
BACHELORARBEIT

Westsächsische Hochschule Zwickau

Fakultät: **Physikalische Technik/Informatik**



Optimierung physikalisch-chemischer Parameter der Sudan-IV-Paraffinfärbung für die episkopische Fluoreszenzbildgebung

Schott, Dominik

Geboren am 31. Dezember 1995 in Rodewisch

Studiengang: Biomedizinische Technik

Betreuer, Einrichtung: Prof. Dr. Ralf Hinderer, WH Zwickau

Dr. rer. nat. Anna Mühlig, Universitätsklinikum Jena

Ausgabedatum: 15.01.2026

Abgabetermin: 12.03.2026

Bibliographische Beschreibung:

Schott, Dominik: Optimierung physikalisch-chemischer Parameter der Sudan-IV-Paraffinfärbung für die episkopische Fluoreszenzbildgebung. - 2026. - I-IX, 1-46, 6 Anlagen. Zwickau, Westsächsische Hochschule Zwickau, Fakultät Physikalische Technik/Informatik, Bachelorarbeit, 2026.

English title:

Optimization of Physicochemical Parameters of Sudan IV Paraffin Staining for Episcopic Fluorescence

Kurzbeschreibung:

Die Bachelorarbeit untersucht die Optimierung Sudan-IV-haltiger Paraffineinbettungen für die episkopische Fluoreszenzbildgebung formalinfixierter Gewebe. Ziel ist die Verbesserung der Homogenität des Einbettmediums sowie der Bildqualität für die dreidimensionale Analyse. Untersucht wurden der Einfluss von Abkühlgeschwindigkeit, Inkubationsbedingungen und Gemischzusammensetzung. Ergänzend erfolgte die Bildaufnahme unter verschiedenen spektralen Filterkonfigurationen, insbesondere unter Verwendung mehrerer Emissionsfilter zur Bewertung autofluoreszenter Signale. Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem die Abkühlgeschwindigkeit die strukturelle Homogenität des Paraffins beeinflusst, während die Filterwahl den Informationsgehalt der Bildgebung wesentlich mitbestimmt.

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Ralf Hinderer für die Betreuung von Hochschuleseite und die Unterstützung vor und während der Bearbeitung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Dr. Anna Mühlig für die Betreuung am Universitätsklinikum Jena sowie für die Möglichkeit, die praktischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchzuführen. In diesem Zusammenhang danke ich auch Ulrike Weyer für ihre Unterstützung im Labor sowie für die Hilfe bei technischen und organisatorischen Fragen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Dr. Walter Hauswald für die Betreuung am Leibniz-IPHT, für die Möglichkeit, dort Teile dieser Arbeit durchzuführen und für seine fachliche Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihren Rückhalt in dieser stressigen Zeit. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Sophie, die mich während dieser Phase mit viel Verständnis, Geduld und emotionaler Unterstützung begleitet hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung.....	1
1.2 Zielsetzung.....	3
2 Grundlagen	4
2.1 Histologie	4
2.2 Aufbau und Funktion von Lymphknoten	4
2.3 Probenpräparation.....	6
2.3.1 Fixierung	6
2.3.2 Einbettung	6
2.3.3 Mikrotomie	7
2.3.4 Histologische Färbemethoden (HE- und Azan-Färbung).....	7
2.4 Blockflächen-Bildgebung	8
2.4.1 Autofluoreszenz biologischer Gewebe als Bildsignal	9
2.4.2 Unterdrückung der Fluoreszenzsignale mit Sudan IV	11
3 Material	13
3.1 Chemikalien und Farbstoffe	13
3.2 Laborbedarf	14
3.3 Geräte	14
3.4 Probenmaterial.....	15
4 Methodik.....	16
4.1 Probenmaterial.....	16
4.1.1 Probengewinnung und Fixierung.....	16
4.2 Herstellung der Einbettungsgemische	16
4.2.1 Verwendete Komponenten	16
4.2.2 Allgemeines Herstellungsprotokoll paraffinhaltiger Gemische	16
4.2.3 Abkühl- und Erstarrungsvarianten der Einbettungen	17
4.3 Entwässerung und Einbettung	18
4.4 Optisches System und Bildaufnahme	18
4.4.1 Filterkonfiguration	19
4.4.2 Parametersätze zur Bildaufnahme	21
4.4.3 Ablauf der seriellen Bildaufnahme.....	22
4.5 Bildverarbeitung und Datenauswertung	23
4.5.1 Datengenerierung.....	23
4.5.2 Datenverarbeitung.....	23
4.5.3 Kanalüberlagerung und 3D-Rekonstruktion.....	24

4.6	Experimentelle Untersuchungen	24
4.6.1	Variierte Inkubationsbedingungen (Ultraschall, Schwenken, Xylolmatrix)	25
4.6.2	Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit auf die Mikrostruktur	25
4.6.3	Einfluss der Gemischkomponenten bei konstanter Abkühlungsbedingung	25
4.6.4	Tiefenabhängige Analyse der Homogenität	26
4.7	Qualitative Kanalbewertung, Vergleichsfärbungen und 3D-Rekonstruktion	27
5	Ergebnisse	28
5.1	Variierte Inkubationsbedingungen (Ultraschall, Schwenken, Xylolmatrix)	28
5.2	Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit auf die Mikrostruktur	28
5.3	Einfluss der Gemischanteile bei konstanter Abkühlbedingung	31
5.4	Tiefenabhängigkeit der Homogenitätsparameter	32
5.5	Kanalüberlagerung und Referenzfärbungen	35
5.6	3D-Rekonstruktion	38
6	Diskussion	40
7	Ausblick	42
8	Zusammenfassung	43
9	Abstract	44
	Literaturverzeichnis	45
	Anhang	48
	Selbständigkeitserklärung	54

Abkürzungsverzeichnis

BFI	Block-Face Imaging
BW	Bienenwachs
CMOS	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
CoMBI	Correlative Microscopy and Block-Face Imaging
CSV	Comma-Separated Values
EFIC	Episcopic Fluorescence Image Capturing
em	Emission
ex	Anregung
GS	Gefrierschrankabkühlung
GS2	Gefrierschrankabkühlung mit initialem Wärmeentzug (Eisblock)
HE	Hämatoxylin-Eosin(-Färbung)
HREM	High-Resolution Episcopic Microscopy
IQR	Interquartilsabstand
K	Kühlschrankabkühlung
LED	Light Emitting Diode
LK	Lymphknoten
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(-phosphat)
O	Ofenabkühlung
P	Paraffin
PS1	Parametersatz 1
PS2	Parametersatz 2
RGB	Rot-Grün-Blau
ROI	Region of Interest
BpM	Bewegungen pro Minute
RT	Raumtemperaturabkühlung
RT2	Raumtemperaturabkühlung unter mechanischer Bewegung
SBF-SEM	Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy
SIM	Surface Imaging Microscopy
SIV	Sudan IV
St	Stearinsäure
TIFF	Tagged Image File Format
WS	Whisker-Spannweite
X	Xylol

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausgangsmaterial aus Vorarbeiten.....	3
Abbildung 2 Aufbau eines Lymphknotens (Brenner, 2025, S. 302).	5
Abbildung 3: HE- und Azan-Färbung ösophagealen Anastomosen (Kurazumi et al.).	8
Abbildung 4: Jablonski-Diagramm zur Darstellung der Autofluoreszenz.....	10
Abbildung 5: Strukturformel von Sudan IV (Carl ROTH GmbH).	11
Abbildung 6: Makrofotografieaufbau	19
Abbildung 7: Anregungs-LEDs und -filter.....	20
Abbildung 8: Anregungswellenlängen und -filter.....	20
Abbildung 9: Emissionswellenlängen und -filter	21
Abbildung 10: Schematische Darstellung der statistischen Auswertung der aus dem ROI exportierten CSV-Pixelwerte.....	23
Abbildung 11: Schematische Darstellung der farblichen Zuordnung und additiven Überlagerung der Grauwertkanäle.	24
Abbildung 12: Vergleich der Lymphknotenproben	28
Abbildung 13: Lineare Box-/Violinplot- Darstellung.....	29
Abbildung 14: Grauwertverteilungen der untersuchten paraffinbasierten Gemische bei konstanter Abkühlung (GS2) im Autofluoreszenzkanal PS2-K4.	31
Abbildung 15: Grauwertverteilungen der untersuchten paraffinbasierten Gemische bei konstanter Abkühlung (GS2) im Autofluoreszenzkanal PS2-K5.	32
Abbildung 16: Positionsabhängige Variation der Homogenitätskennwerte innerhalb einer Schnittebene anhand dreier ROI-Positionen (gleiche Probe).....	33
Abbildung 17: Exemplarischer Tiefenverlauf der Homogenitätskennwerte einer einzelnen Probe über serielle Schnittebenen ($\Delta z = 50 \mu\text{m}$).....	33
Abbildung 18: Gegenüberstellung der Tiefenverläufe der Homogenitätskennwerte (Kanal PS2-K4).....	34
Abbildung 19: Gegenüberstellung der Tiefenverläufe der Homogenitätskennwerte (Kanal PS2-K5). Herstellbedingungen: GS, GS2, RT und RT2 sowie RT2 mit Schüttelstufen (20/40/80 BpM).	35
Abbildung 20: Exemplarischer visueller Vergleich ausgewählter Autofluoreszenzkanäle einer Gewebereinbettung.....	36

Abbildung 21: Übersichtsdarstellung des Lymphknotens in Azan-Färbung, Autofluoreszenz und HE-Färbung.....	36
Abbildung 22: Detaildarstellung der in Abbildung 21 markierten Region A in Azan-Färbung, Autofluoreszenz und HE-Färbung.....	37
Abbildung 23: Detaildarstellung der in Abbildung 21 markierten Region B in Azan-Färbung, Autofluoreszenz und HE-Färbung.....	37
Abbildung 24: Detaildarstellung der in Abbildung 21 markierten Region C in Azan-Färbung, Autofluoreszenz und HE-Färbung.....	38
Abbildung 25: Dreidimensionale Darstellung des untersuchten Lymphknotens auf Grundlage der überlagerten Kanäle (PS1-[K4-K6]).	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Endogene Fluorophore mit typischen Anregungs- und Emissionsbereichen sowie biologischer Zuordnung (Croce & Bottiroli, 2014, S. 320-337; Jones,2023)	10
Tabelle 2: Chemikalien.....	13
Tabelle 3: Farbstoffe.	13
Tabelle 4: Laborbedarf	14
Tabelle 5: Geräte	14
Tabelle 6: Makrofotografieaufbau.....	14
Tabelle 7: Anregungsfilter, Herstellername (AHF Analysetechnik Bestellnummer)	15
Tabelle 8: Emissionsfilter, Herstellername (AHF Analysetechnik Bestellnummer).....	15
Tabelle 9: Abkühlvarianten.....	17
Tabelle 10: Optische Aufnahmeparameter (PS1) für Gewebeeinbettungen	22
Tabelle 11: Optische Aufnahmeparameter (PS2) zur Strukturanalyse paraffinbasierter Einbettungen.....	22
Tabelle 12: IQR-/Median-Werte für PS2 - K4 (Belichtungszeit: 10000ms, 365nm, Filterkonfiguration: A-1).....	29
Tabelle 13: Median-Werte für PS2 – K4 und K5.....	30
Tabelle 14: Inhomogenitäten auf Schnittebene in 5-µm-Schnitten aus Paraffineinbettungen (500 × 500 µm).....	30
Tabelle 15: Zusammensetzung der untersuchten paraffinbasierten Einbettgemische	31
Tabelle 16: Übersicht verwendeter Hilfsmittel.....	45
Anhang Tabelle 17: Übersicht aller hergestellten Einbettungen	48
Tabelle 18: 5 µm Schnittdicke, erfasst mit dem NanoZoomer.	52

1 Einleitung

Die histologische Untersuchung biologischer Gewebe basiert auf mikroskopischen Verfahren, die in Forschung und Diagnostik etabliert sind und sich im Zuge technischer Entwicklungen kontinuierlich weiterentwickelt haben. Klassischerweise erfolgt die Analyse anhand dünner Schnittpräparate, die eine hochaufgelöste zweidimensionale Darstellung zellulärer und struktureller Merkmale ermöglichen. Die Erfassung räumlicher Zusammenhänge setzt dabei in der Regel die Anfertigung serieller Schnitte und deren nachfolgende Rekonstruktion voraus (Mullisch & Welsch, 2010).

Die dreidimensionale Analyse biologischer Gewebe gewinnt zunehmend an Bedeutung, da komplexe räumliche Organisationsmuster in zweidimensionalen Schnittpräparaten nur eingeschränkt erfassbar sind. Eine volumetrische Darstellung ermöglicht es, strukturelle Zusammenhänge präziser zu analysieren und die Gewebeorganisation über alle Raumebenen hinweg abzubilden. Vor diesem Hintergrund besteht ein wachsender Bedarf an bildgebenden Verfahren, die eine reproduzierbare und artefaktarme dreidimensionale Rekonstruktion histologischer Proben erlauben.

Einen vielversprechenden Ansatz stellen blockflächenbasierte Verfahren dar, die eine direkte volumetrische Erfassung histologischer Proben ermöglichen. Sie erlauben die serielle Aufnahme der freigelegten Oberfläche eines eingebetteten Probenblocks und erzeugen intrinsisch registrierte Bildstapel für die dreidimensionale Rekonstruktion. In Kombination mit autofluoreszenzbasierten Kontrastmechanismen kann dabei auf zusätzliche Markierungsverfahren verzichtet werden, wodurch eine strukturorientierte, markerfreie 3D-Analyse biologischer Gewebe möglich wird (Liu et al., 2013).

Die vorliegende Arbeit knüpft an bestehende Untersuchungen zur Kontrastoptimierung paraffineingebetteter und mit Sudan IV gefärbter Proben im Rahmen der episkopischen Blockflächen-Bildgebung an und führt diese systematisch fort. Sie ist in die methodische Weiterentwicklung volumetrischer Bildgebungsverfahren innerhalb der Arbeitsgruppe Klinische Biophotonik der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde eingebettet und adressiert gezielt material- und detektionsbedingte Einflussfaktoren auf die Bildqualität. Trotz der beschriebenen methodischen Weiterentwicklungen weisen sowohl klassische Schnittverfahren als auch blockflächenbasierte Ansätze spezifische Limitationen auf. Im folgenden Abschnitt wird darauf näher eingegangen (Sterzel, 2025).

1.1 Problemstellung

Biologische Gewebeproben werden vor der histologischen Analyse fixiert und eingebettet, um ihre Struktur zu konservieren und eine standardisierte Weiterverarbeitung zu gewährleisten. Bereits während dieser Schritte können strukturelle Veränderungen auftreten, da verschiedene Gewebekomponenten unterschiedlich auf die jeweiligen Fixierbedingungen reagieren und

keine universell optimale Fixierung existiert. Darüber hinaus sind auch in den weiteren Präparationsschritten Volumenänderungen und geometrische Verzerrungen möglich. Eine zusätzliche methodische Limitation stellt die Schnitterstellung selbst dar (Mulisch & Welsch, 2010).

Die Mikrotomie ist ein mechanischer Prozess, bei dem Artefakte wie Falten, Kompressionen, Risse oder Dickenvariationen auftreten können und die Geometrie einzelner Schnitte beeinflusst wird. Die Folge dieser Limitationen liegt in der Beschränkung auf zweidimensionale Schnitte. Räumliche Zusammenhänge können nur indirekt über Serienschnitte rekonstruiert werden, was mit erhöhtem Aufwand sowie zusätzlichen Fehlerquellen durch Schnittverluste und geometrische Verzerrungen verbunden ist (Bancroft & Gamble, 2013).

Blockflächenbasierte Verfahren wie die episkopische Fluoreszenzbildgebung reduzieren diese Limitationen, indem nach jedem Abtragungsschritt die freigelegte Blockoberfläche optisch erfasst wird. Dadurch entstehen Aufnahmen, die eine konsistente dreidimensionale Rekonstruktion ermöglichen und Registrierungsprobleme serieller Schnitte reduzieren (Liu et al., 2013).

Bei paraffineingebetteten Proben stellt jedoch die optische Transparenz des Einbettmediums eine zusätzliche Herausforderung dar. Signale aus tieferliegenden Gewebeschichten können die aktuelle Schnittfläche überlagern und zu Kontrastverlust sowie reduzierter axialer Auflösung führen (Ishii et al., 2021).

Zur Reduktion unerwünschter Tiefensignale wird das Einbettmedium modifiziert, um die optische Transparenz des Paraffins zu verringern. Dadurch soll die Signalentstehung stärker auf die aktuelle Blockoberfläche begrenzt werden. In einer vorangegangenen Arbeit wurde Sudan IV als lichtabsorbierender Zusatz eingesetzt (Sterzel, 2025).

Ein zentrales Problem bei diesem Ansatz ist jedoch, wie in Abbildung 1 zu sehen, die Inhomogenität des modifizierten Einbettmediums. Der Farbstoff verteilt sich nicht gleichmäßig im Paraffin-Gemisch und kann zu Artefakten und strukturellen Unregelmäßigkeiten führen, die die optische Homogenität des Blocks beeinträchtigen. Es entsteht somit ein Zielkonflikt zwischen effektiver Unterdrückung tieferliegender Fluoreszenzsignale und der strukturellen Integrität des Einbettmediums, wodurch die praktische Anwendbarkeit Sudan-IV-haltiger Paraffine eingeschränkt wird (Sterzel, 2025).

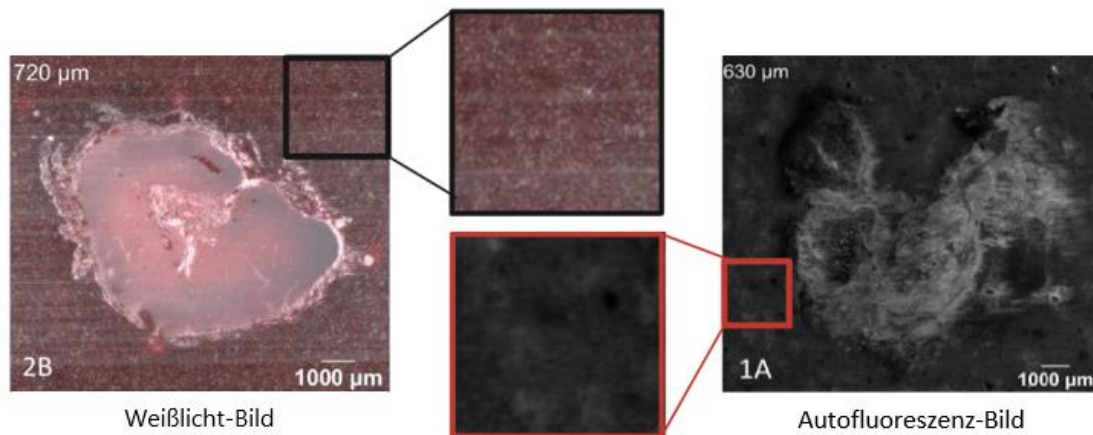


Abbildung 1: Ausgangsmaterial aus Vorarbeiten.

Vergleich eines Weißlichtbildes (links) und eines Autofluoreszenzbildes (rechts). In der Matrix sind deutlich erkennbare Inhomogenitäten sichtbar, dargestellt durch variierende helle und dunkle Strukturen (Sterzel, 2025).

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die episkopische Blockflächen-Fluoreszenzbildgebung formalinfixierter Gewebe in Sudan-IV-haltigen paraffinbasierten Einbettungen gezielt weiterzuentwickeln und kritisch zu bewerten. Ausgangspunkt sind bekannte Limitationen des Ansatzes, insbesondere Inhomogenitäten des eingefärbten Paraffins, verbleibende Farbstoffpartikel, Lufteinschlüsse sowie daraus resultierende Artefakte in der Oberflächenabbildung und eine eingeschränkte Eignung der Bilddaten für präzise dreidimensionale Rekonstruktionen.

Ausgehend von diesen Limitationen soll untersucht werden, welche Faktoren maßgeblich zur Entstehung der beobachteten Inhomogenitäten und Bildartefakte beitragen und in welchem Umfang sie sich systematisch beeinflussen lassen. Ziel ist es, die strukturelle Homogenität der Einbettung quantitativ zu verbessern.

Weiterhin wird geprüft, welchen Einfluss unterschiedliche Anregungs- und Emissionsfilterkombinationen auf das detektierte Autofluoreszenzsignal besitzen. Im Mittelpunkt steht die Frage, inwieweit die spektrale Selektion des Signals die Abbildung der Blockoberfläche beeinflusst und ob sich Signalanteile aus tieferliegenden Schichten oder aus der Matrix differenzieren lassen. Die Arbeit zielt somit darauf ab, die Wechselwirkung zwischen Materialstruktur und optischer Detektion systematisch zu untersuchen.

Der Fokus liegt ausschließlich auf der Optimierung der Sudan-IV-basierten Paraffineinbettung und der Analyse des Einflusses von Anregungs- und Emissionsfiltern auf die Autofluoreszenzdetektion innerhalb des bestehenden Systems.

2 Grundlagen

2.1 Histologie

Die Histologie bezeichnet die Gewebelehre und umfasst die mikroskopische Struktur von Geweben und Zellen und stellt ein Teilgebiet der Anatomie dar. Innerhalb des Fachgebiets wird zwischen Allgemeiner und Spezieller Histologie unterschieden. Während sich die Allgemeine Histologie mit den Grundgeweben befasst, behandelt die Spezielle Histologie den mikroskopischen Aufbau von Organen. Zu den Grundgeweben zählen das Epithelgewebe, das Bindegewebe, das Muskelgewebe sowie das Nervengewebe (Elsässer, 2021, S. IX-X).

Die Histopathologie stellt ein Spezialgebiet der Histologie dar. Sie befasst sich mit krankhaften oder anlagebedingten Veränderungen der Gewebe auf feinstruktureller Ebene. Für die histopathologische Beurteilung ist die Kenntnis des „Normalbefundes“ von großer Bedeutung. Damit eine Gewebeprobe feingeweblich beurteilt werden kann, muss sie einen komplexen Prozess durchlaufen, der unter dem Terminus „Histotechnik“ subsumiert wird und aus mehreren Einzelschritten besteht (Schärer, 2016, S. 3).

Damit eine Gewebeprobe mikroskopisch untersucht werden kann, wird sie in Form dünner, nahezu zweidimensionaler Schnitte aus einem dreidimensionalen Gewebeblock gewonnen. Diese lichtdurchlässigen Schnitte besitzen in der Regel eine Dicke von etwa 5-8 µm und werden mit einem Durchlichtmikroskop betrachtet. Da biologische Strukturen ohne zusätzliche Maßnahmen meist keinen ausreichenden Eigenkontrast aufweisen, werden Farbstoffe oder Farbstoffgemische eingesetzt, die selektiv an unterschiedliche Gewebekomponenten binden und dadurch einen Farbkontrast erzeugen (Elsässer, 2021, S. X-XI).

Nach der Färbung wird die zuvor weitgehend kontrastarme Gewebestruktur differenziert sichtbar. Zellkerne, Zytoplasmaanteile sowie extrazelluläre Bestandteile lassen sich anhand ihrer charakteristischen Farbreaktionen voneinander abgrenzen. Durch die kontrastierende Färbung von Zellkern und Zytoplasma sowie weiteren Gewebekomponenten werden die Strukturen im Präparat deutlicher erkennbar. Dies erleichtert die Unterscheidung einzelner Gewebekomponenten und die Beurteilung morphologischer Merkmale (Feldman & Wolfe, 2014, S. 31-43).

2.2 Aufbau und Funktion von Lymphknoten

Das lymphatische System bildet ein in Richtung Körperzentrum verlaufendes Gefäßnetz, das überschüssige Flüssigkeit aus den Geweben aufnimmt und dem venösen System zuführt. In dieses System sind Lymphknoten als Filter- und Kontrollstationen eingeschaltet, die sowohl der Regulation des Flüssigkeitshaushalts als auch der Immunüberwachung dienen. Sie halten Antigene aus der Lymphe zurück und ermöglichen die gezielte Aktivierung von Immunzellen (Brenner, 2025, S. 301-303; Kaufmann, 2025, S. 19-21).

Makroskopisch sind Lymphknoten bohnenförmige Organe (Abbildung 2), die gruppenweise an charakteristischen Körperregionen wie Axilla, Leiste oder entlang viszeraler Gefäße vorkommen. Sie sind in den Verlauf der Kollektoren und Lymphstämme eingeschaltet und repräsentieren definierte lymphatische Abflussgebiete. Die Gesamtzahl beträgt beim Menschen etwa 400-800 Lymphknoten. Sie sind von einer straffen bindegewebigen Kapsel umgeben, von der Trabekel in das Innere ziehen und eine unvollständige Gliederung des Organs bewirken. An der konkaven Seite befindet sich das Hilum, über das Arterien eintreten sowie Venen und efferente Lymphgefäße austreten, während die afferenten Lymphgefäße an der konvexen Oberfläche in die Kapsel einmünden. Größe und Konsistenz können in Abhängigkeit vom funktionellen Zustand variieren (Brenner, 2025, S. 301-306; Kaufmann, 2025, S. 19-21).

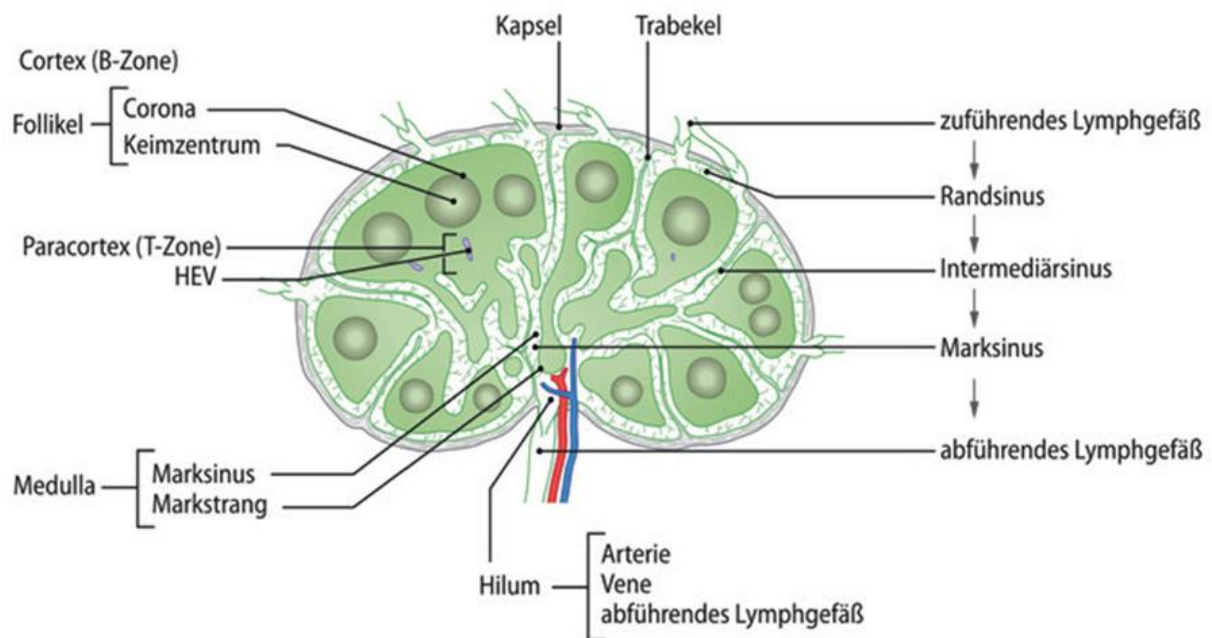


Abbildung 2 Aufbau eines Lymphknotens (Brenner, 2025, S. 302).

Mikroskopisch lassen sich Cortex, Paracortex und Medulla unterscheiden. Der Cortex enthält überwiegend B-Lymphozyten in Follikeln, die bei Antigenkontakt Keimzentren ausbilden, während der Paracortex die T-Zell-Zone darstellt. Die Medulla besteht aus Marksträngen und Marksinus, die B- und T-Zellen sowie Makrophagen enthalten. Die Lymphe tritt über die Vasa afferentia in den Randsinus ein, durchfließt die Sinussysteme und verlässt den Lymphknoten über die Vasa efferentia am Hilum, parallel erfolgt die Blutversorgung über begleitende Arterien und Venen (Brenner, 2025, S. 301-306).

Funktionell wirken Lymphknoten als biologische Filter, in denen Fremdpartikel, Mikroorganismen und Zelltrümmer aus der Lymphe entfernt werden. Gleichzeitig stellen sie als sekundäre lymphatische Organe zentrale Orte der adaptiven Immunantwort dar. Antigene und antigenpräsentierende Zellen gelangen über die Lymphe in den Knoten, wo T-Lymphozyten im Paracortex und B-Lymphozyten im Cortex gezielt aktiviert und differenziert werden. Die enge räumliche Organisation ermöglicht eine effiziente Zusammenführung von Antigenen und Immunzellen (Kaufmann, 2025, S. 19-21).

Die histologische Untersuchung von paraffineingebetteten Lymphknoten ist ein zentrales diagnostisches Verfahren zur Beurteilung entzündlicher und neoplastischer Veränderungen. An Schnittpräparaten lassen sich charakteristische morphologische Veränderungen wie Desmoplasien, Lipomatosen oder Nekrosen erkennen, die auf Umbauprozesse des lymphatischen Gewebes infolge chronischer Antigenstimulation oder Tumordinfiltration hinweisen können (Priya, 2023).

Insbesondere ermöglicht die Histopathologie den Nachweis einer metastatischen Beteiligung von Lymphknoten. Besonders relevant ist dies bei der Untersuchung von Sentinel-Lymphknoten, da diese eine präzise Beurteilung des Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom erlauben. Der Nachweis oder Ausschluss einer metastatischen Beteiligung ist für die Therapieplanung und das weitere operative Vorgehen von wesentlicher Bedeutung. (Cserni et al., 2022).

2.3 Probenpräparation

Die Probenpräparation umfasst eine Abfolge standardisierter Arbeitsschritte, die das Ziel verfolgen, biologische Materialien in einem strukturell möglichst unveränderten Zustand mikroskopisch untersuchbar zu machen.

2.3.1 Fixierung

Die Fixierung stellt den ersten und entscheidenden Schritt der Probenpräparation dar. Nach der Gewebeentnahme setzen autolytische Prozesse ein, die unbehandelt zu strukturellem Abbau führen können. Die Fixierung dient daher der Stabilisierung der Gewebestrukturen durch chemische Veränderungen, insbesondere durch Denaturierung, Koagulation oder Quervernetzung von Proteinen. Auf diese Weise sollen Zellen und Gewebe für die Untersuchung möglichst in ihrem momentanen Zustand erhalten bleiben. Für ein optimales Ergebnis sind mehrere Einflussfaktoren zu berücksichtigen, darunter Art und Konzentration des Fixativs, das Verhältnis von Fixierlösung zu Gewebevolumen, Temperatur sowie Dauer der Einwirkzeit. Eine unzureichende Fixierung kann zu strukturellen Veränderungen führen, während zu lange Fixierungszeiten die Präparate hart, brüchig und stark extrahiert machen können. Auch die Größe der Gewebeproben ist von Bedeutung, da eine vollständige Durchdringung mit dem Fixativ gewährleistet sein muss. In der histologischen Routine werden vor allem formaldehydbasierte Fixative verwendet. Formalin beziehungsweise Formol bezeichnet dabei eine kommerziell erhältliche 30–40 %ige wässrige Formaldehydlösung, die zusätzlich Stabilisatoren, meist Methanol, enthalten kann. Für histologische Zwecke wird diese Stammlösung verdünnt. In der Routinifixierung kommen unter anderem gepufferte Formalinlösungen zum Einsatz. Die Fixierung bildet somit die methodische Grundlage für alle weiteren Schritte der histologischen Aufarbeitung (Mulisch & Welsch, 2010, S. 87-104).

2.3.2 Einbettung

Im Anschluss an die Fixierung erfolgt die Einbettung, deren Ziel die Überführung des Gewebes in ein formstabiles und schnittfähiges Medium ist. Da gebräuchliche Einbettmedien wie Paraffin

nicht mit Wasser mischbar sind, muss das Gewebe zunächst schrittweise entwässert werden. Dies geschieht in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen, um Zerreißen und Schrumpfung möglichst zu vermeiden. Nach der vollständigen Dehydrierung wird ein Zwischenmedium eingesetzt, das sowohl mit Alkohol als auch mit dem Einbettmedium kompatibel ist. Erst danach erfolgt die Infiltration mit dem eigentlichen Einbettmedium. Bei Paraffin führt das Abkühlen nach der Infiltration zur Aushärtung des Materials und damit zur notwendigen Stabilität für die Schnittpräparation. Besondere Bedeutung kommt der korrekten Orientierung des Gewebes im Einbettmedium zu, da sie die spätere Schnittebene bestimmt und somit die Darstellung spezifischer Strukturen beeinflusst. Die Einbettung stellt daher einen wesentlichen und qualitätsbestimmenden Abschnitt der Probenpräparation dar. (Mulisch & Welsch, 2010, S. 105-120).

2.3.3 Mikrotomie

Die Mikrotomie bildet den abschließenden mechanischen Schritt der Probenpräparation. Der ausgehärtete Gewebeblock wird in ein Mikrotom eingespannt und mit einer präzise geführten Klinge in definierter Dicke geschnitten. Für lichtmikroskopische Untersuchungen liegen die Schnittdicken typischerweise im Bereich weniger Mikrometer. Eine gleichmäßige Schnittdicke ist Voraussetzung für eine zuverlässige mikroskopische Beurteilung. Die Qualität der Schnitte wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, darunter die Beschaffenheit des Einbettmediums, die Schärfe und Führung der Klinge, die Temperatur des Blocks sowie die Schnittgeschwindigkeit. Ungünstige Bedingungen können die Qualität der Präparate beeinträchtigen und die Interpretation erschweren. Nach dem Schneiden werden die Schnitte auf ein Wasserbad überführt, anschließend auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Erst danach sind sie für weitere Bearbeitungsschritte, insbesondere Färbungen, geeignet. Die Mikrotomie erfordert daher eine präzise technische Durchführung und stellt einen entscheidenden Faktor für die Qualität des Endpräparates dar (Mulisch & Welsch, 2010, S. 120-127).

2.3.4 Histologische Färbemethoden (HE- und Azan-Färbung)

Nach der Schnitterstellung erfolgt die histologische Färbung, deren Ziel es ist, zelluläre und extrazelluläre Strukturen kontrastreich darzustellen. Da Paraffinschnitte hydrophob sind, ist vor der eigentlichen Färbung eine geeignete Vorbehandlung erforderlich, um die Aufnahme wässriger Farbstofflösungen zu ermöglichen.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung (Abbildung 3-A) ist die am häufigste eingesetzte Routinefärbung in der Histologie und bildet die Grundlage der morphologischen Beurteilung von Geweben. Zunächst erfolgt die Kernfärbung mit Hämatoxylin, das vor allem das Kernchromatin und weitere saure Zellbestandteile färbt. Dadurch werden Zellkerne blau bis violett dargestellt. Ein anschließender Bläuungsschritt im alkalischen Milieu verändert die Kernfärbung von rötlich zu blauviolett (Feldman & Wolfe, 2014, S. 31–43).

Nach der Kernfärbung erfolgt die Gegenfärbung mit Eosin, das Zytoplasma und Faserstrukturen rosa bis rötlich färbt, sodass ein deutlicher Kontrast zu den gefärbten Zellkernen entsteht.

Das resultierende Färbebild ermöglicht eine differenzierte Darstellung der Gewearchitektur und ist für die morphologische Diagnostik von zentraler Bedeutung (Wick, 2019, S. 303–311).

Azan-Färbung

Die Azan-Färbung (Abbildung 3-B) dient der differenzierten Darstellung von Bindegewebsanteilen und beruht auf der Kombination der Farbstoffe Azokarmin, Anilinblau und Orange G. Zunächst werden die Zellkerne mit Azokarmin angefärbt. Durch eine partielle Entfärbung wird erreicht, dass insbesondere kollagene und retikuläre Fasern im Anschluss Anilinblau aufnehmen. Orange G wirkt als zusätzlicher Farbstoff, der vor allem funktionelles Gewebe kontrastiert. Das resultierende Färbemuster ist charakteristisch: Zellkerne, Erythrozyten und Fibrin erscheinen rot, kollagenes und retikuläres Bindegewebe blau, während Muskelgewebe je nach Fixierung rötlich bis orange dargestellt wird. Aufgrund dieser klaren Differenzierung eignet sich die Azan-Färbung besonders zur strukturellen Beurteilung des Bindegewebes und zur Abgrenzung zellulärer von extrazellulären Komponenten (Riedelsheimer & Büchl-Zimmermann, 2015, S. 217-218).

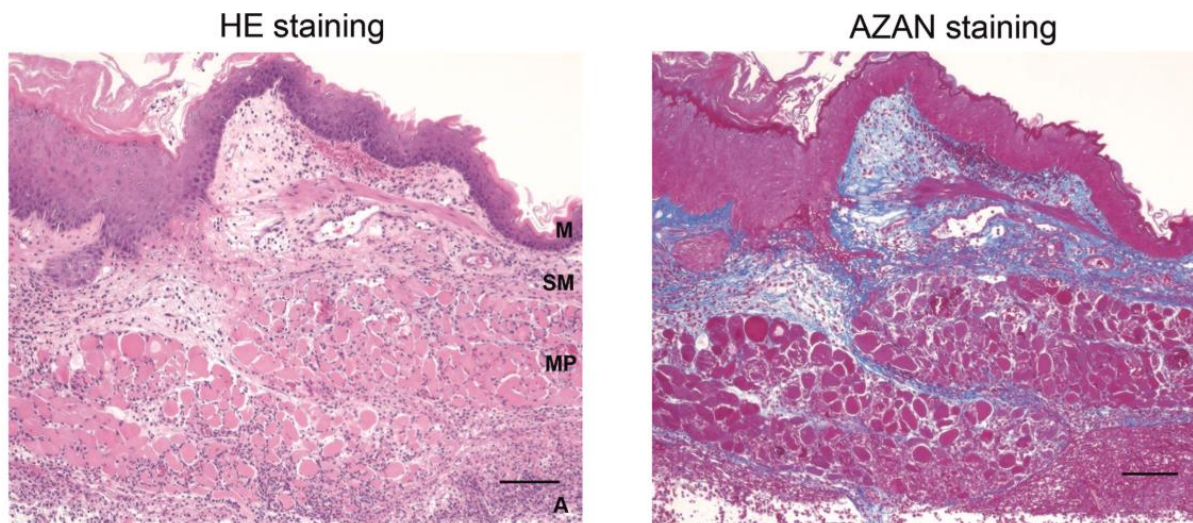


Abbildung 3: HE- und Azan-Färbung ösophagealer Anastomosen (Kurazumi et al.).

In der HE-Färbung erscheinen Zellkerne überwiegend blau-violett, während Zytosol und Muskelanteile überwiegend rosa bis rötlich dargestellt werden. In der Azan-Färbung wird vor allem kollagenes Bindegewebe blau angefärbt, wohingegen zell- und muskelreiche Strukturen eher rötlich erscheinen.

2.4 Blockflächen-Bildgebung

Die Blockflächen-Bildgebung (Block-Face Imaging, BFI) bezeichnet ein dreidimensionales Bildgebungsprinzip, bei dem während der seriellen Abtragung eines eingebetteten Probenblocks fortlaufend Bilder der jeweils neu freigelegten Blockoberfläche aufgenommen werden. Im Gegensatz zur klassischen Histologie erfolgt die Bildaufnahme nicht an separierten Dünnschnitten, sondern direkt an der stabilen Oberfläche des Blockes. Durch die wiederholte Abfolge von Schneiden und Erfassen entsteht eine intrinsisch registrierte Bildserie, die eine volumetrische Rekonstruktion ohne nachträgliche digitale Registrierung ermöglicht. Die räumliche Auflösung wird dabei durch die laterale Pixelgröße sowie die Schnittdicke zwischen zwei Aufnahmen bestimmt (Weninger & Geyer, 2008).

Eine Erweiterung dieses Grundprinzips stellt die Correlative Microscopy and Block-Face Imaging-Technologie (CoMBI) dar. Dabei werden zusätzlich zu den seriellen Blockflächenaufnahmen gezielt physische Schnitte entnommen und separat histologisch oder immunhistochemisch analysiert. Diese 2D-Daten können mit dem dreidimensionalen Blockdatensatz korreliert werden, wodurch strukturelle und molekulare Informationen kombiniert ausgewertet werden können (Ishii et al., 2021).

Eine elektronenmikroskopische Umsetzung des Blockflächenprinzips ist die Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM). Hierbei ist ein Ultramikrotom direkt in ein Rasterelektronenmikroskop integriert. Nach jedem Abtrag einer ultradünnen Schicht wird die frisch freigelegte Oberfläche rasterförmig mit einem Elektronenstrahl abgetastet und mittels Rückstreuelektronendetektion erfasst. Dadurch entstehen hochauflösende Datensätze, die eine dreidimensionale Rekonstruktion zellulärer und subzellulärer Strukturen ermöglichen (Denk & Horstmann, 2004).

Im lichtmikroskopischen Bereich wurden verschiedene Varianten des Blockflächenprinzips entwickelt. Eine hochauflösende Variante der episkopischen Mikroskopie ist die High-Resolution Episcopic Microscopy (HREM). Sie nutzt ein gefärbtes Einbettmedium zur Kontrasterzeugung und reduziert dadurch das Durchscheinen tieferliegender Strukturen. Das Verfahren erzeugt konsistente serielle Bilddatensätze, die für dreidimensionale morphologische Analysen geeignet sind (Weninger & Geyer, 2008).

Eine fluoreszenzbasierte Ausprägung des Prinzips stellt die Surface Imaging Microscopy (SIM) dar. In ein opakes Polymer eingebettete Proben werden seriell abgetragen und die jeweilige Blockoberfläche im Fluoreszenzmodus erfasst. Die Methode detektiert Fluoreszenzsignale aus der Blockoberfläche und kann sowohl exogene Fluoreszenzmarker als auch intrinsische Autofluoreszenz erfassen (Ewald et al., 2002).

Eine weitere Variante, die auf Fluoreszenz beruht, ist das Episcopic Fluorescence Image Capturing (EFIC). Hierbei werden eingebettete Proben seriell geschnitten und die Blockoberfläche im Fluoreszenzmodus aufgenommen. Der Kontrast entsteht durch die Detektion der Gewebeatofluoreszenz. (Weninger & Geyer, 2008).

2.4.1 Autofluoreszenz biologischer Gewebe als Bildsignal

Autofluoreszenz beschreibt die intrinsische Fluoreszenz biologischer Gewebe nach optischer Anregung, ohne dass exogene Fluorophore zugesetzt werden müssen. Sie entsteht durch natürlich vorkommende, endogene Moleküle, insbesondere solche mit π -konjugierten Bindungssystemen, wie sie in aromatischen oder planaren zyklischen Strukturen vorkommen (Jacob et al., 2024). Diese Moleküle absorbieren elektromagnetische Strahlung und emittieren anschließend Licht längerer Wellenlänge. Da zahlreiche metabolische und strukturelle Biomoleküle fluoreszieren, stellt die Autofluoreszenz ein überlagertes Signal dar, das sowohl biochemische als auch morphologische Eigenschaften des Gewebes widerspiegelt (Monici, 2005).

Die photophysikalische Grundlage der Autofluoreszenz lässt sich mithilfe des in Abbildung 4 dargestellten Jablonski-Diagramms beschreiben. Nach Absorption eines Photons der Wellenlänge λ_{ex} erfolgt der Übergang eines Elektrons vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 . Dieser Übergang ist mit einer Energieaufnahme E_{ex} verbunden. Innerhalb des angeregten Zustands kommt es zunächst zu einer schnellen, nicht-strahlenden Vibrationsrelaxation. Dabei wird ein Teil der aufgenommenen Energie als Wärme an die molekulare Umgebung abgegeben. Anschließend erfolgt der Übergang zurück in den Grundzustand unter Emission eines Photons der Wellenlänge λ_{em} . Aufgrund des vorangegangenen Energieverlusts besitzt das emittierte Photon eine geringere Energie ($E_{em} < E_{ex}$) und damit eine größere Wellenlänge ($\lambda_{em} > \lambda_{ex}$). Diese Differenz wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet (Monici, 2005).

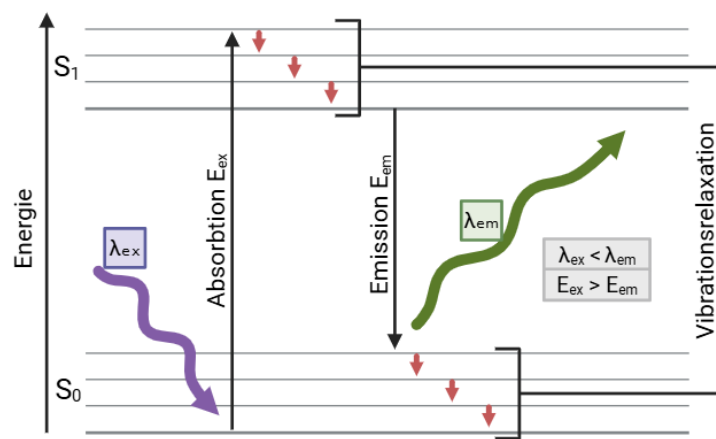


Abbildung 4: Jablonski-Diagramm zur Darstellung der Autofluoreszenz.

Nach Absorption eines Photons der Wellenlänge λ_{ex} (hohe Energie, E_{ex}) erfolgt der Übergang vom elektronischen Grundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_1 . Innerhalb von S_1 tritt eine nicht-strahlende Vibrationsrelaxation (Wärmeabgabe) auf, bevor der Übergang in S_0 unter Emission eines Photons der Wellenlänge λ_{em} erfolgt. Aufgrund des vorherigen Energieverlusts gilt $E_{ex} > E_{em}$ bzw. $\lambda_{em} > \lambda_{ex}$ (Stokes-Verschiebung). Eigene Darstellung (erstellt mit BioRender)

Zu den zentralen Fluorophoren zählen metabolisch aktive Koenzyme wie NAD(P)H und Flavine sowie Strukturproteine der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagen und Elastin. Während NAD(P)H und Flavine vor allem Informationen über den zellulären Energiestoffwechsel liefern, prägen Kollagen und Elastin maßgeblich das Autofluoreszenzsignal bindegewebiger Strukturen. Eine Übersicht dieser und weiterer Beispiele ist in Tabelle 1 dargestellt (Croce & Bottioli, 2014, S. 320-337).

Tabelle 1: Endogene Fluorophore mit typischen Anregungs- und Emissionsbereichen sowie biologischer Zuordnung (Croce & Bottioli, 2014, S. 320-337; Jones, 2023)

Fluorophor	Anregung (nm)	Emission nm)	Ort / histologisch relevante Lokalisation
Kollagen / Elastin	330–340 / 350–420	400–410 / 420–510	Extrazelluläre Matrix, Bindegewebe, Dermis, Gefäßwände
NAD(P)H	330–380	440/462	Zytoplasma nahezu aller lebenden Zellen
Flavine	350–370 / 440–450	480–540	Vor allem Mitochondrien stoffwechselaktiver Zellen
Protoporphyrin	405	630–700	Hämhaltige Proteinstrukturen
Lipopigmente	UV, 400–500	480–700	Alters- oder stoffwechselassoziierte Pigmentablagerungen im Zytoplasma

Die Intensität und spektrale Zusammensetzung der Autofluoreszenz hängen von der Gewebeart, der strukturellen Organisation sowie vom molekularen und funktionellen Zustand des Gewebes ab. Veränderungen in Stoffwechselaktivität, Gewebearchitektur oder molekularer Zusammensetzung führen zu messbaren Unterschieden in Signalstärke und -verteilung. Autofluoreszenzbasierte Bildgebung kann daher Informationen über morphologische und funktionelle Eigenschaften von Zellen und Geweben liefern (Monici, 2005).

Da Autofluoreszenz markerfrei erfasst werden kann und keine Fixierung oder Färbung voraussetzt, eignet sie sich insbesondere für bildgebende Verfahren, bei denen eine reproduzierbare, serielle Datenerfassung erforderlich ist. In episkopischen Bildgebungsverfahren kann Autofluoreszenz somit als intrinsisches Kontrastsignal genutzt werden, um Gewebestrukturen sichtbar zu machen und räumlich konsistente Bilddaten über das Probenvolumen hinweg zu erzeugen. Dies ist besonders für serielle Blockflächenaufnahmen relevant, da der Kontrast ohne wiederholte Färbeschritte zwischen den Schnitten stabil bleibt (Weninger & Geyer, 2008).

2.4.2 Unterdrückung der Fluoreszenzsignale mit Sudan IV

Zur Reduktion unerwünschter Tiefensignale kann das Einbettmedium mit lichtabsorbierenden Substanzen versetzt werden, um die optische Transparenz zu verringern. Durch die erhöhte Absorption im sichtbaren Spektralbereich wird die Detektion von Fluoreszenzanteilen aus tieferliegenden Schichten begrenzt und die Signalentstehung stärker auf die aktuelle Blockoberfläche fokussiert (Rosenthal et al., 2004).

Sudan IV ist ein fettlöslicher Bisazofarbstoff mit der Summenformel $C_{24}H_{20}N_4O$ (Abbildung 5) und einer molaren Masse von 380,44 g/mol. Das Molekül enthält zwei Azobrücken (-N=N-), über die aromatische Ringsysteme miteinander verbunden sind. Diese ausgedehnte konjugierte π -Elektronenstruktur ist verantwortlich für die intensive Farbe des Farbstoffs (RÖMPP, 2018).

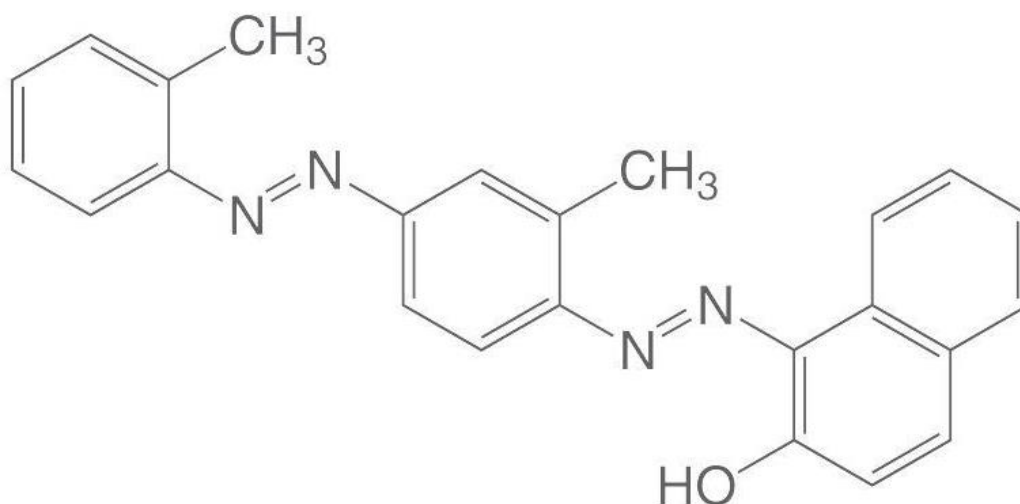


Abbildung 5: Strukturformel von Sudan IV (Carl ROTH GmbH).

In fester Form liegt Sudan IV als rotbrauner bis schwarzroter kristalliner Feststoff vor, während er in Lösung einen scharlachroten Farbton zeigt. Der Farbstoff löst sich schlecht in Wasser,

jedoch gut in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Chloroform oder Benzol sowie in Ölen, Wachsen als Lipidfarbstoff in der Histologie (RÖMPP, 2018).

Historisch wird Sudan IV primär in der Histochemie zur Darstellung neutraler Lipide und Triglyceride eingesetzt. Besonders geeignet ist der Farbstoff für Gefrierschnittpräparate, da Lipide während der Paraffineinbettung weitgehend extrahiert werden und somit in klassischen Paraffinschnitten oft nicht mehr nachweisbar sind. Unter spezifischen Bedingungen kann jedoch auch in Paraffinschnitten eine Anfärbung proteingebundener Lipidanteile erfolgen. Darüber hinaus besitzt Sudan IV technische Bedeutung als Industriefarbstoff, beispielsweise zur Einfärbung von Ölen, Wachsen, Kunststoffen und Kraftstoffen (NCBI, 2025).

Neben seinen färbetechnischen Anwendungen ist Sudan IV auch toxikologisch relevant. Als Vertreter der Azofarbstoffe kann er im Organismus zu aromatischen Aminen metabolisiert werden. Diese Metabolite stehen im Verdacht, leberschädigende und nierenschädigende Effekte zu verursachen. Aufgrund dieses Risikopotenzials ist der Einsatz von Sudan-Farbstoffen im Lebensmittelbereich international untersagt (Li et al., 2017).

Zusammenfassend ist Sudan IV als lipophiler Farbstoff grundsätzlich zur Reduktion des optischen Durchscheinens in der Blockflächen-Bildgebung geeignet, dennoch zeigen bisherige paraffineingebettete, Sudan-IV-gefärbte Präparate weiterhin Inhomogenitäten innerhalb des Einbettmediums. Die Anwendung in paraffinbasierten Einbettungen wurde in einer vorangegangenen Arbeit innerhalb derselben Arbeitsgruppe (Klinische Biophotonik der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde) experimentell untersucht, wobei sich insbesondere hinsichtlich der Homogenität der Farbstoffverteilung und der reproduzierbaren Kontrastierung weiterer Optimierungsbedarf zeigte (Sterzel, 2025).

3 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

3.1 Chemikalien und Farbstoffe

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (Tabelle 2) und Farbstoffe (Tabelle 3) sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 2: Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller	Ort	Art. Nr.
2-Propanol	≥99,5 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	CP41.3
Ethanol	≥99,8 %, vergällt	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	K928.3
Xylol	≥97 %,	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	9713.3
ParaplastPlus		Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	X881.1
Stearinsäure	≥98 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	9459.1
Entellan		Sigma Aldrich	St. Louis	1.07961.0100
Phosphorwolframsäure		Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	2635.2
Anilin		Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	9846.1
Essigsäure	100 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	3738.1
Formaldehyd	4 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	P087.5

Zusätzlich wurde explorativ Bienenwachs verwendet, das von einem Imker zur Verfügung gestellt wurde.

Tabelle 3: Farbstoffe.

Farbstoff	Hersteller	Ort	Art. Nr.
Sudan-IV	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	S4261-25G
AzokarminG	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	A1091-10G
Orange G	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	0318.3
Anilinblau	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	4002.2
Eosin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	HT110132-1L
Hämalaunlösung nach Meyer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	T865.1

3.2 Laborbedarf

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Laborbedarf

Material	Hersteller	Ort	Art. Nr.
Faltenfilter Porengröße (13 μm)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	CA17.1
Rollrandgläser	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland	X655.1
Cover slips Approx. 100, 24 x 60 mm	epredia	Portsmouth, USA	24X60-1-002G

3.3 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 aufgeführt. Der für die makroskopische Bildgebung verwendete Aufbau ist in Tabelle 6 dargestellt. Die zugehörigen Anregungs- und Emissionsfilter sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 5: Geräte

Gerät	Modell/Typ	Hersteller	Ort
Schüttler	RS-RS 5	Phönix Instrument	Garbsen, Deutschland
Ultraschallgerät	USC200T	VWR Collection	Leuven, Belgien
Thermometer	LT-102	TFA Dostmann GmbH	Wertheim-Reicholzheim, Deutschland
Umluftofen	UN30	Memmert GmbH	Schwabach, Deutschland
NanoZoomer-SQ Digital Slide Scanner	C13140-01	Hamamatsu Photonics	Shizuoka, Japan
Feinwaage	Adv. Pro AV264C	Ohaus	Nänikon, Schweiz
Episkop-Gerät	Aufbau in Tabelle 6 aufgeführt, in Abschnitt 4.4 näher beschrieben.		

Tabelle 6: Makrofotografieaufbau

Komponente	Bezeichnung / Modell	Technische Daten	Hersteller (Ort, Land)
CMOS-Kamera	QHY600U3G20M (monochrom)	61 MP, auf 2°C gekühlt	Light Speed Vision, Beijing, China
Kamera-Sensor	IMX455 (Back-Illuminated CMOS)	36 × 24 mm, 3,76 μm Pixelgröße	Sony Corporation, Japan
Objektiv	SAPPHIRE 0.09/1.143x V70 (ehem. Xenon-Sapphire 2.8/98)	f = 98 mm, f/2,8, NA = 0,08, M = 1,143×	Schneider Optische Werke GmbH, Bad Kreuznach, Deutschland
LED-Lichtquelle (LED _{ex})	pE-4000	15 Wellenlängen	CoolLED Ltd., Andover, UK
Kondensorlinse	ACL12708U-A	Ø 12,7 mm; f = 8,0 mm	Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA
Emissionsfilterrad	QHYCFW3M-SR	5 × 2" mounted / 50 mm unmounted	Light Speed Vision, Beijing, China

Komponente	Bezeichnung / Modell	Technische Daten	Hersteller (Ort, Land)
LED-Modul (LED _{Ring})	NeoPixelRing-24x5050-RGB-LED	24 LEDs	Adafruit Industries, New York, USA
Lineartisch	L-511.60SD00	155 mm Verstellbereich, 0,2 µm Schrittweite	Physik Instrumente (PI) SE & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Motorcontroller	Mercury Motor Controller	-	Physik Instrumente (PI) SE & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotationsmikrotom	HistoCore NANO-CUT R	0,25 bis 50 µm Schnittdicke, 24 mm Vorschub-	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Schmalband-Einwegklingen	DB80LX	-	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
XY-Translation	LX20/M	25 mm Verschiebung	Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA
Anregungs- / Emissionsfilter	Die Anregungsfilter sind in Tabelle 7 und Emissionsfilter in Tabelle 8 näher aufgeführt.		

Tabelle 7: Anregungsfilter, Herstellername (AHF Analysetechnik Bestellnummer)

Filter	Bezeichnung	Mittenwellenlänge	Bandbreite
A	BrightLine HC 377/50 (F39-377)	377 nm	50 nm
B	BrightLine HC 470/20 (F39-470)	470 nm	20 nm
C	BrightLine HC 555/18 (F39-553)	555 nm	18 nm

Tabelle 8: Emissionsfilter, Herstellername (AHF Analysetechnik Bestellnummer)

Filter	Bezeichnung	Mittenwellenlänge	Bandbreite
1	434/32 ET Bandpass (F47-434)	434 nm	32 nm
2	475/42 BrightLine HC (F39-476)	475 nm	42 nm
3	535/70 ET Bandpass (F47-539)	535 nm	70 nm
4	650/100 ET Bandpass (F47-651)	650 nm	100 nm

3.4 Probenmaterial

Insgesamt wurden vier Lymphknoten (LK) von vier Patienten untersucht. Durch Zerteilung der Lymphknoten mit einem Skalpell wurden daraus insgesamt sechs Einzelproben gewonnen.

4 Methodik

In den folgenden Abschnitten werden die Herstellung und Variation paraffinbasierter Sudan-IV-Gemische, die standardisierte Probenpräparation und -einbettung sowie die episkopische Mehrkanalbilddaufnahme unter definierten Anregungs- und Emissionsfilterkonfigurationen beschrieben. Anschließend wird die softwaregestützte Auswertung der Bilddaten erläutert.

4.1 Probenmaterial

In diesem Abschnitt werden die Gewinnung der Proben sowie die nachfolgenden Schritte ihrer histologischen Aufbereitung, einschließlich Fixierung und Einbettung, beschrieben.

4.1.1 Probengewinnung und Fixierung

Voraussetzung für die Verwendung der Lymphknotenproben war die Genehmigung durch die zuständige Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Jena. Zusätzlich war vor dem operativen Eingriff die schriftliche Einwilligung der jeweiligen Patientinnen und Patienten erforderlich, dass das entnommene Gewebe für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden darf.

Die Entnahme der Lymphknoten erfolgte nicht als separater chirurgischer Eingriff, sondern im Rahmen regulärer Operationen, beispielsweise bei Tumorsektionen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich. Lymphknoten wurden dabei ausschließlich dann entnommen, wenn sie intraoperativ zugänglich waren, eine gezielte Präparation oder systematische Suche nach Lymphknoten wurde nicht durchgeführt.

Unmittelbar nach der operativen Entnahme wurden die Lymphknoten in 10 % neutral gepuffertem Formalin fixiert und anschließend bei Kühlschranktemperatur gelagert. Die Dauer bis zur weiteren Verarbeitung variierte dabei erheblich und reichte von wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen.

4.2 Herstellung der Einbettungsgemische

4.2.1 Verwendete Komponenten

Für die Einbettungsversuche wurden Gemische aus Paraffin, Stearinsäure und Sudan IV hergestellt. Stearinsäure wurde aufgrund günstigerer Homogenitätseigenschaften gewählt, die in einer vorausgegangenen Arbeit beschrieben wurden (Sterzel, 2025). In ausgewählten Varianten wurde Xylol zugesetzt, um Sudan IV vorzulösen. Zusätzlich wurde Bienenwachs explorativ als alternative Matrix geprüft, dieses wurde von einem Imker zur Verfügung gestellt. Alle synthetischen Komponenten, bis auf Bienenwachs, wurden als kommerzielle Chemikalien definierter analytischer Reinheit verwendet.

4.2.2 Allgemeines Herstellungsprotokoll paraffinhaltiger Gemische

Die Komponenten wurden in einem hitzebeständigen Gefäß in einem temperierten Wasserbad bei 60-70 °C geschmolzen und unter Magnetrühren homogenisiert. Die eingesetzten Stoffmengen wurden zuvor mithilfe einer Feinwaage bestimmt. Xylol wurde volumetrisch erfasst

und unter Berücksichtigung der Dichte in die entsprechende Masse umgerechnet. In xylolhaltigen Gemischen wurde Sudan IV zunächst in Xylol vorgelöst. Aufgrund der Flüchtigkeit und gesundheitsschädlichen Dämpfe von Xylol wurden diese Arbeitsschritte unter dem Abzug durchgeführt. Anschließend wurden Stearinsäure und Paraffin unter Erwärmung zugegeben. Bei xylolfreien Ansätzen war keine feste Zugabereihenfolge erforderlich. Nach vollständiger Aufschmelzung wurde das Gemisch weitere 5-10 Minuten gerührt.

Anschließend erfolgte eine Heißfiltration über einen Faltenfilter in einem auf 65 °C vorgeheizten Ofen, um ungelöste Partikel zu entfernen und ein vorzeitiges Erstarren zu vermeiden. Die filtrierten Gemische wurden bis zur Verwendung temperiert gelagert. Xylolhaltige Gemische wurden dabei luftdicht verschlossen, um Verdunstungsverluste zu minimieren. Der Zusatz von Xylol diente der Prüfung, ob die Vorlösung von Sudan IV die Homogenität der Einbettungsmische beeinflusst.

Zur Identifikation wurden alle Gemische nach einem systematischen Schema benannt, das die verwendeten Komponenten und deren Massenanteile in Prozent enthält (z. B. P906_St5_X4_SIV04 für 90,6 % Paraffin, 5 % Stearinsäure, 4 % Xylol und 0,4 % Sudan IV). Die Codierung gewährleistete eine konsistente Zuordnung in Tabellen, Dateinamen und Auswerteskripten. Eine vollständige Liste aller Gemische ist in Tabelle 16 im Anhang (Blatt 1) aufgeführt.

4.2.3 Abkühl- und Erstarrungsvarianten der Einbettungen

Die Erstarrung der Paraffingemische erfolgte unter definierten Abkühlbedingungen (Tabelle 9), um den Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit auf die Mikrostruktur systematisch zu untersuchen.

Tabelle 9: Abkühlvarianten

Abkürzung	Umgebung	Temperatur	Besonderheit
O	Ofenabkühlung	65 °C	langsamste Abkühlung
RT	Raumtemperatur	23 °C	moderate Abkühlgeschwindigkeit
K	Kühlschrank	5 °C	erhöhte Abkühlgeschwindigkeit
GS	Gefrierschrank	-23 °C	hohe Abkühlgeschwindigkeit
RT2	Raumtemperatur	23 °C	Mechanische Bewegung durch kontinuierliches Schwenken während Erstarrung
GS2	Gefrierschrank	-23 °C	zusätzlicher initialer Wärmeentzug durch Eisblock

Die genannten Abkürzungen werden im Folgenden konsistent zur Kennzeichnung der jeweiligen Abkühlvarianten verwendet.

4.3 Entwässerung und Einbettung

Proben mit größerem Volumen wurden vor der Entwässerung mit einem sterilen Skalpell in mehrere Teilstücke zerteilt, um mehrere unabhängige Einbettungen und damit vergleichbare Untersuchungsproben zu generieren.

Vor der Einbettung wurden die Gewebeproben 1 h unter fließendem Wasser gespült und anschließend über eine aufsteigende Isopropanolreihe entwässert (60 % für 1,5 h, 90 % für 1,5 h, 100 % für 1,5 h, 2x 100% für je 1 h). Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 65 °C in dem jeweiligen paraffinbasierten Gemisch sowie am Folgetag eine zweite Inkubation für 2,5 h in frischem Gemisch bei gleicher Temperatur. Die Einbettung wurde anschließend in vorgewärmten Metallkassetten durchgeführt und die Proben in die definierte Abkühlumgebung überführt.

4.4 Optisches System und Bildaufnahme

Das Makrofotografie-Setup (Abbildung 6) (Leibniz-IPHT Jena) besteht aus einem Rotationsmikrotom mit Halterung für Einbettkassetten (1), einem Beleuchtungsstrahlengang zur Anregung der Fluoreszenz (2), einem LED-Ringlicht für die Weitfeld-Auflichtbeleuchtung (3) sowie einem fokussierbaren Kamerasystem (5) mit Fluoreszenzfilterrad (4). Der Beleuchtungsstrahlengang besteht aus einer flüssigkeitsfasergekoppelten 15-Kanal-LED-Lichtquelle (exLED), Anregungsfiltern, einer Kondensorlinse und einem Umlenkspiegel zur pseudokoaxialen Beleuchtung. Der Aufbau wird mit einer am Leibniz-IPHT entwickelten Software gesteuert. Mit dieser lassen sich Sequenzen für die automatische Bildaufnahme programmieren. Von jedem Schnitt werden lineare 16-Bit-TIFF-Dateien mit einer Seite pro Anregungs- und Emissionsfilterkonfiguration aufgezeichnet. Zur Minimierung von Störsignalen erfolgte die Bildaufnahme unter weitgehend abgedunkelten Umgebungsbedingungen.



Abbildung 6: Makrofotografieaufbau

(1) Rotationsmikrotom mit integrierter Probenhalterung, (2) Mehrkanalige LED-Lichtquelle (ex-LED) mit integrierten Anregungsfiltern, (3) RingLED für die Weitfeld-Auflichtbeleuchtung (4) motorisiertes Filterrad mit Emissionsfiltern, (5) Kamerasystem. Das System ermöglicht die serielle Blockflächenaufnahme unter definierten spektralen Bedingungen.

Das von der Anregungs-LED (ex-LED) emittierte Licht wurde spektral gefiltert und in den optischen Aufbau eingekoppelt, mithilfe einer asphärischen Kondensorlinse geformt und über einen Umlenkspiegel auf die Probenoberfläche gelenkt, die Autofluoreszenz im Gewebe anregt.

Emittiertes Fluoreszenzlicht von der Probe wird durch Emissionsfilter selektiert, die im motorisierten Filterrad zwischen Probe und Objektiv positioniert sind. Diese Filter blockieren das Anregungslicht und lassen ausschließlich den gewünschten Emissionswellenlängenbereich zur Kamera passieren. Die Abbildung erfolgt über ein Objektiv mit fester Vergrößerung auf den Sensor einer monochromen CMOS-Kamera mit 16-Bit-Grauwerttiefe. Die resultierenden TIFF-Dateien enthalten neben den Bilddaten auch Metadaten zu den jeweiligen Aufnahmeparametern. Nach Abschluss einer Aufnahme wird automatisch die jeweils folgende vordefinierte Aufnahmeconfiguration angewendet. Der optische Strahlengang bleibt dabei weitgehend unverändert, lediglich für einen Filter war aufgrund eines abweichenden Fokusdeltas (Tabelle 8) eine geringfügige Anpassung der Positionierung erforderlich. Angepasst wurden ansonsten ausschließlich die aufnahmespezifischen Parameter wie aktive Lichtquelle, Anregungs- und Emissionsfilter, Lichtintensität und Belichtungszeit. Für jede Probenebene wurden auf diese Weise mehrere Aufnahmen unter unterschiedlichen spektralen Bedingungen erstellt.

4.4.1 Filterkonfiguration

In diesem Abschnitt wird die für die Anregung und Detektion der Autofluoreszenz verwendete Filterkonfiguration beschrieben. Abbildung 7 zeigt die spektralen Verteilungen der verfügbaren Anregungs-LEDs zusammen mit den benutzten Anregungsfiltern (A, B und C).

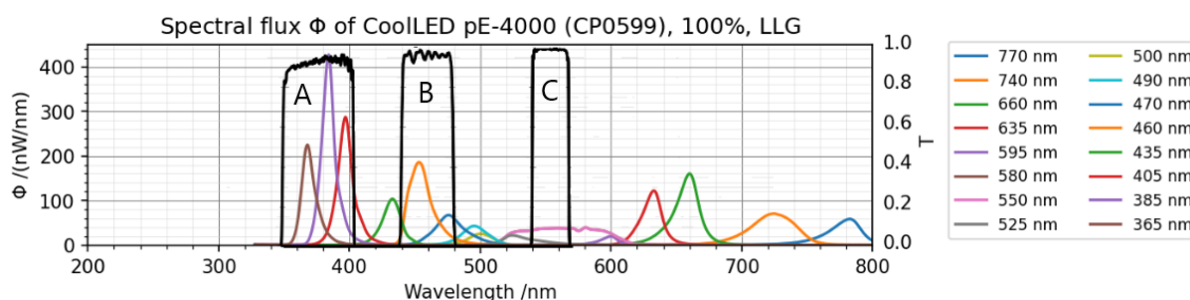


Abbildung 7: Anregungs-LEDs und -filter.

Dargestellt sind die spektralen Verteilungen der verwendeten Anregungs-LEDs (farbige Kurven, linke y-Achse in nW/nm) sowie die wellenlängenabhängige, dimensionslose Transmission T der Anregungsfilter A, B und C (Tabelle 7, schwarze Balken, rechte y-Achse als Transmissionsgrad von 0 bis 1). Für jede Aufnahme wurde ausschließlich eine LED mit dem zugehörigen Anregungsfilter verwendet.

Zur spektralen Einordnung der gewählten Anregungsfilter sind in Abbildung 8 die Anregungsspektren ausgewählter endogener Fluorophore dargestellt. Die dargestellten Spektraldaten decken den Wellenlängenbereich von Anregungsfilter C nicht ab.

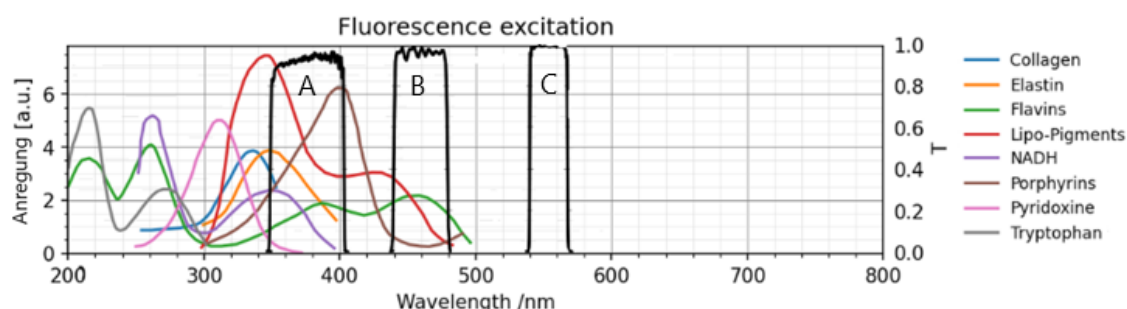


Abbildung 8: Anregungswellenlängen und -filter

Dargestellt sind die Anregungsspektren ausgewählter endogener Fluorophore (farbige Kurven, linke y-Achse) sowie die wellenlängenabhängige, dimensionslose Transmission T der Anregungsfilter (Tabelle 7) A, B und C (schwarze Balken, rechte y-Achse als Transmissionsgrad von 0 bis 1). Die dargestellten Spektraldaten umfassen nicht den Wellenlängenbereich von Anregungsfilter C.

In einer vorangegangenen Untersuchung wurde zur Detektion der Fluoreszenzemission ausschließlich der Emissionsfilter 475/42 nm (F39-476) verwendet (Sterzel). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Filter als Emissionsfilter 2 beibehalten und die Konfiguration um die Emissionsfilter 1, 3 und 4 erweitert. Abbildung 9 zeigt die Emissionsspektren ausgewählter endogener Fluorophore in Überlagerung mit den verwendeten Emissionsfiltern (1-4). Zusätzlich ist das Emissionsspektrum von Sudan IV dargestellt. Dieses weist im Bereich der Emissionsfilter 1 und 2 lokale Maxima und im Durchlassbereich von Emissionsfilter 4 ein deutlich stärker ausgeprägtes Maximum auf.

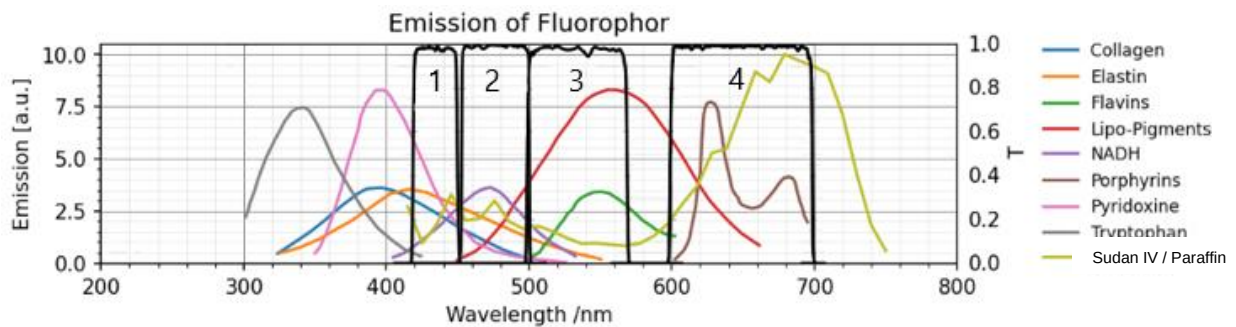


Abbildung 9: Emissionswellenlängen und -filter

Dargestellt sind die Emissionsspektren ausgewählter endogener Fluorophore und von Sudan IV (farbige Kurven, linke y-Achse) sowie die wellenlängenabhängige, dimensionslose Transmission T der Emissionsfilter 1 bis 4 (schwarze Balken, rechte y-Achse als Transmissionsgrad von 0 bis 1). Das Emissionsspektrum von Sudan IV weist im Bereich der Emissionsfilter 1 und 2 lokale Maxima und im Durchlassbereich von Emissionsfilter 4 ein deutlich stärker ausgeprägtes Emissionsmaximum auf.

Die beschriebene Anregungs- und Emissionsfilterkonfiguration bildete die Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Parametersätze. Auf Basis der spektralen Zuordnung von LEDs, Filtern und relevanten Fluorophoren wurden die einzelnen Parameterkombinationen für die Aufnahmen festgelegt.

4.4.2 Parametersätze zur Bildaufnahme

Auf Grundlage der beschriebenen Filterkonfiguration wurden zwei Parametersätze für die Bildaufnahme definiert. Einer wurde zur Untersuchung von Gewebeeinbettungen verwendet (PS1), ein weiterer diente der Strukturanalyse paraffinbasierter Einbettungen (PS2). Beide wurden während der Durchführung unverändert angewendet. Neben den Autofluoreszenzaufnahmen wurden zusätzlich Übersichtsaufnahmen mit der RGB-Ring-LED ohne Anregungs- und Emissionsfilter angefertigt.

Die Auswahl der Parameterkombinationen erfolgt anhand der spektralen Trennung von Anregungs- und Emissionsbereich. Kombinationen mit spektraler Überlappung sowie Kombinationen mit Anregungswellenlängen oberhalb des jeweiligen Emissionsbereichs wurden ausgeschlossen. Der für die Untersuchung von Gewebeeinbettungen verwendete Parametersatz ist in Tabelle 10 dargestellt. Die Belichtungszeit wurde für jede Gewebeeinbettung so angepasst, dass eine ausreichende Belichtung ohne Über- oder Unterbelichtung gewährleistet war.

Tabelle 10: Optische Aufnahmeparameter (PS1) für Gewebeeinbettungen

Kanal	Quelle	LED (nm)	Intensität	Anregungsfilter	Emissionsfilter	Fokus- Δ
1	RingLED	Rot	130	-	-	0
2	RingLED	Grün	118	-	-	0
3	RingLED	Blau	70	-	-	0
4	exLED	365	100	A	1	-0,65
5	exLED	365	100	A	2	-1,30
6	exLED	365	100	A	3	-0,40
7	exLED	460	100	B	3	-0,40
8	exLED	365	100	A	4	-0,40
9	exLED	460	100	B	4	-0,40
10	exLED	550	100	C	4	-0,40

Zusätzlich wurde ein weiterer Parametersatz für Strukturanalysen an paraffinbasierten Einbettungen ohne Gewebe definiert, der in Tabelle 11 dargestellt ist. Neben den bereits beschriebenen Übersichtsaufnahmen wurde dabei eine zusätzliche Aufnahme im blauen Kanal mit verlängerter Belichtungszeit durchgeführt, um Artefakte visuell besser darstellbar zu machen. Ergänzend erfolgten zwei Autofluoreszenzaufnahmen mit den Emissionsfiltern 1 und 4. Die Belichtungszeit wurde innerhalb der übrigen Aufnahmen konstant gehalten.

Tabelle 11: Optische Aufnahmeparameter (PS2) zur Strukturanalyse paraffinbasierter Einbettungen.

Kanal	Quelle	Aktiver Kanal	Intensität	Belichtungszeit (ms)	Emissionsfilter	Fokus- Δ
1	RingLED	Rot	130	250	-	0
2	RingLED	Grün	118	250	-	0
3	RingLED	Blau	70	250	-	0
4	exLED	365 nm	100	10000	1	-0,65
5	exLED	365 nm	100	6000	4	-0,4
6	RingLED	Blau	100	500	-	0

Die in den Tabellen dargestellten Parametersätze wurden anschließend für die serielle Bildaufnahme der Proben eingesetzt.

4.4.3 Ablauf der seriellen Bildaufnahme

Die Bildaufnahme erfolgte seriell auf Basis der definierten Parametersätze. Für jede freigelegte Schnittebene wurde der vollständige Parametersatz abgearbeitet, mehrere Seiten pro Schnittebene entstanden.

Anschließend wurde mit einem Rotationsmikrotom eine definierte Materialschicht abgetragen und eine neue Probenebene freigelegt.

Dieser Ablauf aus Schnitterstellung und erneuter Bildaufnahme wurde für alle Schnittebenen wiederholt.

4.5 Bildverarbeitung und Datenauswertung

Die im Rahmen der Strukturanalyse aufgenommenen Bilddaten wurden anschließend weiterverarbeitet und ausgewertet. Die Quellcodes der selbst erstellten Programme sind im digitalen Anhang zusammen mit Beispieldateien und einer kurzen Anleitung verfügbar.

4.5.1 Datengenerierung

Die Vorverarbeitung der Bilddaten erfolgt mithilfe eines selbst entwickelten ImageJ-Makros. Für jede Probe liegt eine mehrseitige TIFF-Datei mit Aufnahmen unter unterschiedlichen spektralen Bedingungen vor. Pro Probe wird eine quadratische Region of Interest (ROI) mit einer festen Größe von 500×500 Pixel definiert und auf alle zugehörigen Seiten angewendet. In Einzelfällen wird die Position des ROI angepasst, um Störartefakte auszuschließen, die ROI-Größe bleibt dabei unverändert. Die 16-Bit-Grauwertwerte innerhalb des ROI werden seitenweise extrahiert und als *.csv-Dateien gespeichert. Zusätzlich werden die konkreten ROI-Daten gesondert abgespeichert. Für jede Seite wird außerdem eine PNG-Datei mit markiertem ROI-Bereich erzeugt, um die gewählte Auswertungsregion visuell zu dokumentieren und die Nachvollziehbarkeit der Analyse zu gewährleisten. Die verwendeten Makros sind im digitalen Anhang (A_Programme_Makros/Datengenerierung) dokumentiert.

Die standardisierte Speicherung der erzeugten Daten ermöglichte deren anschließende Weiterverarbeitung.

4.5.2 Datenverarbeitung

Die statistische Auswertung der aus dem ImageJ-Makro generierten 16-Bit-Pixelwertdatensätze erfolgt mithilfe eines selbst entwickelten Python-Programms. Grundlage bilden die aus den definierten ROI extrahierten und als CSV-Dateien gespeicherten Pixelwerte. Für jede Grauwertverteilung innerhalb eines ROI werden der Median, der Interquartilsabstand sowie die Whiskergrenzen nach Tukey berechnet und grafisch dargestellt (Abbildung 10). Die Berechnung der statistischen Kenngrößen erfolgte für alle Experimente nach identischem Verfahren. Die verwendeten Programme sind im Digitalen Anhang (A_Programme_Makros/Datenverarbeitung) dokumentiert.

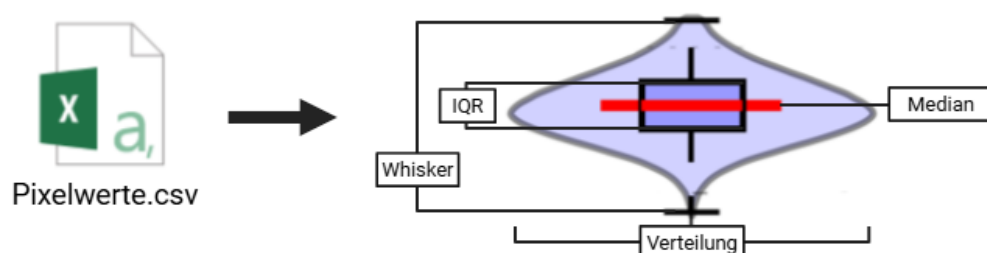


Abbildung 10: Schematische Darstellung der statistischen Auswertung der aus dem ROI exportierten CSV-Pixelwerte.

Der Boxplot zeigt Median, Interquartilsabstand und Whiskergrenzen. Der Violinplot ergänzt diese Darstellung um die Dichteverteilung der im ROI enthaltenen Pixelwerte.

Zur vergleichenden Beurteilung der Grauwertverteilungen wurden die aus dem ROI extrahierten Pixelwerte für alle Experimente nach demselben Auswertungsschema analysiert. Die verschiedenen Programme stehen im digitalen Anhang zur Verfügung

4.5.3 Kanalüberlagerung und 3D-Rekonstruktion

Zur Verarbeitung mehrkanaliger Bildstapel wurden bestehende Python-Skripte weiterentwickelt und angewendet. Die Anpassungen betrafen die Programmstruktur sowie die Implementierung einer grafischen Benutzeroberfläche zur benutzerfreundlicheren Durchführung der Kanalüberlagerung, nicht jedoch die zugrundeliegende Methodik. Für jeden Kanal wurden Intensitätshistogramme berechnet und daraus untere und obere Intensitätsgrenzen für die Darstellung festgelegt. Die Intensitäten wurden auf einen definierten Bereich normiert und anschließend additiv zu RGB-Darstellungen kombiniert. Das Prinzip der farblichen Zuordnung und additiven Überlagerung der Grauwertkanäle ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Für Weißlichtbilder erfolgte keine Intensitätsanpassung. Die überlagerten Bilder wurden als *.png-Dateien gespeichert. Das verwendete Programm ist im digitalen Anhang (*A_Programme_Makros/Kanalüberlagerung*) dokumentiert.

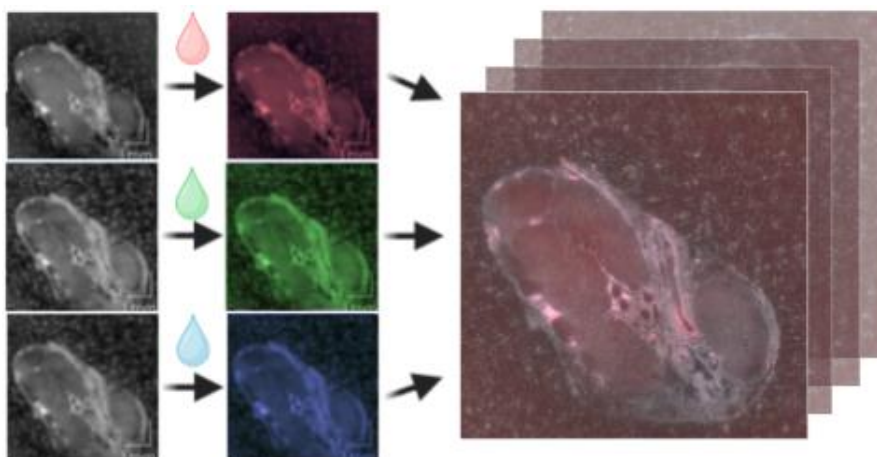


Abbildung 11: Schematische Darstellung der farblichen Zuordnung und additiven Überlagerung der Grauwertkanäle.

Für jeden Kanal werden anhand des Intensitätshistogramms untere und obere Intensitätsgrenzen für die Darstellung festgelegt und die Werte anschließend auf den definierten Bereich normiert.

Nach der Kanalüberlagerung der Einzelbilder konnten die resultierenden Bilddaten mit einem weiteren Python-Programm, das zur Verfügung gestellt und nicht weiter modifiziert wurde, zu einem Bildstapel zusammengeführt und 3D-rekonstruiert werden.

4.6 Experimentelle Untersuchungen

In den folgenden Versuchsabschnitten wurden ausgewählte Material-, Prozess- und Aufnahmeparameter systematisch variiert, um deren Einfluss auf Struktur, Bildcharakteristik und Gewebereinbettung zu untersuchen.

4.6.1 Variierte Inkubationsbedingungen (Ultraschall, Schwenken, Xylolmatrix)

Untersucht wurde der Einfluss zusätzlicher physikalischer Einwirkungen während der Inkubationsphase auf Sudan-IV-haltige Paraffingemische. Als Einbettungsmedium wurde das Gemisch P946_St5_SIV04 verwendet, das sich in vorangegangenen Untersuchungen bewährt hatte (Sterzel, 2025). Für jede Versuchsvariante wurde jeweils eine Lymphknotenprobe eingebettet. Präparation und Einbettung erfolgten gemäß Abschnitt 4.2.

Neben einer unbehandelten Referenzprobe wurden drei Variationen untersucht. Bei der Ultraschallvariante wurde die Probe während der zweiten Inkubationsphase für 15 min in ein auf ca. 70 °C temperiertes Ultraschallbad überführt und anschließend im Ofen weiter inkubiert. In der Variante mit mechanischer Bewegung wurde die Probe während der zweiten Inkubationsphase über einen Zeitraum von 2,5 h in Abständen von 10-20 min manuell geschwenkt. Für die dritte Variante wurde ein xylolhaltiges Gemisch (P906_St5_X4_SIV04) hergestellt.

Die Abkühlung erfolgte einheitlich bei Raumtemperatur. Die Bildaufnahme wurde mit dem Parametersatz zur Gewebeaufnahme (PS1) durchgeführt (Tabelle 10). Die RGB-Bilder wurden mit dem Programm zur Kanalüberlagerung (4.5.3) in ihre entsprechenden LED-Farben eingefärbt und überlagert.

4.6.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit auf die Mikrostruktur

Untersucht wurde der Einfluss unterschiedlicher Abkühlbedingungen auf die Struktur paraffinbasierter Gemische. Hierzu wurden sechs definierte Gemische untersucht: P100 und P95_St5 (ungefärbt) sowie P996_SIV04, P946_St5_SIV04, P956_X4_SIV04 und P906_St5_X4_SIV04 (gefärbt). Die Herstellung der Gemische erfolgte gemäß Abschnitt 4.2. Von jedem Gemisch wurden Einbettungen unter vier definierten Abkühlbedingungen (O, RT, K, GS; Abschnitt 4.2.3) hergestellt, sodass insgesamt 24 Proben entstanden, davon 16 gefärbte und 8 ungefärbte. Die Proben wurden unmittelbar nach dem Ausgießen in die jeweilige Abkühlumgebung überführt und dort bis zur vollständigen Erstarrung belassen. Anschließend erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur. In Einzelfällen traten bei der Ofenvariante technische Schwierigkeiten bei der Haftung der Einbettung in der Kassette auf, sodass betroffene Proben erneut hergestellt wurden.

Aus jeder Einbettung wurde ein Schnitt für die episkopische Untersuchung angefertigt. Die 16 gefärbten Proben wurden mit dem Parametersatz zur Paraffin-Strukturanalyse (PS2, Tabelle 11) aufgenommen. Zusätzlich wurde von allen 24 Proben jeweils ein Schnitt aufgefangen, auf einen Objektträger überführt und lichtmikroskopisch untersucht. Für jedes Gemisch wurden die vier Abkühlvarianten auf einem Objektträger zusammengeführt. Die Schnitttiefe variierte dabei zwischen 50 und 100 µm. Diese Schnitte wurden mit dem Scanner erfasst. Die Auswertung und Visualisierung der Bilddaten erfolgte gemäß Abschnitt 4.5

4.6.3 Einfluss der Gemischkomponenten bei konstanter Abkühlungsbedingung

Untersucht wurde der Einfluss veränderter Gemischzusammensetzungen auf die Struktur paraffinbasierter Einbettungen und deren Bildcharakteristika. Der Fokus lag auf der Variation des

Xylol- und Sudan-IV-Anteils sowie auf der explorativen Prüfung von Bienenwachs als alternativer Matrixkomponente. Als Ausgangsgemische dienten P906_St5_X4_SIV04 und P946_St5_SIV04. Zur Untersuchung eines erhöhten Xylolanteils wurde ein Gemisch mit verdoppeltem Xylolgehalt (P866_St5_X8_SIV04) hergestellt. Zur Variation der Farbstoffkonzentration wurden zwei Gemische mit erhöhtem Sudan-IV-Anteil gefertigt (P942_St5_SIV08 und P938_St5_SIV12).

Zusätzlich wurde Paraffin schrittweise durch Bienenwachs substituiert (10 %, 20 %, 50 % und 99,6 % Bienenwachs). Aufgrund der höheren Schmelztemperatur erfolgte die Verarbeitung dieser Gemische bei 70 °C.

Für alle Einbettungen wurde einheitlich die Abkühlvariante GS2 (Tabelle 9) verwendet. Die Untersuchung erfolgte mit dem Parametersatz zur Strukturanalyse (PS2, Tabelle 11). Die Schnitttiefe wurde dabei auf 50 µm eingestellt. Abweichend davon wurde die Probe P942_St5_SIV08 versehentlich in einer Tiefe von etwa 100 µm erfasst.

4.6.4 Tiefenabhängige Analyse der Homogenität

In diesem Abschnitt wurde die Homogenität paraffinbasierter Einbettungen in Abhängigkeit von der Schnitttiefe untersucht. Hierzu wurde das Gemisch P946_St5_SIV04 verwendet. Nach vollständiger Aushärtung erfolgte die serielle Schnittführung mit einem konstanten Abstand von 50 µm. Pro Ansatz wurden 50 Schnitte angefertigt, entsprechend einer Gesamttiefe von etwa 2500 µm. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Parametersatz zur Strukturanalyse PS2 (Tabelle 11). Die Auswertung wurde gemäß Abschnitt 4.5 durchgeführt.

Gefrierschrankabkühlung

Für diese Versuchsreihe wurden zwei Einbettungen in der Abkühlvariante GS2 hergestellt, bei der die Kassette im Gefrierschrank zusätzlich in Kontakt mit einem Eisblock stand. Ergänzend wurde eine Einbettung mit erhöhtem Sudan-IV-Anteil (1,2 %) untersucht.

Raumtemperatur mit mechanischer Bewegung

Ergänzend wurde der Einfluss kontinuierlicher mechanischer Bewegung während der Erstarrung bei Raumtemperatur analysiert. Dazu wurden die Einbettungen auf einem Schüttler (Phoenix Instrument RS-RS5) positioniert. Untersucht wurden Schwenkfrequenzen von 20, 40 und 80 Bewegungen pro Minute. Zusätzlich wurden zwei Referenzansätze ohne Bewegung hergestellt. Die Platzierung erfolgte jeweils mittig auf dem Schüttler. Die Schwenkbewegung wurde während der gesamten Abkühlphase, mindestens jedoch für eine Stunde, aufrechterhalten. Alle übrigen Bedingungen, einschließlich Zusammensetzung und Verarbeitungstemperatur, blieben unverändert.

4.7 Qualitative Kanalbewertung, Vergleichsfärbungen und 3D-Rekonstruktion

Zur qualitativen Beurteilung der aufgenommenen Autofluoreszenzsignale wurden die Bilddaten mithilfe des in Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Programms zur Kanalüberlagerung verarbeitet. Dabei wurden die verschiedenen Kanäle hinsichtlich ihrer Darstellbarkeit relevanter Gewebestrukturen qualitativ bewertet und geeignete Kanäle überlagert dargestellt.

Ergänzend wurden zur qualitativen Einordnung klassische histologische Vergleichsfärbungen (Hämatoxylin-Eosin und Azan) an 5 µm dicken Schnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden während der seriellen Bildaufnahme entnommen, sodass eine Zuordnung zu korrespondierenden Schnitttiefen der episkopischen Datensätze möglich war. Die Färbungen erfolgten gemäß standardisierten Laborprotokollen (Anhang Blatt 2-4). Die gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht und digital erfasst.

Zusätzlich wurde ein weiterer ungenutzter Lymphknoten seriell untersucht. Die Schnittabnahme erfolgte in Abständen von 3 µm unter Verwendung des Parametersatzes für die Gewebereinbettung (PS1, Tabelle 10). Anschließend wurden die geeigneten Kanäle überlagert. Zur Erstellung eines Bildstapels für die 3D-Rekonstruktion wurde außerdem ein bereitgestelltes, nicht modifiziertes Python-Programm verwendet. Da eine nachträgliche Anpassung der Belichtungszeit nach Beginn der Aufnahme nicht möglich war und die Bildserie gestartet wurde, bevor der Lymphknoten im Anschnitt erschien, wurden die Belichtungsparameter einer Referenzprobe aus Abschnitt 4.6.1 übernommen. Die Aufnahme einer einzelnen Ebene dauerte jeweils 4 bis 5 min. Nach zwei Tagen wurde die Bildaufnahme vorzeitig abgebrochen.

5 Ergebnisse

5.1 Variierte Inkubationsbedingungen (Ultraschall, Schwenken, Xylolmatrix)

Im Folgenden werden die Auswirkungen der untersuchten Variationen während der Inkubationsphase auf die Einbettungsqualität und das Bildverhalten der Lymphknotenproben dargestellt.

Nach der Filtration der geschmolzenen Gemische verblieben feste Rückstände im Filter.

In Abbildung 12 sind ausgewählte Kanäle visualisiert. In allen Aufnahmen ist eine fein verteilte, inhomogene Matrixstruktur sichtbar. In zwei Proben der RGB-Aufnahmen (B1, C1) traten zusätzlich blasenförmige Strukturen mit hellen Grenzkanten auf. In den korrespondierenden Autofluoreszenzkanälen erscheinen diese Bereiche signalarm. Bei der visuellen Kontrolle der Blockoberfläche wurden an den entsprechenden Positionen Lufteinschlüsse festgestellt. Diese lagen in unmittelbarer Nähe des Gewebes.

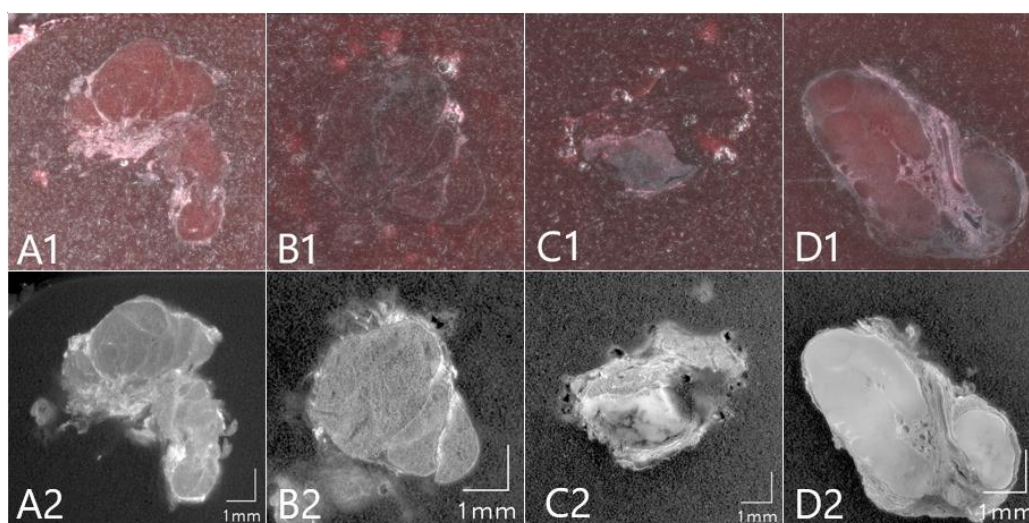


Abbildung 12: Vergleich der Lymphknotenproben
Dargestellt sind (A) Referenzprobe, (B) Ultraschallbehandlung, (C) mechanisches Schwenken und (D) xylolhaltiges Paraffingemisch. (1) zeigt die RGB-Überlagerung der RingLED-Kanäle (PS2-K1 bis PS2-K3). (2) zeigt den Autofluoreszenzkanal PS2-K9.

Zwischen den Varianten zeigen sich nur leichte visuelle Unterschiede. Die fein verteilte Matrixstruktur erscheint jedoch in allen Proben ähnlich ausgeprägt. Ein deutlicher Unterschied in der Ausprägung der Matrixstruktur ist nicht erkennbar.

5.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit auf die Mikrostruktur

Die in Abschnitt 4.6.2 beschriebenen 16 gefärbten Proben wurden episkopisch untersucht, die programm-basierte Auswertung erfolgte gemäß Abschnitt 4.5. Für jede Probe wurde ein Diagramm erstellt, das die vier Abkühlbedingungen gegenüberstellt (Beispiel Abbildung 13). Die Darstellung erfolgt linear. Ausreißer werden in den Boxplots ausgeblendet, um die Hauptverteilung und damit die Unterschiede zwischen den Abkühlbedingungen übersichtlich darzustellen.

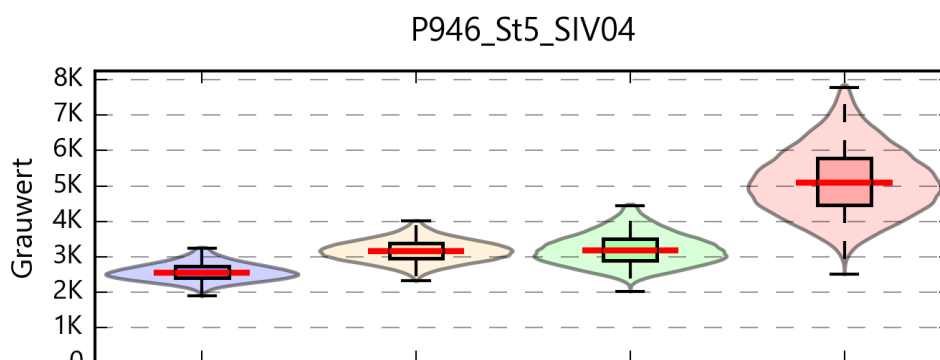


Abbildung 13: Lineare Box-/Violinplot- Darstellung.

Dargestellt ist ein Box-/Violinplot der 16-Bit-Grauwertverteilung im ROI für das Gemisch P906_St5_SIV04 unter vier Abkühlvarianten. Die Boxen geben den Interquartilsbereich (IQR, 25.-75. Perzentil) an, die zentrale Linie den Median, die Whisker markieren die Streuung außerhalb des IQR gemäß der in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Definition. Ausreißer sind in der Darstellung ausgeblendet.

Über nahezu alle untersuchten Gemische zeigt sich eine Zunahme der Streuung der Intensitätsverteilungen mit abnehmender Abkühlgeschwindigkeit.

Die Ofenabkühlung weist dabei die höchsten IQR-Werte auf, während die Abkühlung im Gefrierschrank die geringste Streuung zeigt. Die Whisker-Spannweite und der Median folgen im Referenz-Aufnahmeparametersatz demselben Trend.

Tabelle 12 fasst die Kennwerte für den Referenz-Aufnahmeparametersatz P964_St5_SIV04 über alle 16 untersuchten Proben zusammen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Tabellenwerte farbcodiert dargestellt. Dabei kennzeichnet eine blaue Färbung niedrigere Werte, während rötliche Farbtöne höhere Werte markieren. Die Farbcodierung wurde jeweils separat für jede Tabelle vorgenommen.

Tabelle 12: IQR-/Median-Werte für PS2 - K4 (Belichtungszeit: 10000ms, 365nm, Filterkonfiguration: A-1).

	IQR				Median			
	Gefrierschrank	Kühlschrank	Raumtemperatur	Ofen	Gefrierschrank	Kühlschrank	Raumtemperatur	Ofen
P906_St5_X4_SIV04	487	717	1000	1587	3527	4117	4816	6720
P946_St5_SIV04	347	427	635	1355	2559	3165	3190	5108
P956_X4_SIV04	732	965	1204	1322	3104	5646	5799	5296
P996_SIV04	516	740	845	1600	3235	3695	4276	7092

Über nahezu alle Gemische zeigt sich dabei derselbe Zusammenhang wie in der Beispielabbildung: Mit abnehmender Abkühlgeschwindigkeit nehmen IQR und Median zu, sodass die schnellste Abkühlung im Gefrierschrank die kleinsten und die Ofenabkühlung die größten Werte aufweist.

Eine Variation der Aufnahmeparameter verändert den beobachteten Trend der IQR- und Whisker-Spannweite nicht. Die schnellste Abkühlung weist die kleinsten und die Ofenabkühlung die größten Werte auf.

Der Median zeigt über die meisten untersuchten Aufnahmeparameter einen gleichgerichteten Verlauf, weicht jedoch in zwei Kanälen von diesem Trend ab, die entsprechenden Medianübersichten sind in Tabelle 13 (PS2 – K1 und PS2 – K5) dargestellt.

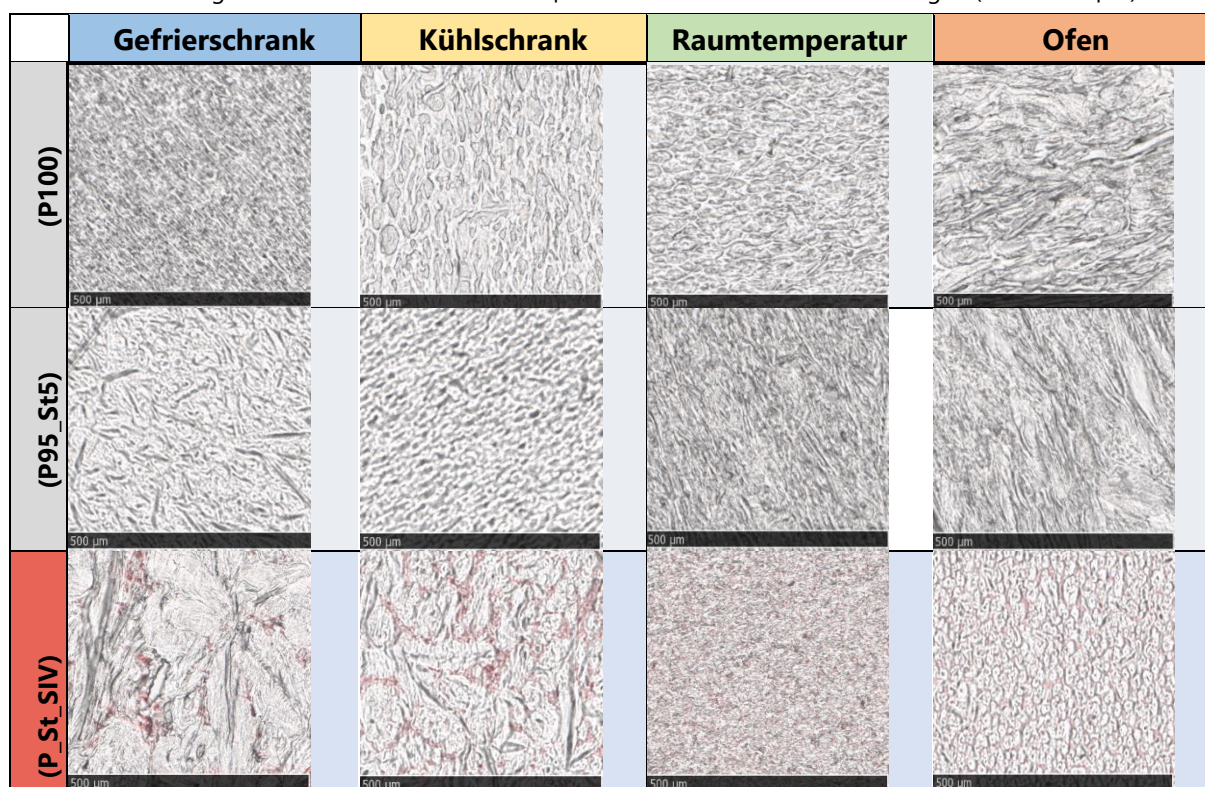
Tabelle 13: Median-Werte für PS2 – K4 und K5.

Median	PS2 – K1				PS2 – K4			
	Gefrierschrank	Kühlschrank	Raumtemperatur	Ofen	Gefrierschrank	Kühlschrank	Raumtemperatur	Ofen
P906_St5_X4_SIV04	7216	6284	5479	5893	10254	9191	8587	8287
P946_St5_SIV04	8228	6601	6486	6186	8765	8529	9017	8161
P956_X4_SIV04	6629	3482	3491	7526	10245	6899	6431	8271
P996_SIV04	5009	4832	4012	8403	7606	7290	6920	8209

In Kanal K1 und Kanal K5 zeigt der Median kein monotones Verhalten über die Abkühlbedingungen. In mehreren Gemischen liegen die Medianwerte der Gefrierschrankproben erhöht, während Kühlschrank und Raumtemperatur häufig auf ähnlichem Niveau liegen. Die Ofenwerte zeigen kein einheitliches Muster. Damit unterscheidet sich der Verlauf dieser Kanäle vom generellen Median-Trend. Die entsprechenden Übersichten für weitere Kenngrößen bzw. Aufnahmeparameter sind in digitalen Anhang (B_Experimenteller Teil/5.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit) dargestellt.

Aus jeder Einbettung wurde ein einzelner 5-µm-Schnitt angefertigt und episkopisch untersucht, um die innerhalb der Paraffinmatrix auftretenden Inhomogenitäten auf Schnittebene sichtbar zu erfassen. Tabelle 14 zeigt hierzu exemplarisch zwei ungefärbte (P100, P95_5) sowie ein SudanIV-gefärbtes (P946_St5_SIV04) Gemisch als Referenz unter den vier Abkühlvarianten (vollständige Übersicht: Anhang: Blatt 5).

Tabelle 14: Inhomogenitäten auf Schnittebene in 5-µm-Schnitten aus Paraffineinbettungen (500 × 500 µm)



In den gezeigten Schnitten sind ausgeprägte kristalline Strukturen erkennbar. Ein klarer Unterschied zwischen P100 und P95_5 ist in den dargestellten Beispielen nicht erkennbar. In der gefärbten Referenzprobe zeigt sich eine inhomogene, fleckige Verteilung des Farbstoffs. Dieses Verteilungsmuster ist ebenfalls in den übrigen gefärbten Proben erkennbar.

5.3 Einfluss der Gemischanteile bei konstanter Abkühlbedingung

Untersucht wurden paraffinbasierte Einbettgemische bei konstanter Abkühlbedingung GS2 und Schnitttiefe von 50µm in Abhängigkeit von der Gemischzusammensetzung. Dazu wurden Gemische mit variiertem Xylolanteil, variiertem Sudan-IV-Anteil sowie Gemische mit (teilweiser bzw. vollständiger) Substitution von Paraffin durch Bienenwachs hergestellt.

Zur besseren Übersicht werden die Gemische im Folgenden über vereinfachte Probe-IDs bezeichnet, die sich jeweils aus der charakteristischen Variation der Zusammensetzung ableiten (z. B. wird P906_St5_X4_SIV04 als X4 bezeichnet, um die Xylol-Variation hervorzuheben). Dieses Prinzip wurde analog auf alle Gemische angewendet (Tabelle 15).

Tabelle 15: Zusammensetzung der untersuchten paraffinbasierten Einbettgemische

Proben-ID	X8	X4	SIV1,2	SIV0,8	SIV0,4	BW10	BW20	BW50	BW99,6
Paraffin (%)	86,6	90,6	93,8	94,2	94,6	89,6	79,6	47,1	
Stearinsäure (%)	5	5	5	5	5			2,5	
Xylol (%)	8	4							
Sudan-IV (%)	0,4	0,4	1,2	0,8	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Bienenwachs (%)						10	20	50	99,6

Im nächsten Schritt werden die Grauwertverteilungen der in Tabelle 15 aufgeführten Gemische unter den untersuchten Aufnahmeparametern verglichen. Dabei wurden die Autofluoreszenzkanäle näher untersucht. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis für den Autofluoreszenzkanal PS2-K4.

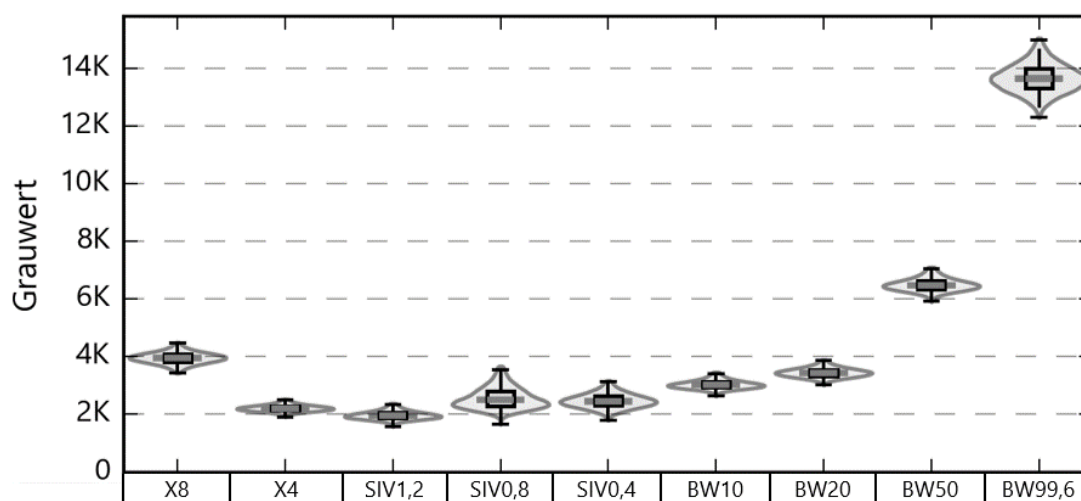


Abbildung 14: Grauwertverteilungen der untersuchten paraffinbasierten Gemische bei konstanter Abkühlung (GS2) im Autofluoreszenzkanal PS2-K4.

Dargestellt sind kombinierte Box- und Violinplots der Grauwerte im definierten ROI (lineare Darstellung). Die Boxplots zeigen Median, Interquartilsabstand (IQR) sowie Whisker ($1,5 \times \text{IQR}$). Die Probenbezeichnungen entsprechen den in Tabelle 15 definierten Probe-IDs.

Für die Xylol-Variation zeigt X8 im Vergleich zu X4 einen leicht höheren Median bei weiterhin schmaler Verteilung. Bei den Sudan-IV-Variationen weist SIV12 den niedrigsten Median auf. SIV04 und SIV08 liegen auf einem vergleichbaren, höheren Niveau, wobei SIV08 eine breitere Verteilung zeigt. Die explorativ untersuchten Bienenwachs-Proben zeigen insgesamt höhere

Medianwerte mit zunehmendem Bienenwachsanteil. BW10 und BW20 liegen dabei nahe beieinander, BW50 ist höher, und BW99,6 weist die höchsten Werte sowie eine größere Streuung auf.

Anschließend wird derselbe Vergleich für den zweiten Autofluoreszenzkanal PS2-K5 durchgeführt (Abbildung 15).

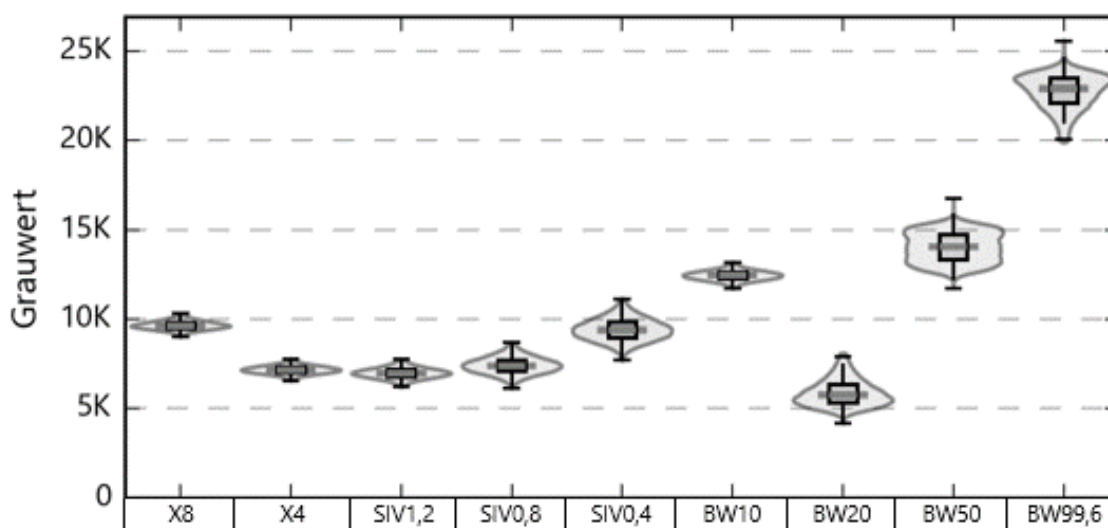


Abbildung 15: Grauwertverteilungen der untersuchten paraffinbasierten Gemische bei konstanter Abkühlung (GS2) im Autofluoreszenzkanal PS2-K5.

Die Probenbezeichnungen entsprechen den in Tabelle 15 definierten Probe-IDs.

Die Xylol-Proben X4 und X8 zeigen ein vergleichbares Verteilungsverhalten. Bei den Sudan-IV-Proben weist SIV12 den niedrigsten Median auf, gefolgt von SIV08 und SIV04. Die explorativ untersuchten Bienenwachs-Proben zeigen auch in PS2-K5 einen ansteigenden Trend, wobei BW10 im Vergleich zur Darstellung in PS2-K4 deutlich erhöhte Grauwerte aufweist. Insgesamt liegen die Bienenwachs-Proben auf höheren Verteilungen und zeigen größere IQR-Werte.

Im direkten Vergleich der Kanäle liegen die Medianwerte in PS2-K5 insgesamt höher als in PS2-K4, obwohl die Belichtungszeit in PS2-K5 geringer gewählt wurde (10 000 ms vs. 6 000 ms).

5.4 Tiefenabhängigkeit der Homogenitätsparameter

Zur Beurteilung der Tiefenabhängigkeit der Homogenität wurden die Einbettproben seriell in definierten Abständen ($\Delta z = 50 \mu\text{m}$) geschnitten und für jede Schnittebene die Grauwertverteilungen im ROI ausgewertet. Die resultierenden Kenngrößen (u. a. Median und IQR) wurden über die Schnitttiefe dargestellt und zwischen den Versuchsbedingungen verglichen.

Zur Abschätzung der Aussagekraft der Kennwerte wurde exemplarisch eine Probe an drei räumlich getrennten ROI-Positionen ausgewertet. Die resultierenden Verteilungen und Kenngrößen dienen als Maß für die positionsabhängige Variation innerhalb einer Schnittebene und werden in Abbildung 16 dargestellt.

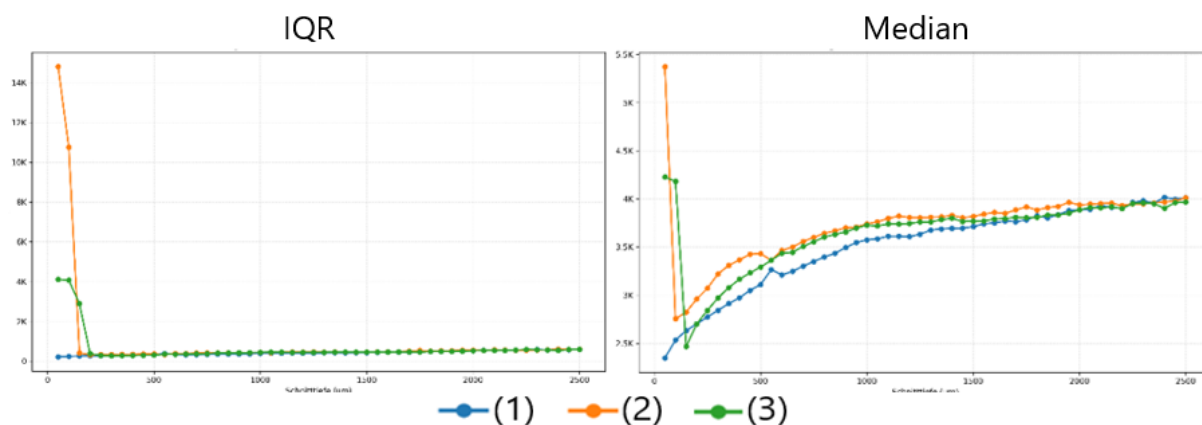


Abbildung 16: Positionsabhängige Variation der Homogenitätskennwerte innerhalb einer Schnittebene anhand dreier ROI-Positionen (gleiche Probe).

Links: Interquartilsabstand (IQR), rechts: Median der Grauwertverteilungen. Die Darstellung dient der Abschätzung der Reproduzierbarkeit der Kennwerte innerhalb einer Schnittebene.

Für den IQR ergeben sich zwischen den ROI-Positionen nur geringe Unterschiede, die Werte liegen auf vergleichbarem Niveau. Auch die Medianwerte zeigen über die ROI-Positionen hinweg eine weitgehend konsistente Ausprägung. In den ersten Schnittebenen treten initial erhöhte Werte auf, die auf Rand-/Grenzkantenartefakte bzw. Effekte der oberflächennahen Schichten zurückzuführen sind und bei der Beurteilung nicht berücksichtigt wurden. Insgesamt deutet die Darstellung darauf hin, dass die Kennwerte innerhalb einer Schnittebene nur gering von der ROI-Position abhängen und damit für die nachfolgende Tiefenanalyse geeignet sind.

Auf Basis dieser Reproduzierbarkeitsprüfung wird im nächsten Schritt die Tiefenabhängigkeit der Kennwerte exemplarisch anhand einer einzelnen Probe dargestellt. Der gezeigte Verlauf dient der Veranschaulichung des typischen Verhaltens über die Schnitttiefe, Abbildung 17 zeigt dazu den Verlauf von IQR, Median und Whisker für die Probe (P946_St5_SIV04)_GS2_4 des Kanals PS2-K4.

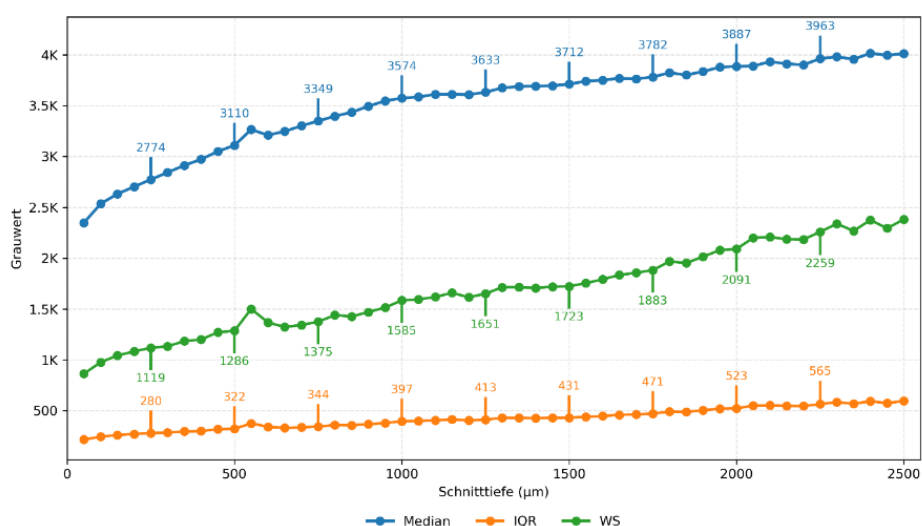


Abbildung 17: Exemplarischer Tiefenverlauf der Homogenitätskennwerte einer einzelnen Probe über serielle Schnittebenen ($\Delta z = 50 \mu\text{m}$).

Dargestellt sind IQR und Median der Grauwertverteilungen vom Gemisch (P946_St5_SIV04_GS2_4) in Abhängigkeit von der Schnitttiefe. Aufnahmeparameter: Anregung 365 nm (Intensität 100), Belichtungszeit 10 000 ms, Emissionsfilter: 1 (434/32).

Bei der exemplarisch dargestellten Probe ist über den gesamten untersuchten Tiefenbereich ein kontinuierlicher Anstieg der Kennwerte erkennbar. Grenzkantenartefakte treten nicht auf, der Anstieg beginnt ab der ersten Schnittebene. Der Median zeigt zu Beginn größere Zuwächse, bevor der Verlauf anschließend linear weiterläuft. IQR und Whisker verhalten sich bereits zu Beginn linear. Bis zur maximal untersuchten Tiefe ($\approx 2500 \mu\text{m}$) ist kein lokales Maximum erkennbar.

Im Anschluss werden die Tiefenverläufe der Homogenitätskennwerte für verschiedene Herstellungsbedingungen direkt gegenübergestellt. Verglichen werden die Abkühlvarianten GS2, GS, RT und RT2. Für RT2 werden unterschiedliche Schüttelstufen (20, 40 und 80 BpM) betrachtet. Für ausgewählte Bedingungen (SIV04-GS2 und RT) liegen jeweils zwei Proben vor.

In der folgenden Abbildung werden die Tiefenverläufe der Homogenitätskennwerte zusammengeführt und direkt gegenübergestellt. Zunächst wird hierzu der Kanal PS2-K4 betrachtet (Abbildung 18).

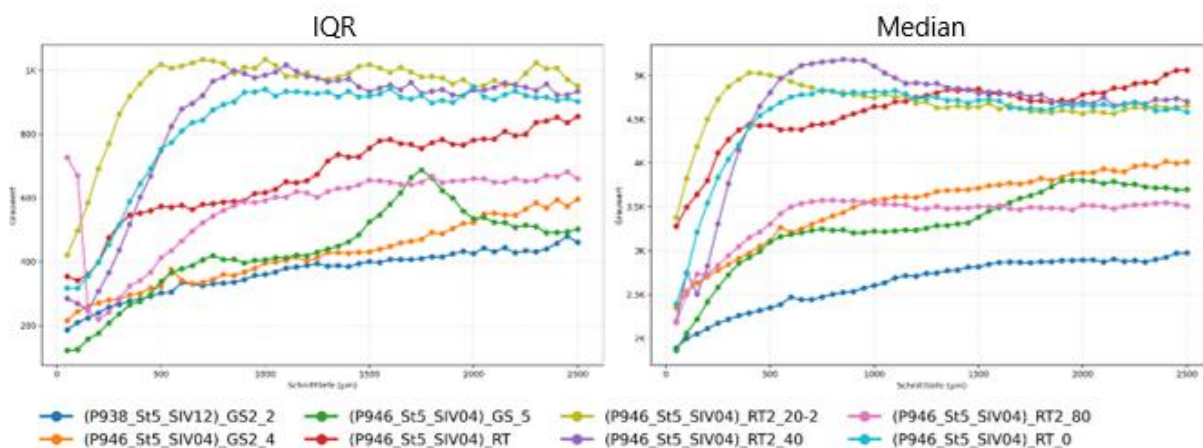


Abbildung 18: Gegenüberstellung der Tiefenverläufe der Homogenitätskennwerte (Kanal PS2-K4). Abgebildet sind die Tiefenverläufe der Gemische GS, GS2, RT und RT2 sowie RT2 mit Schüttelstufen (20/40/80 BpM).

Links: Interquartilsabstand (IQR), rechts: Median der Grauwertverteilungen, jeweils in Abhängigkeit von der Schnitttiefe ($\Delta z = 50 \mu\text{m}$, bis ca. $2500 \mu\text{m}$). Aufnahmeparameter: Anregung 365 nm (Intensität 100), Belichtungszeit $10\,000 \text{ ms}$, Emissionsfilter: 1 (434/32).

Der gleiche Vergleich wird im nächsten Schritt für den Kanal PS2-K5 durchgeführt (Abbildung 19).

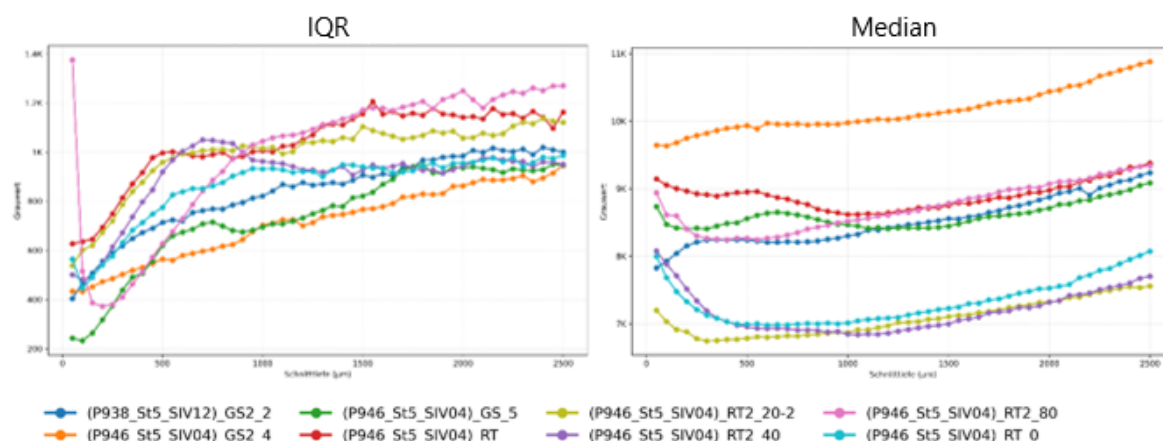


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Tiefenverläufe der Homogenitätskennwerte (Kanal PS2-K5). Herstellbedingungen: GS, GS2, RT und RT2 sowie RT2 mit Schüttelstufen (20/40/80 BpM). Links: Interquartilsabstand (IQR), rechts: Median der Grauwertverteilungen, jeweils in Abhängigkeit von der Schnitttiefe ($\Delta z = 50 \mu\text{m}$, bis ca. $2500 \mu\text{m}$). Aufnahmeparameter: Anregung 365 nm (Intensität 100), Belichtungszeit 6 000 ms, Emissionsfilter: 4 (650/100).

Die GS2-Proben zeigen tendenziell niedrigere IQR-Werte als RT-Proben bei einem näherungsweise linearen Anstieg über die Schnitttiefe. Im Median ergibt sich hingegen eine stärkere Abgrenzung zwischen den Proben: RT2_20 und RT2_40 bilden eine Gruppe mit sehr ähnlichen, vergleichsweise niedrigeren Verläufen. Weitere Proben, darunter RT und RT2_80 sowie die Sudan-Varianten, liegen auf einem höheren Niveau. Eine einzelne SIV04-Probe weist deutlich erhöhte Medianwerte auf und liegt damit außerhalb der übrigen Verläufe.

Wie auch bei den anderen Untersuchungen zeigt PS2-K5 höhere Median-Werte als der Kanal PS2_K4.

5.5 Kanalüberlagerung und Referenzfärbungen

Die aufgenommenen Autofluoreszenzkanäle werden exemplarisch hinsichtlich ihres strukturellen Informationsgehalts für die Darstellung von Gewebestrukturen verglichen. Auf dieser Grundlage werden geeignete Kanäle ausgewählt, als Mehrkanalüberlagerungen dargestellt und qualitativ mit histologischen Vergleichsfärbungen (HE, Azan) abgeglichen. RGB-Aufnahmen werden nicht berücksichtigt, da sie nur eingeschränkt mit den emissionsbasierten Autofluoreszenzsignalen vergleichbar sind. Abbildung 20 zeigt einen exemplarischen visuellen Vergleich ausgewählter Kanäle. Da mehrere Kanäle ähnliche Bildcharakteristika aufweisen, werden nicht alle Einzelkanäle separat dargestellt. Kanal 4 repräsentiert die Kanäle 4-6, Kanal 7 wird aufgrund seiner abweichenden Signalcharakteristik einzeln dargestellt und Kanal 9 steht stellvertretend für die Kanäle 8-10. Die Kanalbilder sind jeweils im digitalen Anhang (B_Experimenteller Teil/5.5 Kanalüberlagerung und Referenzfärbungen) hinterlegt.

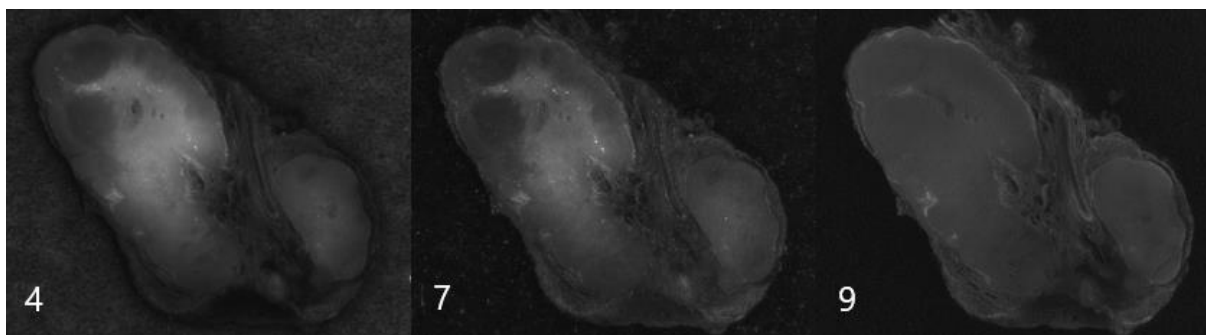


Abbildung 20: Exemplarischer visueller Vergleich ausgewählter Autofluoreszenzkanäle einer Gewebereinbettung.

Dargestellt sind Kanal 4 (repräsentativ für Kanäle 4-6), Kanal 7 (abweichende Signalcharakteristik) und Kanal 9 (repräsentativ für Kanäle 8-10). Eine vollständige Übersicht aller Einzelkanäle ist im digitalen Anhang dargestellt.

Die Kanäle 4–6 zeigen detaillierte Gewebestrukturen sowie differenzierte Helligkeitsbereiche innerhalb des Lymphknotens. Auch Kanal 7 weist grundsätzlich strukturelle Informationen auf, jedoch treten über das gesamte Bildfeld hinweg ausgeprägte Glanzeffekte auf, die die Bildqualität beeinträchtigen. Die Kanäle 8–10 ermöglichen zwar eine deutliche Abgrenzung des Gewebes gegenüber dem Hintergrund, innerhalb des Lymphknotens sind jedoch kaum strukturelle Details erkennbar. Aufgrund einer starken Signalintensität musste die Belichtungszeit in diesen Kanälen reduziert werden, um Überbelichtung zu vermeiden, wodurch die Detailerkennbarkeit zusätzlich eingeschränkt wurde.

Auf Grundlage dieser Bewertung wurde eine Überlagerung der Kanäle 4, 5 und 6 erstellt und im Rahmen der qualitativen Bildauswertung in Abbildung 21 dargestellt. Die resultierende Kanalüberlagerung wurde mit der korrespondierenden HE-Färbung verglichen. Der Vergleich mit der Azan-Färbung erfolgte anhand eines Schnittes, der in einem Abstand von 5 μm zum für die Kanalüberlagerung verwendeten Schnitt angefertigt wurde.

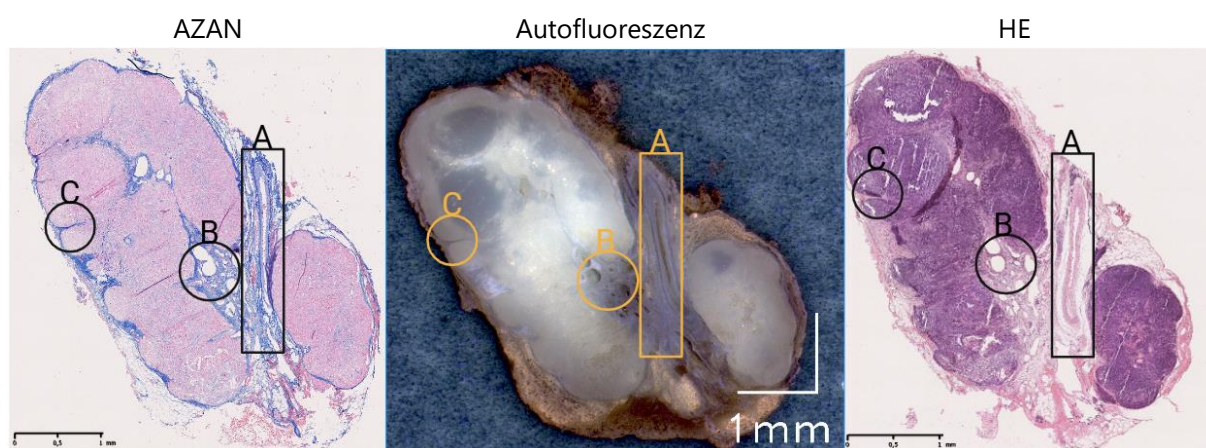


Abbildung 21: Übersichtsdarstellung des Lymphknotens in Azan-Färbung, Autofluoreszenz und HE-Färbung.

Die Autofluoreszenzdarstellung basiert auf einer Überlagerung der Kanäle R: K6, G: K5 und B: K4. In der Azan-Färbung erscheinen Zellkerne rötlich bis dunkel, zellreiche beziehungsweise zytoplasmatische Gewebeanteile rot bis rosa und kollagene beziehungsweise bindegewebige Strukturen blau. In der HE-Färbung sind Zellkerne dunkelblau bis violett und das übrige Gewebe überwiegend rosa dargestellt.

In den Übersichtsaufnahmen zeigen sich mehrere rundliche Gewebebereiche, die in Autofluoreszenz, HE- und Azan-Färbung grundsätzlich korrespondieren. Dabei fällt auf, dass die inneren Anteile in der Autofluoreszenz deutlich signalstärker erscheinen als die äußeren Bereiche. Darüber hinaus ist ein äußerer rötlichbrauner Randbereich erkennbar, der sich in den histologischen Färbungen nicht in gleicher Deutlichkeit abgrenzen lässt.

Die in Abbildung 21 markierten Regionen A, B und C wurden anschließend exemplarisch in den Abbildung 22, 23 und 24 näher untersucht, um mögliche strukturelle Übereinstimmungen zwischen Autofluoreszenz, HE- und Azan-Färbung auf regionaler Ebene zu beurteilen.

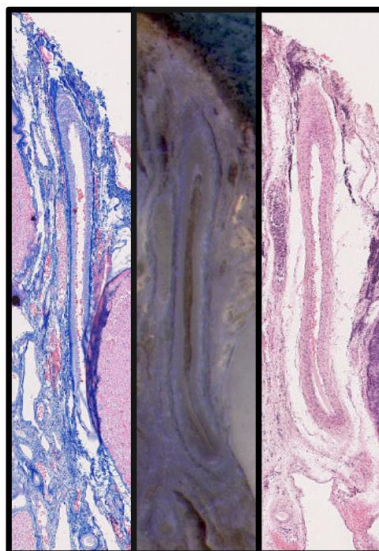


Abbildung 22: Detaildarstellung der in Abbildung 21 markierten Region A in Azan-Färbung, Autofluoreszenz und HE-Färbung.

In der exemplarisch ausgewählten Region zeigt sich in allen drei Bildmodalitäten eine langgestreckte, klar abgrenzbare Struktur. Auffällig ist eine längs verlaufende zentrale spalt- beziehungsweise lumenartige Zone. Besonders in der Azan-Färbung treten faserige beziehungsweise bindegewebige Anteile deutlich hervor. Insgesamt lässt sich die Struktur in Autofluoreszenz, HE- und Azan-Färbung gut korrelieren und ist morphologisch mit einer gefäßartigen Struktur vereinbar. In der Autofluoreszenzaufnahme sind zusätzlich Strukturen erkennbar, die vermutlich aus tieferliegenden Gewebeschichten stammen.

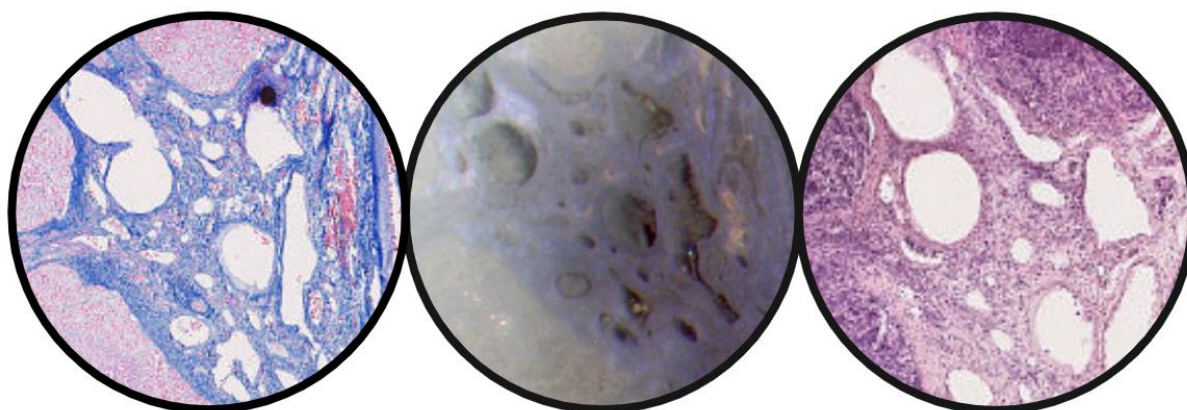


Abbildung 23: Detaildarstellung der in Abbildung 21 markierten Region B in Azan-Färbung, Autofluoreszenz und HE-Färbung.

In dieser Region zeigen sich in allen drei Bildmodalitäten mehrere rundliche bis unregelmäßige hohlraumartige Strukturen innerhalb eines netzartig gegliederten Zwischengewebes. Besonders in der Azan-Färbung treten die umgebenden bindegewebigen Anteile deutlich hervor. Morphologisch ist der Bereich mit sinusartigen Strukturen vereinbar, wobei eine Einordnung als Marksinus naheliegt. Eine eindeutige histologische Zuordnung allein anhand der vorliegenden Aufnahmen bleibt jedoch eingeschränkt.

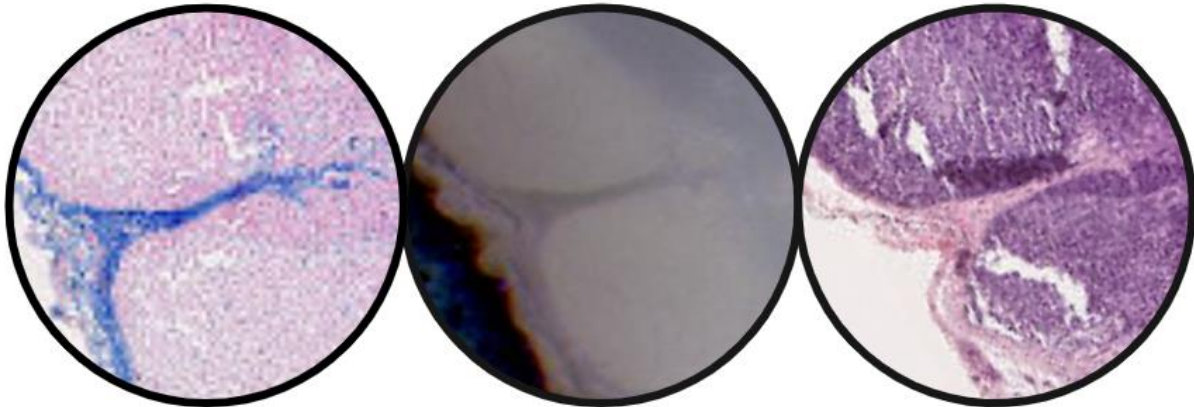


Abbildung 24: Detaildarstellung der in Abbildung 21 markierten Region C in Azan-Färbung, Autofluoreszenz und HE-Färbung.

In der exemplarisch ausgewählten Region zeigt sich in allen drei Bildmodalitäten eine bandförmige, zwischen angrenzenden Gewebebereichen verlaufende Struktur. Besonders in der Azan-Färbung treten die bindegewebigen Anteile deutlich hervor, während sich in der Autofluoreszenz eine korrespondierende signalärmere Abgrenzung erkennen lässt. Auch in der HE-Färbung ist die Struktur als helleres Zwischengewebe nachvollziehbar. Insgesamt lässt sich der Befund in allen drei Modalitäten gut korrelieren und ist morphologisch mit einer trabekelartigen Struktur vereinbar.

Insgesamt zeigte die qualitative Gegenüberstellung, dass sich in der Autofluoreszenz sichtbare Strukturen mit den korrespondierenden HE- und Azan-Färbungen grundsätzlich vergleichen lassen. Dabei wurden sowohl gemeinsame architektonische Merkmale als auch modalitätsspezifische Unterschiede erkennbar. Die Auswertung erlaubt somit eine orientierende morphologische Einordnung der dargestellten Bereiche. Weitere Beispielregionen sind im Anhang zusammengefasst.

5.6 3D-Rekonstruktion

Für die dreidimensionale Rekonstruktion wurde ein separater Lymphknoten herangezogen. Die methodische Vorgehensweise ist in Abschnitt 4.5.3 beschrieben. Bei einer Schnittdicke von 3 μm dauerte die Aufnahme eines vollständigen Parametersatzes pro Schnitt etwa 4 bis 5 Minuten. Die serielle Bildaufnahme wurde nach rund 48 Stunden vorzeitig beendet, sodass kein vollständiger Datensatz des Präparats vorliegt. Zudem wurden die Belichtungszeiten aus einer vorangegangenen Aufnahme eines anderen Lymphknotens übernommen. Im Verlauf der Mes-

sung nahm die Signalintensität des untersuchten Präparats zu, sodass spätere Aufnahmen zunehmend signalstark erschienen. Darüber hinaus verlagerte sich der Lymphknoten teilweise aus dem Bildfeld, da seine genaue Position zu Beginn der Messung nicht vollständig erfasst worden war. Die resultierende 3D-Rekonstruktion ist in Abbildung 25 dargestellt.

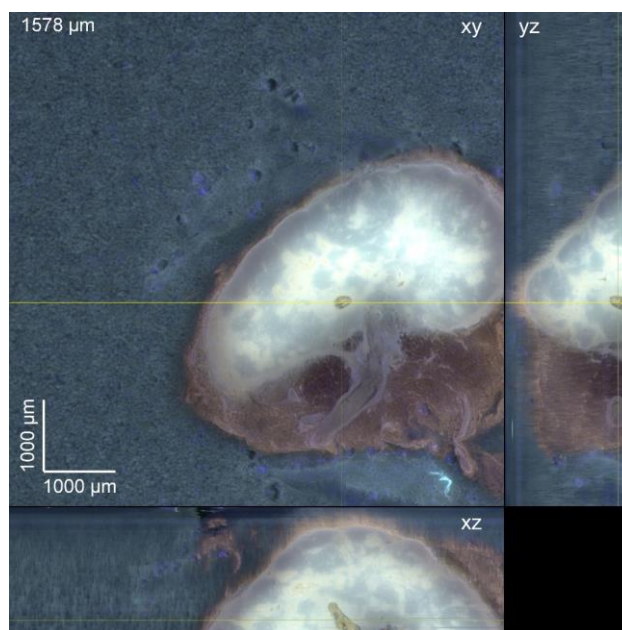


Abbildung 25: Dreidimensionale Darstellung des untersuchten Lymphknotens auf Grundlage der überlagerten Kanäle (PS1-[K4-K6]).

Die zentrale xy-Ansicht entspricht der originalen Aufnahmeebene der Blockflächenmikroskopie, während die yz- und xz-Ansichten softwaretechnisch aus dem Bildstapel rekonstruierte orthogonale Ebenen darstellen.

Während die xy-Ebene die ursprünglich aufgenommene Blockfläche zeigt, wurden die yz- und xz-Ansichten aus dem Bildstapel programmtechnisch erzeugt. In den rekonstruierten orthogonalen Ebenen ist die Grundform des Präparats grundsätzlich nachvollziehbar, auch wenn die Bildqualität im Vergleich zur originalen xy-Aufnahme reduziert ist. Dennoch erlaubt die Darstellung eine orientierende Beurteilung der räumlichen Ausdehnung und Form.

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Homogenität fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen eingebetteter Proben durch eine angepasste Filterkonfiguration sowie durch Veränderungen der Einbettung zu verbessern. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bildhomogenität im vorliegenden Versuchsaufbau wesentlich durch während der Erstarrung entstehende kristallartige Strukturen beeinflusst wurde. Damit erwies sich nicht primär die Variation einzelner eingesetzter Komponenten als entscheidend, sondern vor allem das Erstarrungsverhalten des Einbettmediums.

Ein eigenständiger Einfluss des eingesetzten Farbstoffs Sudan-IV auf die Homogenität konnte dabei nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zwar zeigten sich in lichtmikroskopisch untersuchten Einzelschnitten Hinweise auf eine inhomogene Verteilung von Farbstoffanteilen innerhalb der Probe, ein klarer Zusammenhang zwischen dieser Verteilung und der Bildhomogenität ließ sich jedoch nicht ableiten. Vielmehr ist der Einfluss der während der Erstarrung entstehenden Strukturen so ausgeprägt, dass ein möglicher zusätzlicher Beitrag des Farbstoffs nicht sicher beurteilt werden konnte. Hinzu kommt, dass der eingesetzte Faltenfilter Feststoffe zurückhielt. Da Sudan-IV laut Hersteller nur eine Reinheit von etwa 80 % aufweist, konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den im Filter verbliebenen Feststoffen tatsächlich um Farbstoffreste oder um andere herstellungsbedingte Bestandteile handelte. Auch dadurch bleibt die Bewertung des tatsächlichen Farbstoffeinflusses eingeschränkt.

Als wesentlicher Einflussfaktor auf die Ausbildung der beobachteten Inhomogenitäten erwies sich die Abkühlgeschwindigkeit. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abkühlrate die Ausbildung der kristallartigen Strukturen und damit die optische Erscheinung der Proben maßgeblich beeinflusst. Für die Variation der Einbettkomponenten ließ sich dagegen, mit Ausnahme des explorativ untersuchten Bienenwachses, kein klarer Zusammenhang mit der Homogenität nachweisen. Beobachtete Unterschiede blieben insgesamt gering. Da die Abkühlbedingungen jedoch einen starken Einfluss ausübten, ist eine belastbare Bewertung der Materialzusammensetzung nur eingeschränkt möglich. Die Ergebnisse sprechen daher eher dafür, dass die Homogenität stärker von den thermischen Bedingungen während der Erstarrung als von moderaten Änderungen der Zusammensetzung bestimmt wird.

Hinzu kommt, dass die Homogenität mit zunehmender Tiefe der Probe abnahm. Dies lässt sich plausibel auf veränderte Abkühlbedingungen innerhalb derselben Probe zurückführen, da tiefer liegende Bereiche zeitlich und thermisch anders erstarren als oberflächennahe Schichten. Daraus ergibt sich zugleich eine methodische Einschränkung: Es ist davon auszugehen, dass bereits Unterschiede in der Füllhöhe des Einbettmediums oder die Größe der verwendeten Metallkassette das Erstarrungsverhalten und damit auch die Homogenität beeinflussen können. Da zudem die exakte Schnitttiefe nicht in jedem Fall sicher getroffen werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der beobachteten Unterschiede auf diese Tiefenabhängigkeit und nicht auf Unterschiede der Materialzusammensetzung zurückzuführen ist.

Auch die Eigenfluoreszenz des Einbettmediums beeinflusste die Signalentstehung. Für die Bewertung der Aufnahmen ist daher ein möglichst schwach autofluoreszierendes Medium vorteilhaft, um unspezifische Hintergrundsignale gering zu halten. Das explorativ eingesetzte Bienenwachs fiel in diesem Zusammenhang durch insgesamt hellere Signale auf. Da es jedoch nur ergänzend untersucht wurde, kommt diesem Befund vor allem orientierender Charakter zu.

Der erweiterte Filtersatz erwies sich insgesamt als geeignet, um relevante Gewebestrukturen differenzierter darzustellen. Im Vergleich mit etablierten Vergleichsfärbungen zeigte sich, dass sich wesentliche Strukturen auch in den Autofluoreszenzaufnahmen wiederfinden ließen. Dies spricht dafür, dass die Methode tatsächlich gewebebezogene Informationen erfassen kann. Besonders günstige Ergebnisse wurden bei einer Anregung mit 365 nm in Kombination mit den Bandpassfiltern 434/32 nm, 475/42 nm und 535/70 nm erzielt. Diese Konfiguration lieferte die besten Ergebnisse hinsichtlich Kontrast und struktureller Wiedererkennbarkeit. Der 650/100-nm-Bandpassfilter erwies sich demgegenüber als weniger geeignet. Dies unterstreicht, dass die Bildqualität nicht allein von einzelnen Filtern abhängt, sondern von der Abstimmung zwischen Filterkonfiguration, spektraler Anregung und Probe.

Bei der Interpretation der Aufnahmen ist zudem zu berücksichtigen, dass weiterhin Signale aus tieferen Schichten erkennbar waren. Dadurch wird die eindeutige Zuordnung einzelner Signale zur tatsächlich betrachteten Ebene eingeschränkt. Für den Vergleich mit histologischen Referenzfärbungen bedeutet dies, dass gefundene Übereinstimmungen zwar die grundsätzliche Aussagekraft der Autofluoreszenzaufnahmen stützen, die exakte räumliche Zuordnung einzelner Strukturen jedoch nur eingeschränkt möglich ist.

Die entwickelten Programme erwiesen sich als geeignete Unterstützung für Datenerstellung und Auswertung. Insbesondere das modifizierte Programm zur Kanalüberlagerung erleichterte die Auswertung deutlich und ermöglichte eine benutzerfreundlichere sowie schnellere Zusammenführung der Einzelkanäle.

Die Ergebnisse sind insgesamt durch mehrere Limitationen eingeschränkt. In einzelnen Untersuchungen wurde nur eine Probe analysiert, sodass die Befunde nicht uneingeschränkt abgesichert sind. Hinzu kommen Einflüsse der Tiefenlage, der Abkühlbedingungen und der nicht in jedem Fall exakt reproduzierbaren Einbettung. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dennoch, dass die Bildhomogenität im vorliegenden Ansatz wesentlich durch die Ausbildung kristallartiger Strukturen während der Erstarrung, durch die Abkühlbedingungen sowie durch die spektrale Abstimmung von Anregung und Filterung bestimmt wird, während ein eigenständiger Einfluss des Farbstoffs auf die Homogenität nicht eindeutig belegt werden konnte.

7 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich mehrere Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen. Ein wesentlicher Aspekt betrifft die Optimierung der Einbettung. Da die vorliegenden Ergebnisse darauf hindeuten, dass die strukturelle Homogenität der Einbettungen wesentlich durch die Kristallbildung des Paraffins beeinflusst wird, könnten alternative Prozessführungen während der Erstarrung untersucht werden. Denkbar wäre insbesondere eine gezielte mechanische Beanspruchung beziehungsweise die Erzeugung von Scherkräften, um die Ausbildung kleinerer Kristalle zu fördern und so die Matrix homogener zu gestalten. Da die Kristallbildung des Paraffins jedoch als grundlegende Materialeigenschaft nicht vollständig verhindert werden kann und zudem eine Nachkristallisation über längere Zeiträume nicht ausgeschlossen werden kann, erscheint auch die Untersuchung alternativer Einbettmedien sinnvoll. Insbesondere amorphe Einbettmaterialien wie bestimmte Kunststoffe könnten hier Vorteile bieten, auch wenn ihr Einsatz mit erhöhtem Aufwand, beispielsweise durch die Notwendigkeit härterer und kostenintensiverer Klingen, verbunden wäre.

Ein weiterer Ansatzpunkt betrifft die Wahl des Farbstoffs. Da Sudan IV in bestimmten spektralen Bereichen Eigenfluoreszenz zeigt und dadurch einzelne Autofluoreszenzkanäle einschränkt, könnte der Einsatz alternativer Farbstoffe mit verändertem Autofluoreszenzverhalten neue spektrale Bereiche für die Detektion erschließen. Daraus ergibt sich zugleich die Möglichkeit, das optische System um weitere Emissionsfilter zu erweitern, um zusätzliche Spektralbereiche gezielt untersuchen und potenziell weitere Fluorophore erfassen zu können.

Auch softwareseitig bestehen Möglichkeiten zur Weiterentwicklung. Eine adaptive Regelung der Belichtungszeit könnte dazu beitragen, Intensitätsschwankungen innerhalb der Bildaufnahme besser auszugleichen und die Bildqualität konstanter zu halten. Darüber hinaus wäre eine softwaregestützte Korrektur beziehungsweise Nachregelung der Positionierung sinnvoll, falls der Lymphknoten während der seriellen Aufnahme teilweise aus dem Bildfeld läuft. Dies könnte die Stabilität der Datensätze verbessern und ihre weitere Auswertung erleichtern.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sowohl materialbezogene als auch optische und softwaretechnische Weiterentwicklungen dazu beitragen können, die episkopische Blockflächenbildgebung weiter zu verbessern.

8 Zusammenfassung

Die dreidimensionale Analyse biologischer Gewebe ist für das Verständnis komplexer räumlicher Strukturen von großer Bedeutung. Klassische histologische Verfahren basieren jedoch überwiegend auf zweidimensionalen Schnittpräparaten, sodass räumliche Zusammenhänge nur eingeschränkt erfasst werden können. Episkopische Blockflächenverfahren ermöglichen dagegen die serielle Aufnahme der Oberfläche eines eingebetteten Probenblocks und liefern intrinsisch registrierte Bildstapel für dreidimensionale Rekonstruktionen. Eine Herausforderung stellt dabei die optische Transparenz paraffinbasierter Einbettungen dar, da Fluoreszenzsignale aus tieferliegenden Schichten den Kontrast der Blockoberfläche beeinträchtigen können.

Zur Verringerung dieser Tiefensignale wurde Paraffin mit dem lichtabsorbierenden Farbstoff Sudan IV modifiziert. Ziel dieser Arbeit war es, physikalisch-chemische Parameter dieser Einbettung zu untersuchen und ihren Einfluss auf die strukturelle Homogenität sowie auf die autofluoreszenzbasierte Bildgebung zu bewerten.

Hierfür wurden Sudan-IV-haltige Paraffingemische unter variierenden Herstellungsbedingungen analysiert. Im Fokus standen unterschiedliche Abkühlgeschwindigkeiten, Inkubationsbedingungen und Variationen der Gemischzusammensetzung. Zusätzlich wurden verschiedene Kombinationen aus Anregungs- und Emissionsfiltern untersucht, um geeignete spektrale Einstellungen für die Bildgebung zu identifizieren. Für die Auswertung der Experimente wurden überwiegend neue Programme entwickelt. Ein bestehendes Programm zur Kanalüberlagerung wurde zudem umfassend modifiziert und zu einer interaktiven, benutzerfreundlichen Anwendung weiterentwickelt. Die Homogenität wurde anhand von Grauwertverteilungen in definierten Bildregionen beurteilt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Inkubationsbedingungen und Gemischzusammensetzung nur geringe Auswirkungen auf die Homogenität hatten. Den größten Einfluss hatte die Abkühlgeschwindigkeit während der Erstarrung des Paraffins: Schnellere Abkühlung führte zu homogenen Strukturen, langsame Abkühlung zu stärkeren Inhomogenitäten. Zudem nahm die Streuung der Grauwerte mit zunehmender Schnitttiefe zu. Die Untersuchung verschiedener Filterkombinationen zeigte außerdem, dass geeignete Kombinationen aus Anregungs- und Emissionsfiltern eine verbesserte autofluoreszenzbasierte Darstellung relevanter Strukturen ermöglichen.

Insgesamt wird die Homogenität Sudan-IV-haltiger Paraffineinbettungen vor allem durch die Kristallisation des Paraffins bestimmt. Eine kontrollierte Abkühlung stellt daher einen zentralen Parameter zur Optimierung der Einbettung dar. Zugleich ist die gezielte Auswahl geeigneter Filterkombinationen entscheidend für die Nutzung autofluoreszenter Kontraste. Die entwickelten Programme tragen darüber hinaus zu einer effizienteren Auswertung und Visualisierung episkopischer Bilddaten bei.

9 Abstract

Three-dimensional analysis of biological tissue is extremely important for understanding complex spatial structures. However, traditional histological methods are predominantly based on two-dimensional section preparations, which means that spatial relationships can only be captured to a limited extent. Episcopic block sectioning methods, on the other hand, enable serial imaging of the surface of an embedded sample block and provide intrinsically registered image stacks for three-dimensional reconstructions. One challenge here is the optical transparency of paraffin-based embedments, as fluorescence signals from deeper layers can impair the contrast of the block surface.

To reduce these deep signals, paraffin was modified with the light-absorbing dye Sudan IV. The aim of this work was to investigate the physicochemical parameters of this embedding and to evaluate its influence on structural homogeneity and autofluorescence-based imaging.

For this purpose, Sudan IV-containing paraffin mixtures were analyzed under varying manufacturing conditions. The focus was on different cooling rates, incubation conditions, and variations in mixture composition. In addition, various combinations of excitation and emission filters were investigated to identify suitable spectral settings for imaging. New programs were developed for the evaluation of the experiments. An existing program for channel superposition was also extensively modified and further developed into an interactive, user-friendly application. Homogeneity was assessed based on gray value distributions in defined image regions.

The results show that incubation conditions and mixture composition had only a minor effect on homogeneity. The greatest influence was exerted by the cooling rate during paraffin solidification: faster cooling led to more homogeneous structures, while slow cooling resulted in greater inhomogeneities. In addition, the dispersion of gray values increased with increasing section depth. The investigation of different filter combinations also showed that suitable combinations of excitation and emission filters enable improved autofluorescence-based imaging of relevant structures.

Overall, the homogeneity of Sudan IV-containing paraffin embedments is primarily determined by the crystallization of the paraffin. Controlled cooling is therefore a key parameter for optimizing embedding. At the same time, the targeted selection of suitable filter combinations is crucial for the use of autofluorescent contrasts. The programs developed also contribute to more efficient evaluation and visualization of episcopic image data.

Literaturverzeichnis

- Bancroft, J. D., & Gamble, M. (2013). *Theory and practice of histological techniques* (7th ed.). Churchill Livingstone Elsevier.
- Brenner, E. (2025). Anatomie und Physiologie des Lymphgefäßsystems – Was man in der Klinik wissen sollte. *Radiologie*, 65(5), 301–306. <https://doi.org/10.1007/s00117-025-01432-2>
- Carl ROTH GmbH + Co. KG. (n.d.). Sudan IV (C. I. 26105), CAS Nr. 85-83-6. Abgerufen am 8. März 2026, von <https://www.carlroth.com/de/de/fettfarbstoffe/sudan-iv-%28c-%C2%A0i-26105%29/p/0327.2>
- Croce, A. C., & Bottirolì, G. (2014). Autofluorescence spectroscopy and imaging: A tool for biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*, 58, Article 2461. <https://doi.org/10.4081/ejh.2014.2461>
- Cserni, G., Maguire, A., Bianchi, S., Ryska, A., & Kovács, A. (2022). Sentinel lymph node assessment in breast cancer: An update on current recommendations. *Virchows Archiv*, 480, 95–107. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03128-z>
- Denk, W., & Horstmann, H. (2004). Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biology*, 2(11), e329. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020329>
- Elsässer, H.-P. (2021). *Allgemeine Histologie*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-63328-1>
- Ewald, A. J., McBride, H., Reddington, M., Fraser, S. E., & Kerschmann, R. (2002). Surface imaging microscopy: An automated method for visualizing whole embryo samples in three dimensions at high resolution. *Developmental Dynamics*, 225(3), 369–375.
- Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. In R. I. Freshney (Ed.), *Histopathology: Methods and protocols* (Vol. 1180). Springer.
- Ishii, Y., Sakamoto, Y., Ito, R., & Takahashi, S. (2021). Correlative microscopy and block-face imaging (CoMBI) method for three-dimensional analysis of biological specimens. *Scientific Reports*, 11, Article 92485. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92485-5>
- Jacob, A.M., Lindemann, A.F., Wagenpfeil, J. et al. Autofluorescence-based tissue characterization enhances clinical prospects of light-sheet-microscopy. *Sci Rep* 14, 18033 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67366-2>
- Jones, J. (2023, 30. März). Eine biologische Betrachtung der Autofluoreszenz: Warum Proben natürlich leuchten. Evident Scientific / Olympus LS. <https://evidentscientific.com/de/insights/a-biological-breakdown-of-autofluorescence-why-your-samples-naturally-glow>

- Kaufmann, S. H. E., Schaible, U. E., & Dorhoi, A. (2025). *Basiswissen Immunologie*. Springer Medizin.
- Kurazumi, H., Sakamoto, R., Ueno, K., Fujita, A., Matsunaga, K., Yanagihara, M., Takemoto, Y., Murakami, J., Oga, A., Katsura, S., & Hamano, K. (2025). Anastomotic leakage prevention using dry-preserved fibroblast cell sheets in esophageal reconstruction. *Regenerative Therapy*, 30, 795–801. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2025.09.011>
- Li, T., Hao, M., Pan, J., Zong, W., & Liu, R. (2017). Comparison of the toxicity of the dyes Sudan II and Sudan IV to catalase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(10), e21943.
- Liu, X., Tobita, K., Francis, R. J., & Lo, C. W. (2013). Imaging techniques for visualizing and phenotyping congenital heart defects in murine models. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 99(2), 93–105.
- Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*, 11, 227–256.
- Mulisch, M., & Welsch, U. (Eds.). (2010). *Romeis – Mikroskopische Technik* (18. Aufl.). Spektrum Akademischer Verlag.
- National Center for Biotechnology Information. (2025). PubChem compound summary for CID 62330, Sudan IV. PubChem. Abgerufen am 28. Februar 2026, von <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62330>
- Priya, N. S. (2023). Lymph nodes in health and disease: A pathologist's perspective. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 27(1), 6–11. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_40_23
- Riedelsheimer, B., & Büchl-Zimmermann, S. (2015). Färbungen. In M. Mulisch & U. Welsch (Eds.), *Romeis – Mikroskopische Technik*. Springer.
- Rosenthal, J., Mangal, V., Walker, D., Bennett, M., Mohun, T. J., & Lo, C. W. (2004). Rapid high resolution three-dimensional reconstruction of embryos with episcopic fluorescence image capture. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 72(3), 213–223.
- RÖMPP Online – Thieme Gruppe. (2018). Sudan IV. In RÖMPP Online – Lexikon der Chemie. Abgerufen am 28. Februar 2026, von <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-19-05645>
- Schärer, L. (2016). Histologische Techniken. In L. Cerroni (Ed.), *Histopathologie der Haut* (2. Aufl.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45565-4>
- Sterzel, H. (2025). Evaluierung der Anwendbarkeit von gefärbtem Paraffin zur Kontrastierung formalinfixierten Gewebes im Rahmen des Block-Face-Imaging (Bachelorarbeit). Hochschule Mittweida.

Weninger, W. J., & Geyer, S. H. (2008). Episcopic 3D imaging methods: Tools for researching gene function. *Current Genomics*, 9, 282–289.

Wick, M. R. (2019). The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology: An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 36(5), 303–311.

Tabelle 16: Übersicht verwendeter Hilfsmittel

Produkt	Genutzter Funktionsumfang	Textstellen
ChatGPT (OpenAI)	Unterstützung bei der Erstellung von ImageJ-Makros und pythonbasierten Programmen	Datengenerierung, Daten, Kanalüberlagerung und 3D-Rekonstruktion
BioRender	Erstellung schematischer Abbildungen	Abbildung 4
DeepL	Übersetzungen	Abstract

Anhang

Blatt 1: Hergestellte Einbettungen

Anhang Tabelle 17: Übersicht aller hergestellten Einbettungen

	Einbettung	P	St	SIV	X	BW
1	(P100)_GS	100	0	0	0	0
2	(P100)_KS	100	0	0	0	0
3	(P100)_O	100	0	0	0	0
4	(P100)_RT	100	0	0	0	0
5	(P99-6_SIV04)_GS	99,6	0	0,4	0	0
6	(P99-6_SIV04)_KS	99,6	0	0,4	0	0
7	(P99-6_SIV04)_O	99,6	0	0,4	0	0
8	(P99-6_SIV04)_RT	99,6	0	0,4	0	0
9	(P95-6_X4_SIV04)_GS	95,6	0	0,4	4	0
10	(P95-6_X4_SIV04)_KS	95,6	0	0,4	4	0
11	(P95-6_X4_SIV04)_RT	95,6	0	0,4	4	0
12	(P95-6_X4_SIV04)_O	95,6	0	0,4	4	0
13	(P95_St5)_GS	95	5	0	0	0
14	(P95_St5)_KS	95	5	0	0	0
15	(P95_St5)_O	95	5	0	0	0
16	(P95_St5)_RT	95	5	0	0	0
17	(P94-6_St5_SIV0-4)_GS	94,6	5	0,4	0	0
18	(P94-6_St5_SIV04)_GS2	94,6	5	0,4	0	0
19	(P94-6_St5_SIV04)_GS2_1	94,6	5	0,4	0	0
20	(P94-6_St5_SIV04)_GS2_1	94,6	5	0,4	0	0
21	(P94-6_St5_SIV04)_GS2_2	94,6	5	0,4	0	0
22	(P94-6_St5_SIV04)_GS2_4	94,6	5	0,4	0	0
23	(P94-6_St5_SIV04)_GS2_5	94,6	5	0,4	0	0
24	(P94-6_St5_SIV04)_KS	94,6	5	0,4	0	0
25	(P94-6_St5_SIV04)_O	94,6	5	0,4	0	0
26	(P94-6_St5_SIV04)_RT	94,6	5	0,4	0	0
27	LK01_(P94-6_St5_SIV0-4)_RT	94,6	5	0,4	0	0
28	LK02_1_(P94-6_St5_SIV0-4)_RT	94,6	5	0,4	0	0
29	LK02_2_(P94-6_St5_SIV0-4)_RT	94,6	5	0,4	0	0
30	LK03_2_(P94-6_St5_SIV0-4)_RT	94,6	5	0,4	0	0
31	(P94-6_St5_SIV04)_RT2_20_1	94,6	5	0,4	0	0
32	(P94-6_St5_SIV04)_RT2_20_2	94,6	5	0,4	0	0
33	(P94-6_St5_SIV04)_RT2_40_1	94,6	5	0,4	0	0
34	(P94-6_St5_SIV04)_RT2_40_2	94,6	5	0,4	0	0
35	(P94-6_St5_SIV04)_RT2_80	94,6	5	0,4	0	0
36	(P94-2_St5_SIV08)_GS2	94,2	5	0,8	0	0
37	(P94-2_St5_SIV08)_GS2_1	94,2	5	0,8	0	0
38	(P93-8_St5_SIV12)_GS2	93,8	5	1,2	0	0
39	(P93-8_St5_SIV12)_GS2_1	93,8	5	1,2	0	0
40	(P93-8_St5_SIV12)_GS2_1	93,8	5	1,2	0	0
41	(P93-8_St5_SIV12)_GS2_2	93,8	5	1,2	0	0
42	(P90-6_St5_X4_SIV0-4)_GS	90,6	5	0,4	4	0
43	(P90-6_St5_X4_SIV0-4)_GS2	90,6	5	0,4	4	0
44	(P90-6_St5_X4_SIV0-4)_GS2_1	90,6	5	0,4	4	0
45	(P90-6_St5_X4_SIV0-4)_KS	90,6	5	0,4	4	0
46	(P90-6_St5_X4_SIV0-4)_O	90,6	5	0,4	4	0
47	(P90-6_St5_X4_SIV0-4)_RT	90,6	5	0,4	4	0
48	LK03_1_(P90-6_St5_X4_SIV0-4)_RT	90,6	5	0,4	4	0
49	(P89-6_BW10_SIV0-4)_GS2	89,6	0	0,4	0	10
50	(P86-6_St5_X8_SIV04)_GS2	86,6	5	0,4	8	0
51	(P86-6_St5_X8_SIV0-4)_GS2_1	86,6	5	0,4	8	0
52	(P79-6_BW20_SIV0-4)_GS2	79,6	0	0,4	0	20
53	(P47-1_St2-5_BW50_SIV0-4)_GS2	47,1	2,5	0,4	0	50
54	(BW99-6_SIV0-4)_GS2	0	0	0,4	0	99,6

Blatt 2: Färbeprotokoll: HE-Färbung

Universitätsklinikum Jena
Klinik Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde
AG Clinical Biophotonic / AG MALDI Imaging

Work instruction	Hematoxylin eosin (H&E) staining		19.03.2024
created:	Ulrike Weyer	19.03.2024	Version V1
edited:			

1. PREPARATION

FFPE sections

(Dewaxing/ Rehydration)

1h for 60°C in open
 10 min Xylene I
 10 min Xylene II
 1 min Ethanol 100% I
 1 min Ethanol 100% II
 1 min Ethanol 95%

Cryo sections

(Fixation)

15 min Vacuum dry
 2 min Ethanol 70%
 2 min Ethanol 95%
 15 min Vacuum dry

After MALDI MSI

(Matrix off)

5 min Ethanol 80% I
 5 min Ethanol 80% II

2. STAINING

TIME OF HEMATOXYLIN AND EOSIN NEEDS TO BE ADJUSTED

5 min Hematoxylin (filter before staining)
 10 min Tap water → control of staining
 20 sec Eosin
 Rinse in Aqua dest
 3 min Ethanol 70% Föllung > Eosin
 3 min Ethanol 95%
 3 min Ethanol 100% I
 3 min Ethanol 100% II
 3 min Xylene I
 Up to 30 min Xylene II

3. MOUNTING

- cover the slides with Entellan new and coverslips

4. SOLUTION MAINTENANCE

- After around 20 to 40 slides change solutions with following rotation:

Discard solution I > place solution II to I > fill solution II with new solvent

FFPE:

Xylene I	Xylene II	100% EtOH I	100% EtOH II	95% EtOH
Discard, fill with Solution II	Rotate to I, new fill up	Discard, fill with Solution II	Rotate to I, new fill up	Discard, new fill up

Dehydration:

70% EtOH	95% EtOH	100% EtOH I	100% EtOH II	Xylene I	Xylene II
Discard, new fill up	Discard, new fill up	Discard, fill with Solution II	Rotate to I, new fill up	Discard, fill with Solution II	Rotate to I, new fill up

Blatt 3: Färbeprotokoll: AZAN-Färbung (Seite 1 von 2)

Universitätsklinikum Jena
Klinik Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde
AG Klinische Biophotonik / AG MALDI Imaging

Arbeitsanweisung	AZAN Färbung von FFPE Schnitten		11.02.2025
Erstellt:	Ulrike Weyer	01.03.2024	Version V1
Bearbeitet:	Daniela Pelzel	11.02.2025	V2
	Ulrike Weyer	26.02.2025	V3

1. CHEMIKALIEN

Azokarmin G	Merck	A1091-10G	
Anilin	Carl Roth	9846.1	
Phosphorwolframsäure	Diagonal	3D-092	
Anilinblau, wasserlöslich	Diagonal	1B-501	
Orange G	Diagonal	1B-221	
Xylol	Carl Roth	9713.3	SAP 1200961
Ethanol vergällt >99,8%	Carl Roth	K928.3	SAP 1201587
Eisessig (Essigsäure 100%)	Carl Roth	3738.1	

2. VORBEREITUNG**Azokarminfärbelösung:**

0,1 g Azokarmin G in 100 ml Aqua dest. Aufschwemmen
kurz aufkochen, abkühlen auf RT, filtrieren
vor Gebrauch 1% Eisessig zugeben

Anilinblau-Orange G-Färbelösung:

0,5 g Anilinblau und 2 g Orange G in 100 ml Aqua dest. Lösen
8 ml Eisessig zusetzen
aufkochen und nach Erkalten filtrieren
vor Gebrauch 1:2 verdünnen mit Aqua dest.

Anilin-Alkohol:

1 ml Anilin auf 1000 ml 96% Ethanol

Essigsäure-Alkohol:

10 ml Eisessig auf 1000 ml 96% Ethanol

5% Phosphorwolframsäure in Aqua dest.

Blatt 4: Färbeprotokoll: AZAN-Färbung (Seite 2 von 2)

Universitätsklinikum Jena**Klinik Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde****AG Klinische Biophotonik / AG MALDI Imaging**

Arbeitsanweisung	AZAN Färbung von FFPE Schnitten		11.02.2025
Erstellt:	Ulrike Weyer	01.03.2024	Version V1
Bearbeitet:	Daniela Pelzel	11.02.2025	V2
	Ulrike Weyer	26.02.2025	V3

3. FÄRBEPROTOKOLL**3.1 Entparaffinieren**

- 60 min bei 60°C anschmelzen
- 2x 5 min Xylol
- 5 min 99,8% Ethanol
- 5 min 96% Ethanol
- 5 min 70% Ethanol → Aqua dest.

3.2 AZAN-Färbung

- 5 min in vorgewärmte Azokarminlösung 56°C → 3x Aqua dest. spülen
- 2 min differenzieren in Anilin-Alkohol (bis nur noch Zellkerne gefärbt sind)
- 1 min Anilin in Essigsäure-Alkohol auswaschen
- 15 min in 5% Phosphorwolframsäure beizen → 3x Aqua dest. spülen
- 10-15 min in Anilinblau-Orange G-Essigsäure färben → 3x Aqua dest. Spülen

3.3 Entwässern und Eindecken

- 2 min 96% Ethanol
- 2x 3 min 99% Ethanol
- 2x 5 min Xylol → Eindecken mit Entellan

4. FÄRBEERGEBNIS

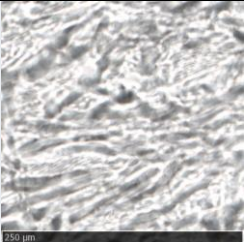
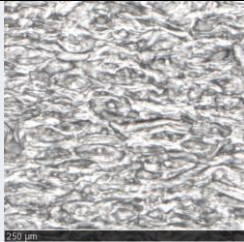
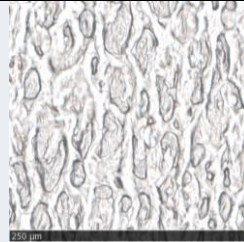
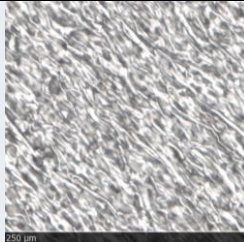
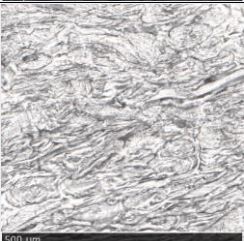
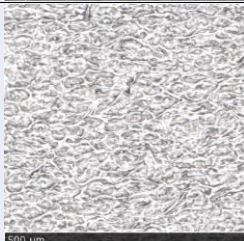
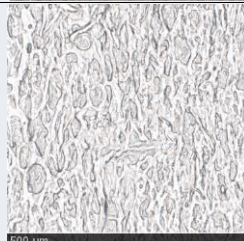
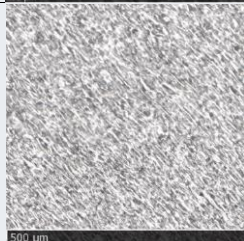
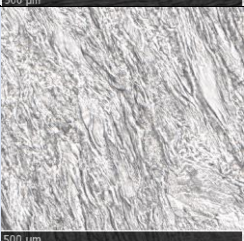
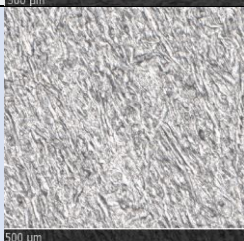
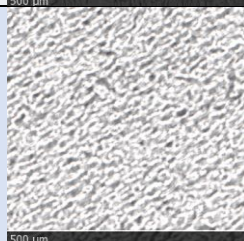
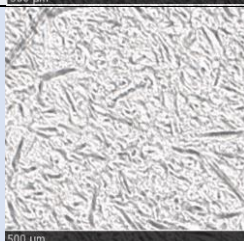
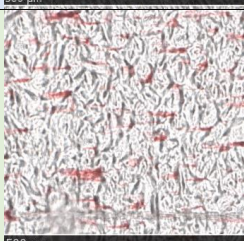
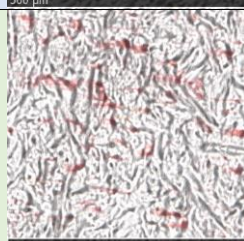
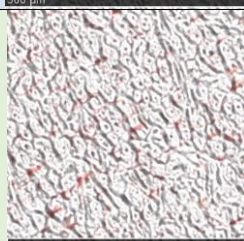
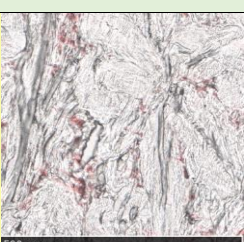
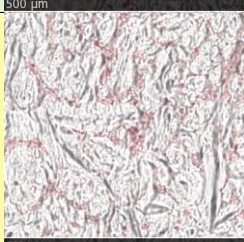
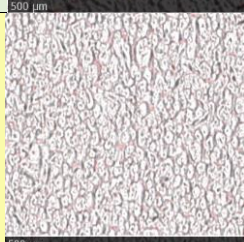
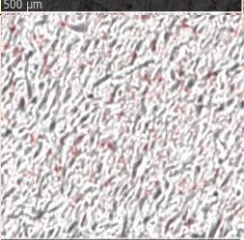
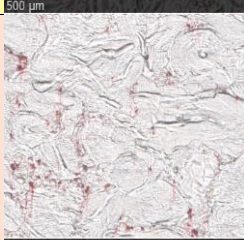
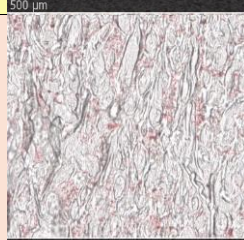
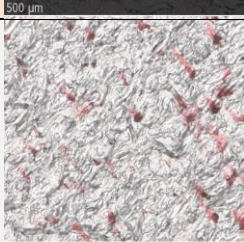
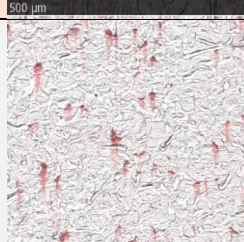
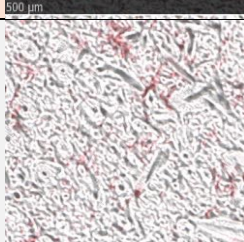
Blau: Kollagenes und retikuläres Bindegewebe, saure Mucosubstanzen

Rot: Kerne, Erythrozyten, Fibrin, Gliafibrillen

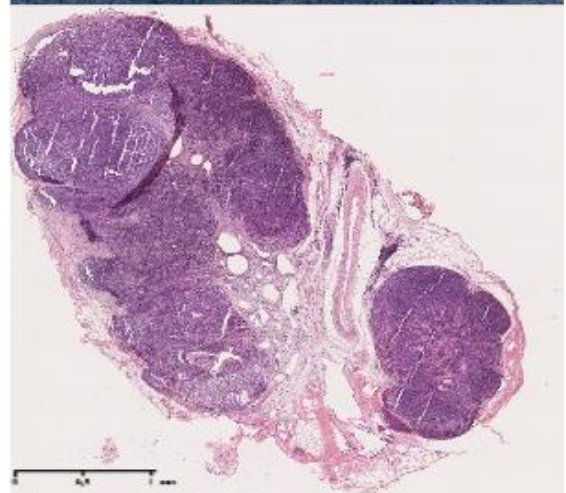
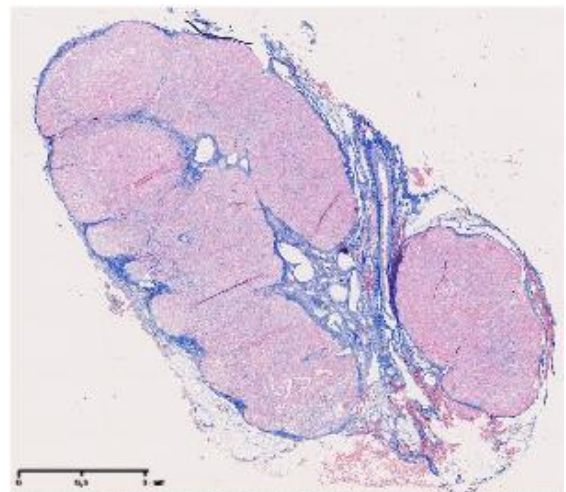
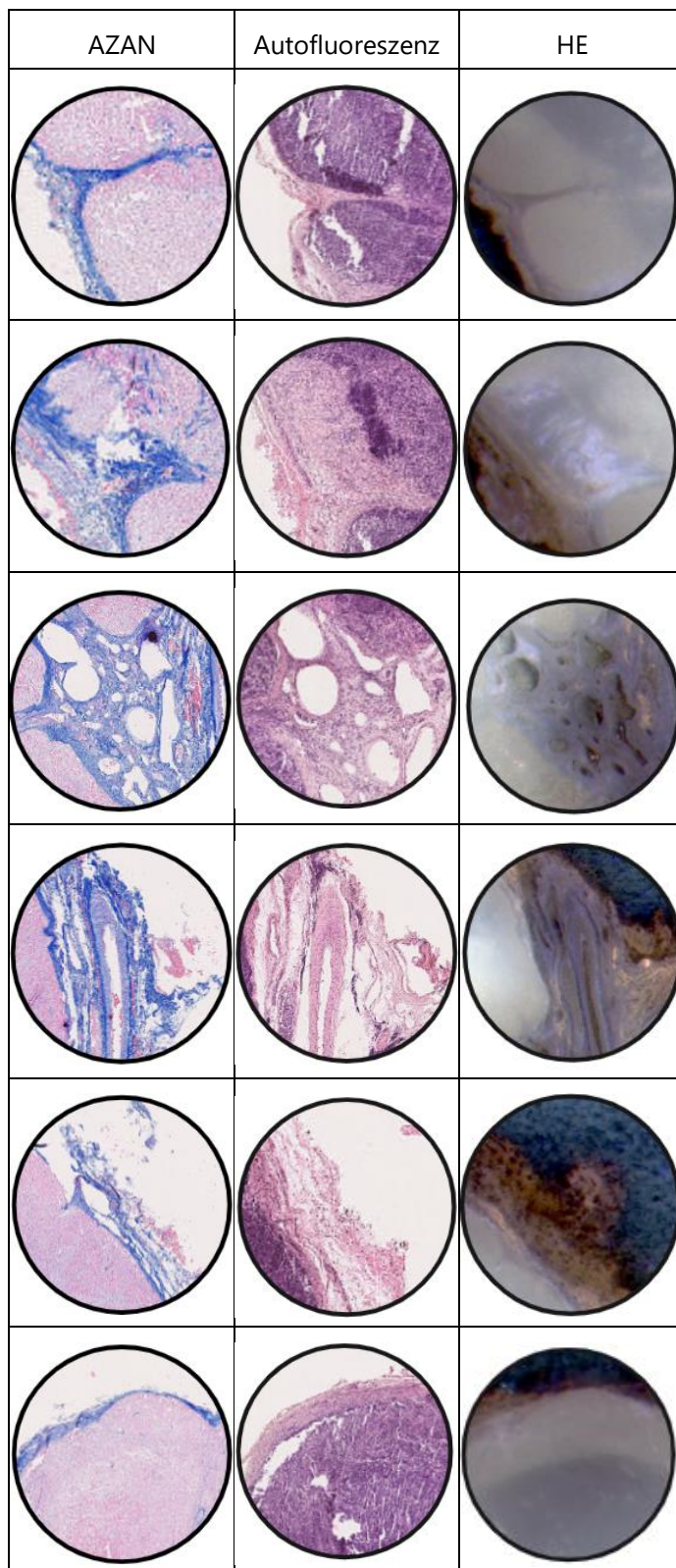
Rötlich bis orange: Muskelgewebe

Blatt 5: Einzelschnitte

Tabelle 18: 5 µm Schnittdicke, erfasst mit dem NanoZoomer.

7	_slow	_RT_KS	_KS	_GS_KS
(P) [250 µm]				
(P) [500 µm]				
(P_St)				
(P_SIV)	Nicht verfügbar			
(P_St_SIV)				
(P_St_X_SIV)				
(P_X_SIV)	Nicht verfügbar			

Blatt 6: Vergleich Autofluoreszenzbild-Vergleichsfärbung



Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbstständig angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form in noch keiner anderen Prüfung vorgelegen hat. Mir ist bewusst, dass ich Autor der vorliegenden Arbeit bin und volle Verantwortung für den Text trage.

Ich erkläre, dass ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken - dazu gehören auch Internetquellen - übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht und die entsprechenden Quellen angegeben habe.

Mir ist bewusst, dass meine Arbeit auf Plagiate überprüft werden kann. Mir ist bekannt, dass es sich bei der Abgabe eines Plagiats um ein schweres akademisches Fehlverhalten handelt und dass Täuschungen nach der für mich gültigen Prüfungsordnung geahndet werden.

Zusätzlich versichere ich, dass ich auf künstlicher Intelligenz (KI) basierende Werkzeuge nur in Absprache mit den Prüfern verwendet habe. Dabei stand meine eigene geistige Leistung im Vordergrund, und ich habe jederzeit den Prozess steuernd bearbeitet.

Diese Werkzeuge habe ich im Quellenverzeichnis in der Rubrik „Übersicht verwendeter Hilfsmittel“ mit ihrem Produktnamen und einer Übersicht des im Rahmen dieser Prüfungs-/Studienarbeit genutzten Funktionsumfangs unter Angabe der Textstelle in der Arbeit vollständig aufgeführt.

Ich versichere, dass ich keine KI-basierten Tools verwendet habe, deren Nutzung die Prüfer explizit schriftlich ausgeschlossen haben. Ich bin mir bewusst, dass die Verwendung von Texten oder anderen Inhalten und Produkten, die durch KI-basierte Tools generiert wurden, keine Garantie für deren Qualität darstellt.

Ich verantworte die Übernahme jeglicher von mir verwendeter maschinell generierter Passagen vollumfänglich selbst und trage die Verantwortung für eventuell durch die KI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

Miesitz, 12.03.26

Ort, Datum



Unterschrift der/des Kandidatin/Kandidaten