

## Schwerpunkt: Gastrointestinale Motilitätsstörungen

Pathologie 2007 · 28:93–100  
DOI 10.1007/s00292-007-0902-1  
Online publiziert: 17. Februar 2007  
© Springer Medizin Verlag 2007

E. Bruder · Y. Knecht · M. Kasper · R. Chaffard · S. Ipsen · L. Terracciano ·  
W. A. Meier-Ruge

Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel, Schweiz

# Enzymhistochemische Diagnostik gastrointestinaler Motilitätsstörungen

## Ein Laborleitfaden

Die Enzymhistochemie stellt die enzymatische Aktivität eines Proteins am nativen Gewebeschnitt dar und erlaubt so einen Einblick in die Zellfunktion [3, 4, 7, 9]. In der Diagnostik gastrointestinaler Motilitätsstörungen lässt sich enzymhistochemisch die Aktivität cholinergischer Nervenfasern komplementär zu derjenigen der Dehydrogenasen der Nervenzellen des enteralen Nervensystems beurteilen. So kann eine funktionell relevante Aussage über die enterale Innervation getroffen werden.

Die Acetylcholinesterase-Reaktion zeigt die Acetylcholinesterase-Aktivität der cholinergen Nervenfasernetze der Muscularis mucosae und der Muscularis propria sowie das Vorhandensein von cholinergen Nervenfasern im Stroma der Lamina propria.

Laktatdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und Nitroxidsynthetase entsprechen zytoplasmatischen und mitochondrialen Enzymen vor allem der Nervenzellen und erlauben die selektive färbende Hervorhebung der Nervenzellen der Ganglien von Plexus submucosus und myentericus. Damit ist eine rasche semi-quantitative Einschätzung des enterischen Nervenzellbesatzes möglich. Auch in der Schnellschnittsituation gelangt sie zur Anwendung.

Die Picro-Siriusrot-Färbung stellt das kollagenfaserige Bewegungsgerüst der Muscularis propria dar und ermöglicht eine Aussage über dessen Architektur und somit über die strukturelle Voraussetzung zum peristaltischen Transport.

Diese Anleitung beschreibt detailliert alle enzymhistochemischen Färbungen zur Untersuchung gastrointestinaler Motilitätsstörungen, wie sie routinemäßig im Hirschsprung-Labor des Institutes für Pathologie am Universitätsspital Basel zur Anwendung gelangen. Die Methodik wurde über 4 Jahrzehnte erprobt und technisch laufend verfeinert. Diese standardisierte und optimierte Färbetechnik garantiert reproduzierbare und vergleichbare Resultate.

In den letzten Jahren sind auch kommerzielle enzymhistochemische Reaktionskits verfügbar geworden (Districhem, Hohlweg 25, CH-4104 Oberwil, E-Mail: [districhem@bluewin.ch](mailto:districhem@bluewin.ch) oder Bio-Optica, Via San Faustino 58, I-20134 Milano, <http://www.bio-optica.it>).

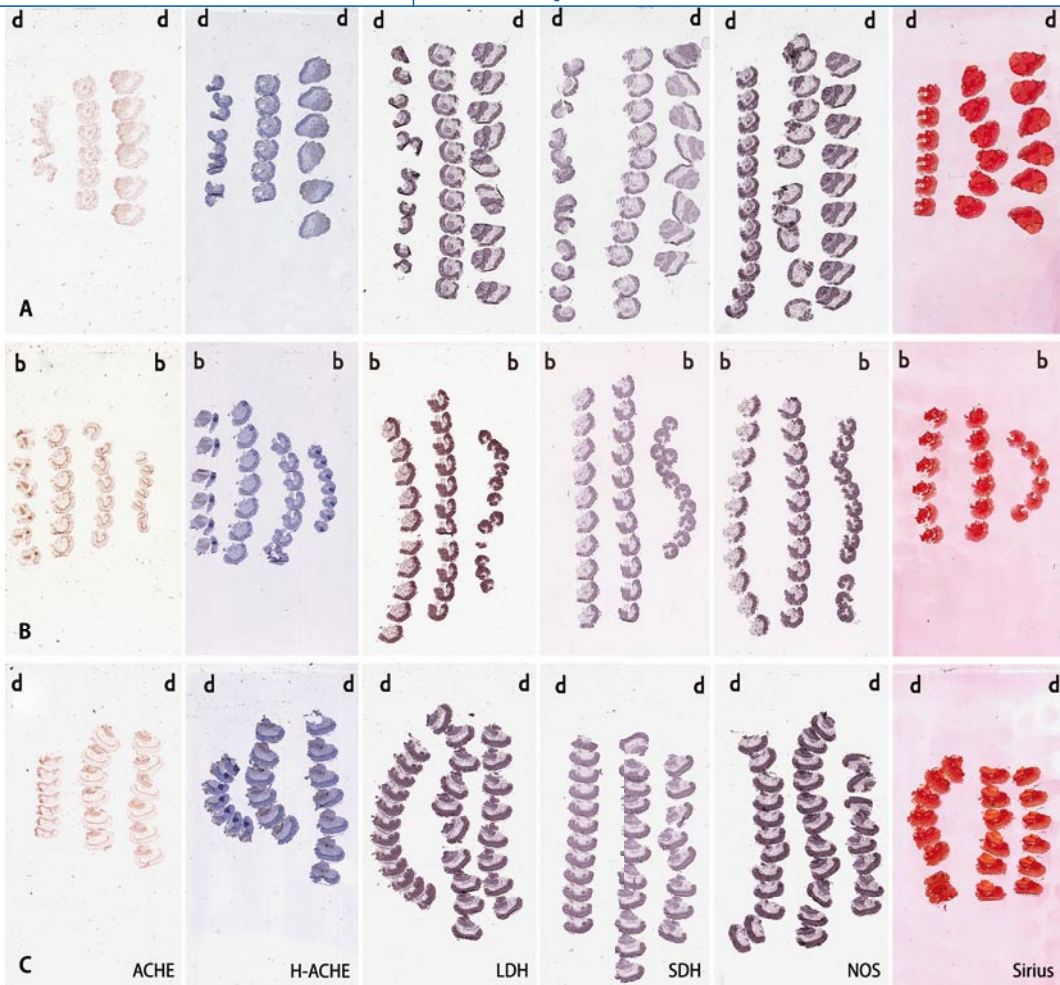
### Umgang mit Biopsien

#### Transport

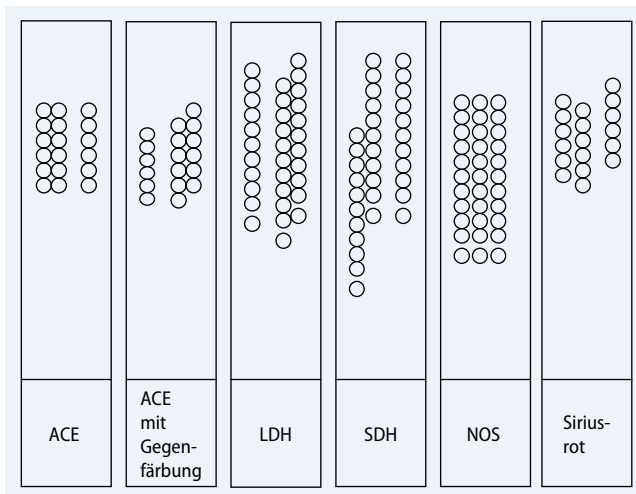
Die Enzymhistochemie bildet die enzymatische Aktivität eines Proteins ab. Da die Enzymaktivität der meisten Proteine

durch Formalinfixation und Paraffineinbettung verloren geht, basieren die Techniken zur Untersuchung gastrointestinaler Motilitätsstörungen auf nativem, unfixiertem Gewebe. Darüber hinaus sind auch bei anderen Geweben Aussagen über deren Vitalität möglich (z. B. perakuter Myokardinfarkt, zerebraler Infarkt, endokrine Aktivitäten).

In der allgemeinen Routinediagnostik der Pathologie ist heute die Formalinfixation etabliert. Daher müssen die Einsender darüber informiert werden, dass zur speziellen Diagnostik gastrointestinaler Motilitätsstörungen native, unfixierte Biopsien erforderlich sind. Insbesondere muss für einen adäquaten gekühlten Transport zwischen Operationssaal oder Endoskopieeinheit und Pathologie gesorgt sein. Bis zu 6 Stunden ist eine Kühlung der nativen Biopsien auf Wassereis möglich. Falls die Transportdauer 6 Stunden überschreitet, müssen die Biopsien auf Trockeneis (CO<sub>2</sub>, –80°C) tiefgefroren und in gefrorenem Zustand transportiert werden. Hierzu sollten wichtige Verpackungshinweise beachtet und ausreichend Trockeneis zu Verfügung gestellt werden. Die Infoboxen auf S. 99 zeigen ein Beispiel für eine Transportinformation an die einsendenden Kliniken für das Institut für Pathologie am Universitätsspital Basel.



**Abb. 1** ▲ Beispiel aus der Biopsiediagnostik bei Verdacht auf Innervationsstörung. **A** Die Biopsie aus der Linea dentata wurde aufgetaut und vollständig in Kryostatschnitten à 15 µm Dicke (Enddicke 4,5 µm) aufgearbeitet. Es werden alternierend Serienschritte hergestellt. Standardisierte Anordnung von links nach rechts: Acetylcholinesterase (ACHE) ohne Gegenfärbung 18 Schnitte, ACHE mit Gegenfärbung 20 Schnitte, Laktatdehydrogenase (LDH) 32 Schnitte, Succinatdehydrogenase (SDH) 31 Schnitte, Nitroxidsynthetase (NOS) 32 Schnitte, Picro-Siriusrot 18 Schnitte. Gesamtzahl der Schnitte: 151. Die Serienschritte werden von links nach rechts in gleicher Orientierung auf dem Objektträger aufgezogen, um eine rasche Übersicht der gesamten Biopsie am Schnittpräparat zu ermöglichen. **B** Analoge Verarbeitung der Biopsie aus dem Rektum, 4 cm ab ano. Schnittanordnung von links nach rechts: ACHE 26 Schnitte, ACHE mit Gegenfärbung 27 Schnitte, LDH 33 Schnitte, SDH 33 Schnitte, NOS 32 Schnitte, Picro-Siriusrot 18 Schnitte, Gesamtzahl der Schnitte: 169. **C** Biopsie von 6 cm ab ano. Schnittanordnung von links nach rechts: ACHE 19 Schnitte, ACHE mit Gegenfärbung 20 Schnitte, LDH 30 Schnitte, SDH 31 Schnitte, NOS 31 Schnitte, Picro-Siriusrot 20 Schnitte, Gesamtzahl der Schnitte: 151



**Abb. 2** ◀ Aufteilung der Kryostatschnitte

### Auffrieren der Biopsien und Herstellung der Kryostatschnitte

Die Herstellung der Biopsieschnitte sollte konstant nach diesem Protokoll erfolgen, um eine optimale Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten.

- Montage der Biopsien mit wenig Tissue-Tek® auf Kryostatträgern in Trockeneis (Biopsie nicht in Tissue Tek® einschließen, wegen elektrostatischem Aufrollen der Schnitte),
- beim Auffrieren auf optimale Orientierung der Biopsien achten,

- ganze Biopsie in 15±1 µm dicke Kryostatserienschnitte aufschneiden (Schnitte haben durch Ausbreitung auf Objektträger und Lufttrocknung eine Enddicke von etwa 4,5 µm),
- für Laktatdehydrogenase-, Succinatdehydrogenase- und Nitroxidsynthetase-Färbungen: je 3 Reihen mit je mindestens 10 Serienschritten (■ **Abb. 1**),
- Acetylcholinesterase (mit und ohne Gegenfärbung) und Siriusrot-Färbung: je 3 Reihen mit je mindestens 6 Serienschritten (Maximierung des Aussagewerts der Biopsie),
- Schnitte lufttrocknen,
- anschließend Schnitte sofort färben oder in geschlossener Box bei +4°C für *wenige* Tage lagern,
- **Achtung:** nach Lagerung Schnitte bei +4°C vor dem Färben zuerst in *geschlossener Box* (Kondenswasser!) etwa 15 min auf Raumtemperatur bringen,
- für lange Aufbewahrung Schnitte einzeln eingeschweißt tiefgefroren bei -70°C lagern.

### Aufteilung der Schnitte

Die Aufteilung der Schnitte ist schematisch in der ■ **Abb. 2** dargestellt.

### Auffrieren von Resektaten auf Kryostatträgern

Ist die Diagnose eines M. Hirschsprung bi-optisch bestätigt, besteht gegenwärtig die Therapie der Wahl in der chirurgischen Resektion des aganglionären Darmsegments. Proximal des aganglionären Darmabschnitts findet sich eine hypoganglionäre Übergangszone mit spärlich entwickeltem Plexus myentericus, die sich auf bis zu 30 cm Länge erstrecken kann. Das hypoganglionäre Übergangsegment genügt nicht, um eine ausreichend funktionsfähige Peristaltik zu bewirken, sodass die chirurgische Resektion die hypoganglionäre Übergangszone einschließen und bis zum normal innervierten proximalen (oralen) Darmabschnitt erfolgen sollte.

Die Aufarbeitung des resezierten Darms muss dieser Fragestellung Rechnung tragen und die Zunahme der Gangliendichte mit zunehmender Nervenzellbesiedelung in Längsrichtung von

## Zusammenfassung · Abstract

Pathologie 2007 · 28:93–100 DOI 10.1007/s00292-007-0902-1  
© Springer Medizin Verlag 2007

E. Bruder · Y. Knecht · M. Kasper · R. Chaffard · S. Ipsen · L. Terracciano · W. A. Meier-Ruge  
**Enzymhistochemische Diagnostik gastrointestinaler Motilitätsstörungen. Ein Laborleitfaden**

### Zusammenfassung

Die enzymhistochemischen Reaktionen für Acetylcholinesterase, Laktatdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und Nitroxidsynthetase bilden gegenwärtig den Goldstandard zur histologischen Diagnose gastrointestinaler Motilitätsstörungen. Die Acetylcholinesterase-Reaktion stellt cholinerge Nervenfaser-netze der Muscularis mucosae und Muscularis propria dar und zeigt deren Acetylcholinesterase-Aktivität an. Laktatdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und Nitroxidsynthetase dienen komplementär der selektiven Darstellung der Nervenzellen des Plexus myentericus und submucosus. Diese enzymhistochemischen Techniken erfordern natives Gewebe, sodass der direkte Transport von der gastroenterologischen oder chirurgischen Abteilung zur Pathologie ohne Zeitverzug gewährleistet sein muss. Alternativ

können die Biopsien auf Trockeneis an ein weiter entfernt gelegenes Institut versendet werden. Die hier beschriebene Laboranleitung ist über 4 Jahrzehnte optimiert und verfeinert worden. Die im Labor optimierten enzymhistochemischen Reaktionen zeichnen sich durch ein höchstes Maß an Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit aus. Insbesondere für eine interinstitutionelle Vergleichbarkeit der Resultate ist eine standardisierte Methodik unerlässlich. Entsprechend wird in dieser Anleitung eine detaillierte Darstellung der wichtigsten enzymhistochemischen Reaktionen zur Diagnostik gastrointestinaler Motilitätsstörungen gegeben.

### Schlüsselwörter

Enzymhistochemische Technik · Chronische Obstipation · Biopsie · Labortechnik

## Enzyme histochemical reactions for diagnosis of gastrointestinal motility disorders. A laboratory guide

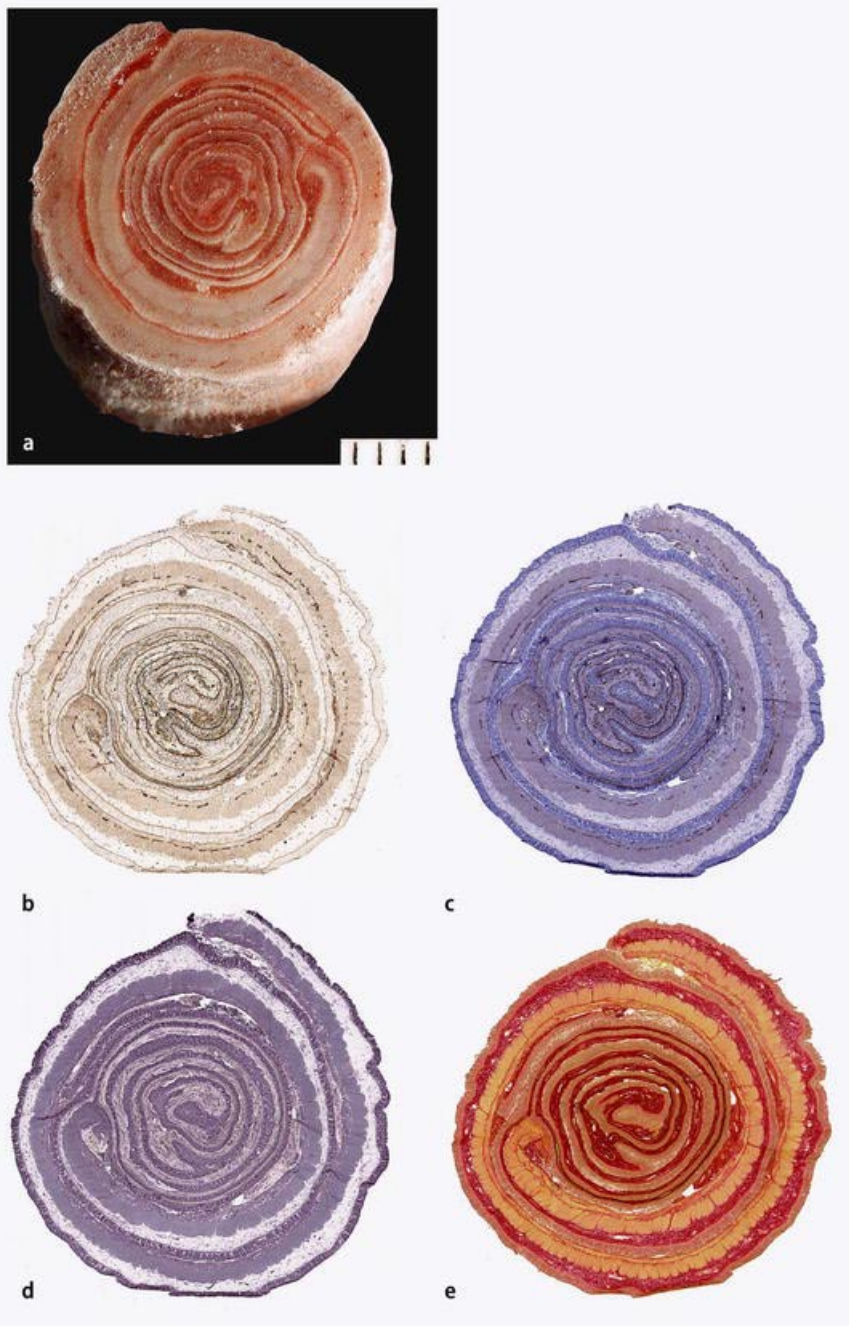
### Abstract

The enzyme histochemical reactions for acetylcholinesterase, lactic dehydrogenase, succinic dehydrogenase and nitroxide synthase are currently the gold standards for the diagnosis of gastrointestinal motility disorders. The acetylcholinesterase staining reaction shows the cholinergic nerve fibre network of the muscularis mucosae and muscularis propria, and correlates with their acetylcholinesterase activity. Lactic dehydrogenase, succinic dehydrogenase and nitroxide synthase selectively demonstrate the nerve cells of the myenteric and submucous plexus. These enzyme histochemical techniques require fresh, native tissue. Consequently, the transport of biopsies from gastroenterology or surgery to pathology must be well organized and feasible without time loss. Alternatively, biopsies

may be mailed on dry ice to more distant pathology institutes. The enzyme histochemical laboratory technique has been optimized and refined over four decades. The optimized reactions are highly reliable and reproducible. In particular, a standardized methodology is a prerequisite for the interinstitutional comparability of results. This laboratory manual provides a detailed methodological description of the most important enzyme histochemical reactions for the diagnosis of gastrointestinal motility disorders.

### Keywords

Enzyme histochemical technique · Chronic constipation · Biopsy · Laboratory technique



**Abb. 3** ▲ Verarbeitung eines Kolonresektats bei M. Hirschsprung. **a** Makroskopische Aufsicht auf längs aufgefrorenes Kolonresektat. Im Zentrum der Rolle der kaudale Resektionsrand des Kolonstreifens, außen der kraniale Resektionsrand. **b–e** Enzymohistochemisch gefärbte Gefrierschnitte (15 µm Dicke) des Kolonresektats in der Lupenübersicht: **b** Enzymohistochemie für AChE ohne Gegenfärbung. **c** Enzymohistochemie für AChE mit Hämalau-Gegenfärbung. **d** Enzymohistochemie für SDH. **e** Picro-Siriusrot-Färbung

kaudal nach kranial dokumentieren. Dies lässt sich am besten gewährleisten, indem das resezierte Kolon aufgerollt und auf diese Weise in Längsrichtung aufgefroren wird. Diese bewährte Rollentechnik erlaubt einen idealen Überblick jeweils über 10–15 cm Darmlänge pro Schnittpräparat. Bei sehr langen Resektaten sind zuweilen

2–3 kaudokranial aufgerollte Darmsegmente erforderlich.

Zur Herstellung einer Darmrolle wird intertänial ein etwa 1–2 cm breiter Streifen der gesamten Darmwand über die gesamte Länge des Resektats entnommen. Nach Abpräparieren des subserösen Fett- und Bindegewebes wird der Darmstreifen von

kaudal nach kranial standardisiert orientiert aufgerollt. Diese Darmrolle wird anschließend mit Pinzetten gefasst, auf einen mit Tissue Tek® präparierten Kryostaträger transportiert und auf Trockeneis aufgefroren (■ **Abb. 3 a–e**). Kryostat-schnitte von 15 µm Dicke werden analog zu den diagnostischen Schleimhautbiopsien für die enzymohistochemischen Färbungen hergestellt, um die Verteilung der Ganglien des Plexus myentericus und der Acetylcholinesterase-Aktivität beurteilen zu können. Dabei gewährt die Rollentechnik eine optimale Übersicht. Es werden immer alle 4 komplementären enzymohistochemischen Reaktionen durchgeführt, die Laktatdehydrogenase (LDH) und Nitroxidsynthetase (NOS) sind in ■ **Abb. 3 a–e** nicht gezeigt.

Für den postoperativen Verlauf sind vor allem die Befunde am proximalen Resektatrand von Bedeutung, dieser wird daher in einem separaten Querschnitt nochmals untersucht (■ **Abb. 4**).

### Enzymohistochemische Färbetechniken

#### Darstellung der Acetylcholinesterase (ACHE)

Siehe [2].

1. Kryostat-schnitte, 15 µm dick, auf Polylisine® (oder entfettete) Objektträger ausbreiten, ggf. mit einem feinen Pinsel separieren, auftauen und luft-trocknen. Die Schnitte können bei 4°C im Kühlschrank in einer verschließbaren Mappe/Box aufbewahrt werden (Schnitte verlieren durch Auftauen und Trocknen 70% ihres Volumens).
2. Inkubation in Gebrauchsmedium bei 37°C im Wasserbad, 90 min. Pro Biopsie 2 Objektträger inkubieren; einer ist für die Variante mit der Kernfärbung vorgesehen.
3. Spülen mit Aqua demin.
4. Für die Schnitte mit Gegenfärbung: aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, abs. Alkohol), im zweiten abs. Alkohol 5–20 min stehen lassen.
5. Die nicht gegenzufärbenden Schnitte: nach Aqua demin. fixieren in Phosphat-gepuffertem Formalin 4%, pH 7,0 während 20 min.
6. Aqua dest. 2-mal wechseln.

7. Mit Medi-Mount® (Medite Best.-Nr. 70-2100-30) überziehen und auf Heizplatte bei 60–70°C trocknen. Schnitte mit Pertex eindecken.
8. Gegenfärbung (ab Punkt 4): direkt aus dem Alkohol 1 min in Harris Hämatoxylin (Medite Best.-Nr. 41-1011-00) geben, spülen und bläuen in handwarmem Wasser (kurz).
9. Auch die gegengefärbten Schnitte ins Aqua dest. stellen, mit Medi-Mount® überziehen und anschließend decken, wie Punkt 7. Die Gegenfärbung wird durch Medi-Mount® stabilisiert. Ohne Medi-Mount® verblasst die Gegenfärbung.

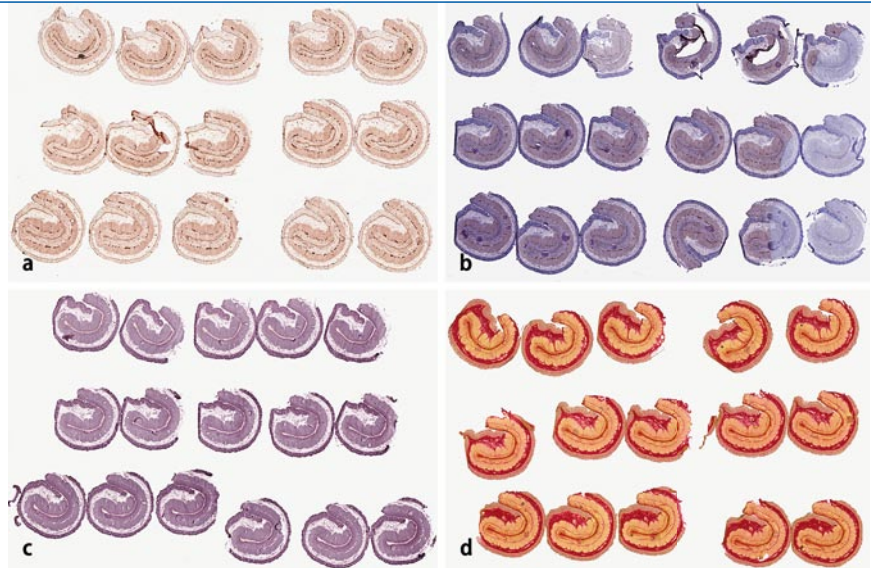
### Herstellung von Gefriermedium

- 500 mg Acetylthiocholinjodid (Fluka 01480) und
- 5,14 g wasserfreies Natriumacetat 0,06 M (Merck 6268) in 725 ml Aqua dest. lösen,
- 1,43 g Tri-Natriumcitrat-2-hydrat 0,1 M (Merck 6430) in 50 ml Aqua dest. lösen,
- 750 mg Kupfersulfat  $\times 5 \text{ H}_2\text{O}$  0,03 M (Merck 2790) in 100 ml Aqua dest. lösen,
- 25 ml Iso-Ompa (löst sich sehr langsam) [250 mg Iso-Ompa (Tetraisopropylpyrophosphoramid, Sigma Best.-Nr. T 1505, 250 mg) in 182 ml Aqua dest. vorlösen, im Kühlschrank haltbar],
- etwa 7 Tropfen konzentrierte Essigsäure zufügen, um den pH-Wert auf 5,5–5,6 einzustellen,
- 25 Portionen à 36 ml tiefgefrieren.

Substrat ist mehrere Monate bei  $-20^\circ\text{C}$  haltbar.

### Gebrauchslösung

- Medium unter fließendem warmem Wasser auftauen und auf etwa  $37^\circ\text{C}$  aufwärmen lassen,
- 4 ml Kaliumferrizyanid 0,005 M (Merck 4973) dem aufgetauten Medium zusetzen (Stammlösung: z. B. 165 mg/100 ml Aqua dest., bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahren, mehrere Monate haltbar).



**Abb. 4 ▲** Kryostatsschnitte des quer aufgearbeiteten proximalen Resektatrandes. **a** AChE-Enzymhistochemie. **b** AChE-Enzymhistochemie mit Hämalaun-Gegenfärbung. **c** LDH-Enzymhistochemie. **d** Picrosiriusrot-Färbung

### Laktatdehydrogenase (LDH)

Nach Hess [1, 5, 6].

1. Kryostatsschnitte, 15  $\mu\text{m}$  dick, auf Polysine® (oder entfettete) Objektträger wie bei der AChE-Darstellung ausbreiten, ggf. mit einem feinen Pinsel separieren, auftauen, lufttrocknen, Schnitt-Enddicke etwa 4,5  $\mu\text{m}$ . Die Schnitte können bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlschrank in einer verschließbaren Mappe/Box aufbewahrt werden.
2. Inkubation in aufgetautem Gebrauchsmittel LDH bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad, 5–10 min.
3. Spülen mit Aqua demin.
4. Fixieren in Phosphat-gepuffertem 4% Formalin, pH 7,0 während 20 min.
5. Spülen in Leitungswasser und Aqua demin.
6. Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und mit Pertex eindecken.
7. Schnitte können auch aus dem Aqua demin direkt auf Heizplatte getrocknet werden. Nach Xylol eindecken.

### Herstellung von Gefriermedium

- 11,2 g Natrium-DL-lactat (Natrium-Lactat Fluka 71720) 1,0 M in 300 ml Aqua dest.,
- 100 ml einer Lösung aus Natriumcyanid 0,1 M (Merck 106437) 1 g/200 ml mit 1 N HCl auf pH-Wert 7,2 einstellen,

- 100 ml einer Lösung von Magnesiumchlorid Hexahydrat 0,05 M (2 g/200 ml),
- 250 ml PBS („phosphate buffered saline“ 0,01–0,025 molar), pH 7,4
- oder Phosphatpuffer (s. unten),
- 250 ml Tetranitroblau-Tetrazoliumchlorid, 0,1%, wässrig (TNBT Fluka 87961) 250 mg TNBT in 5 ml Dimethylformamid vorlösen und tropfenweise unter Rühren zu 250 ml Aqua dest. geben,
- pH-Wert der Lösung auf 7,3–7,4 einstellen,
- 20 Portionen à 50 ml tiefgefrieren.

Substrat ist mehrere Monate bei  $-20^\circ\text{C}$  haltbar.

### Gebrauchslösung

- Medium unter fließendem warmem Wasser auftauen und auf etwa  $37^\circ\text{C}$  aufwärmen lassen,
- Co-Enzym NAD (b-Nicotinamide adenine dinucleotide Fluka 43410) zugeben (100 $\pm$ 10 mg, entspricht einem Volumen von 0,5 ml eines Eppendorf-Röhrchens), mischen. Spatelspitze NADH zusetzen.

### Unbefriedigendes Ergebnis

- pH-Wert kontrollieren!
- evtl. 1–2 ml TNBT-Lösung (250 mg TNBT in 20 ml Dimethylformamid) und NADH zusetzen.

### Succinatdehydrogenase (SDH)

Siehe [8].

1. Kryostatschnitte, 15 µm dick, auf Polysine® (oder entfettete) Objektträger ausbreiten, ggf. mit einem feinen Pinsel separieren, auftauen, lufttrocknen, Enddicke der Schnitte 4,5 µm. Die Schnitte können bei 4°C im Kühlschrank in einer verschließbaren Mappe/Box aufbewahrt werden.
2. Inkubation in aufgetautem Gebrauchsmedium SDH bei 37°C im Wasserbad, 5–10 min.
3. Spülen mit Aqua demin.
4. Fixieren in Phosphat-gepuffertem 4% Formalin, pH 7,0 während 20 min.
5. Spülen in Leitungswasser.
6. Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und mit Pertex eindecken.

#### Herstellung von Gefriermedium

- 13,5 g Natriumsuccinat (Fluka 14170), 0,2 M,
- 250 ml PBS („phosphate buffered saline“ 0,01–0,025 molar), pH 7,4
- oder Phosphatpuffer (s. unten),
- 500 ml Tetranitroblau-Tetrazoliumchlorid, 0,1%, wässrig (TNBT Fluka 87961. 500 mg TNBT in 10 ml Dimethylformamid vorlösen und tropfenweise unter Rühren zu 500 ml Aqua dest. geben),
- pH 7,4–7,6 mit Phosphatpuffer-Stammlösung [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9,08 g/l (sauer) oder  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 17,89 g/l (alkalisch)] einstellen,
- 20 Portionen à 50 ml tiefgefrieren.

Substrat ist mehrere Monate bei –20°C haltbar.

#### Gebrauchslösung

- Medium unter fließendem warmem Wasser auftauen und auf etwa 37°C aufwärmen lassen,
- 1–2 Kleinspatelspitzen b-Nicotinamide adenine dinucleotide reduced Disodium salt (Fluka 43420) zugeben, mischen und filtrieren.

#### Unbefriedigendes Ergebnis:

- pH-Wert kontrollieren!
- evtl. 1–2 ml TNBT-Lösung (250 mg TNBT in 20 ml Dimethylformamid) oder NADH zusetzen.

### Nitroxidsynthetase (NOS; NADPH-Diaphorase)

1. Kryostatschnitte, 15 µm dick, auf Polysine® (oder entfettete) Objektträger ausbreiten, ggf. mit einem feinen Pinsel separieren, auftauen, lufttrocknen, Enddicke der Schnitte 4,5 µm. Schnitte können bei 4°C im Kühlschrank in einer verschließbaren Mappe/Box aufbewahrt werden.
2. Schnitte fixieren in 0,5% Paraformaldehyd in PBS bei 4°C, 12 min.
3. Fixierte Schnitte 3-mal mit PBS spülen.
4. Inkubation in aufgetautem Gebrauchsmedium NOS bei 37°C im Wasserbad, 5–10 min.
5. Spülen mit Aqua demin.
6. Fixieren in Phosphatgepuffertem 4% Formalin, pH 7,0 während 20 min.
7. Spülen in Leitungswasser.
8. Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und mit Pertex eindecken.

#### Herstellung von Gefriermedium und Fixierlösung

- PBS („phosphate buffered saline“ 0,01–0,025 molar), pH 7,4 oder Phosphatpuffer ist in der Regel in Histologie-labors gebrauchsfertig erhältlich.
- 0,5% Paraformaldehyd in PBS: 10 g Paraformaldehyd in 2000 ml PBS über Nacht bei Raumtemperatur ansetzen, wiederholt schütteln, braucht etwa 24 h zum Lösen. Kann bis etwa 1 Jahr im Kühlschrank gelagert werden [evtl. eine 4%ige Stammlösung (durch Aufkochen lösen) herstellen, da Paraformaldehyd schwer löslich ist. Diese Stammlösung dann für den Gebrauch 1:8 (10 ml Stocklösung/70 ml PBS) zur Gebrauchslösung verdünnen].
- 1000 ml PBS („phosphate buffered saline“ 0,01–0,025 molar), pH 7,4
- oder Phosphatpuffer (s. unten),
- 5 ml Tetranitroblau-Tetrazoliumchlorid, vorgelöst (TNBT Fluka 87961. 250 mg TNBT in 5 ml Dimethylformamid vorlösen und tropfenweise unter Rühren zum PBS geben. Vorsicht: TNBT kann ausfallen),
- 20 Portionen à 50 ml tiefgefrieren.

Substrat ist mehrere Monate bei –20°C haltbar.

#### Gebrauchslösung

- Medium unter fließendem warmem Wasser auftauen und auf etwa 37°C aufwärmen lassen.
- 2–3 Kleinspatelspitzen NADH, b-Nicotinamide adenine dinucleotide reduced Disodium salt (Fluka 43420) zugeben, mischen.

#### Unbefriedigendes Ergebnis

- pH-Wert kontrollieren!
- evtl. 1–2 ml TNBT-Lösung (250 mg TNBT in 20 ml Dimethylformamid) oder NADH zusetzen.

### Picro-Siriusrot-Färbung an Kryostatschnitten

1. Kryostatschnitte, 15 µm dick, auf Polysine® (oder entfettete) Objektträger ausbreiten, ggf. mit einem feinen Pinsel separieren, auftauen, lufttrocknen, Enddicke der Schnitte 4,5 µm. Die Schnitte können bei 4°C im Kühlschrank in einer verschließbaren Mappe/Box aufbewahrt werden.
2. 45–60 min fixieren in Fixierungsflüssigkeit nach Delaunay.
3. 5 min färben in Coelestinblau, direkt aus Delaunay.
4. 2 min färben in Harris-Hämatoxylin (Medite Best.-Nr. 41–1011–00).
5. Bläuen in handwarmem Wasser 2 min.
6. 45–60 min färben in Picro-Siriusrot.
7. 96%, abs. Alk, mit Pertex eindecken.

#### Lösungen und Reagenzien

##### Delaunay.

- 50 ml abs. Alkohol,
- 50 ml Aceton,
- 3 ml 1 M Trichloressigsäure, (5 g/30 ml Aqua dest., Merck 807).

##### Coelestinblau.

- 45 g Eisenalaun,
- in 900 ml Aqua dest. lösen,
- 4,5 g Coelestinblau (Celestine Blue, Aldrich 206342–5G, oder Sigma C-7143),
- das Gemisch 8 min unter ständigem Rühren kochen (starke Schaumbil-

dung), abkühlen lassen und filtrieren, 126 ml Glycerin zugeben.

Diese Lösung ist nicht unbeschränkt haltbar. Sobald sie braun und wässrig erscheint, ist sie zu verwerfen.

### Picro-Siriusrot.

- Siriusrot (Siriusrot F3 BA, Chroma-Gesellschaft 1A 280, Cat. Nr. 35780) 0,2% in gesättigter Pikrinsäure (15 g Pikrinsäure in 950 ml Aqua dest. lösen). Lösung muss auf einem Satz ungelöster Pikrinsäure stehen.
- Fertige Lösung zum Reifen 2 Tage stehen lassen.
- Siriusrot-Konzentration sehr genau einstellen. Die Lösung ist gut haltbar.
- Wenn nur schwache Orangefärbung auftritt, ist die Pikrinsäure nicht gesättigt (auf Pikrinsäurebodensatz achten). In diesem Fall mehr Pikrinsäure zugeben und 24 h stehen lassen.

### Resultat

Kollagenes Bindegewebe rot, Muskulatur gelb, Kerne schwarzbraun.

### Unbefriedigendes Ergebnis

Wird die Muskulatur bei der Färbung rot, sollte der Delaunay-Lösung mehr Trichloressigsäure zugegeben werden. Trichloressigsäure kann mit der Zeit zerfallen und wirkungslos werden. Ursache einer Rotfärbung der Muskulatur kann auch eine zu geringe Pikrinsäurekonzentration verursachen, auf Pikrinsäurebodensatz der Siriusrot-Lösung achten.

### FärbeprocEDURE für Rektumbiopsien zur Abklärung eines Morbus Hirschsprung

#### Verdichtetes Vorgehen/ alle Färbungen parallel

1. Wasserbad (37°C) anschalten.
2. Coenzyme aus dem Kühlschrank nehmen.
3. Aliquots der Färbelösungen aus -25°C Kühlfach in fließendem kaltem Wasser auftauen.
4. Tiefgekühlte Schnitte in geschlossener Präparatmappe oder -schachtel auf Zimmertemperatur bringen.

### Anleitung zum Versand von Biopsiematerial auf Trockeneis

Hirschsprung-Labor  
Institut für Pathologie  
Schönbeinstraße 40  
Ch-4031 Basel  
Telefon 0041/61-265 2757  
Telefax 0041/61-265 3194  
Direktwahl 0041/61-265 2783

### Transportdienst

- Klären Sie mit dem gewählten Transportdienst die garantierte Zustellzeit ab (z. B. ICE-Parceldienst der Bahn, FedEx, DHL)
- Bemessen Sie das Trockeneis großzügig: (3–) 5 kg pro 24 h
- Melden Sie den Versand der Proben an: (0041) (0) 61-265 2783

5. Küvetten (Hellendahl- oder Coplin-Küvette), Zylinder und Trichter bereitstellen.
6. Paraformaldehyd herstellen: 70 ml PBS und 10 ml Paraformaldehyd-Stammlösung.
7. Delaunay-Lösung frisch herstellen: 50 ml abs. Alk. + 50 ml Aceton + 0,3 ml Trichloressigsäure.
8. Schnitte für Picro-Siriusrot-Färbung für mindestens 1 Stunde in Delaunay-Lösung stellen.
9. NOS-Schnitte für 12 min im Kühlschrank in Paraformaldehyd-Gebrauchslösung stellen.
10. Trichter mit Filterpapier in Kapelle richten.
11. Zu LDH-Lösung NAD (Fluka 43410) geben, Deckel drauf geben, mischen und Spatelspitze NADH zusetzen.
12. Zu SDH-Lösung 2 kl. Spatelspitzen NADH (Fluka 43420) geben, mischen.
13. Zu NOS-Lösung 3 kl. Spatelspitzen NADH (Fluka 43420) geben, Deckel drauf, mischen.
14. Wenn Wecker von Parafo-Fixierungsschritt klingelt: 3-mal mit PBS spülen.
15. Zu ACE-Lösung: 4 ml Ferrizyanid-Lösung geben, mischen, nicht filtrieren.
16. Nun alle Schnitte in die entsprechenden Färbelösungen geben und die Küvetten ins Wasserbad stellen. Färbedauer: LDH, SDH und NOS 5–10 min, ACHE 90 min.
17. Nach 5–10 min LDH, SDH und NOS stoppen: 3-mal mit Aqua demin. spü-

### Aufbereitung der Proben zum Versand

1. Die Biopsien sollten mindestens 1,5–3 mm<sup>3</sup> (Pfefferkorn) groß sein. Die Probe sollte für eine optimale Beurteilung Submukosa enthalten.
2. Biopsie an die Wand eines trockenen Eppendorf-Röhrchens (im Labor erhältlich) geben. Biopsie nicht einpacken oder zusammendrücken. Biopsie *nicht* in physiologischer Kochsalzlösung einfrieren.
3. Röhrchen mit wasserfestem Filzstift beschriften. Klebeetiketten fallen bei -70°C ab.
4. Eppendorf-Röhrchen mit Biopsie in Trockeneis (Kohlensäureschnee, festes CO<sub>2</sub>, -80°C) einfrieren. Bei Schwierigkeiten in der Beschaffung von Trockeneis kann die Biopsie in gekühltem (-25°C) Isopentan oder Petroläther eingefroren werden. Anschließend wird die Biopsie in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und bei -25°C bis zum Versand aufbewahrt. Achtung, zu langes Aufbewahren der Biopsie bei -25°C führt zu Gewebemumifizierung! Ohne den Temperaturvermittler Isopentan oder Petroläther entstehen bei -25°C Eisnadeln, die die Biopsie zerstören.
5. Eppendorf-Röhrchen mit der Biopsie in eine kleine Plastiktüte geben. Kein CO<sub>2</sub> in Eppendorf-Röhrchen oder Plastiktütchen geben (Explosionsgefahr!).
6. Biopsie in Plastiksäcklein in eine Styroporkiste (etwa 20×20×20 cm) gefüllt mit Trockeneis geben. Ausreichend Trockeneis kalkulieren, etwa (3–) 5 kg pro 24 h.
7. Bei hohen Außentemperaturen Styroporbox zusätzlich in Zeitungspapier oder Karton verpacken.
8. Brief mit Namen, Geburtsdatum des Patienten sowie Absender beifügen.
9. Vermeiden Sie, gefrorene Biopsien vor dem Versand unnötig lange auf Kohlensäureschnee offen aufzubewahren, da eine Mumifizierung des Materials die histologische Verarbeitung unmöglich macht! Am besten Biopsien sofort, wie oben angegeben, verpacken und bis zum Versand in Kohlensäureschnee (-80°C) lagern.
10. Geben Sie die Biopsien nicht auf trockenes Filterpapier oder Mull, da sie dort rasch austrocknen. Wenn nötig kann das Trägermaterial mit physiologischem NaCl angefeuchtet werden. Die Biopsie sollte nicht mit Flüssigkeit in Berührung kommen.

len, anschließend 4% Formalin und darin mindestens 20 min stehen lassen.

18. Später auch die ACHE-Färbung stoppen, spülen und mit Formalin 20 min fixieren.

19. ACHE-Schnitte, die eine Kernfärbung erhalten sollen, nicht in Formalin geben. Nach 1-mal Aqua demin. mit 70%, 96%, abs. Alkohol spülen. Im letzten Alkohol stehen lassen, mindestens 20 min.
20. Sirius färben: 5 min Celestinblau (filtriert) und 2 min Harris-Hämatoxylin (filtriert).
21. Sirius-Schnitte nach Harris etwa 2 min in kaltem Leitungswasser spülen und bläuen in lauwarmem Wasser.
22. Anschließend mindestens 1 Stunde in Siriusrot-Farblösung (unfiltriert) färben.
23. ACHE-Schnitte nach Alkoholfixierung: direkt in Harris-Hämatoxylin für etwa 1 min. Anschließend etwa 4 min kaltes Leitungswasser zum Spülen und Bläuen in lauwarmem Wasser.
24. LDH-, SDH-, NOS-Färbungen durch aufsteigende Alkoholreihe ziehen und mit Pertex eindecken.
25. ACHE-Schnitte mit und ohne Kernfärbung in destilliertes Wasser stellen und daraus mit Medimount überziehen (etwa 4 Tropfen) auf Heizplatte (etwa 70°C) trocknen. Anschließend mit Pertex eindecken.
26. Sirius-Schnitte nach 1 Stunde Siriusrot: 96%, abs. Alkohol, abs. Alkohol, mit Pertex decken.

## Puffer

Alternativ zur kommerziell erhältlichen Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) kann Phosphatpuffer selbst im eigenen Labor hergestellt werden.

### Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,0–7,5

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (17,89 g/l), reagiert alkalisch,
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (13,89 g/l), reagiert saurer,
- pH der Pufferlösung ggf. kontrollieren.

Die beiden Lösungen je nach gewünschtem pH mischen.

## PBS (selbst hergestellt)

- 0,26 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$  (1,9 mM),
- 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (8,1 mM),
- 9,00 g NaCl (154 mM) in 900 ml Aqua dest. lösen,
- pH 7,2 einstellen mit 1 M NaOH oder 1 N HCl, mit Aqua dest. auf einen Liter auffüllen.

## Fazit für die Praxis

**Die standardisierten und optimierten enzymhistochemischen Reaktionen zeichnen sich durch hohe Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit aus. Sie sind unerlässliche Voraussetzung für die interinstitutionelle Vergleichbarkeit der erhobenen Resultate.**

**Die enzymhistochemischen Reaktionen für Acetylcholinesterase, Laktatdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und Nitroxidsynthetase bilden ein komplementäres Set zur Beurteilung sowohl der cholinergen Nervenfasernetze als auch der Ganglien des enteralen Nervensystems. Es hat sich in der täglichen Praxis der Diagnostik der gastrointestinalen Motilitätsstörungen bewährt, immer simultan alle 4 Reaktionen als diagnostische Einheit durchzuführen.**

**Die hier ausgeführte Aliquotierung der Stammlösungen minimiert den Aufwand für die individuelle Färbereaktion in der täglichen Routinediagnostik in idealer, erprobter Weise. Für lediglich sporadische enzymhistochemische Untersuchungen können alternativ fertige Reaktionskits vorrätig gehalten werden (Districhem, Hohlweg 25, Ch-4104 Oberwil, E-Mail [districhem@bluewin.ch](mailto:districhem@bluewin.ch); Bio-Optica, Via San Faustino 58, I-20134 Milano, <http://www.bio-optica.it>).**

## Korrespondierender Autor

**Dr. E. Bruder**

Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel  
Schönbeinstraße 40, 4031 Basel, Schweiz  
[elisabeth.bruder@unibas.ch](mailto:elisabeth.bruder@unibas.ch)

**Interessenkonflikt.** Es besteht kein Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen. Die Präsentation des Themas ist unabhängig und die Darstellung der Inhalte produktneutral.

## Literatur

1. Hess R, Scarpelli DG, Pearse AGE (1958) The cytochemical localization of oxidative enzymes II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 753–760
2. Karnovsky MJ, Roots L (1964) A 'direct-coloring' thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12: 219–221
3. Lojda Z, Gossran R, Schiebeler TH (1979) Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Springer, Berlin Heidelberg New York
4. Meier-Ruge WA, Bielser W, Wiederhold KH, Meyenhofer M (1971) Incubation media for routine laboratory work in enzyme histopathology. *Beitr Pathol* 144: 409–431
5. Meier-Ruge WA (1982) Morphological diagnosis of Hirschsprung disease. In: Holschneider AM (ed) Hirschsprung's disease. Hippokrates, Stuttgart; Thieme-Stratton, New York, pp 62–71
6. Meier-Ruge WA, Schärli AF, Stoss F (1995) How to improve histopathological results in the biopsy diagnosis of gut dysganglionosis. *Pediatr Surg Int* 10: 454–458
7. Meier-Ruge WA, Bruder E (2005) Preparation of incubation media for the daily routine of enzyme histochemical reactions. *Pathobiology* 72: 95–99
8. Nachlas MM, Tsou KC, DeSouze E et al. (1957) Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* 5: 420–436
9. Pearse AGE (1968) Histochemistry, theoretical and applied, 3rd edn. Churchill, London New York