B.K., 1993. A histological processing technique that preserves the integrity of calcified tissues (bone, enamel), yolky amphibian embryos, and growth factor antigens in skeletal tissue. *J Histochem Cytochem* 41, 1429-1434.
- Bouzeghrane, F., Mercure, C., Reudelhuber, T.L., Thibault, G., 2004. Alpha8beta1 integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 36, 343-353.
- Brandtzaeg, P., Rognum, T.O., 1983. Evaluation of tissue preparation methods and paired immunofluorescence staining for immunocytochemistry of lymphomas. *Histochem J* 15, 655-689.

- Braun, M., Menon, R., Nikolov, P., Kirsten, R., Petersen, K., Schilling, D., Schott, C., Gundisch, S., Fend, F., Becker, K.F., Perner, S., 2011. The HOPE fixation technique - a promising alternative to common prostate cancer biobanking approaches. *BMC Cancer* 11, 511.
- Brenes, F., Harris, S., Paz, M.O., Petrovic, L.M., Scheuer, P.J., 1986. PLP fixation for combined routine histology and immunocytochemistry of liver biopsies. *J Clin Pathol* 39, 459-463.
- Breugelmans, S., Casteleyn, C., Simoens, P., Van den Broeck, W., 2011a. Distribution of the lingual lymphoid tissue in domestic ruminants. *Anat Histol Embryol* 40, 426-432.
- Breugelmans, S., De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Simoens, P., Van den Broeck, W., 2011b. Differences between the ovine tonsils based on an immunohistochemical quantification of the lymphocyte subpopulations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34, 217-225.
- Breugelmans, S., Van den Broeck, W., Demeyere, K., Meyer, E., Simoens, P., 2011c. Immunoassay of lymphocyte subsets in ovine palatine tonsils. *Acta Histochem* 113, 416-422.
- Buchwalow, I., Samoilova, V., Boecker, W., Tiemann, M., 2011. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep* 1, 28.
- Buesa, R.J., 2008. Histology without formalin? *Ann Diagn Pathol* 12, 387-396.
- Buxton, D., Anderson, I.E., Longbottom, D., Livingstone, M., Wattedgera, S., Entrican, G., 2002. Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J Comp Pathol* 127, 133-141.
- Callanan, J.J., Jones, B.A., Irvine, J., Willett, B.J., McCandlish, I.A., Jarrett, O., 1996. Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. *Vet Pathol* 33, 264-272.
- Caluwaerts, S., Vercruyse, L., Luyten, C., Pijnenborg, R., 2005. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta* 26, 574-584.
- Casey, T.T., Cousar, J.B., Collins, R.D., 1988. A simplified plastic embedding and immunohistologic technique for immunophenotypic analysis of human hematopoietic and lymphoid tissues. *Am J Pathol* 131, 183-189.
- Casteleyn, C.R., Breugelmans, S., Simoens, P., Van den Broeck, W., 2008. Morphological and immunological characteristics of the bovine temporal lymph node and hemal node. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 339-350.
- Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M.H., Poggi, S., Bifulco, C., Key, G., D'Amato, L., Sabattini, E., Feudale, E., et al., 1993. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 171, 83-98.
- Caturegli, P., Rose, N.R., Kimura, M., Kimura, H., Tzou, S.C., 2003. Studies on murine thyroiditis: new insights from organ flow cytometry. *Thyroid* 13, 419-426.
- Champion, E.E., Mann, S.J., Glazier, J.D., Jones, C.J., Rawlings, J.M., Sibley, C.P., Greenwood, S.L., 2004. System beta and system A amino acid transporters in the feline endotheliochorial placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R1369-1379.
- Chianini, F., Majo, N., Segales, J., Dominguez, J., Domingo, M., 2001. Immunohistological study of the immune system cells in paraffin-embedded tissues of conventional pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 82, 245-255.
- Chilosi, M., Pizzolo, G., Fiore-Donati, L., Bofill, M., Janossy, G., 1983. Routine immunofluorescent and histochemical analysis of bone marrow involvement of lymphoma/leukaemia: the use of cryostat sections. *Br J Cancer* 48, 763-775.
- Cocquyt, G., Simoens, P., Muylle, S., Van den Broeck, W., 2008. Anatomical and histological aspects of the bovine lingual tonsil. *Res Vet Sci* 84, 166-173.

- Collings, L.A., Poulter, L.W., Janossy, G., 1984. The demonstration of cell surface antigens on T cells, B cells and accessory cells in paraffin-embedded human tissues. *J Immunol Methods* 75, 227-239.
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., Berliner, E., 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. *J Immunol* 45, 159-170.
- Corona, R., Verguts, J., Schonman, R., Binda, M.M., Mailova, K., Koninckx, P.R., 2011. Postoperative inflammation in the abdominal cavity increases adhesion formation in a laparoscopic mouse model. *Fertil Steril* 95, 1224-1228.
- Coupland, S.E., Perez-Canto, A., Hummel, M., Stein, H., Heimann, H., 2005. Assessment of HOPE fixation in vitrectomy specimens in patients with chronic bilateral uveitis (masquerade syndrome). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243, 847-852.
- Cox, M.L., Schray, C.L., Luster, C.N., Stewart, Z.S., Korytko, P.J., KN, M.K., Paulauskis, J.D., Dunstan, R.W., 2006. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp Mol Pathol* 80, 183-191.
- Coxon, A., Bready, J., Min, H., Kaufman, S., Leal, J., Yu, D., Lee, T.A., Sun, J.R., Estrada, J., Bolon, B., McCabe, J., Wang, L., Rex, K., Caenepeel, S., Hughes, P., Cordover, D., Kim, H., Han, S.J., Michaels, M.L., Hsu, E., Shimamoto, G., Cattley, R., Hurh, E., Nguyen, L., Wang, S.X., Ndifor, A., Hayward, I.J., Falcon, B.L., McDonald, D.M., Li, L., Boone, T., Kendall, R., Radinsky, R., Oliner, J.D., 2010. Context-dependent role of angiopoietin-1 inhibition in the suppression of angiogenesis and tumor growth: implications for AMG 386, an angiopoietin-1/2-neutralizing peptibody. *Mol Cancer Ther* 9, 2641-2651.
- Crawford, P.C., Papadi, G.P., Levy, J.K., Benson, N.A., Mergia, A., Johnson, C.M., 2001. Tissue dynamics of CD8 lymphocytes that suppress viral replication in cats infected neonatally with feline immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 184, 671-681.
- Croke, J.M., Pike, L.R., MacPhee, D.J., 2007. The focal adhesion protein Hic-5 is highly expressed in the rat myometrium during late pregnancy and labour and co-localizes with FAK. *Reprod Biol Endocrinol* 5, 22.
- Cuevas, E.C., Bateman, A.C., Wilkins, B.S., Johnson, P.A., Williams, J.H., Lee, A.H., Jones, D.B., Wright, D.H., 1994. Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. *J Clin Pathol* 47, 448-452.
- D'Amico, F., Skarmoutsou, E., Stivala, F., 2009. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J Immunol Methods* 341, 1-18.
- Daneshtalab, N., Dore, J.J., Smeda, J.S., 2010. Troubleshooting tissue specificity and antibody selection: Procedures in immunohistochemical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 61, 127-135.
- Dapson, R.W., 1993. Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. *Biotech Histochem* 68, 75-82.
- Dapson, R.W., 2007a. Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval. *Biotech Histochem* 82, 161-166.
- Dapson, R.W., 2007b. Effects of fixation on routine, special and immunohistochemical stains: introduction to a symposium for the Biological Stain Commission. *Biotech Histochem*, 1-2.
- Dapson, R.W., 2007c. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotech Histochem* 82, 133-140.
- De Marzo, A.M., Fedor, H.H., Gage, W.R., Rubin, M.A., 2002. Inadequate formalin fixation decreases reliability of p27 immunohistochemical staining: probing optimal fixation time using high-density tissue microarrays. *Hum Pathol* 33, 756-760.
- De Spiegelaere, W., Cornillie, P., Casteleyn, C., Burvenich, C., Van den Broeck, W., 2010a. Detection of hypoxia inducible factors and angiogenic growth factors during foetal endochondral and intramembranous ossification. *Anat Histol Embryol* 39, 376-384.

- De Spiegelaere, W., Cornillie, P., Erkens, T., Van Loo, D., Casteleyn, C., Van Poucke, M., Burvenich, C., Van Hoorebeke, L., Van Ginneken, C., Peelman, L., Van den Broeck, W., 2010b. Expression and localization of angiogenic growth factors in developing porcine mesonephric glomeruli. *J Histochem Cytochem* 58, 1045-1056.
- De Spiegelaere, W., Cornillie, P., Van den Broeck, W., 2010c. Localization of erythropoietin in and around growing cartilage. *Mol Cell Biochem* 337, 287-291.
- Dechend, R., Gratze, P., Wallukat, G., Shagdarsuren, E., Plehm, R., Brasen, J.H., Fiebeler, A., Schneider, W., Caluwaerts, S., Vercruyse, L., Pijnenborg, R., Luft, F.C., Muller, D.N., 2005. Agonistic autoantibodies to the AT1 receptor in a transgenic rat model of preeclampsia. *Hypertension* 45, 742-746.
- Delsol, G., Chittal, S., Brousset, P., Caveriviere, P., Roda, D., Mazerolles, C., Barillet-Alard, C., al Saati, T., Gorguet, B., Voigt, J.J., 1989. Immunohistochemical demonstration of leucocyte differentiation antigens on paraffin sections using a modified AMeX (ModAMeX) method. *Histopathology* 15, 461-471.
- Droemann, D., Goldmann, T., Branscheid, D., Clark, R., Dalhoff, K., Zabel, P., Vollmer, E., 2003. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 119, 103-108.
- Droemann, D., Albrecht, D., Gerdes, J., Ulmer, A.J., Branscheid, D., Vollmer, E., Dalhoff, K., Zabel, P., Goldmann, T., 2005a. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res* 6, 1.
- Droemann, D., Goldmann, T., Tiedje, T., Zabel, P., Dalhoff, K., Schaaf, B., 2005b. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 6, 68.
- Droemann, D., Rupp, J., Goldmann, T., Maass, M., Vollmer, E., Zabel, P., Dalhoff, K., 2005c. Pulmonale Infektionen im humanen Lungengewebsmodell. *Pneumologie* 59, 411-427.
- Droemann, D., 2006. In vitro Infektion im humanen Lungengewebsmodell am Beispiel von *Chlamydia pneumoniae*. *Focus MUL* 23, 24-27.
- Droemann, D., Rupp, J., Goldmann, T., Uhlig, U., Branscheid, D., Vollmer, E., Kujath, P., Zabel, P., Dalhoff, K., 2007. Disparate innate immune responses to persistent and acute *Chlamydia pneumoniae* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 791-797.
- Droemann, D., Rupp, J., Rohmann, K., Osbahr, S., Ulmer, A.J., Marwitz, S., Roschmann, K., Abdullah, M., Schultz, H., Vollmer, E., Zabel, P., Dalhoff, K., Goldmann, T., 2010. The TGF-beta-Pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Respir Res* 11, 67.
- Elson, K., Speck, P., Simmons, A., 2003. Herpes simplex virus infection of murine sensory ganglia induces proliferation of neuronal satellite cells. *J Gen Virol* 84, 1079-1084.
- Elson, K., Ribeiro, R.M., Perelson, A.S., Simmons, A., Speck, P., 2004a. The life span of ganglionic glia in murine sensory ganglia estimated by uptake of bromodeoxyuridine. *Exp Neurol* 186, 99-103.
- Elson, K., Simmons, A., Speck, P., 2004b. Satellite cell proliferation in murine sensory ganglia in response to scarification of the skin. *Glia* 45, 105-109.
- Emoto, K., Yamashita, S., Okada, Y., 2005. Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: does pH or ionic strength of the solution play a role for refolding antigens? *J Histochem Cytochem* 53, 1311-1321.
- Engelhardt, H., Croy, B.A., King, G.J., 2002. Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy. *Biol Reprod* 66, 1875-1880.
- Ericsson, A., Hamark, B., Powell, T.L., Jansson, T., 2005. Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Hum Reprod* 20, 521-530.

- Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., Busche, A., Branscheid, D., Vollmer, E., Brandau, S., 2008. Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59, 32-40.
- Ferrero, R.L., Ave, P., Radcliff, F.J., Labigne, A., Huerre, M.R., 2000. Outbred mice with long-term *Helicobacter felis* infection develop both gastric lymphoid tissue and glandular hyperplastic lesions. *J Pathol* 191, 333-340.
- Fitzgibbons, P.L., Page, D.L., Weaver, D., Thor, A.D., Allred, D.C., Clark, G.M., Ruby, S.G., O'Malley, F., Simpson, J.F., Connolly, J.L., Hayes, D.F., Edge, S.B., Lichter, A., Schnitt, S.J., 2000. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124, 966-978.
- Fivenson, D.P., Beck, E.R., Dunstan, R.W., Nickoloff, B.J., Moore, P.F., 1992. Dermal dendrocytes and T-cells in canine mycosis fungoides. Support for an animal model of human cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer* 70, 2091-2098.
- Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J.L., Goy-Thollot, I., Ledieu, D., Ghernati, I., Magnol, J.P., 2002. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol* 39, 92-109.
- Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P., 1985. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 33, 845-853.
- Fragkou, I.A., Dagleish, M.P., Papaioannou, N., Cripps, P.J., Boscos, C.M., Ververidis, H.N., Orfanou, D.C., Solomakos, N., Finlayson, J., Govaris, A., Kyriazakis, I., Fthenakis, G.C., 2010. The induction of lymphoid follicle-like structures in the ovine teat duct following experimental infection with *Mannheimia haemolytica*. *Vet J* 184, 194-200.
- Fricke, I., Mitchell, D., Mittelstadt, J., Lehan, N., Heine, H., Goldmann, T., Bohle, A., Brandau, S., 2006. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* 176, 5173-5182.
- Gendelman, H.E., Moench, T.R., Narayan, O., Griffin, D.E., 1983. Selection of a fixative for identifying T cell subsets, B cells, and macrophages in paraffin-embedded mouse spleen. *J Immunol Methods* 65, 137-145.
- Gerard, C., Doillon, C.J., 2010. Facilitating tissue infiltration and angiogenesis in a tubular collagen scaffold. *J Biomed Mater Res A* 93, 615-624.
- Geusens, N., Verlohren, S., Luyten, C., Taube, M., Hering, L., Vercruyse, L., Hanssens, M., Dudenhausen, J.W., Dechend, R., Pijnenborg, R., 2008. Endovascular trophoblast invasion, spiral artery remodelling and uteroplacental haemodynamics in a transgenic rat model of pre-eclampsia. *Placenta* 29, 614-623.
- Geusens, N., Hering, L., Verlohren, S., Luyten, C., Drijkoningen, K., Taube, M., Vercruyse, L., Hanssens, M., Dechend, R., Pijnenborg, R., 2010. Changes in endovascular trophoblast invasion and spiral artery remodelling at term in a transgenic preeclamptic rat model. *Placenta* 31, 320-326.
- Goldmann, T., Wiedorn, K.H., Kuhl, H., Olert, J., Branscheid, D., Pechkovsky, D., Zissel, G., Galle, J., Muller-Quernheim, J., Vollmer, E., 2002. Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 198, 91-95.
- Goldmann, T., Vollmer, E., Gerdes, J., 2003. What's cooking? detection of important biomarkers in HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues eliminates the need for antigen retrieval. *Am J Pathol* 163, 2638-2640.
- Goldmann, T., Flohr, A.M., Murua Escobar, H., Gerstmayer, B., Janssen, U., Bosio, A., Loeschke, S., Vollmer, E., Bullerdiek, J., 2004. The HOPE-technique permits Northern blot and microarray analyses in paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 200, 511-515.

- Goldmann, T., Burgemeister, R., Sauer, U., Loeschke, S., Lang, D.S., Branscheid, D., Zabel, P., Vollmer, E., 2006. Enhanced molecular analyses by combination of the HOPE-technique and laser microdissection. *Diagn Pathol* 1, 2.
- Goldmann, T., Kahler, D., Vollmer, E., 2012. Proteomics? *Arch Pathol Lab Med* 136, 236-237.
- Goldstein, N.S., Hewitt, S.M., Taylor, C.R., Yaziji, H., Hicks, D.G., 2007. Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15, 124-133.
- Gonzalez, L., Anderson, I., Deane, D., Summers, C., Buxton, D., 2001. Detection of immune system cells in paraffin wax-embedded ovine tissues. *J Comp Pathol* 125, 41-47.
- Gown, A.M., de Wever, N., Battifora, H., 1993. Microwave-based antigenic unmasking. *Appl Immunohistochem* 1, 256-266.
- Gown, A.M., 2004. Unmasking the mysteries of antigen or epitope retrieval and formalin fixation. *Am J Clin Pathol* 121, 172-174.
- Grizzle, W.E., 2009. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem* 84, 185-193.
- Grznil, M., Kaulfuss, S., Thelen, P., Hemmerlein, B., Schweyer, S., Obenauer, S., Kang, T.W., Burfeind, P., 2006. Expression and functional analysis of Bax inhibitor-1 in human breast cancer cells. *J Pathol* 208, 340-349.
- Gulbahar, M.Y., Davis, W.C., Yuksel, H., Cabalar, M., 2006. Immunohistochemical evaluation of inflammatory infiltrate in the skin and lung of lambs naturally infected with sheeppox virus. *Vet Pathol* 43, 67-75.
- Gutierrez, M., Forster, F.I., McConnell, S.A., Cassidy, J.P., Pollock, J.M., Bryson, D.G., 1999. The detection of CD2+, CD4+, CD8+, and WC1+ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 321-334.
- Hadler-Olsen, E., Kanapathipillai, P., Berg, E., Svineng, G., Winberg, J.O., Uhlin-Hansen, L., 2010a. Gelatin in situ zymography on fixed, paraffin-embedded tissue: zinc and ethanol fixation preserve enzyme activity. *J Histochem Cytochem* 58, 29-39.
- Hadler-Olsen, E., Wetting, H.L., Rikardsen, O., Steigen, S.E., Kanapathipillai, P., Grenman, R., Winberg, J.O., Svineng, G., Uhlin-Hansen, L., 2010b. Stromal impact on tumor growth and lymphangiogenesis in human carcinoma xenografts. *Virchows Arch* 457, 677-692.
- Haines, D.M., West, K.H., 2005. Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 151-156.
- Hammond, M.E., Hayes, D.F., Dowsett, M., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S., Fitzgibbons, P.L., Francis, G., Goldstein, N.S., Hayes, M., Hicks, D.G., Lester, S., Love, R., Mangu, P.B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C.K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J.N., Sweep, F.C., Taube, S., Torlakovic, E.E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R.B., Wittliff, J.L., Wolff, A.C., 2010. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 134, 907-922.
- Harley, R., Gruffydd-Jones, T.J., Day, M.J., 2011. Immunohistochemical characterization of oral mucosal lesions in cats with chronic gingivostomatitis. *J Comp Pathol* 144, 239-250.
- Hartmannsberger, D., Mack, B., Eggert, C., Denzel, S., Stepp, H., Betz, C.S., Gires, O., 2011. Transketolase-like protein 1 confers resistance to serum withdrawal in vitro. *Cancer Lett* 300, 20-29.

- Hattori, N., Mochizuki, S., Kishi, K., Nakajima, T., Takaishi, H., D'Armiento, J., Okada, Y., 2009. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *Am J Pathol* 175, 533-546.
- Havouis, S., Dumas, G., Ave, P., Pritsch, O., Huerre, M., Dighiero, G., Pourcel, C., 2000. Negative regulation of autoreactive B cells in transgenic mice expressing a human pathogenic cold agglutinin. *Eur J Immunol* 30, 2290-2299.
- Hermo, L., Schellenberg, M., Liu, L.Y., Dayanandan, B., Zhang, T., Mandato, C.A., Smith, C.E., 2008. Membrane domain specificity in the spatial distribution of aquaporins 5, 7, 9, and 11 in efferent ducts and epididymis of rats. *J Histochem Cytochem* 56, 1121-1135.
- Hewitt, S.M., Lewis, F.A., Cao, Y., Conrad, R.C., Cronin, M., Danenberg, K.D., Goralski, T.J., Langmore, J.P., Raja, R.G., Williams, P.M., Palma, J.F., Warrington, J.A., 2008. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med* 132, 1929-1935.
- Hicks, D.J., Johnson, L., Mitchell, S.M., Gough, J., Cooley, W.A., La Ragione, R.M., Spencer, Y.I., Wangoo, A., 2006. Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers. *Biotech Histochem* 81, 23-30.
- Higashi, T., McIntosh, J.M., Shirahata, M., 2003. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors in cultured arterial chemoreceptor cells of the cat. *Brain Res* 974, 167-175.
- Hirschberger, J., 1987. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes. *Vet.med.Diss.*, Gießen.
- Hofman, F., 2002. Immunohistochemistry. *Curr Protoc Immunol Suppl* 49, 21.24.21-21.24.23.
- Holgate, C.S., Jackson, P., Lauder, I., Cowen, P.N., Bird, C.C., 1983. Surface membrane staining of immunoglobulins in paraffin sections of non-Hodgkin's lymphomas using immunogold-silver staining technique. *J Clin Pathol* 36, 742-746.
- Holgate, C.S., Jackson, P., Pollard, K., Lunny, D., Bird, C.C., 1986. Effect fixation on T and B lymphocyte surface membrane antigen demonstration in paraffin processed tissue. *J Pathol* 149, 293-300.
- Hornickel, I.N., Kacza, J., Schnapper, A., Beyerbach, M., Schoennagel, B., Seeger, J., Meyer, W., 2011a. Demonstration of substances of innate immunity in the esophageal epithelium of domesticated mammals. Part I - Methods and evaluation of comparative fixation. *Acta Histochem* 113, 163-174.
- Hornickel, I.N., Kacza, J., Schnapper, A., Beyerbach, M., Schoennagel, B., Seeger, J., Meyer, W., 2011b. Demonstration of substances of innate immunity in the esophageal epithelium of domesticated mammals: Part II--Defence mechanisms, including species comparison. *Acta Histochem* 113, 175-188.
- Howard, K.E., Burkhard, M.J., 2007. Mucosal challenge with cell-associated or cell-free feline immunodeficiency virus induces rapid and distinctly different patterns of phenotypic change in the mucosal and systemic immune systems. *Immunology* 122, 571-583.
- Howard, K.E., Reckling, S.K., Egan, E.A., Dean, G.A., 2010. Acute mucosal pathogenesis of feline immunodeficiency virus is independent of viral dose in vaginally infected cats. *Retrovirology* 7, 2.
- Hsu, S.M., Raine, L., 1981. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29, 1349-1353.
- Hunt, N.C., Attanoos, R., Jasani, B., 1996. High temperature antigen retrieval and loss of nuclear morphology: a comparison of microwave and autoclave techniques. *J Clin Pathol* 49, 767-770.

- Huntley, J.F., van den Broek, A., Machell, J., Mackellar, A., Pettit, D., Meikle, L., Barcham, G., Meeusen, E.N., Smith, D., 2005. The effect of immunosuppression with cyclosporin A on the development of sheep scab. *Vet Parasitol* 127, 323-332.
- Ismail, J.A., Poppa, V., Kemper, L.E., Scatena, M., Giachelli, C.M., Coffin, J.D., Murry, C.E., 2003. Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovasc Pathol* 12, 82-90.
- Jambhekar, N.A., Chaturvedi, A.C., Madur, B.P., 2008. Immunohistochemistry in surgical pathology practice: a current perspective of a simple, powerful, yet complex, tool. *Indian J Pathol Microbiol* 51, 2-11.
- Jennings, A., Carroll, W., 2010. Quantification of oligodendrocyte progenitor cells in human and cat optic nerve: implications for endogenous repair in multiple sclerosis. *Glia* 58, 1425-1436.
- Jensen, U.B., Owens, D.M., Pedersen, S., Christensen, R., 2010. Zinc fixation preserves flow cytometry scatter and fluorescence parameters and allows simultaneous analysis of DNA content and synthesis, and intracellular and surface epitopes. *Cytometry A* 77, 798-804.
- Joehrens, K., Anagnostopoulos, I., Durkop, H., Stein, H., 2006. Different T-bet expression patterns characterize particular reactive lymphoid tissue lesions. *Histopathology* 48, 343-352.
- Johansson, M., Jansson, T., Powell, T.L., 2000. Na(+)-K(+)-ATPase is distributed to microvillous and basal membrane of the syncytiotrophoblast in human placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R287-294.
- Johansson, M., Glazier, J.D., Sibley, C.P., Jansson, T., Powell, T.L., 2002. Activity and protein expression of the Na⁺/H⁺ exchanger is reduced in syncytiotrophoblast microvillous plasma membranes isolated from preterm intrauterine growth restriction pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5686-5694.
- Johansson, M., Jansson, T., Pestov, N.B., Powell, T.L., 2004. Non-gastric H⁺/K⁺ ATPase is present in the microvillous membrane of the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta* 25, 505-511.
- Kähler, D., Alexander, C., Schultz, H., Abdullah, M., Branscheid, D., Lindner, B., Zabel, P., Vollmer, E., Goldmann, T., 2010. Proteomics out of the archive: Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry using HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 58, 221-228.
- Kamstock, D.A., Ehrhart, E.J., Getzy, D.M., Bacon, N.J., Rassnick, K.M., Moroff, S.D., Liu, S.M., Straw, R.C., McKnight, C.A., Amorim, R.L., Bienzle, D., Cassali, G.D., Cullen, J.M., Dennis, M.M., Esplin, D.G., Foster, R.A., Goldschmidt, M.H., Gruber, A.D., Hellmen, E., Howerth, E.W., Labelle, P., Lenz, S.D., Lipscomb, T.P., Locke, E., McGill, L.D., Miller, M.A., Mouser, P.J., O'Toole, D., Pool, R.R., Powers, B.E., Ramos-Vara, J.A., Roccabianca, P., Ross, A.D., Sailasuta, A., Sarli, G., Scase, T.J., Schulman, F.Y., Shoieb, A.M., Singh, K., Sledge, D., Smedley, R.C., Smith, K.C., Spangler, W.L., Steficek, B., Stromberg, P.C., Valli, V.E., Yager, J., Kiupel, M., 2011. Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Vet Pathol* 48, 19-31.
- Keresztes, G., Takacs, L., Vilmos, P., Kurucz, E., Ando, I., 1996. Monoclonal antibodies detecting components of the bovine immune system in formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue specimens. *Vet Immunol Immunopathol* 52, 383-392.
- Kilarski, W.W., Jura, N., Gerwins, P., 2005. An ex vivo model for functional studies of myofibroblasts. *Lab Invest* 85, 643-654.
- Kim, S.H., Kook, M.C., Song, H.G., 2004. Optimal conditions for the retrieval of CD4 and CD8 antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Histol* 35, 403-408.

- Kimura, H., Kimura, M., Tzou, S.C., Chen, Y.C., Suzuki, K., Rose, N.R., Caturegli, P., 2005a. Expression of class II major histocompatibility complex molecules on thyrocytes does not cause spontaneous thyroiditis but mildly increases its severity after immunization. *Endocrinology* 146, 1154-1162.
- Kimura, H., Kimura, M., Westra, W.H., Rose, N.R., Caturegli, P., 2005b. Increased thyroidal fat and goitrous hypothyroidism induced by interferon-gamma. *Int J Exp Pathol* 86, 97-106.
- Kiupel, M., Teske, E., Bostock, D., 1999. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol* 36, 292-300.
- Kothmaier, H., Rohrer, D., Stacher, E., Quehenberger, F., Becker, K.F., Popper, H.H., 2011. Comparison of formalin-free tissue fixatives: a proteomic study testing their application for routine pathology and research. *Arch Pathol Lab Med* 135, 744-752.
- Kunder, S., Calzada-Wack, J., Holzlwimmer, G., Muller, J., Kloss, C., Howat, W., Schmidt, J., Hofler, H., Warren, M., Quintanilla-Martinez, L., 2007. A comprehensive antibody panel for immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded hematopoietic neoplasms of mice: analysis of mouse specific and human antibodies cross-reactive with murine tissue. *Toxicol Pathol* 35, 366-375.
- Lang, D.S., Droemann, D., Schultz, H., Branscheid, D., Martin, C., Ressmeyer, A.R., Zabel, P., Vollmer, E., Goldmann, T., 2007. A novel human ex vivo model for the analysis of molecular events during lung cancer chemotherapy. *Respir Res* 8, 43.
- Lang, T., Ave, P., Huerre, M., Milon, G., Antoine, J.C., 2000. Macrophage subsets harbouring *Leishmania donovani* in spleens of infected BALB/c mice: localization and characterization. *Cell Microbiol* 2, 415-430.
- Lara-Garcia, A., Wellman, M., Burkhard, M.J., Machado-Parrula, C., Valli, V.E., Stromberg, P.C., Couto, C.G., 2008. Cervical thymoma originating in ectopic thymic tissue in a cat. *Vet Clin Pathol* 37, 397-402.
- Larsson, L.-I., 1993. Tissue Preparation Methods for Light Microscopic Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem* 1, 2-16.
- Lateef, Z., Baird, M.A., Wise, L.M., Mercer, A.A., Fleming, S.B., 2009. Orf virus-encoded chemokine-binding protein is a potent inhibitor of inflammatory monocyte recruitment in a mouse skin model. *J Gen Virol* 90, 1477-1482.
- Leong, A.S., Wright, J., 1987. The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis. *Histopathology* 11, 1295-1305.
- Leong, A.S., Gilham, P.N., 1989. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology* 21, 266-268.
- Leong, A.S., Milios, H.T., 1993. An assessment of the Efficacy of the microwave antigen-retrieval procedure on a range of tissue antigens. *Appl Immunohistochem* 1, 267-274.
- Leong, A.S., Leong, T.Y., 2006. Newer developments in immunohistology. *J Clin Pathol* 59, 1117-1126.
- Leong, T.Y., Leong, A.S., 2007. How does antigen retrieval work? *Adv Anat Pathol* 14, 129-131.
- Leong, T.Y., Cooper, K., Leong, A.S., 2010. Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol* 17, 404-418.
- Levin, E.G., Santell, L., Osborn, K.G., 1997. The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J Cell Sci* 110 (Pt 2), 139-148.
- Liebana, E., Marsh, S., Gough, J., Nunez, A., Vordermeier, H.M., Whelan, A., Spencer, Y., Clifton-Hardley, R., Hewinson, G., Johnson, L., 2007. Distribution and activation of T-lymphocyte subsets in tuberculous bovine lymph-node granulomas. *Vet Pathol* 44, 366-372.

- Linder, J., 1991. Antibodies marking paraffin-embedded leukocytes. Status report 1991. *Am J Clin Pathol* 95, 607-608.
- Löhler, J., Hirner, H., Schmidt, B., Kramer, K., Fischer, D., Thal, D.R., Leithauser, F., Knipschild, U., 2009. Immunohistochemical characterisation of cell-type specific expression of CK1delta in various tissues of young adult BALB/c mice. *PLoS One* 4, e4174.
- Longhi, M.P., Williams, A., Wise, M., Morgan, B.P., Gallimore, A., 2007. CD59a deficiency exacerbates influenza-induced lung inflammation through complement-dependent and -independent mechanisms. *Eur J Immunol* 37, 1266-1274.
- Lykidis, D., Van Noorden, S., Armstrong, A., Spencer-Dene, B., Li, J., Zhuang, Z., Stamp, G.W., 2007. Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. *Nucleic Acids Res* 35, e85.
- Mahajan, A., Naylor, S., Mills, A.D., Low, J.C., Mackellar, A., Hoey, D.E., Currie, C.G., Gally, D.L., Huntley, J., Smith, D.G., 2005. Phenotypic and functional characterisation of follicle-associated epithelium of rectal lymphoid tissue. *Cell Tissue Res* 321, 365-374.
- Maley, S.W., Buxton, D., Macaldowie, C.N., Anderson, I.E., Wright, S.E., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Hamilton, C.M., Storset, A.K., Innes, E.A., 2006. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J Comp Pathol* 135, 130-141.
- Malisius, R., Merz, H., Heinz, B., Gafumbegete, E., Koch, B.U., Feller, A.C., 1997. Constant detection of CD2, CD3, CD4, and CD5 in fixed and paraffin-embedded tissue using the peroxidase-mediated deposition of biotin-tyramide. *J Histochem Cytochem* 45, 1665-1672.
- Manenti, L., Riccardi, E., Marchini, S., Naumova, E., Floriani, I., Garofalo, A., Dossi, R., Marrazzo, E., Ribatti, D., Scanziani, E., Bani, M., Belotti, D., Broggin, M., Giavazzi, R., 2005. Circulating plasma vascular endothelial growth factor in mice bearing human ovarian carcinoma xenograft correlates with tumor progression and response to therapy. *Mol Cancer Ther* 4, 715-725.
- Manoonkitiwongsa, P.S., Schultz, R.L., 2002. Proper nomenclature of formaldehyde and paraformaldehyde fixatives for histochemistry. *Histochem J* 34, 365-367.
- Marsilio, S., 2007. Histopathologische, morphometrische und immunhistochemische Untersuchungen zur Phänotypsierung von Immunzellen in Biopsien aus dem Intestinaltrakt von Katzen mit chronischen idiopathischen Darmentzündungen. Diss. med. vet., Hannover.
- Martynova, M.G., Bystrova, O.A., Shabelnikov, S.V., Margulis, B.A., Prokofjeva, D.S., 2007. Hsp70 in the atrial neuroendocrine units of the snail, *Achatina fulica*. *Cell Biol Int* 31, 413-419.
- Marwitz, S., Zeiser, T., Schultz, H., Kahler, D., Abdullah, M., Hauber, H.P., Zabel, P., Vollmer, E., Goldmann, T., 2009. The human placenta releases substances that drive lung cancer into apoptosis. *Diagn Pathol* 4, 27.
- Marwitz, S., Abdullah, M., Vock, C., Fine, J.S., Visvanathan, S., Gaede, K.I., Hauber, H.P., Zabel, P., Goldmann, T., 2011. HOPE-BAL: improved molecular diagnostics by application of a novel technique for fixation and paraffin embedding. *J Histochem Cytochem* 59, 601-614.
- Matthews, K., Rhind, S.M., Gossner, A.G., Dalziel, R.G., Hopkins, J., 2007. The effects of gene gun delivered pIL-3 adjuvant on skin pathology and cytokine expression. *Vet Immunol Immunopathol* 119, 233-242.
- Mc Sherry, E.A., Mc Goldrick, A., Kay, E.W., Hopkins, A.M., Gallagher, W.M., Dervan, P.A., 2007. Formalin-fixed paraffin-embedded clinical tissues show spurious copy number changes in array-CGH profiles. *Clin Genet* 72, 441-447.

- Mengel, M., von Wasielewski, R., Wiese, B., Rudiger, T., Muller-Hermelink, H.K., Kreipe, H., 2002. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol* 198, 292-299.
- Mephram, B.L., 1982. Influence of fixatives on the immunoreactivity of paraffin sections. *Histochem J* 14, 731-737.
- Merkler, D., Ernsting, T., Kerschensteiner, M., Bruck, W., Stadelmann, C., 2006. A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain* 129, 1972-1983.
- Meyer, B., Loeschke, S., Schultze, A., Weigel, T., Sandkamp, M., Goldmann, T., Vollmer, E., Bullerdiek, J., 2007. HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog* 46, 503-511.
- Meyer, W., Hornickel, I.N., 2010. Tissue Fixation-the most underestimated methodical feature of immunohistochemistry. In: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education (Microscopy Series N° 4)*. Méndez-Vilas, A.a.D., J., Formatex, Badajoz, 953-959.
- Middel, P., Raddatz, D., Gunawan, B., Haller, F., Radzun, H.J., 2006. Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut* 55, 220-227.
- Moelans, C.B., ter Hoeve, N., van Ginkel, J.W., ten Kate, F.J., van Diest, P.J., 2011. Formaldehyde substitute fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol* 136, 548-556.
- Monteith, C.E., Chelack, B.J., Davis, W.C., Haines, D.M., 1996. Identification of monoclonal antibodies for immunohistochemical staining of feline B lymphocytes in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Can J Vet Res* 60, 193-198.
- Mueller, C., Edmiston, K.H., Carpenter, C., Gaffney, E., Ryan, C., Ward, R., White, S., Memeo, L., Colarossi, C., Petricoin, E.F., 3rd, Liotta, L.A., Espina, V., 2011. One-step preservation of phosphoproteins and tissue morphology at room temperature for diagnostic and research specimens. *PLoS One* 6, e23780.
- Mugnaini, E., Dahl, A.L., 1983. Zinc-aldehyde fixation for light-microscopic immunocytochemistry of nervous tissues. *J Histochem Cytochem* 31, 1435-1438.
- Mulisch, M., Welsch, U., (Hrsg.), 2010. *Romeis Mikroskopische Technik*, 18. Edition. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 87-104.
- Nadji, M., Nassiri, M., Vincek, V., Kanhoush, R., Morales, A.R., 2005. Immunohistochemistry of tissue prepared by a molecular-friendly fixation and processing system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13, 277-282.
- Nagai, H., Hara, I., Horikawa, T., Oka, M., Kamidono, S., Ichihashi, M., 2002. Gene transfer of secreted-type modified interleukin-18 gene to B16F10 melanoma cells suppresses in vivo tumor growth through inhibition of tumor vessel formation. *J Invest Dermatol* 119, 541-548.
- Namimatsu, S., Ghazizadeh, M., Sugisaki, Y., 2005. Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method. *J Histochem Cytochem* 53, 3-11.
- Naresh, K.N., Lampert, I., Hasserjian, R., Lykidis, D., Elderfield, K., Horncastle, D., Smith, N., Murray-Brown, W., Stamp, G.W., 2006. Optimal processing of bone marrow trephine biopsy: the Hammersmith Protocol. *J Clin Pathol* 59, 903-911.
- Nayak, B.N., Friel, J.K., Rempel, C.B., Jones, P.J., 2009. Energy-restricted diets result in higher numbers of CD4+, CD8+, immunoglobulins (A, M, and G), and CD45RA cells in spleen and CD4+, immunoglobulin A, and CD45RA cells in colonic lamina propria of rats. *Nutr Res* 29, 487-493.

- Nikitina, L., Ahammer, H., Blaschitz, A., Gismondi, A., Glasner, A., Schimek, M.G., Dohr, G., Sedlmayr, P., 2011. A new method for morphometric analysis of tissue distribution of mobile cells in relation to immobile tissue structures. *PLoS One* 6, e15086.
- Novotney, C., English, R.V., Housman, J., Davidson, M.G., Nasisse, M.P., Jeng, C.R., Davis, W.C., Tompkins, M.B., 1990. Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Aids* 4, 1213-1218.
- Nowak-Sliwinska, P., van Beijnum, J.R., van Berkel, M., van den Bergh, H., Griffioen, A.W., 2010. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis* 13, 281-292.
- Ocklind, A., 1998. Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp Eye Res* 67, 179-191.
- O'Leary, T.J., Fowler, C.B., Evers, D.L., Mason, J.T., 2009. Protein fixation and antigen retrieval: chemical studies. *Biotech Histochem* 84, 217-221.
- Olert, J., Wiedorn, K.H., Goldmann, T., Kuhl, H., Mehraein, Y., Scherthan, H., Niketeghad, F., Vollmer, E., Muller, A.M., Muller-Navia, J., 2001. HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* 197, 823-826.
- Ordonez, N.G., Manning, J.T., Jr., Brooks, T.E., 1988. Effect of trypsinization on the immunostaining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol* 12, 121-129.
- Ott, S.R., 2008. Confocal microscopy in large insect brains: zinc-formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. *J Neurosci Methods* 172, 220-230.
- Paavilainen, L., Edvinsson, A., Asplund, A., Hober, S., Kampf, C., Ponten, F., Wester, K., 2010. The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. *J Histochem Cytochem* 58, 237-246.
- Pajak, B., De Smedt, T., Moulin, V., De Trez, C., Maldonado-Lopez, R., Vansanten, G., Briend, E., Urbain, J., Leo, O., Moser, M., 2000. Immunohistowax processing, a new fixation and embedding method for light microscopy, which preserves antigen immunoreactivity and morphological structures: visualisation of dendritic cells in peripheral organs. *J Clin Pathol* 53, 518-524.
- Pallesen, G., Knudsen, L.M., 1985. Leucocyte antigens in human post mortem tissues: their preservation and loss as demonstrated by monoclonal antibody immunohistological staining. *Histopathology* 9, 791-804.
- Paltrinieri, S., Cammarata, M.P., Cammarata, G., Comazzi, S., 1998. Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 65, 205-220.
- Pechkovsky, D.V., Goldmann, T., Vollmer, E., Muller-Quernheim, J., Zissel, G., 2006. Interleukin-18 expression by alveolar epithelial cells type II in tuberculosis and sarcoidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46, 30-38.
- Pelstring, R.J., Allred, D.C., Esther, R.J., Lampkin, S.R., Banks, P.M., 1991. Differential antigen preservation during tissue autolysis. *Hum Pathol* 22, 237-241.
- Pileri, S.A., Roncador, G., Ceccarelli, C., Piccioli, M., Briskomatis, A., Sabattini, E., Ascani, S., Santini, D., Piccaluga, P.P., Leone, O., Damiani, S., Ercolessi, C., Sandri, F., Pieri, F., Leoncini, L., Falini, B., 1997. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 183, 116-123.
- Pilling, D., Fan, T., Huang, D., Kaul, B., Gomer, R.H., 2009. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One* 4, e7475.

- Pineda, A., Verdin-Teran, S.L., Camacho, A., Moreno-Fierros, L., 2011. Expression of toll-like receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 is increased in placentas from patients with preeclampsia. *Arch Med Res* 42, 382-391.
- Pinschewer, D.D., Schedensack, M., Bergthaler, A., Horvath, E., Bruck, W., Lohning, M., Merkler, D., 2010. T cells can mediate viral clearance from ependyma but not from brain parenchyma in a major histocompatibility class I- and perforin-independent manner. *Brain* 133, 1054-1066.
- Pollard, K., Lunny, D., Holgate, C.S., Jackson, P., Bird, C.C., 1987. Fixation, processing, and immunochemical reagent effects on preservation of T-lymphocyte surface membrane antigens in paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 35, 1329-1338.
- Ponce, F., Magnol, J.P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K., Fournel-Fleury, C., 2004. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J* 167, 158-166.
- Prasse, A., Pechkovsky, D.V., Toews, G.B., Jungraithmayr, W., Kollert, F., Goldmann, T., Vollmer, E., Muller-Quernheim, J., Zissel, G., 2006. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 781-792.
- Prento, P., Lyon, H., 1997. Commercial formalin substitutes for histopathology. *Biotech Histochem* 72, 273-282.
- Preusser, M., Plumer, S., Dirnberger, E., Hainfellner, J.A., Mannhalter, C., 2010. Fixation of brain tumor biopsy specimens with RCL2 results in well-preserved histomorphology, immunohistochemistry and nucleic acids. *Brain Pathol* 20, 1010-1020.
- Puchtler, H., Meloan, S.N., 1985. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82, 201-204.
- Radtke, J., Rezaie, S.G., Kugler, C., Zabel, P., Schultz, H., Vollmer, E., Goldmann, T., Lang, D.S., 2010. Expression analysis of EML4 in normal lung tissue and non-small cell lung cancer (NSCLC) in the absence and presence of chemotherapeutics. *Rom J Morphol Embryol* 51, 647-653.
- Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., 2000. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J Vet Diagn Invest* 12, 307-311.
- Ramos-Vara, J.A., 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42, 405-426.
- Ramos-Vara, J.A., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelack, B., Czub, S., Del Piero, F., Dial, S., Ehrhart, E.J., Graham, T., Manning, L., Paulsen, D., Valli, V.E., West, K., 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 20, 393-413.
- Randall, K.J., Pearse, G., 2008. A dual-label technique for the immunohistochemical demonstration of T-lymphocyte subsets in formalin-fixed, paraffin-embedded rat lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 36, 795-804.
- Rathkolb, B., Pohlenz, J.F., Wohlsein, P., 1997. Identification of leucocyte surface antigens in paraffin-embedded bovine tissues using a modified formalin dichromate fixation. *Histochem J* 29, 487-493.
- Reche, A., Jr., Daniel, A.G., Lazaro Strauss, T.C., Taborda, C.P., Vieira Marques, S.A., Haipek, K., Oliveira, L.J., Monteiro, J.M., Kfoury, J.R., Jr., 2010. Cutaneous mycoflora and CD4:CD8 ratio of cats infected with feline immunodeficiency virus. *J Feline Med Surg* 12, 355-358.
- Richards, H., Williams, A., Jones, E., Hindley, J., Godkin, A., Simon, A.K., Gallimore, A., 2010. Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology* 131, 583-592.

- Richter, M., Iwata, A., Nyhuis, J., Nitta, Y., Miller, A.D., Halbert, C.L., Allen, M.D., 2000. Adeno-associated virus vector transduction of vascular smooth muscle cells in vivo. *Physiol Genomics* 2, 117-127.
- Rideout, B.A., Lowensteine, L.J., Hutson, C.A., Moore, P.F., Pedersen, N.C., 1992. Characterization of morphologic changes and lymphocyte subset distribution in lymph nodes from cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *Vet Pathol* 29, 391-399.
- Rios-de Alvarez, L., Greer, A.W., Jackson, F., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J.F., 2008. The effect of dietary sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology* 135, 1117-1124.
- Roccabianca, P., Woo, J.C., Moore, P.F., 2000. Characterization of the diffuse mucosal associated lymphoid tissue of feline small intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 75, 27-42.
- Roccabianca, P., Vernau, W., Caniatti, M., Moore, P.F., 2006. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8(alpha)(alpha) phenotype. *Vet Pathol* 43, 15-28.
- Rojo-Botello, N.R., Garcia-Hernandez, A.L., Moreno-Fierros, L., 2012. Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 47, 62-73.
- Roosje, P.J., van Kooten, P.J., Thepen, T., Bihari, I.C., Rutten, V.P., Koeman, J.P., Willemse, T., 1998. Increased numbers of CD4+ and CD8+ T cells in lesional skin of cats with allergic dermatitis. *Vet Pathol* 35, 268-273.
- Roosje, P.J., Thepen, T., Rutten, V.P., van den Brom, W.E., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Willemse, T., 2004. Immunophenotyping of the cutaneous cellular infiltrate after atopy patch testing in cats with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 101, 143-151.
- Rundle, C.H., Strong, D.D., Chen, S.T., Linkhart, T.A., Sheng, M.H., Wergedal, J.E., Lau, K.H., Baylink, D.J., 2008. Retroviral-based gene therapy with cyclooxygenase-2 promotes the union of bony callus tissues and accelerates fracture healing in the rat. *J Gene Med* 10, 229-241.
- Rupp, J., Droemann, D., Goldmann, T., Zabel, P., Solbach, W., Vollmer, E., Branscheid, D., Dalhoff, K., Maass, M., 2004. Alveolar epithelial cells type II are major target cells for *C. pneumoniae* in chronic but not in acute respiratory infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41, 197-203.
- Sai, S., Iwata, A., Thomas, R., Allen, M.D., 2001. Vascular cell adhesion molecule-1 up-regulation and phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells predate mononuclear infiltration in transplant arteriopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122, 508-517.
- Salguero, F.J., Mekonnen, T., Ruiz-Villamor, E., Sanchez-Cordon, P.J., Gomez-Villamandos, J.C., 2001. Detection of monokines in paraffin-embedded tissues of pigs using polyclonal antibodies. *Vet Res* 32, 601-609.
- Sanchez-Cordon, P.J., Nunez, A., Salguero, F.J., Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J.C., 2005. Evolution of T lymphocytes and cytokine expression in classical swine fever (CSF) virus infection. *J Comp Pathol* 132, 249-260.
- Sanchez-Cordon, P.J., Rodriguez-Sanchez, B., Risalde, M.A., Molina, V., Pedrera, M., Sanchez-Vizcaino, J.M., Gomez-Villamandos, J.C., 2010. Immunohistochemical detection of bluetongue virus in fixed tissue. *J Comp Pathol* 143, 20-28.
- Sato, Y., Mukai, K., Watanabe, S., Goto, M., Shimosato, Y., 1986. The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Pathol* 125, 431-435.

- Schewe, C., Goldmann, T., Grosser, M., Zink, A., Schluns, K., Pahl, S., Ulrichs, T., Kaufmann, S.H., Nerlich, A., Baretton, G.B., Dietel, M., Vollmer, E., Petersen, I., 2005. Inter-laboratory validation of PCR-based detection of Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 447, 573-585.
- Schultz, H., Kahler, D., Branscheid, D., Vollmer, E., Zabel, P., Goldmann, T., 2008. TKTL1 is overexpressed in a large portion of non-small cell lung cancer specimens. *Diagn Pathol* 3, 35.
- Sen Gupta, R., Hillemann, D., Kubica, T., Zissel, G., Muller-Quernheim, J., Galle, J., Vollmer, E., Goldmann, T., 2003. HOPE-fixation enables improved PCR-based detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex in paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 199, 619-623.
- Sheinin, J.J., Davenport, H.A., 1931. Some Experiments With Salts Of Heavy Metals As Fixatives. *Stain Techn* 6, 131-148.
- Shetye, J.D., Scheynius, A., Mellstedt, H.T., Biberfeld, P., 1996. Retrieval of leukocyte antigens in paraffin-embedded rat tissues. *J Histochem Cytochem* 44, 767-776.
- Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L., 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39, 741-748.
- Shi, S.R., Imam, S.A., Young, L., Cote, R.J., Taylor, C.R., 1995. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 43, 193-201.
- Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, C.R., 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 45, 327-343.
- Shi, S.R., Liu, C., Pootrakul, L., Tang, L., Young, A., Chen, R., Cote, R.J., Taylor, C.R., 2008. Evaluation of the value of frozen tissue section used as "gold standard" for immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 129, 358-366.
- Shi, S.R., Shi, Y., Taylor, C.R., 2011. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem* 59, 13-32.
- Shimajima, M., Miyazawa, T., Kohmoto, M., Ikeda, Y., Nishimura, Y., Maeda, K., Tohya, Y., Mikami, T., 1998a. Expansion of CD8 α + β - cells in cats infected with feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 1), 91-94.
- Shimajima, M., Pecoraro, M.R., Maeda, K., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mikami, T., 1998b. Characterization of anti-feline CD8 monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 61, 17-23.
- Shimajima, M., Nishimura, Y., Miyazawa, T., Tohya, Y., Akashi, H., 2004. T cell subpopulations mediating inhibition of feline immunodeficiency virus replication in mucosally infected cats. *Microbes Infect* 6, 265-271.
- Shirahata, M., Hirasawa, S., Okumura, M., Mendoza, J.A., Okumura, A., Balbir, A., Fitzgerald, R.S., 2004. Identification of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptors in the cat carotid body chemosensory system. *Neuroscience* 128, 635-644.
- Shynlova, O., Williams, S.J., Draper, H., White, B.G., MacPhee, D.J., Lye, S.J., 2007. Uterine stretch regulates temporal and spatial expression of fibronectin protein and its α 5 integrin receptor in myometrium of unilaterally pregnant rats. *Biol Reprod* 77, 880-888.
- Spinardi-Barbisan, A.L., Barbisan, L.F., de Camargo, J.L., Rodrigues, M.A., 2004. Infiltrating CD8+ T lymphocytes, natural killer cells, and expression of IL-10 and TGF- β 1 in chemically induced neoplasms in male Wistar rats. *Toxicol Pathol* 32, 548-557.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S., 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161, 1961-1971.

- Stanley, A.C., Huntley, J.F., Jeffrey, M., Buxton, D., 2001. Characterization of ovine nasal-associated lymphoid tissue and identification of M cells in the overlying follicle-associated epithelium. *J Comp Pathol* 125, 262-270.
- Stein, H., Gatter, K.C., Heryet, A., Mason, D.Y., 1984. Freeze-dried paraffin-embedded human tissue for antigen labelling with monoclonal antibodies. *Lancet* 2, 71-73.
- Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Jr., Cuculis, J.J., Meyer, H.G., 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18, 315-333.
- Su, J.M., Perlaky, L., Li, X.N., Leung, H.C., Antalffy, B., Armstrong, D., Lau, C.C., 2004. Comparison of ethanol versus formalin fixation on preservation of histology and RNA in laser capture microdissected brain tissues. *Brain Pathol* 14, 175-182.
- Sueda, J., Hikita, N., Mochizuki, M., Jimi, A., Kojiro, M., 2000. Kinetics of apoptotic cells in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 799-804.
- Summers, C., Norval, M., De Las Heras, M., Gonzalez, L., Sharp, J.M., Woods, G.M., 2005. An influx of macrophages is the predominant local immune response in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 285-294.
- Suraud, V., Olivier, M., Bodier, C.C., Guilloteau, L.A., 2007. Differential expression of homing receptors and vascular addressins in tonsils and draining lymph nodes: Effect of *Brucella* infection in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 239-250.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W., 2008. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th. IARC Press, Lyon, France.
- Tammer, R., Evensen, O., Lutz, H., Reinacher, M., 1995. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 49, 177-182.
- Tanaka, M., Tanaka, H., Ishikawa, E., 1984. Immunohistochemical demonstration of surface antigen of human lymphocytes with monoclonal antibody in acetone-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 32, 452-454.
- Taylor, C.R., Shi, S.R., Cote, R.J., 1996. Antigen retrieval for immunohistochemistry. Status and need for greater standardization. *Appl Immunohistochem* 4, 144-166.
- Taylor, C.R., Shi, S.R., 2000. Antigen retrieval: call for a return to first principles. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 8, 173-174.
- Taylor, S.H., Al-Youha, S., Van Agtmael, T., Lu, Y., Wong, J., McGrouther, D.A., Kadler, K.E., 2011. Tendon is covered by a basement membrane epithelium that is required for cell retention and the prevention of adhesion formation. *PLoS One* 6, e16337.
- Tingstedt, J.E., Tornehave, D., Lind, P., Nielsen, J., 2003. Immunohistochemical detection of SWC3, CD2, CD3, CD4 and CD8 antigens in paraformaldehyde fixed and paraffin embedded porcine lymphoid tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 94, 123-132.
- Titford, M.E., Horenstein, M.G., 2005. Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med* 129, 502-506.
- Tizard, I.R., 2009a. Chapter 11: Lymphocytes. In: *Veterinary Immunology* 8. Edition. Saunders, St. Louis, 128-138.
- Tizard, I.R., 2009b. Chapter 12: Helper T Cells And Their Response To Antigen. In: *Veterinary Immunology* 8. Edition. Saunders, St. Louis, 139-151.
- Tizard, I.R., 2009c. Chapter 10: Organs Of The Immune System. In: *Veterinary Immunology* 8. Edition. Saunders, St. Louis, 112-127.
- Tizard, I.R., 2009d. Chapter 2: How Inflammation Is Triggered. In: *Veterinary Immunology* 8. Edition. Saunders, St. Louis, 11-27.

- Tome, Y., Hirohashi, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., 1990. Preservation of cluster 1 small cell lung cancer antigen in zinc-formalin fixative and its application to immunohistological diagnosis. *Histopathology* 16, 469-474.
- Tompkins, M.B., Gebhard, D.H., Bingham, H.R., Hamilton, M.J., Davis, W.C., Tompkins, W.A., 1990. Characterization of monoclonal antibodies to feline T lymphocytes and their use in the analysis of lymphocyte tissue distribution in the cat. *Vet Immunol Immunopathol* 26, 305-317.
- Trzpis, M., McLaughlin, P.M., van Goor, H., Brinker, M.G., van Dam, G.M., de Leij, L.M., Popa, E.R., Harmsen, M.C., 2008. Expression of EpCAM is up-regulated during regeneration of renal epithelia. *J Pathol* 216, 201-208.
- Uhlig, U., Haitzma, J.J., Goldmann, T., Poelma, D.L., Lachmann, B., Uhlig, S., 2002. Ventilation-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur Respir J* 20, 946-956.
- Uhlig, U., Fehrenbach, H., Lachmann, R.A., Goldmann, T., Lachmann, B., Vollmer, E., Uhlig, S., 2004a. Phosphoinositide 3-OH kinase inhibition prevents ventilation-induced lung cell activation. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 201-208.
- Uhlig, U., Uhlig, S., Branscheid, D., Zabel, P., Vollmer, E., Goldmann, T., 2004b. HOPE technique enables Western blot analysis from paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 200, 469-472.
- Umland, O., Ulmer, A.J., Vollmer, E., Goldmann, T., 2003. HOPE fixation of cytospin preparations of human cells for in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 51, 977-980.
- Valli, V.E., Jacobs, R.M., Parodi, A.L., Vernau, W., Moore, P.F., 2002. World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals: Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals. In, Armed Force Institut of Pathology, American Registry of Pathologie.
- Valli, V.E., San Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E.J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H., Vernau, W., 2011. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol* 48, 198-211.
- Van Alstine, W.G., Popielarczyk, M., Albregts, S.R., 2002. Effect of formalin fixation on the immunohistochemical detection of PRRS virus antigen in experimentally and naturally infected pigs. *J Vet Diagn Invest* 14, 504-507.
- van den Berg, F.M., Baas, I.O., Polak, M.M., Offerhaus, G.J., 1993. Detection of p53 overexpression in routinely paraffin-embedded tissue of human carcinomas using a novel target unmasking fluid. *Am J Pathol* 142, 381-385.
- van den Broek, A.H., Huntley, J.F., Mackellar, A., Machell, J., Taylor, M.A., Miller, H.R., 2005. Characterisation of lesional infiltrates of dendritic cells and T cell subtypes during primary infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite. *Vet Immunol Immunopathol* 105, 141-150.
- van der Beek, E.M., Pool, C.W., van Eerdenburg, F.J., Sluiter, A.A., van der Donk, H.A., van den Hurk, R., Wiegant, V.M., 1992. Fc-mediated nonspecific staining of the porcine brain with rabbit antisera in immunocytochemistry is prevented by pre-incubation of the sera with proteins A and G. *J Histochem Cytochem* 40, 1731-1739.
- van der Loos, C.M., 2007. A focus on fixation. *Biotech Histochem* 82, 141-154.
- van Essen, H.F., Verdaasdonk, M.A., Elshof, S.M., de Weger, R.A., van Diest, P.J., 2010. Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 63, 1090-1094.

- Vercruyse, L., Caluwaerts, S., Luyten, C., Pijnenborg, R., 2006. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta* 27, 22-33.
- Vince, D.G., Tbakhi, A., Gaddipati, A., Cothren, R.M., Cornhill, J.F., Tubbs, R.R., 1997. Quantitative comparison of immunohistochemical staining intensity in tissues fixed in formalin and Histochoice. *Anal Cell Pathol* 15, 119-129.
- Vincek, V., Nassiri, M., Nadji, M., Morales, A.R., 2003. A tissue fixative that protects macromolecules (DNA, RNA, and protein) and histomorphology in clinical samples. *Lab Invest* 83, 1427-1435.
- Vincek, V., Nassiri, M., Block, N., Welsh, C.F., Nadji, M., Morales, A.R., 2005. Methodology for preservation of high molecular-weight RNA in paraffin-embedded tissue: application for laser-capture microdissection. *Diagn Mol Pathol* 14, 127-133.
- Vollmer, E., Galle, J., Lang, D.S., Loeschke, S., Schultz, H., Goldmann, T., 2006. The HOPE technique opens up a multitude of new possibilities in pathology. *Rom J Morphol Embryol* 47, 15-19.
- Vollmer, E., Goldmann, T., 2011. Pathology on the edge of interdisciplinarity. A historical epitome. *Rom J Morphol Embryol* 52, 223-230.
- von Wasielewski, R., Mengel, M., Nolte, M., Werner, M., 1998. Influence of fixation, antibody clones, and signal amplification on steroid receptor analysis. *Breast J* 4, 33-40.
- Waly, N., Gruffydd-Jones, T.J., Stokes, C.R., Day, M.J., 2001. The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats. *J Comp Pathol* 124, 172-182.
- Waly, N.E., Stokes, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., Day, M.J., 2004. Immune cell populations in the duodenal mucosa of cats with inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med* 18, 816-825.
- Waly, N.E., Gruffydd-Jones, T.J., Stokes, C.R., Day, M.J., 2005. Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *J Comp Pathol* 133, 253-260.
- Wang, B.L., Springer, G.F., Kaufman, M.W., 1996. Concurrent immunohistochemical staining of tumor-infiltrating lymphocytes and carcinoma-associated T (Thomsen-Friedenreich)/Tn antigens in human breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* 44, 187-191.
- Ward, J.M., Erexson, C.R., Faucette, L.J., Foley, J.F., Dijkstra, C., Cattoretti, G., 2006. Immunohistochemical markers for the rodent immune system. *Toxicol Pathol* 34, 616-630.
- Webster, J.D., Miller, M.A., Dusold, D., Ramos-Vara, J., 2009. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *J Histochem Cytochem* 57, 753-761.
- Webster, J.D., Miller, M.A., Dusold, D., Ramos-Vara, J., 2010. Effects of Prolonged Formalin Fixation on the Immunohistochemical Detection of Infectious Agents in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Vet Pathol*.
- Wenneras, C., Ave, P., Huerre, M., Arondel, J., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., Sansonetti, P., 2000. Blockade of CD14 increases Shigella-mediated invasion and tissue destruction. *J Immunol* 164, 3214-3221.
- Werner, M., Von Wasielewski, R., Komminoth, P., 1996. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* 105, 253-260.
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., Battifora, H., 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24, 1016-1019.
- Westbroek, I., van der Plas, A., de Rooij, K.E., Klein-Nulend, J., Nijweide, P.J., 2001. Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem* 276, 28961-28968.

- Wester, K., Asplund, A., Backvall, H., Micke, P., Derveniece, A., Hartmane, I., Malmstrom, P.U., Ponten, F., 2003. Zinc-based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues. *Lab Invest* 83, 889-899.
- Whiteland, J.L., Nicholls, S.M., Shimeld, C., Easty, D.L., Williams, N.A., Hill, T.J., 1995. Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leukocytes in paraffin-embedded rat and mouse tissues with monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 43, 313-320.
- Wiedorn, K.H., Olert, J., Stacy, R.A., Goldmann, T., Kuhl, H., Matthus, J., Vollmer, E., Bosse, A., 2002. HOPE--a new fixing technique enables preservation and extraction of high molecular weight DNA and RNA of > 20 kb from paraffin-embedded tissues. Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect. *Pathol Res Pract* 198, 735-740.
- Willett, B.J., Callanan, J.J., 1995. The expression of leucocyte differentiation antigens in the feline immune system. In: *Feline Immunology and Immunodeficiency*. Willett, B.J., Jarrett, O., (Hrsg.), 1. Edition. Oxford University Press, Oxford, 3-15.
- Williams, C., Ponten, F., Moberg, C., Soderkvist, P., Uhlen, M., Ponten, J., Sitbon, G., Lundberg, J., 1999. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 155, 1467-1471.
- Williams, S.J., White, B.G., MacPhee, D.J., 2005. Expression of alpha5 integrin (Itga5) is elevated in the rat myometrium during late pregnancy and labor: implications for development of a mechanical syncytium. *Biol Reprod* 72, 1114-1124.
- Williams, S.J., Shynlova, O., Lye, S.J., Macphee, D.J., 2010. Spatiotemporal expression of alpha(1), alpha(3) and beta(1) integrin subunits is altered in rat myometrium during pregnancy and labour. *Reprod Fertil Dev* 22, 718-732.
- Williamson, S.L., Steward, M., Milton, I., Parr, A., Piggott, N.H., Krajewski, A.S., Angus, B., Horne, C.H., 1998. New monoclonal antibodies to the T cell antigens CD4 and CD8. Production and characterization in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 152, 1421-1426.
- Wintzer, H.O., Amberg, R., von Kleist, S., Forster, B., 1988. Immunohistological demonstration of lymphocyte surface antigens in postmortem lymphoid tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 413, 581-589.
- Witchell, J., Varshney, D., Gajjar, T., Wangoo, A., Goyal, M., 2008. RNA isolation and quantitative PCR from HOPE- and formalin-fixed bovine lymph node tissues. *Pathol Res Pract* 204, 105-111.
- Wong, J.K., Lui, Y.H., Kapacee, Z., Kadler, K.E., Ferguson, M.W., McGrouther, D.A., 2009. The cellular biology of flexor tendon adhesion formation: an old problem in a new paradigm. *Am J Pathol* 175, 1938-1951.
- Wong, J.K., Alyouha, S., Kadler, K.E., Ferguson, M.W., McGrouther, D.A., 2010. The cell biology of suturing tendons. *Matrix Biol* 29, 525-536.
- Xu, F., Droemann, D., Rupp, J., Shen, H., Wu, X., Goldmann, T., Hippenstiel, S., Zabel, P., Dalhoff, K., 2008. Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 522-529.
- Yamaguchi, S., Balbir, A., Schofield, B., Coram, J., Tankersley, C.G., Fitzgerald, R.S., O'Donnell, C.P., Shirahata, M., 2003. Structural and functional differences of the carotid body between DBA/2J and A/J strains of mice. *J Appl Physiol* 94, 1536-1542.
- Zargham, R., Thibault, G., 2005. alpha8beta1 Integrin expression in the rat carotid artery: involvement in smooth muscle cell migration and neointima formation. *Cardiovasc Res* 65, 813-822.

Zhao, H., Li, J., Traganos, F., Halicka, H.D., Zarebski, M., Dobrucki, J., Darzynkiewicz, Z., 2011. Cell fixation in zinc salt solution is compatible with DNA damage response detection by phospho-specific antibodies. *Cytometry A* 79, 470-476.

8 Anhang

8.1 Tabellen

Tabelle 8.1.1 Daten zu Tagebuchnummer, Rasse, Alter, Geschlecht, pathologischer Gesamtdiagnose und Lagerungsdauer (unter Kennzeichnung postalisch zugestellter oder gefrorener Tierkörper)

Tgb.-Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Pathologische Gesamtdiagnose	Lagerungsdauer
S176/06	EKH	1,5 J	wk	Herz-Kreislaufversagen uÄ	2 d
S1525/06	EKH	1,5 J	wk	Feline infektiöse Peritonitis	4 h
S359/07	nb	4 Mo	m	Katarrhalische Enteritis	1 h
S111/10	nb	nb	mk	Felines Asthma, Rhinitis	3 d (P)
S158/10	BKH	8 Mo	w	Feline infektiöse Peritonitis	2 d (P)
S161/10	EKH	5 J	mk	Aortenruptur	max. 12 h
S174/10	DR	8 Mo	w	Eitrige Hepatitis	2 d (P)
S176/10	EKH	3,5 J	mk	Erkrankungsursache unklar	1 d (P)
S179/10	Siam	4,5 J	mk	Herzmissbildung	gefroren (P)
S180/10	BKH	6 J	nb	Herz-Kreislaufversagen uÄ	gefroren (P)
S193/10	nb	3 J	mk	Anämie	1 d (P)
S606/10	nb	2 J	wk	Felines Asthma	4 h

EKH: Europäische Kurzhaarkatze; BKH: Britische Kurzhaarkatze; DR: Devon Rex; nb: nicht bekannt; m: männlich; mk: männlich kastriert; w: weiblich; wk: weiblich kastriert; uÄ: unklarer Ätiologie; P: Tierkörper über den Postweg eingesandt

Tabelle 8.1.2 Daten zu Fixierungsart und Fixierungsdauer der Gewebeproben sowie Angaben zu abweichender Prozessierung und Paraffinierung

Tgb.-Nr.	Fixierungsmethode	FD	Gewebe	Bemerkungen
S176/06	GF		Milz, LK	
	Formalin	48 h	Milz, LK	
	HOPE®	44 h	Milz, LK	
	ZSF	78 h	Milz, LK	
S1525/06	GF		Milz, LK	
	Formalin		nv	
	HOPE®	47 h	Milz, LK	
	ZSF	75 h	Milz, LK	
S359/07	GF		Milz, LK	
	Formalin	42 h	Milz, LK	
	HOPE®	42 h	Milz, LK	
	ZSF	42 h	Milz, LK	
	ZSF-M	42 h	Milz, LK	PD 30 min
			LK	PD 12,5 h
S111/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	24 h	Milz, LK	
	HOPE®	41 h	Milz, LK	
	ZSF	48 h	Milz, LK	
S158/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	46 h	Milz, LK	
	HOPE®	40 h	Milz, LK	
		64 h	LK	
	ZSF	46 h	Milz, LK	
70 h		Milz, LK		

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 8.1.2 Daten zu Fixierungsart und Fixierungsdauer der Gewebeproben sowie Angaben zu abweichender Prozessierung und Paraffinierung (Fortsetzung)

Tgb.-Nr.	Fixierungsmethode	FD	Gewebe	Bemerkungen
S161/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	46 h	Milz, LK	
	HOPE®	40 h	Milz, LK	
		64 h	Milz, LK	
	ZSF	46 h	Milz, LK	
		70 h	Milz, LK	
S174/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	25 h	Milz, LK	
	HOPE®	42 h	Milz, LK	
		66 h	Milz, LK	
	ZSF	48 h	Milz, LK	
		72 h	Milz, LK	
S176/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	25 h	Milz, LK	
	HOPE®	43 h	Milz, LK	
		67 h	Milz, LK	
	ZSF	49 h	Milz, LK	
		73 h	Milz, LK	
S179/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	25 h	Milz, LK	
	HOPE®	43 h	Milz, LK	
		67 h	Milz, LK	
	ZSF	49 h	Milz, LK	
		73 h	Milz, LK	
S180/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	26 h	Milz, LK	
	HOPE®	44 h	Milz, LK	
		67 h	Milz	

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 8.1.2 Daten zu Fixierungsart und Fixierungsdauer der Gewebeproben sowie Angaben zu abweichender Prozessierung und Paraffinierung (Fortsetzung)

Tgb.-Nr.	Fixierungsmethode	FD	Gewebe	Bemerkungen
S180/10	ZSF	26 h	Milz, LK	
		50 h	Milz, LK	
		74 h	Milz	
S193/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	26 h	Milz, LK	
	HOPE [®]	44 h	Milz, LK	
		67 h	Milz, LK	
	ZSF	26 h	Milz, LK	
		50 h	Milz, LK	
		74 h	Milz, LK	
S606/10	GF		Milz, LK	
	Formalin	24 h	Milz, LK	
	HOPE [®]	17 h	Milz, LK	
		42 h	Milz, LK	
		66 h	Milz, LK	
		89 h	Milz, LK	
		103 h	Milz, LK	
		10 d	Milz, LK	
	ZSF	24 h	Milz, LK	
		48 h	Milz, LK	
		72 h	Milz, LK	
		96 h	Milz, LK	
		120 h	Milz, LK	
		10 d	Milz, LK	
41 d		Milz, LK		

GF: Gefrierschnitttechnik; ZSF: Zinksalzfixans; PD: Paraffinierungsdauer (Gesamtinkubationsdauer der fixierten Proben in Paraffin); LK: Mesenteriallymphknoten; FD: Fixierungsdauer

Tabelle 8.1.3: Prozessierungsprotokoll des Gewebereinbettungsautomaten

Stufe 1	10 % Formalin	1 h	37 °C
Stufe 2	50 % Ethanol	1 h	37 °C
Stufe 3	70 % Ethanol	1 h	37 °C
Stufe 4	80 % Ethanol	1 h	37 °C
Stufe 5	90 % Ethanol	45 min	37 °C
Stufe 6	Isopropanol	1 h	37 °C
Stufe 7	Isopropanol	1 h	37 °C
Stufe 8	Xylol	1,5 h	40 °C
Stufe 9	Xylol	1,5 h	40 °C
Stufe 10	Xylol	1 h	40 °C
Stufe 11	Paraffin	1 h	60 °C
Stufe 12	Paraffin	1 h	60 °C
Stufe 13	Paraffin	1 h	60 °C
Stufe 14	Paraffin	1,5 h	60 °C

Tabelle 8.1.4: Daten zur immunhistologischen Darstellung von CD8⁺ T-Lymphozyten in Gefriermaterial

Tgb.-Nr.	Gewebe	Färbeintensität (Standard)
S176/06	Milz	+++
	LK	+++
S1525/06	Milz	+++
	LK	+++
S359/07	Milz	+++
	LK	+++
S111/10	Milz	+++
	LK	+++
S158/10	Milz	+++
	LK	+++
S161/10	Milz	+++
	LK	+++
S174/10	Milz	+++
	LK	+++
S176/10	Milz	+++
	LK	+++
S179/10	Milz	+++
	LK	+++
S180/10	Milz	-
	LK	+++
S193/10	Milz	+++
	LK	+++
S606/10	Milz	+++
	LK	+++

LK: Mesenteriallymphknoten; Symbole: zur Erläuterung siehe unter 3.4.5.2.2

Tabelle 8.1.5: Daten zur Bewertung der Färbeintensität des immunhistologischen Nachweises von CD8⁺ T-Lymphozyten in formalinfixiertem Material im Vergleich zu parallel inkubiertem Gefriermaterial

Tgb.-Nr.	Gewebe	Bewertung der Färbeintensität	
		Formalinfixiertes Material	Gefrierschnitt (Standard)
S176/06	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S1525/06	Milz	nv	
	LK	nv	
S359/07	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S111/10	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S158/10	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S161/10	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S174/10	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S176/10	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S179/10	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S180/10	Milz	-	-
	LK	-	+++
S193/10	Milz	-	+++
	LK	-	+++
S606/10	Milz	-	+++
	LK	-	+++

LK: Mesenteriallymphknoten; nv: nicht vorhanden; Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 8 unter 3.4.5.2.2

Tabelle 8.1.6 Bewertung des immunhistologischen Nachweises von CD8⁺ T-Lymphozyten in HOPE[®]-fixiertem Material im Vergleich zu Gefriermaterial

Tgb.-Nr.	FD	Gewebe	Bewertung der Färbeintensität	
			HOPE [®] -fixiertes Material	Gefrierschnitt (Standard)
S176/06	44 h	Milz	+	+++
		LK	++	+++
S1525/06	47 h	Milz	+	+++
		LK	++	+++
S359/07	42 h	Milz	+	+++
		LK	++	+++
S111/10	41 h	Milz	+	+++
		LK	++	+++
S158/10	40 h	Milz	+	+++
		LK	+	+++
	64 h	Milz	nv	
		LK	+	+++
S161/10	40 h	Milz	++	+++
		LK	++	+++
	64 h	Milz	+	+++
		LK	++	+++
S174/10	42 h	Milz	++	+++
		LK	++	+++
	66 h	Milz	+	+++
		LK	++	+++
S176/10	43 h	Milz	++	+++
		LK	++	+++
	67 h	Milz	+	+++
		LK	+	+++

Fortsetzung
nächste Seite

Tabelle 8.1.6 Bewertung des immunhistologischen Nachweises von CD8⁺ T-Lymphozyten in HOPE[®]-fixiertem Material im Vergleich zu Gefriermaterial (Fortsetzung)

Tgb.-Nr.	FD	Gewebe	Bewertung der Färbeintensität	
			HOPE [®] -fixiertes Material	Gefrierschnitt (Standard)
S179/10	43 h	Milz	-	+++
		LK	+	+++
	67 h	Milz	-	+++
		LK	+	+++
S180/10	44 h	Milz	-	-
		LK	+	+++
	67 h	Milz	-	-
		LK	nv	
S193/10	44 h	Milz	++	+++
		LK	++	+++
	67 h	Milz	++	+++
		LK	++	+++

FD: Fixierungsdauer; LK: Mesenteriallymphknoten; nv: nicht vorhanden;

Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 8 unter 3.4.5.2.2

Tabelle 8.1.7 Bewertung des immunhistologischen Nachweises von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-fixiertem Material im Vergleich zu Gefriermaterial

Tgb.-Nr.	FD	Gewebe	Bewertung der Färbeintensität	
			ZDF-fixiertes Material	Gefrierschnitt (Standard)
S176/06	78 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
S1525/06	75 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
S359/07	49 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
S111/10	48 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
S158/10	46 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
	70 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
S161/10	46 h	Milz	+	+++
		LK	+	+++
	70 h	Milz	+	+++
		LK	+	+++
S174/10	48 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
	72 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
S176/10	49 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
	73 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++

Fortsetzung
nächste Seite

Tabelle 8.1.7 Bewertung des immunhistologischen Nachweises von CD8⁺ T-Lymphozyten in ZSF-fixiertem Material im Vergleich zu Gefriermaterial (Fortsetzung)

Tgb.-Nr.	FD	Gewebe	Bewertung der Färbeintensität	
			ZDF-fixiertes Material	Gefrierschnitt (Standard)
S179/10	49 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
	73 h	Milz	-	+++
		LK	-	+++
S180/10	26 h	Milz	-	-
		LK	-	+++
	50 h	Milz	-	-
		LK	-	+++
	74 h	Milz	-	-
		LK	nv	
S193/10	26 h	Milz	+	+++
		LK	+	+++
	50 h	Milz	+	+++
		LK	+	+++
	74 h	Milz	+	+++
		LK	-	+++

FD: Fixierungsdauer; LK: Mesenteriallymphknoten; nv: nicht vorhanden; Symbole: zur Erläuterung siehe Tabelle 8 unter 3.4.5.2.2

8.2 Lösungen, Puffer und Bezugsquellen

8.2.1 Lösungen und Puffer

Zinksalzfixans (ZSF, pH 6,5-7,0) nach Beckstead (1994)

0,1 M Tris-buffered saline (TBS):

12,1 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

900 ml Aqua dest.

81,5 ml 1 N HCl

Ad 1000 ml Aqua dest.

0,5 g Calciumacetat

5 g Zinkacetat

5 g Zinkchlorid

Auf eine Voreinstellung des pH-Wertes des Tris/HCl-Puffers auf 7,4, wie in der Publikation von Beckstead (1994) angegeben, wurde verzichtet, da in diesem Fall nach Zugabe von Calciumacetat, Zinkacetat und Zinkchlorid der endgültige pH-Wert von ZSF unter den von Beckstead (1994) vorgegebenen Wert von 6,5-7,0 sank. Der endgültige pH-Wert der Lösung wurde deshalb erst nach Zugabe der Salze mit 1 N HCl auf einen Wert zwischen 6,5 und 7 eingestellt.

Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung (10x):

60,57 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

610 ml Aqua dest.

390 ml 1 N HCl

Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit 1 N HCl

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml NaCl 0,8 % in Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit 1 N NaOH/1 N HCl

Imidazol/HCL-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol

Ad 1000 ml Aqua dest.

500 ml 0,1 M HCl

Einstellen des pH-Wertes auf 7,1 mit 0,1 M HCl

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB)

100 mg DAB

200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1)

Mit Magnetrührer mischen, anschließend mittels eines Trichters und eines Filterpapiers (Filterpapier MN 615 ¼, Ø 320 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30 % H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p.a.) zugeben

Kardasewitsch

200 ml 25% Ammoniaklösung

800 ml 70% Ethanol

Papanicolauos Gebrauchslösung

Papanicolauos Hämatoxylin 1b und Aqua dest. im Verhältnis 1:10 mischen und anschließend filtrieren

8.2.2 Bezugsquellen für Chemikalien, Seren, Antiseren und Geräte

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Aceton (9372.3)

Aluminiumfolie (2596.1)

Ammonia solution, reinst (5460.3)

Formaldehyd (P733.3)

Isopropanol (9866.4)

Roti[®]-Histol (6640.2)

Roti[®]-Plast (Schmelzpunkt 56-58 °C) (6642.6)

DCS Innovative Diagnostik Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg

HOPE[®] I (HL001R500)

HOPE[®] II (HL002C001)

Low Melting Paraffin (Schmelzpunkt: 52-54 °C) (PL003S2K)

Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig

SuperFrost[®]Plus-Objektträger (J1800AMNZ)

R. Langenbrinck, Teningen

SuperFrost[®]Plus Objektträger (03-0060)

Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch

Rotationsmikrotom RM 2255

Life Science International, Frankfurt am Main

Coverplates[™] 721100013

Macherey- Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Filterpapier MN 615 ¼, Ø 320 mm

Merck KGaA, Darmstadt

Calciumacetat (2052)

HCl Tritrisol[®] (1.09970.0001)

Natriumchlorid (1.06400.5000)

NaOH Tritrisol[®] (1.09956.0001)

Papanicolaous Lösung 1b Hämatoxylinlösung S (1.09254.2500)

Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p.a. (1.07210.0250)

Zinkacetat (1.08802.0250)

Zinkchlorid (1.08816.0250)

Microm International GmbH, Walldorf

Rotationsmikrotom HM 335E

Reichert-Jung, Nußloch

Kryomikrotom Frigocut 2700

Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Einbettmedium (4583)

Tissue-Tek[®] SCA[™] Eindeckfilm (4770)

Tissue-Tek[®] TEC[™] 5 Paraffinausgießstation mit Kühlplatte (5229)

Tissue-Tek[®] VIP[™] 5 Jr. Gewebeeinbettungsautomat (5905)

SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn

Ethanol 96 %, verg. mit 1 % Methylethylketon

Paraffin (Schmelzpunkt 50-52 °C)

Xylol

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) (D-5637)

Imidazol (56750)

2-Methylbutan (M3,263-1)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma[®] base) (93352)

Vogel GmbH & Co KG, Gießen

Tissue-Tek[®] Coverslipper (4765)

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BKH	Britische Kurzhaarkatze
CD	cluster of differentiation
d	Tag(e)
DAB	Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dest.	destillata
DR	Devon Rex
EKH	Europäische Kurzhaarkatze
et al.	et alii
FD	Fixierungsdauer
GF	Gefrierschnitttechnik
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOPE [®]	<u>H</u> EPES glutamic acid buffer mediated <u>o</u> rganic solvent <u>p</u> rotection <u>e</u> ffect
IARC	international agency for research of cancer
Ig	Immunglobulin
J	Jahr(e)
kbp	Kilobasenpaare
LK	Mesenteriallymphknoten
M	molar
m	männlich
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
mk	männlich kastriert
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
Mo	Monat(e)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
N	normal
nb	nicht bekannt
nv	nicht vorhanden

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Obj.	Objektivvergrößerung
P	Tierkörper über den Postweg eingesandt
p. a.	pro analysi
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD	Paraffinierungsdauer (Gesamtinkubationsdauer in Paraffin)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion)
s	Sekunde(n)
TBS	Tris-buffered saline
Tgb.-Nr.	Tagebuch-Nummer(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
uÄ	unklarer Ätiologie
UK	United Kingdom (Vereinigtes Königreich)
u. U.	unter Umständen
v. a.	vor allem
verg.	vergällt
w	weiblich
wk	weiblich kastriert
ZSF	Zinksalzfixans
ZSF-M	in ZSF fixierte und manuell nach dem Protokoll von Beckstead (1994) prozessierte Proben
z. T.	zum Teil
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
®	registered trade mark
™	unregistered trade mark

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher für die Überlassung des Dissertationsthemas und für seine freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit sowie seine stete Diskussionsbereitschaft.

den MitarbeiterInnen des Instituts für Veterinär-Pathologie für die herzliche Aufnahme und kollegiale Hilfsbereitschaft.

Dr. Manfred Henrich für die freundschaftliche Zusammenarbeit (sitzend und sprechend!) und seine freigiebige und stets geduldige Hilfe bei rezidivierenden Computerfragen, für die ich tief in seiner Schuld stehe.

Herrn Prof. Dr. Eberhardt Burkhardt für unvergesslich heitere Diagnostikstunden, für die Weitergabe unbezahlbarer Lebensweisheiten und vor allem für seine ansteckende Begeisterung für die Veterinärpathologie.

der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für die Gewährung eines zweijährigen Stipendiums.

Patricia, Christina und Mirjam für ihre Freundschaft - und die richtigen Worte zur richtigen Zeit.

meiner Großmutter und meiner Tante für ihre finanzielle Unterstützung, ihr waches Interesse und die vielen, wunderbaren Erinnerungen, die bleiben.

Roman für unermüdliche Ratschläge und die aufmerksame Zuneigung des großen Bruders.

meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung und unerschöpfliche Geduld, für stets offene Ohren und ihre unerschütterliche Zuversicht - und für eine wundervolle Kindheit!

Frank. Für so vieles. Für alles. Für noch viel mehr.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5931-6



9 783835 195931 6