

Trichromfärbungen ...

... oder: was macht Fasern blau und Muskeln rot?



wissenschaft
& praxis

Trichromfärbungen gehören zu den Klassikern der histologischen Färbetechnik. Historisch betrachtet waren sie die natürliche Konsequenz, die sich aus den Einfach- und Zweifachfärbungen des 19. Jahrhunderts entwickeln musste. Erst gegen Ende des 19. Jh. wurde es durch die Erfindung der Anilinfarben möglich, die Histowelt richtig bunt zu gestalten, was die Histologen tatkräftig umsetzten. Auf empirischem Weg wurden möglichst kontrastreiche Farben kombiniert. 1889 setzte Dr. Ira van Gieson (1866-1913) dazu Säurefuchsin in gesättigter Pikrinsäure zur Kollagenfärbung ein. Als erste echte Trichromfärbung wird jene von Dr. Frank Burr Mallory (1862-1941, Harvard Medical School) angesehen. Er entdeckte diese Technik zur differenzierten Anfärbung für Bindegewebsfasern und Reticulin (A Contribution to Staining Methods, J. Exp. Med. 1900) und verwendete dabei Phosphormolybdänsäure in Kombination mit Säurefuchsin, Anilinblau und Orange G. Dieses Rezept wurde im Laufe der nächsten Jahrzehnte noch vielfach modifiziert, unter anderem von Dr. Pierre Masson (1889-1959, Straßbourg, Montreal), der 1929 seine Technik veröffentlichte. Der geborene Ungar Dr. George Gomori (1904-1957, Chicago) war einer der berühmten Pathologen, die die langwierige succedane Färbung 1950 durch eine einfachere simultane Methode ersetzten. Die Trichrom-Technik profitierte auch besonders durch die Studien von Dr. Ralph D. Lillie (1896-1979) und seine Modifikationen (Tab. 1). Auch wenn insgesamt die Bedeutung von Spezialfärbungen abgenommen hat, werden Trichromfärbungen bis heute zur Darstellung von bindegewebigen Strukturen eingesetzt. Sei es in der morphologischen Diagnostik oder als Hilfsmittel bei wissenschaftlichen Studien z. B. über Tissue Engineering.

Tab. 1

Trichroms

• Van Gieson (1889)	• Ladewig (1938)
• Mallory (1900/1936)	• Cason (1950)
• Azan (Heidenhain, 1915)	• Gomori (1950)
• Masson (1929)	• CAB (Roque, 1953)
• Goldner (1938)	• MSB (Lendrum, 1962)

Trichromfärbung – die Bindegewebefärbung

Man fasst mit dieser Bezeichnung Techniken zusammen, die eine differenzierte Darstellung der Bindegewebekomponenten mit Hilfe von mindestens drei Farbstoffen (FS) erreichen. Im engeren Sinne werden hier meist Bindegewebsfasern (Kollagen) und ihre kontrastierende Anfärbung in Bezug zu Muskelgewebe oder Organparenchym verstanden.

Kollagen ist eines der häufigsten Proteine im menschlichen Körper. Es ist ein polymeres Makromolekül, das aus zu Fibrillen verdrehten Polypeptidketten aufgebaut ist. Die Hauptbausteine der Peptidkette sind Glycin, Prolin, Hydroxylysin und Hydroxyprolin, wobei jede dritte Aminosäure Glycin ist. Drei verdrehte Polypeptidketten bilden das Tropocollagen, das sich

wiederum zu Fibrillen und diese sich zu Fasern zusammenlagern. Beim Reifen des Kollagens erfolgt die Hydroxylierung und Glycosylierung vieler Aminosäurereste, weiters eine Quervernetzung der Fasern über Aldehydbrückenbildung. Kollagen ist damit ein **ba-**

sisches Glycoprotein, das je nach Aufbau verschiedenen Typen (mind. 18) zugeordnet wird. Typ I ist ein fibrilläres Kollagen, das man in Sehnen findet, Typ IV ist ein nicht-fibrilläres Kollagen, das z. B. in der Basalmembran enthalten ist.

Muskelzellen enthalten hauptsächlich Aktin, Myosin, Troponomyosin und Troponine als Teile der Motilitätseinheiten. Um die Muskelzellen mit Energie versorgen zu können, sind sie reich an **Myoglobin** (IP bei 7,2) zur Sauerstoffübertragung auf die Mitochondrien. Die Muskelzellen sind umgeben von einer Basallamina und zusammengefasst zu Bündeln. Intrazellulär und zwischen den Bündeln findet man wiederum kollagene und reticuläre Fasern. (Abb. 1)

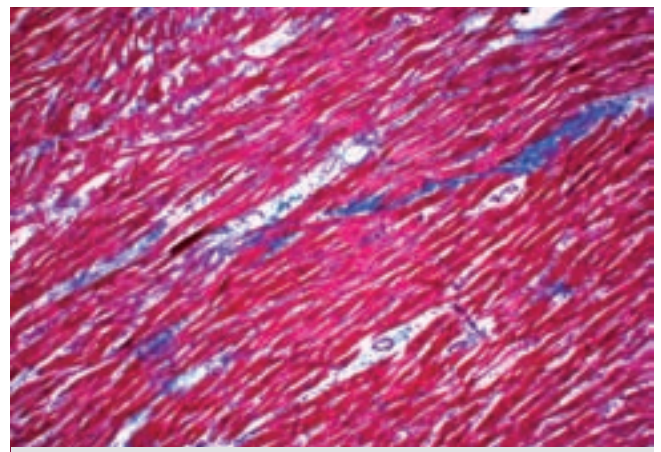


Abb. 1 Herzmuskel Masson-Trichrom

Neben der Darstellung der Bindegewebsfasern hat auch die Anfärbung von extrazellulären **Protein-** bzw. **Fibrinablagerungen** im Gewebe eine Bedeutung, speziell in der Nierendiagnostik. Das Fibrinmonomer entsteht durch Abspaltung aus Fibrinogen durch die Wirkung von Thrombin. Es ist reich an den **basischen Aminosäuren** Glycin, Histidin und Arginin und bildet im Gewebe Polymere z. B. bei Verletzungen oder bei Entzündungen. Bei Immunkomplexnephritiden finden sich in den Glomeruli Ablagerungen von kondensierten **Immunglobulinen**, die eine ähnliche Affinität zu den Trichromfarbstoffen zeigen wie Fibrin. Um hier unterscheiden zu können, ist die Durchführung einer Immunfluoreszenzuntersuchung hilfreich.

Als intrazelluläre Degenerationserscheinung findet man sogenannte Mallorybodies in Hepatozyten. Sie tragen ihren Namen aufgrund ihrer Anfärbbarkeit bei der Trichrom-Methode. Mallorybodies bezeichnet man auch als **intrazelluläres Hyalin** bzw. als alkoholisches Hyalin, weil es vor allem durch die toxische Einwirkung bei Alkoholabusus entsteht. Es erscheint azidophil, glasartig, ist PAS-positiv und enthält zusammengesinterte Cytokeratine und Glykoproteine. Immunhistochemisch soll es Ubiquitin-pos. sein. Die Form ist tropfen-, wurm- bis geweihartig.

Weitere Begleiter im histologischen Schnitt sind **Erythrozyten**. Sie werden eigentlich nicht speziell angefärbt, nehmen aber durch ihren hohen Gehalt an **Hämoglobin** mit vielen basischen Aminosäuren die angebotenen Farbstoffe in typischer Weise an. (Abb. 2)

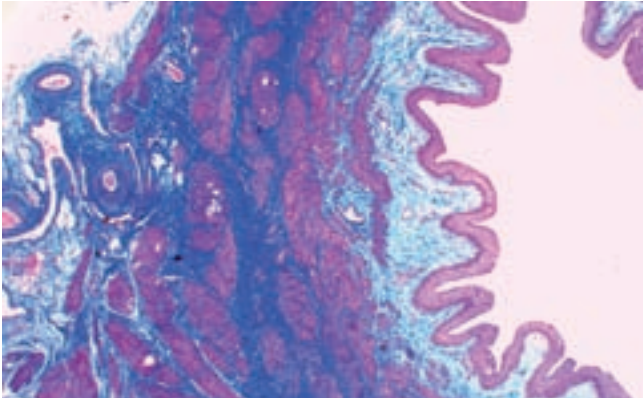


Abb. 2 Ureter Masson-Trichrom

Betrachtet man nun das **Cytoplasma** der zu färbenden Zellen, kann man es als Proteingemisch von hoher Konzentration aus Strukturproteinen bzw. gelösten Proteinen ansehen. Diese enthalten **basische funktionelle Gruppen** als Bindungspartner für die entsprechenden Farbstoffe (Tab. 2). Genau dieselben Gruppen (α -Aminogruppe von Lysin, Guanidinogruppe von Arginin) sind aber auch die bevorzugten Reaktionspartner bei der Aldehydfixierung. Ist eine Aminogruppe durch eine Methylenbrücke belegt, steht sie für die Färbungsreaktion nicht mehr zur Verfügung. Trotzdem sind aufgrund der Proteindichte noch jede Menge freie Plätze verfügbar. Je länger die Fixierung allerdings dauert, umso schlechter wird die Anfärbbarkeit.

Tab. 2 Aminosäurenladung		
Aminosäure	funktionelle Gruppe	isoelektrischer Punkt
Valin	- α -Aminogruppe	IP 6,0
Glycin	- α -Aminogruppe	IP 6,06
Prolin	- Pyrolidingruppe	IP 6,3
Histidin	- Imidazolgruppe	IP 7,6
Lysin	- ϵ -Aminogruppe	IP 9,74
Arginin	- Guanidinogruppe	IP 10,76

Milieu unter pH=5 acidophil und basisch (+) durch Formaldehydfixierung sinkt der IP Protein-IP resultiert aus den einzelnen Bausteinen
 Je nach Zusammensetzung Graduierung in der Farbstoffaufnahme in Bezug auf Umgebungs-pH

In den letzten Absätzen wurde die Betonung oft auf die **elektrische Ladung der Gewebekomponenten** gelegt (Tab. 3). Tatsächlich ist dies eine Differenzierung zwischen den einzelnen Strukturen, die sich eben durch unterschiedliche Anteile von basischen Aminosäuren auszeichnen bzw. auch durch unterschiedliche Dichte an diesen Bausteinen. Alle genannten Komponenten verhalten sich mehr oder weniger azidophil (also säureliebend), wobei diese Eigenschaft immer relativ zum umgebenden pH-Milieu zu sehen ist. Als Gegenpart dazu verhalten sich Chromatin (DNA und Kernproteine) und RNA basophil.

Eine weitere im Zusammenhang mit den Trichromfärbungen wichtige Eigenschaft ist die **Architektur** der Gewebekomponenten. Man spricht hier von grobmaschigem Kollagen und feinmaschigem Cytoplasma, wobei es eigentlich verwunderlich erscheint, dass das engverdrillte, faserige Kollagen permeabler sein soll als flüssigkeitsgefülltes Cytoplasma. Hier muss man die **Permeabilität** in Relation zur Fixierung bringen. Durch die Aldehydfixierung entsteht ein sehr dichtes, dreidimensionales Netzwerk (Gel), das viele Bindungspartner anbietet. Reifes Kollagen hat seine Bindungspartner bei der ei-

Tab. 3 Gewebeeigenschaften		
Substrat	Ladung	Struktur
Erythrozyten	basisch/kation. +	feinmaschig
Fibrin/Ig	basisch/kation. +	feinmaschig
Muskel	basisch/kation. +	feinmaschig
Zytoplasma	basisch/kation. +	feinmaschig
Hyalin	basisch/kation. +	grobmaschig
Kollagen	basisch/kation. +	grobmaschig
Zellkerne	sauer/anion. -	

genen Verknüpfung teilweise schon verbraucht. Es kommt zusätzlich noch zu einem unterschiedlichen Färbeverhalten von lockerem bzw. straffem Kollagen, das anscheinend mit dem Spannungs- auch seinen Ladungszustand verändert.

Das ist wohl auch der Grund, warum Koagulationsfixierungen wie bei Bouin oder Dichromat für Trichromfärbungen gegenüber Formaldehydfixierung vorteilhaft sind.

So wie sich einerseits die Farbsubstrate in Ladung und Struktur unterscheiden, so gibt es auch andererseits bei den Farbstoffen Unterschiede bei diesen Eigenschaften.

Farbstoffe der Trichromfärbung

Als Kern-FS wird üblicherweise Weigerts Eisenhämatoxylin eingesetzt. Dabei werden eine alkoholische Hämatoxylinlösung und eine angesäuerte Eisen(III)chloridlösung vermischt. Die Metallionen wirken hier gleichzeitig als Oxidationsmittel und Beize. Es entsteht ein schwarzer, basischer Hämateinlack, der die basophilen Strukturen im Schnitt anfärbt. Dieser FS hat den Vorteil gegenüber Hämalaun, dass er relativ säurestabil ist. Bei längerer Säureeinwirkung sieht man aber auch einen erheblichen Farbverlust. (Abb. 3)

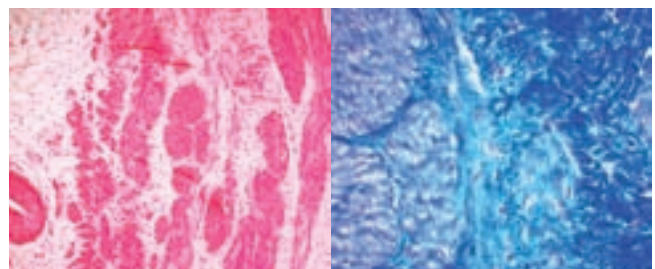


Abb. 3 Ureter ohne Anilinblau, die Fasern sind durch PMA/PTA entfärbt (li.), Ureter ohne Biebrich-Scarlet/Säurefuchsin, Anilinblau in allen Strukturen (re.)

Die Cytoplasma-FS umfassen eine große Auswahl an sogenannten sauren Farbstoffen. (Triarylmethanfarbstoffe – Anilinblau, Säurefuchsin, Lichtgrün; Azofarbstoffe – Orange G; Pikrofarbstoffe – Pikrinsäure). Sie zeigen unterschiedliche **Molekulargewichte** und Größen. Daraus resultiert auch der Umfang des konjugierten Systems (Bereich, über den sich die freien Elektronen bewegen) und in Abhängigkeit davon das **Absorptionsmaximum** und die Farbe. Die Ladung des FS wird durch die Anzahl an positiv (Aminogruppen) und negativ (Sulfatgruppen) geladenen **Substituenten** bestimmt. Auch die dreidimensionale **Struktur** des Moleküls hat Auswirkungen auf das Färbeverhalten. So können sich plane FS leichter anlagern als solche mit einer sogenannten „Propellerstruktur“ (zueinander verdrehte Benzolgruppen). Weiters bestimmen hydrophile bzw. hydrophobe Substituenten das Bindungsverhalten oder auch das Zusammenlagern zu größeren Farbstoffaggregaten (Micellen).

Es eignet sich eine große Menge an ähnlichen FS für die Verwendung bei Trichromfärbungen. Hier vier Farbstoffe als beispielhafte Vertreter: (Tab. 4)

Tab. 4 Farbstoffeigenschaften				
Farbstoff	Orange G	Biebrich Scarlet	Säurefuchsin	Anilinblau / WS
Color Index	CI 16230	CI 26905	CI 42685	CI 42780 / CI 42755
Typ	Monoazo	Diazo	Triarylmet-han	Triarylmet-han
Ladung	sauer	sauer	sauer / amphotär	sauer / amphotär
Gruppen	zweifach sulfatiert	zweifach sulfatiert	dreifach sulfatiert, drei Amino-gruppen	dreifach sulfatiert, drei Amino-gruppen
Molekulargewicht	452	556	586	800 / 738
Struktur	plan	plan	Propeller	Propeller
Wasser-Löslichkeit	ja	ja	ja	ja
Alkohol-Löslichkeit	schwach	schwach	mäßig	mäßig
Xylol-Löslichkeit	nein	nein	nein	nein

Farbstoffbindung

Bei histologischen Färbungen treten wie bei anderen komplexen Abläufen mehrere Formen der chemischen Bindung auf. Die wichtigste hier ist allerdings die **Ionenbindung**, die sich durch die gegenseitige Anziehung entgegengesetzt geladener Reaktionspartner auszeichnet. So kommt es zur Anbindung des basischen Hämateinlacks an DNA und RNA und andererseits der sauren FS-Ionen an acidophile Strukturen.

Der wichtigste Faktor für das Verhalten der Bindungspartner ist hier das **umgebende pH-Milieu**. Für die Cytoplasmafärbung werden FS-Lösungen mit einem pH zwischen 1 und 3 angeboten. Dieser sehr saure pH bietet die besten Bedingungen für das gewünschte Reaktionsverhalten. Der Grund dafür liegt in der Relation zu den **isoelektrischen Punkten (IP) der Gewebeproteine**, die weit oberhalb davon liegen. Das heißt, bei einem pH unter dem isoelektrischen Punkt verhält sich das Protein basisch bzw. bei einem pH über dem isoelektrischen Punkt verhält es sich sauer. Diese Eigenschaft verstärkt sich je nachdem, wie weit der pH vom isoelektrischen Punkt entfernt ist. So kommt es aufgrund des unterschiedlichen relativen Ladungsverhaltens zur unterschiedlichen Affinität zwischen Proteinen und sauren FS. Wird der Abstand zu den isoelektrischen Punkten zu groß (unter pH 1), flacht die Unterscheidbarkeit der Ladungen wieder ab, die Affinität wird ähnlich, die Selektivität schwächer.

Das pH-Milieu ist indirekt durch den Einfluss auf das Ladungsverhalten auch mitverantwortlich für die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Somit werden auch das Annähern der Bindungspartner und hydrophobe Wechselwirkungen erleichtert.

Der zweite wichtige Faktor ist die **Architektur** der Gewebekomponenten im Zusammenhang mit Größe und Struktur der FS. „Kleine“ FS erreichen schneller ihre Bindungspartner und dringen leichter in engmaschige Räume ein. Mittelgroße und große FS folgen ihnen und vertreiben sie wieder aus weitmaschigen Räumen.

Die Architektur wird hier nicht nur vom verarbeiteten Gewebe vorbestimmt, sondern auch von der Bearbeitungsweise beeinflusst. Gefrierschnitte verhalten sich hier „grober“ als Paraffinschnitte bzw. Kunststoffschnitte. Die Schnittdicke gibt die Diffusionsstrecke der FS vor. Und natürlich ist die Fixierung je nach Art und Dauer mitbestimmend für die Engmaschigkeit des dreidimensionalen Proteinnetzwerks.

Nach neueren Erkenntnissen (Prento 200134) darf man die Bedeutung der **hydrophoben Wechselwirkung** bei der biologischen Färbung nicht unterschätzen. Auch wenn die einzelne Bindungskraft minimal ist, so kommt es hier zu starken Summierungseffekten. In wässrigen Systemen erfolgt zuerst die Diffusion des FS in den Gewebeschnitt (in Relation zu Architektur und FS-Geometrie), anschließend zu einem Anlagern der Bindungspartner entsprechend ihrer elektrischen Ladung und Ladungsverteilung (Stabilisierung durch Neutralisation). Die Nähe der amphiphilen Makromoleküle zueinander ermöglicht den energetisch günstigeren Zustand der hydrophoben Bindung der unpolaren Bereiche. Das betrifft in erster Linie globuläre (Zytoplasma-)proteine. Die Bindege-websfasern haben weder im nativen noch im fixierten Zustand große Tendenz zu gefalteten Sekundärstrukturen, ein innerer „Spannungszustand“ wie bei den globulären Proteinen bleibt aus. Sie bieten eher die Möglichkeit zur Ausbildung von **Wasserstoffbrücken** aufgrund der Lage der Peptidbindungen.

Ablauf der Masson-Trichrom-Färbung

Es handelt sich dabei um eine **succedane Technik**.

1. Umfixieren

Die besten Ergebnisse erzielt man bei Trichromfärbungen nach Fixierung mit Bouin bzw. Dichromat-Fixierung. Um ähnlich gute Resultate bei Formaldehyd fixiertem Gewebe zu erreichen, erfolgt das Umfixieren der entparaffinierten Schnitte in Bouin (60 min bei 56°C oder über Nacht bei Raumtemperatur). Anschließend wird die Pikrinsäure durch mehrmaliges Spülen in Leitungswasser ausgewaschen. Diese Behandlung ist dem Antigen-Retrieval der IHC gleichzusetzen, wo die benötigten funktionellen Gruppen wieder freigelegt und Konformationsänderungen der Proteine hervorgerufen werden.

2. Kernfärbung

Prinzipiell kann man Weigerts Eisenhämatoxylin progressiv oder regressiv anwenden. Bei 5 min Inkubationszeit erfolgt noch keine Überfärbung, nachfolgendes Differenzieren ist unnötig, da die sauren Färbelösungen sowieso eine Abschwächung der Kernfärbung hervorrufen. Anschließend spülen in Leitungswasser und bläuen für 5 min.

3. Zytoplasmafärbung

Gemisch von Biebrich Scarlet und Säurefuchsin bei pH 2,5 für 5 min. Der kleine und der mittelgroße FS dringen schnell ins Gewebe ein und besetzen alle möglichen Bindungspartner. Der gesamte Schnitt wird rot angefärbt. Auch das Chromatin nimmt über die basischen Kernproteine FS auf. Anschließend spülen in Aqua dest., vorteilhaft ist ein Ansäuern mit einigen Tropfen Eisessig.

4. Ansäuern mit Polyaciden

Dazu setzt man Phosphormolybdänsäure (PMA) und Phosphorwolframsäure (PTA) im Gemisch oder alternativ ein. 5 min Inkubation führt zu einer Entfärbung der kollagenen Fasern vom Plasma-FS und dem Aufhellen der Cytoplasmafärbung. Die theoretischen Hintergründe dazu werden nachfolgend beschrieben. Ohne weiteres Spülen schließt die Faserfärbung an.

5. Kollagenfärbung

Anilinblaulösung wieder mit pH 2,5 für 5 min. Die Bindegewebsfasern nehmen die intensive blaue Farbe auf. Anschließend erfolgt das Spülen in 2 %iger Essigsäure, das schnelle Entwässern direkt in absolutem Alkohol (3 Portionen), Klären in Xylol (oder Ersatz) und Eindecken.

Färbeergebnis: schwarz-rote Kerne, rotes Cytoplasma, hellrotes Fibrin, orange-rote Erythrozyten, blaue Kollagenfasern.

Im Gegensatz zu der succedanea Technik werden bei der **simultanen Methode** Plasma- und Faser-FS im Gemisch angeboten. Die Vorbehandlung mit Umfixieren und Kernfärbung bleibt gleich. Daran anschließend kann nun das Ansäuern mit Phosphormolybdänsäure erfolgen bzw. direkt das FS-Gemisch angeboten werden, falls die Polysäure darin enthalten ist. Zum Abschluss wird wiederum in 2 % Essigsäure gespült und schnell entwässert, geklärt und eingedeckt.

Farbstoffgemisch SFOG:

Säurefuchsin, Orange G, Anilinblau; pH 1,9

Färbeergebnis:

gelb-orange Erythrozyten, blass-rotes Cytoplasma, hellrote Protein-/Fibrinablagerungen, blaue Kollagenfasern

Theorien

Mallory selbst hat in der ersten Veröffentlichung seiner Bindegewebsfärbung keine histochemische Erklärung zur Wirkungsweise gegeben. Später beschäftigten sich einige Forscher mit dem theoretischen Hintergrund. Einen wirklichen Konsens konnten sie dabei aber nicht erzielen. Bis heute stehen zwei Theorien nebeneinander, die ich hier kurz vorstellen möchte, und die sich vor allem bei der Rolle der Polysäuren (Phosphormolybdänsäure und Phosphor) uneinig sind. Die Polysäuren werden als „großer, farbloser Farbstoff“, als „Differenzierung“ oder als „Beize“ bezeichnet. Nachfolgende Tabelle enthält die unumstrittenen Eigenschaften von PMA und PTA (Tab. 5).

Tab. 5 Eigenschaften von Phosphormolybdänsäure und Phosphorwolframsäure

- polyvalente, stark saure Säuren
- hohes MW (PMA 1825 / PTA 2880)
- Komplexbildung der Metallionen mit Phosphorsäure (+6) in stark saurer wässriger Umgebung $[\text{PO}_4(\text{WO}_3)_2]^{3-}$ zunehmender Zerfall der Komplexe bei pH über 2
- Anionen größer als die meisten Farbstoffmoleküle
- Proteinbindung über Ionenbindung (Amino- und Guanidino-gruppen, chem. Entfernen von Aminogruppen verhindert Anbindung an Proteine)
- größere Menge wird an Kollagen als an Cytoplasma gebunden
- bindet nicht an Kohlenhydrate
- Kerne zeigen keine Affinität zu PMA u. PTA
- Entfärbt kollag. Fasern vom Plasmafärbstoff, differenziert Plasmafärbung
- führt zu alleiniger Anfärbung der kollagenen Fasern mit nachfolgendem Farbstoff
- PMA oder PTA gebunden an Proteine bewirkt Anfärbbarkeit mit kationischen Farbstoffen

Theorie nach Puchtler und Isler (1958)¹⁶:

Sie zeigten in ihren Studien, dass die Phosphormolybdänsäure an die kollagenen Fasern bindet und dort auch verbleibt. Das Anbieten von rein sauren FS führte zu keiner Anfärbung der Fasern, jedoch führten basische FS zu einer starken Anfärbung. Sie schlossen daraus, dass bei den Trichrom-

färbungen Anilinblau als basischer/amphotärer FS auftritt. Die negativ geladene Polysäure fungiert als Brücke (Beize) zwischen den positiv geladenen Kollagenfasern auf der einen Seite und dem positiv geladenen FS auf der anderen Seite.

Theorie nach Baker (1958)³⁵:

Baker vertritt die weitaus geläufigere Theorie, dass die unterschiedliche Anfärbung nur auf der Molekülgröße, der Zugänglichkeit der Bindungspartner und dem Zeitfaktor beruht. Er bezeichnet PMA und PTA als „**farbloser Farbstoffe**“ mittlerer Größe, denn Anilinblau würde sie durch Clusterbildung in der Größe übertreffen. Das Credo dieser Theorie besagt, dass ein saurer FS durch einen größeren anderen sauren FS ersetzt wird; und dass die Geschwindigkeit der Anbindung durch die Architektur der Strukturen (fein- oder grobmaschig) vorgegeben ist. Das Endergebnis ist zeitabhängig. Die Anbindung an Kollagen beruhe hauptsächlich auf Wasserstoffbrücken-Bindung. Das Reaktionsgleichgewicht ist erreicht, wenn der größte anionische FS alle Gewebebereiche angefärbt hat.

Beide Theorien erklären manche Erscheinungen, werfen aber auch wieder **Fragen** auf. Warum funktioniert die Methode auch, wenn man die Polysäure vor dem FS-Gemisch aufträgt? Warum kommt annähernd ein ähnliches Ergebnis heraus, wenn man die Polysäure ganz weglässt?

Eine Studie³¹ zeigte mithilfe eines Computer-Molekülmodells, dass sich durch die Helixform ein stark positiv geladener Cluster in der Helixgrube ausbildet. Vielleicht der ideale Reaktionspartner für die PMA, die dadurch die positive Ladung derart absättigt, dass nur mehr die restlichen negativen Ladungen der Säure für das amphotäre Anilinblau in Frage kommen? (Abb. 4)

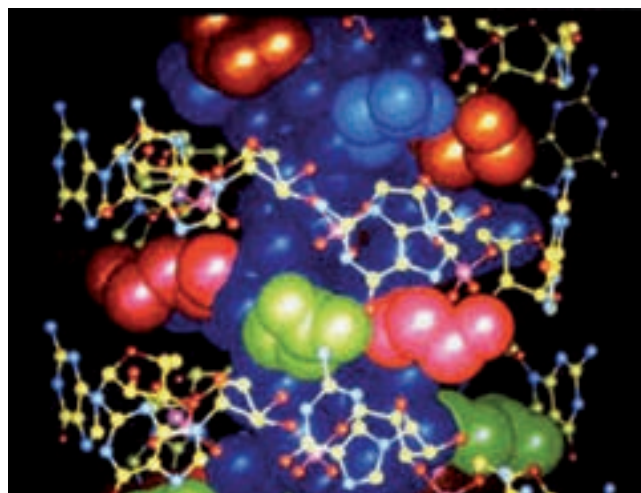


Abb. 4 Kollagenmodell mit DNA, Quelle Nr. 31

Für die Cytoplasmafärbung könnte man annehmen, dass hier dieser „Helix-Effekt“ ausbleibt und die FS und die PMA entsprechend ihrer Molekülgröße, Geometrie und Affinität um die besten und vor allem passenden Plätze im gelartigen Maschenwerk konkurrieren.

Auch wenn man die Polysäuren überhaupt weglässt, wird die Reihenfolge nur durch die „Größenkonkurrenz“ bestimmt. Auf der Kollagenhelix haben anscheinend große negativ geladene Moleküle einen Affinitätsvorteil gegenüber den kleineren, wie z. B. Biebrich Scarlet.

In den 40 Jahren nach Formulierung der oben genannten Theorien wurde immer mehr Wissen auf dem Gebiet der Makromoleküle (Proteine, Farbstoffe) erlangt, was auch in eine Publikation von Paul Prento einfließt:

Biologische Färbung nach Prento (2001)³⁴

Die primäre Selektivität der Farbstoff-Protein-Reaktion wird durch den Ladungszustand vorgegeben. Die Stärke und Verteilung der Ladung ist bedingt durch die Geometrie des FS und Anzahl der Ladungsträger einerseits und die Struktur der Proteine andererseits in Abhängigkeit von pH-Wert, Polarität und Ionenstärke des Lösungsmittels. Unter der Annahme, dass die Sekundärstruktur der globulären Proteine auch nach der Fixierung in einem gewissen Ausmaß erhalten ist, kommt es durch den niedrigen pH der Färbelösung zu einer Umverteilung der Ladungen und zu einer Öffnung der Struktur, wodurch mehr unpolare Bereiche in Kontakt mit dem wässrigen Lösungsmittel kommen. Die Folge ist ein „Spannungszustand“ des Proteins, der durch Anlagerung der Kontra-Ionen und der unpolaren Bezirke des FS neutralisiert werden kann (Stabilisierung). Die Affinität und Substantivität – also die Frage welcher FS sich nun an welchen Bindungspartner in welcher Stärke hängt – ist ein komplexes Zusammenspiel der oben genannten Faktoren. Für die Trichromfärbung bedeutet es, dass sich FS wie Säurefuchsin, Biebrich Scarlet oder Orange G an globuläre (Zytoplasma-)proteine hauptsächlich durch **hydrophobe Wechselwirkung** anbinden. Die Anbindung an die Fasern erfolgt eher über Wasserstoffbrücken, ionische Bindung und ist im Vergleich schwächer. Nach Prento lassen sich die an Kollagen gebundenen FS leicht wieder austauschen (das würde der Theorie nach Baker entsprechen). Die Ursache für die differenzierte Anfärbung von Zytoplasma und Bindegewebsfasern liegt demnach im **unterschiedlichen Bindungstyp** (Tab. 6). Im Widerspruch zu Baker sieht Prento das Reaktionsgleichgewicht bei simultanen Methoden schon nach ca. 1 Stunde erreicht und es ändert sich nicht wesentlich zum Resultat nach wenigen Minuten. Zur Wirkung der Polysäuren trifft Prento keine spezielle Aussage. Seine Beobachtungen von Trichromfärbungen hat er hauptsächlich bei der Pikrofuchsin-Methode (van Gieson, ohne Polysäuren) gemacht.

Tab. 6 Farbstoff-Proteinbindung nach Prento		
Protein	Bindungstyp	Farbstoff
Kollagen	hydrophobe Wechselwirkung	Säurefuchsin
	Wasserstoffbrücken	Fast Green
	Ionenbindung	Anilinblau Sirius Red
globuläre Proteine	hydrophobe Wechselwirkung	Orange G Säurefuchsin Pikrinsäure

Praktische Auswirkungen

Zur Steigerung der Selektivität sollten Trichrom-FS eine Differenz des Molekulargewichts von mindestens 200 aufweisen und (für PMA-Methoden) der Faser-FS starke basische Gruppen (NH₂) enthalten. Eine Verminderung der Selektivität wird hervorgerufen durch zu hohe FS-Konzentrationen, zu niedrigen pH-Wert der Färbelösungen (unter 1), reine Formaldehydfixierung und extrem zu lange Färbedauer (Überfärbung mit Anilinblau). Zu hoher pH-Wert der Färbelösungen (Nähe IP) vermindert die Affinität der Ionenbindung.

Die **Intensität der Cytoplasmafärbung** kann sehr gut durch die PMA-Dauer beeinflusst werden (Abb. 5). Folgt die PMA auf die Cytoplasmafärbung (wie bei der Masson-Trichrom), macht ein Verlängern der PMA-Dauer die Farbe intensiv hellrot, die Fasern intensiv blau. Derselbe Effekt tritt auch bei Simultan-

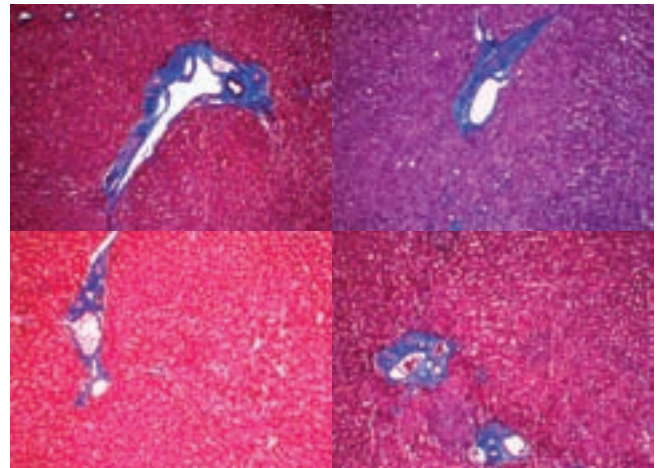


Abb. 5 Leber Masson-Trichrom (l.o.), ohne PMA/PTA (r.o.), mit 20 min PMA/PTA (l.u.) und ohne Bouin (r.u.)

farbstoffgemischen auf, die PMA enthalten (z. B. Cason, Gomori), die Faserfärbung ist dabei weniger intensiv. Ist die PMA dem FS-Gemisch vorgeschaltet (z. B. SFOG, Ladewig), wirkt sie für die Cytoplasma-FS eher blockierend. Anscheinend werden durch die Polysäure die meisten Bindungspartner schon abgesättigt. Deshalb führt hier eine Verkürzung der PMA-Dauer zu einer Intensivierung der Cytoplasmafärbung, eine Verlängerung erlaubt nur mehr eine blässlich-violette Zellfärbung, dafür aber eine starke Faserfärbung.

Es wird ein Spülen nach den FS mit saurem Wasser (1-2 % Essigsäurelösung) empfohlen, um die Farben klarer zu machen. Die Cytoplasmafarbstoffe werden durch wässrige Lösungen etwas differenziert. Empfindlicher sind die Faser-FS auf zu lange Einwirkung von verdünnten Alkoholen. Deshalb sollte man direkt in drei Portionen abs. Alkohol entwässern. Säurefuchsin und Anilinblau verhalten sich hier ähnlich, wobei Säurefuchsin schneller herausdiffundiert (Abschwächen der hydrophoben Bindung durch Alkohol). Längeres Spülen führt deshalb zu blauen Fasern (anstelle von blau-violett), hellt aber auch das Cytoplasma wieder auf.

Um bei der farbintensiven Masson-Trichrom-Färbung noch Einzelheiten am Schnitt erkennen zu können, sollte die

Tab. 7 Indikationen für Trichromfärbungen

- **Verteilung der Bindegewebe-Komponenten**
 - Sklerosierende Veränderungen
 - Entzündungsgeschehen
- **Pathologische Kollagenvermehrung (Masson-Trichrom, CAB)**
 - Kollagenose
 - Leberzirrhose
 - kollagene Colitis
 - sklerosierende Glomerulonephritis
- **Fibrin-, Proteinablagerungen (SFOG)**
 - Immunkomplexnephritis (z. B. Lupusnephritis, nach Streptokokkeninfektion; weiter mit IF)
- **intrazelluläres Hyalin = Mallory-Körper (Chromotrop-Anilinblau)**
 - Alkoholabusus
 - prim. biliäre Zirrhose u. a.
- **Knochenauf- und abbau (Goldner)**
 - Histomorphometrie
- **Muskeldegeneration**
 - Herzmuskelfarkt
 - Nemaline Rod Myopathie (Gefrierschnitte, modified Gomori-Trichrom Engel und Cunningham 1963)
- **Krebs-Abstrich Screening (Papanicolaou)**

Schnittdicke 3 µm nicht überschreiten. Bei der Nierendagnostik werden 2 µm dicke Schnitte verlangt und zur Darstellung von Proteinablagerungen mit SFOG angefärbt. Je dünner die Schnitte sind, umso empfindlicher reagieren sie auf Spülschritte.

Kollagene Fasern zeigen eine Eigenheit bei der Anfärbbarkeit. So lässt sich gealtertes Kollagen mit dem Cytoplasmafaser-FS anstelle des Faser-FS anfärben (eventuell fleckige Erscheinung bei lang gelagerten Blöcken und Schnitten). Man nimmt hier eine Oxidation der Bindungsstellen an. Ähnliches sieht man bei gestreckten im Vergleich zu lockeren Fasern. (Tab. 7)

Obwohl die Methoden mittlerweile über 100 Jahre alt sind, sind die theoretischen Grundlagen für die Trichromfärbungen nicht wirklich geklärt. Nachdem sich der Fokus der Forschung nun auf die molekulare Ebene der Biochemie konzentriert, werden wohl Studien über die Histochemie von morphologi-

sehen Färbemethoden eher der Vergangenheit angehören. Erkenntnisse aus den modernen Forschungsarbeiten, wo der molekulare Aufbau von Zellbestandteilen beispielsweise als Transkriptionsprodukt entschlüsselt wird, könnten aber als Nebeneffekt ein Licht darauf werfen. Die Trichromfärbungen gehen nun gemeinsam mit Hämatoxylin-Eosin und einigen anderen tinktorischen Techniken in ihr 2. Jahrhundert. Die Zukunft wird zeigen, ob für so eine Urzeitmethode noch Platz sein wird. Schade wäre es schon um die farbenfrohen Schnitte mit den blauen Fasern und roten Muskeln. ■

Gudrun Lang

Biomedizinische Analytikerin, Histologisches Labor, AKH Linz
Autorin von „Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik“, Springer Verlag 2006

Literaturverzeichnis:

- (1) Armed Forces Institute of Pathology, Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, reprinted with minor modifications, 1994
- (2) Bancroft and Gamble, Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, 5th edition, 2002
- (3) Burck Hans-Christian, Histologische Technik; Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis, Georg Thieme Verlag, 5. unveränderte Auflage, 1982
- (4) Carson Freida L., Histotechnology, a selfinstructional text; American Society of Clinical Pathologists, 1990
- (5) Horobin und Kiernan, Conns Biological Stains, BIOS Scientific Publishers, Oxford UK, 2002
- (6) Horobin und Bancroft, Troubleshooting Histology Stains, Churchill Livingstone UK, 1998
- (7) Kiernan J.A., Histological and histochemical methods; Theory and Practice, Arnold-Verlag, 3rd edition, 1999
- (8) Lang Gudrun, Histotechnik, Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, Springer Wien New York, 2006
- (9) Romeis, Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage, herausgegeben von P.Böck; Urban und Schwarzenberg, 1989
- (10) Mallory F.B., A Contribution to Staining Methods; J. Exper. Med., 1900
- (11) Singer M., Morrison P.R., The Influence of pH, Dye and Salt Concentration on the Dye Binding of Modified and Unmodified Fibrin, J. Biol. Chemistry, 1948
- (12) Weiss P.L., Binding of Acid and Basic Dye at Varied pH by Blood and Bone Marrow Cells of Man, Blood, 1953, Vol. 8, Nr. 3, pp 249-261
- (13) Singer M., The staining of basophilic components, 1954
- (14) Fullmer H.M., Lillie R.D., The Staining of Collagen with Elastic Tissue Stains; J. Histochem. Cytochem., 1956
- (15) Bear R.S., The Structure of Collagen Molecules and Fibrills; J. Cell. Biol., 1956
- (16) Puchtler H., Isler H.; The Effect of phosphomolybdic acid on the stainability of connective tissue by various dyes; J. Histochem. Cytochem., 1958
- (17) Barnett R.J., Roth W.D., Effect of Fixation on Protein Histochemistry, J. Histochem. Cytochem., 1958
- (18) Spicer S.S., Histochemical selective acidophilia of basic nucleoproteins in chromatin and nucleoli at alkaline pH, 1962
- (19) Lillie R.D., Histochemical Acylation of hydroxyl and amino groups. Effect on the periodic acid schiff reaction, anionic and cationic dye and van Giesons collagen stains, 1964
- (20) Salthouse T.N., Selective staining of collagen and Elastin by Luxol Fast Blue G in methanol: a histochemical study; J. Histochem. Cytochem., 1964, 13:133-140
- (21) Silverman L., Glick D., The Reactivity and Staining of Tissue Proteins with Phosphotungstic Acid, J. Cell. Biol., 1969
- (22) Quintarelli G., Zito R., Cifonelli J.A., On Phosphotungstic Acid Staining I; J. Histochem. Cytochem., 19(11):641-647, 1971
- (23) Quintarelli G., Zito R., Cifonelli J.A., On Phosphotungstic Acid Staining II; J. Histochem. Cytochem., 19(11):648-653, 1971
- (24) Quintarelli G., Bellocci M., Geremia R., On Phosphotungstic Acid Staining IV, Selectivity of the Staining Reaction; J. Histochem. Cytochem., 21(2):155-160, 1973
- (25) Cox R.W., Grant R.A., Kent C.M., An Electron-Microscope study of the reaction of collagen with some monoaldehydes and bifunctional aldehydes; J. Cell. Sci., 12, 933-949, 1973
- (26) Lillie R.D., Reynolds C., Pizzolat P., Phosphomolybdic and Phosphotungstic Acid – Victoria Blue R Stains Two Histochemically Distinct Collagen: Dense Dark Blue and Loose Areolar Pale Green; J. Histochem. Cytochem., 27(7):1092-1094, 1979
- (27) Luna Lee G., The Masson-Trichrome, Some Useful Information, Histologic vol IX(1), 1979
- (28) Horobin R.W., Flemming L., One-bath trichrome staining: investigation of a general mechanism based on a structure-staining correlation analysis; Histochem. J., 1988 Jan; 20(1)29-34
- (29) Stockert J.C. et al., Tungsten and molybdenum heteropolyacids as staining and contrasting agents: reactivity with epoxyresin-embedded cell and tissue structures; Acta Histochem., 1989; 86(2):151-8
- (30) Mason J.T., O'Leary T.J., Effects of Formaldehyd Fixation on Protein Structure: A calorimetric and Infrared Spectroscopic Investigation; J. Histochem. Cytochem., 39 (2):225-229, 1991
- (31) Doi Takefumi et al., Charged Collagen Structure Mediates the Recognition of Negatively Charged Macromolecules by Macrophage Scavenger Receptors, J. Biol. Chemistry, Vol. 268, Nr. 3, pp 2126-2133, 1993
- (32) Prento P., Van Gieson's picrofuchsin. The staining mechanisms for collagen and cytoplasm, and an examination of the dye diffusion rate model of differential staining. Histochemistry, 1993 Feb; 99(2):163-74
- (33) Reid P.E. et al., Mechanism of connective tissue technique. I. The effect of dye concentration and staining time on anionic dye procedures; Histochem. J., 1993 Nov; 25(11):821-9
- (34) Prento P., A contribution to the theory of biological staining based on the principle for structural organization of biological macromolecules; Biotech Histochem., 2001 May; 76(3):137-61
- (35) Horobin R.W., Biological staining: mechanisms and theory; Biotech Histochem., 2002 Jan; 77(1):3-13
- (36) Dapson R.W., Dye-tissue interactions: mechanisms, quantification and bonding parameters for dyes used in biological staining; Biotech Histochem., 2005 Mar-Apr; 80(2):49-72
- (37) Montero C., The Antigen-Antibody Reaction in Immunohistochemistry; J. Histochem. Cytochem., 51(1):1-4, 2003