

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Immunhistologie .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Bedeutung und Einsatzgebiete .....	2
2.1.2 Leukozytendifferenzierungsantigene .....	3
2.1.3 CD8 - Charakterisierung und Bedeutung des immunhistologischen Nachweises .....	5
<b>2.2 Gewebefixierung .....</b>	<b>7</b>
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 Leukozytenoberflächen-antigenen .....	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
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Vorberichte .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Herstellung von Gewebelöcken.....</b>	<b>33</b>
3.3.1 Herstellung von Gefrierlöcken .....	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
<b>3.4 Immunhistologische Untersuchung .....</b>	<b>42</b>
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 Gewebereinbettungsautomaten 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
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Immunhistologie .....</b>	<b>57</b>
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 <sup>+</sup> 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
<b>4.2 Morphologieerhalt.....</b>	<b>87</b>
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
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>90</b>
<b>5.1 Immunhistologie.....</b>	<b>90</b>
5.1.1 Eignung der Fixierungsmethoden für die immunhistologische Darstellung von CD8 <sup>+</sup> 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 Analyse negativer Nachweise .....	94
5.1.1.2.1.2 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
<b>5.2 Morphologieerhalt .....</b>	<b>113</b>
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
<b>6 Zusammenfassung / Summary .....</b>	<b>115</b>
6.1 Zusammenfassung .....	115
6.2 Summary .....	117
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>139</b>
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
<b>9 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>154</b>