

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung und gegebenenfalls Modifikation schonender Fixierungs- und Einbettungsverfahren, um so eine möglichst optimierte Kombination der Erhaltung histomorphologischer Strukturen und der Immunreaktivität boviner Leukozytenantigene in paraffineingebetteten Gewebeproben zu erreichen.

Die Untersuchung gliederte sich in drei Arbeitsabschnitte. Proben lymphatischer Gewebe von Rindern wurden im ersten Teil nach acht verschiedenen Methoden fixiert und eingebettet: 10%Formalin mit automatischer Einbettung (laborübliches Standardverfahren), 4%iges gepuffertes Formalin (LILLIE 1965) mit automatischer Einbettung, eine kalte Ethanol-Konservierung (SAINTE-MARIE 1962), die AmeX-Methode (SATO et al. 1986), PLP (COLLINGS et al. 1984), PLPG (GENDELMAN et al. 1983), PLPD (POLLARD et al. 1987) und eine modifizierte Formalin-Dichromat-Fixierung (mod FD5%: 4%iges gepuffertes Formalin mit einem Zusatz von 5% Kaliumdichromat und 10% PEG 400), kombiniert mit dem Einbettungsverfahren für PLPD. Die Erhaltung morphologischer Details wurde anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten im Vergleich zu dem standardmäßig in 10%Formalin fixierten Gewebe beurteilt. Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden Lymphknotenschnitte mit verschiedenen Methoden zur Entmaskierung immunreaktiver Epitope (0,25% Trypsin, 0,05% Pronase, 0,25% Triton-X 100, Mikrowelle, TUF) vorbehandelt. Vierzehn murine, monoklonale Antikörper und ein kreuzreagierender, polyklonaler Antikörper, die acht verschiedene bovine Leukozytenantigene erkennen, wurden als primäre Antisera in der sensitiven ABC-Methode eingesetzt. Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen in den paraffineingebetteten Geweben wurden mit dem Markierungsmuster in Kryostatschnitten korrespondierender Gewebeproben verglichen.

Im zweiten Arbeitsabschnitt wurden zwei Verfahren, die im ersten Teil die besten Ergebnisse geliefert hatten, selektiert und in verschiedenen Parametern modifiziert. Die Erhaltung histologischer Strukturen und der Immunreaktivität einiger Antigene sowie die Praktikabilität der beiden Aufarbeitungsmethoden sollte dadurch verbessert werden. Die Untersuchung der verschiedenen Modifikationen erfolgte in gleicher Weise wie im ersten Arbeitsabschnitt.

Im dritten Arbeitsabschnitt wurde die Reproduzierbarkeit des am besten geeigneten Verfahrens durch dreimalige Wiederholung mit Gewebeproben von je zwei gesunden Schlachtrindern überprüft. Es wurde dabei die Verteilung der verschiedenen, immunhistologisch identifizierten Leukozytensubpopulationen in allen entnommenen Gewebeproben untersucht.

Verglichen mit dem standardmäßig in 10% Formalin fixierten Gewebe lieferte außer dem 4%igen gepufferten Formalin keine der getesteten Fixierungen eine vergleichbar gute Konservierung histologischer Strukturen. In Ethanol-, PLP-, PLPG-, PLPD- oder mod.FD5%-fixierten Geweben wurden deutliche, zelluläre Schrumpfungen nachgewiesen. Ethanol verursachte zusätzlich eine Vakuolisierung von Zellkernen, während PLPD und mod.FD5% in einer Kondensierung des nukleären Chromatins resultierten. Dennoch waren histologische Details bei diesen fünf

Verfahren noch ausreichend gut erhalten. Die AMeX-Methode hingegen führte zu erheblichen Artefakten, so daß dieses Verfahren von den immunhistologischen Untersuchungen ausgeschlossen wurde. Auch hinsichtlich der Erhaltung der Immunreaktivität der verschiedenen Leukozytenantigene fanden sich große Unterschiede. In formalinfixiertem Gewebe waren nur BoWC1⁺ und CD3⁺ Zellen vollständig darstellbar. Die Zellen, die die B-Zell-Antigene BoWC3, BoWC4 und BoIgM exprimieren sowie die CD1w2⁺ Zellen wurden nur teilweise markiert. Die BoCD4- und BoCD8-spezifischen Antikörper ließen im formalinfixierten Gewebe keinerlei Immunreaktivität erkennen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Ethanol-Konservierung erzielt. Die Markierung der BoWC3⁺ Zellen war bei dieser Methode vollständiger, hingegen konnten CD3⁺ Zellen nicht dargestellt werden. Nach PLP- und PLPG-Fixierung lieferten die meisten Antikörper ein dem Markierungsmuster im Kryostatschnitt entsprechendes Färbungsergebnis. Nur BoCD4⁺ und BoCD8⁺ Zellen wurden nicht markiert. Die Darstellung aller untersuchten Antigene erlaubten nur die PLPD- und die mod.FD5%-Methode mit einer Entwässerung des Gewebes über Isopropanol bei 4°C und einer Einbettung in Paraffin mit niedrigem Schmelzpunkt. Mit den BoCD4-spezifischen Antikörpern CC30 und IL-A12 wurden in mod.FD5%-fixiertem Gewebe die intensiveren Markierungen erzielt. Einer der BoCD8-spezifischen Antikörper, CC58, reagierte in keinem der fixierten, paraffineingebetteten Gewebe.

Die Erhaltung der morphologischen Struktur des Gewebes mit der modifizierten Formalin-Dichromat-Fixierung konnte weder durch eine Reduzierung des Kaliumdichromat-Gehalts um die Hälfte, noch durch eine Verlängerung der Fixierungsdauer von sechs auf dreißig Stunden wesentlich verbessert werden. Beide Maßnahmen wirkten sich jedoch negativ auf die Immunreaktivität des sensitiven BoCD4-Antigens aus. Wurde der pH-Wert dieses Fixans durch Zugabe von 5N NaOH auf pH 7,5 eingestellt, so resultierte eine Verschlechterung der Konservierung sowohl der histologischen Strukturen als auch der Immunreaktivität einiger Antigene. Auch die Versuche die PLPD und die mod.FD5%-Methode durch den Einsatz eines automatischen Einbettungsverfahrens oder die Verwendung von Paraffin mit höherem Schmelzpunkt praktikabler zu machen, führten zu einem Verlust der Immunreaktivität mehrerer Antigene. Die Wahl des Entwässerungsmediums hatte hingegen keinen so deutlichen Einfluß. Bei der Entwässerung über unvergälltes Ethanol waren die immunhistologischen Färbungsergebnisse verglichen mit der Isopropanolentwässerung nur geringgradig schlechter, vergälltes Ethanol hingegen reduzierte die Immunreaktivität des BoCD4-Antigens deutlich.

Die mod.FD5%-Methode erwies sich somit als das Verfahren mit den besten Resultaten. Es gewährleistete in dieser Untersuchung die beste Kombination in der Erhaltung struktureller Details und der Immunreaktivität zahlreicher boviner Leukozytenantigene.

6 Summary

Birgit Rathkolb:

Investigations on the immunohistological identification of bovine leukocyte subsets in paraffin embedded tissues

The objective of this study was to test and modify different fixation and embedding procedures to preserve both, histological details and the immunoreactivity of marker molecules of bovine leukocyte subsets.

The study is divided into three parts. In the first part various bovine lymphoid tissues were fixed and embedded according to eight different methods: 10% formalin with automatic embedding (standard laboratory procedure), 4% buffered formalin (LILLIE 1965) with automatic embedding, a cold ethanol conservation procedure (SAINTE-MARIE 1962), the AMeX-method (SATO et al. 1986), PLP (COLLINGS et al. 1984), PLPG (GENDELMAN et al. 1983), PLPD (POLLIARD et al. 1987) and a modified formalin-dichromate fixation (mod.FD5%: 4% buffered formalin with 5% potassium dichromate and 10% PEG 400) combined with the embedding procedure for PLPD. The preservation of morphological details in H&E stained sections was evaluated by comparison to tissues fixed in 10% formalin and embedded in paraffin according to the standard laboratory procedure. For immunohistology, lymph node sections were partly treated with different methods (0.25% trypsin, 0.05% pronase, 0.25% Triton-X 100, microwave, TUF) to unmask immunoreactive epitopes. Fourteen murine monoclonal antibodies and one crossreactive polyclonal antibody recognizing eight different bovine leukocyte antigens were used as primary antisera in a sensitive ABC method. The preservation of the immunoreactivity in paraffin embedded tissues was compared with the pattern of immunohistological staining in cryostat sections of native tissue.

In the second part of this investigation two methods, providing the best results in the previous part, were selected and modified in different aspects to improve the conservation of the immunoreactivity of the tested antigens and of histological structures as well as the practicability of the preparation procedures. The preservation of histological structures and of the immunoreactivity by these modifications was investigated as described for the first part.

In the third working step the reproducibility of the most suitable procedure was tested by a three times repeat with tissues from different animals. In this section the distribution of the different leukocyte subsets was investigated in all collected tissues.

The two formalin fixations resulted in the best preservation of histological structures. Tissues fixed with ethanol, PLP, PLPG, PLPD and mod.FD5% showed some cellular shrinkage. Ethanol additionally caused a vacuolization of nuclei while PLPD and mod.FD5% resulted in a condensation of nuclear chromatin. Nevertheless, morphological structures were sufficiently

preserved using these five procedures. Using the AMeX-method the tissue was largely destroyed and therefore this method was excluded from the immunohistological investigations.

Substantial differences were found regarding the preservation of the immunoreactivity of the various bovine leukocyte antigens. In formalin fixed tissues only BoWC1⁺ and CD3⁺ cells were completely detectable. The cell populations expressing three different B cell antigens, BoWC3, BoWC4 and BoIgM, as well as the BoCD1w2⁺ cells were incompletely labeled in formalin fixed tissues. The antibodies recognizing BoCD4 and BoCD8 showed no immunoreactivity at all. The results were similar in ethanol fixed tissues. The labeling of BoWC3⁺ cells was more completely than in formalin fixed tissues, but on the other hand CD3⁺ cells could not be demonstrated using this method. The PLP- and the PLPG-method provided better results. Most antigens were detectable and labeled completely. Only BoCD4⁺ and BoCD8⁺ cells could not be demonstrated. Only the PLPD fixation and the modified formalin-dichromate fixation combined with a low temperature embedding procedure in low melting point paraffin allowed the demonstration of all antigens investigated. More intensive staining results with the BoCD4 specific antibodies CC30 and IL-A12 were obtained in mod.FD5%-fixed tissues. One BoCD8 specific antibody, CC58, did not react with cellpopulations in any of the fixed tissues.

A reduction of the potassium dichromate concentration of the mod.FD-fixative and a prolongation of the fixation time from six to thirty hours did not effectively improve the preservation of histological structures. But the immunoreactivity of the most sensible antigens was impaired by these modifications. When the pH of the fixative was adjusted at pH 7,5 by addition of 5N NaOH, the preservation of histological details and of the immunoreactivity of some sensitive antigens was impaired. Also attempts to render the PLPD- or the FD-method more practicable by use of an automatic embedding procedure or at least paraffin with a higher melting point resulted in a loss of immunoreactivity. The choice of different alcohols for the dehydration showed less influence. Compared to isopropanol, absolute ethanol only mildly impaired immunohistological staining results, while denatured ethanol markedly reduced the immunoreactivity of BoCD4.

The mod.FD5%-fixation combined with a cold temperature embedding in low-melting-point paraffin wax proved to be the best procedure providing both, acceptable morphology and good immunoreactivity of many bovine leukocyte antigens.