

# **Untersuchungen zur ultrastrukturellen Enzym- und Immunhistochemie im Postembedding-Verfahren am Knochenmark von Hund und Katze**

## **Studies on electron microscopic postembedding cytochemistry and immunocytochemistry with canine and feline bone marrow**

**M.L. Kröz**

**Zusammenfassung:** Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Methoden zur ultrastrukturellen enzym- und immunhistochemischen Markierung von frühen Reifestadien der neutrophilen Granulozytopoese im Postembedding-Verfahren am Knochenmark von Hund und Katze zu etablieren. Dabei besaß die Präparation und Fixation grundlegende Relevanz für die weitergehenden Untersuchungen. Zunächst wurde die Präparationstechnik verfeinert sowie die optimale Zusammensetzung der Fixantien im Hinblick auf die angeschlossenen Reaktionen ermittelt. Hierbei mußten Kompromisse zwischen einer zufriedenstellenden Erhaltung der Ultrastruktur einerseits und einer ausreichenden Enzymaktivität bzw. Antigenität andererseits eingegangen werden. Die Entkalkung mit EDTA erwies sich ebenfalls als ein die Enzymaktivität beeinflussender Faktor. Beim Hund wurde die Reaktionsintensität der Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase geringgradig, bei der Katze jedoch erheblich durch die Entkalkung reduziert. Bei der immunhistochemischen Untersuchung mit einem Antikörper gegen Lysozym konnte jedoch kein Unterschied in der Reaktionsintensität zwischen entkalktem und nicht entkalktem Knochenmark beobachtet werden. Nach der Gewebebegewinnung und der Fixation wurden die Bedingungen der Einbettung in Unicryl® optimiert. Dabei wurde zunächst die thermische Polymerisation erprobt. Um eine zufriedenstellende morphologische Gewebeerhaltung zu erzielen, mußte die Polymerisationstemperatur jedoch so stark erhöht werden, daß die biologische Aktivität des Gewebes zerstört wurde. Im folgenden wurde das Harz mittels UV-Bestrahlung in der Kälte polymerisiert. Die besten Ergebnisse konnten hier mit Polymerisation bei -15°C erzielt werden. Generell erwiesen sich möglichst kurze Infiltrations- und Polymerisationszeiten als vorteilhaft für die Gewebeerhaltung. Die Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase konnte bei Hund und Katze lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Die elektronenmikroskopische Darstellung des Enzyms im Postembedding-Verfahren gelang jedoch nicht. Mit einem gegen menschliches Lysozym gerichteten Antikörper konnte am Paraffinschnitt eine Reaktion sowohl mit kaninem als auch mit felinem Gewebe erzielt werden, wobei bei der Katze jedoch eine geringere Reaktionsintensität zu beobachten war. Auf ultrastruktureller Ebene konnte eine positive immunhistochemische Reaktion von Promyelozyten und Myelozyten des Hundes demonstriert werden.

**Summary:** The objective of this study was to establish techniques to identify early stages of neutrophilic granulocytes in canine and feline bone marrow through postembedding electron microscopic cytochemistry and immunocytochemistry. It was found that tissue preparation and fixation was a fundamental aspect for the subsequent reactions. Therefore the preparation technique and the composition of the fixative was optimized. Yet a compromise had to be found between good conservation of ultrastructure and sufficient preservation of enzyme activity or antigenicity respectively. Moreover, decalcification by means of EDTA proved to impair enzyme activity of naphthol-AS-D-chloroacetate-esterase slightly in the dog but severely in the cat. In contrast to this, immunocytochemistry with antibody against human lysozyme was not affected by decalcification. Next, the procedure of embedding in Unicryl® was optimized. The first trials tested thermal polymerisation. However, to achieve satisfactory morphological results the temperature for polymerisation had to be raised so much that the biological activity of the tissue was destroyed. Thereupon the resin was polymerized in the cold through UV-irradiation. Best results were achieved by polymerisation at -15°C. In general shortening of the duration of infiltration and polymerisation showed a beneficial effect on the morphological appearance of the tissue. With employment of the postembedding procedure the enzyme

naphthol-AS-D-chloroacetate-esterase could be demonstrated in canine as well as feline bone marrow sections through the light microscope, but not through the electron microscope. In immunocytochemical studies on paraffin sections with antibody against human lysozyme there was a positive reaction in sections of canine as well as feline bone marrow. Yet the reaction in the cat showed less intensity than in the dog. Ultrastructural postembedding studies with the same antibody displayed a positive reaction in canine promyelocytes and myelocytes.