

5

10

15

20

**Verfahren zur optischen Klärung einer Gewebeprobe
mit einem Einbettungsmedium**

25

30

Die Erfindung betrifft ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff von Anspruch 1, ein Kit zur Präparation von biologischen Gewebeproben gemäß Anspruch 10 und eine Verwendung gemäß Anspruch 13.

35 Transparente biologische Gewebeproben werden benötigt, um die Gewebeproben zum Beispiel mittels Lichtblattmikroskopie dreidimensional abbilden zu können. Um die Transparenz von biologischen Präparaten zu erreichen, sind insbesondere Häm-Gruppen des Blutfarbstoffs Hämoglobin und Lipide aus den biologischen Präparaten zu entfernen. Bei den "entwässernden" Verfahren wird das Gewebe mit verschiedenen Mischungen eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels und Wasser behandelt. Die Behandlung wird mit einem aufsteigenden

40

Anteil des organischen Lösungsmittels durchgeführt, um das Wasser vollständig aus dem Gewebe zu entfernen. Hier gibt es mehrere Möglichkeiten, wie z.B. Tetrahydrofuran, Methanol, Isopropanol, tert. Butanol und Ethanol. Für das pathologische Gewebeclearing ist Ethanol zurzeit das meist genutzte Entwässerungsmedium. Das Endresultat aller "entwässernden" Verfahren ist eine wasserfreie Probe.

Der letzte Schritt der verschiedenen Clearingverfahren ist das Angleichen des Brechungsindex an den Brechungsindex des zu mikroskopierenden Gewebes. Der Brechungsindex von entwässertem Gewebe beträgt laut Spalteholz („Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten“, Verlag von S. Hirzel, 1911, Deutsches Reichs-Patent Nr. 229044) $n = 1.547$ für Knochen. Der Brechungsindex anderer Gewebe lässt sich anhand der von ihm empirisch ermittelten optimalen Mischungen auf ca. $n = 1.551$ abschätzen. Ein dermaßen hoher Brechungsindex erfordert den Einsatz aromatischer Verbindungen, die generell nicht mit Wasser mischbar sind. Spalteholz nutzte für seine Untersuchungen Mischungen aus Wintergrünöl (Methylsalicylat) und Benzylbenzoat oder Isosafrol in einem den unterschiedlichen Geweben angepassten Mischungsverhältnis.

Eine Variante des Spalteholz'sche Verfahrens ist aus Dodt, Leischner, Schierloh, Jährling, Mauch, Deininger, Deussing, Eder, Zieglgänsberger, Becker „Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain“. Nat Methods. 2007;4(4):331–6.) bekannt, bei dem "Murray's clear" (eine 2:1 Mischung aus Benzylbenzoat und Benzylalkohol mit einem Brechungsindex von $n = 1.559$) als Einbettungsmedium eingesetzt wird. Eine weitere Variante ist aus Becker, Jährling, Saghafi, Weiler, Dodt H „Chemical Clearing and Dehydration of GFP Expressing Mouse Brains" (2012) PLoS ONE 7(3): e33916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033916> bekannt. Es werden Einbettungsmedien von Spalteholz sowie einige weitere aromatische Verbindungen getestet. Dibenzylether (DBE, Brechungsindex $n = 1.562$) stellte sich als am besten geeignete Verbindung heraus und hat sich zum de facto Goldstandard beim Gewebeclearing etabliert. Der Vorteil des DBE beruht auch darauf, dass es in der Nutzung einfach ist, weil die Lösung nicht angemischt und dann auf den Brechungsindex überprüft werden muss; es kann direkt als Reinstoff genutzt werden.

Aus WO 2017/093323 A1 ist die Verwendung von Ethylcinnamat (ECi) und verwandter Cinnamylester als ungiftige Alternativen zu den bis dahin gängigen Einbettungsmedien bekannt. Es zeigt eine geringere akute und chronische Toxizität als die anderen zur Gewebebehandlung eingesetzten aromatischen Verbindungen, wie Dibenzylether, Benzylalkohol oder Benzylbenzoat. Da es als reine Substanz den gewünschten Brechungsindex erreicht, entfällt ein Mischschritt und damit ein Arbeitsschritt und eine mögliche Fehlerquelle.

Der Auswahl an flüssigen Reinstoffen, die sich als Einbettungsmedien für entwässerte Proben eignen, beschränkt sich somit zurzeit auf die zwei Verbindungen Dibenzylether und Ethylcinnamat. Beide Substanzen haben aber jeweils Nachteile: Dibenzylether ist giftig. Ethylcinnamat hat zwar eine geringe Toxizität, sein Schmelzpunkt liegt aber bei 6- 9°C, so dass die mit Ethylcinnamat geklärten Proben nicht im Kühlschrank aufbewahrt werden können, da das Einbettungsmedium dort auskristallisiert. Ethylcinnamat hat außerdem einen vergleichsweise hohen Dampfdruck.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung transparenter Gewebeprobe eines biologischen Gewebes zur lichtmikroskopischen Untersuchung bereitzustellen, das die vorstehenden Nachteile überwindet und insbesondere mit weniger Aufwand verbunden ist, als Mischungen als Einbettungsmedium herzustellen, Einbettungsmedien erhöhter Toxizität vermeidet und das gekühlte Lagern der entwässerten Gewebeproben erlaubt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren gemäß Patentanspruch 1. Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch ein Kit gemäß Patentanspruch 9 und die Verwendung gemäß Patentanspruch 11.

Weitere Ausführungsformen sind Gegenstand der Unteransprüche oder nachfolgend beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung transparenter Gewebeproben eines biologischen Gewebes zur lichtmikroskopischen Untersuchung umfasst die Schritte:

- a) Entwässern der Gewebeprobe mit einem entwässernden Lösungsmittel und
- b) Klären der entwässerten Gewebeprobe durch Einlegen in ein flüssiges Einbettungsmedium mit einem zum Gewebe passenden Brechungsindex.

Das Einbettungsmedium enthält einen Benzaldehyd-Anisol-Ether, bevorzugt ausgewählt aus 3-Methoxybenzaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd oder 4-Ethoxy-benzaldehyd.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient dazu, die optische Transparenz einer biologischen bzw. humanen Gewebeprobe für die Lichtmikroskopie zu erreichen. Das biologische Gewebe ist beispielsweise humanes Gewebe oder tierisches Gewebe.

Der Klärungsschritt des Clearingverfahrens ist das Angleichen des Brechungsindex an den Brechungsindex des zu mikroskopierenden Gewebes. Die Gewebeprobe wird hierzu in eine Brechungsindex-angleichende Lösung, das Einbettungsmedium, überführt. Das Einbettungsmedium muss mit dem Lösungsmittel des Entwässerungsschritts mischbar sein.

Das Einbettungsmedium enthält in einer Ausführungsform 10 bis 100 Vol.-% des Benzaldehyd-Ethers und 0 bis 90 Vol.-% eines optisch geeigneten, inerten organischen Lösungsmittels mit einem Brechungsindex von etwa 1,3, bevorzugt von etwa 1,5. Beispielsweise enthält das Ein-

5 bettungsmedium 90 bis 100 Vol.-% des Benzaldehyd-Ethers.

Das Einbettungsmedium enthält in einer anderen Ausführungsform 10 bis 100 Vol.-% des Benzaldehyd-Ethers und 0 bis 90 Vol.-% eines optisch geeigneten, inerten organischen Lösungsmittels mit einem Brechungsindex von etwa 2,0, bevorzugt von etwa 1,65. Beispielsweise enthält das Einbettungsmedium 90 bis 100 Vol.-% des Benzaldehyd-Ethers.

10 Alle erfindungsgemäßen Prozentangaben erfolgen in Volumenprozent (Vol.-%).

In der bevorzugten Ausführungsform besteht das Einbettungsmedium aus einem der erfindungsgemäßen Benzaldehyd-Anisol-Ether, d.h. der Benzaldehyd-Anisol-Ether wird als Reinsubstanz eingesetzt. Als Reinsubstanz wird dabei der Benzaldehyd-Anisol-Ether in der technisch verfügbaren Reinheit verstanden.

15

Der Benzaldehyd-Ether ist ein Benzaldehyd-Anisol-Ether. Bevorzugt ist der Benzaldehyd-Anisol-Ether ausgewählt aus 3-Methoxybenzaldehyd (meta-Anisaldehyd; CAS Nr. 591-31-1), 4-Methoxybenzaldehyd (para-Anisaldehyd; CAS Nr. 123-11-5), 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd (6-Hydroxy-m-Anisaldehyd; CAS Nr. 672-13-9) oder 4-Ethoxy-benzaldehyd (HomoAnisaldehyd; CAS Nr. 10031-82-0). 3-Methoxybenzaldehyd weist als technisches Produkt eine Reinheit von ca. 97,0 % auf. 4-Methoxybenzaldehyd weist als technisches Produkt eine Reinheit von ca. 97,0 % auf. 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd weist als technisches Produkt eine Reinheit von ca. 98,0 % auf. 4-Ethoxy-benzaldehyd weist als technisches Produkt eine Reinheit von ca. 99 % auf.

20

25

Der Entwässerungsschritt a) dient dazu, eine wasserfreie Gewebeprobe zu erhalten. Die Gewebeprobe wird in einer Ausführungsform in mehreren Durchgängen bevorzugt mit verschiedenen Dehydratisierungs-Zusammensetzungen mit einer absteigenden Wasserreihe behandelt, d.h.

30 Mischungen mit einem aufsteigenden Anteil eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels, um das Wasser aus dem Gewebe zu entfernen. Als entwässerndes Medium werden Alkohole, Ketone oder Ether eingesetzt. Geeignete entwässernde Lösungsmittel sind z.B. Ethanol, Methanol, Isopropanol, Tert. Butanol (IUPAC: 2-Methylpropan-2-ol), Tetrahydrofuran oder Aceton.

35

Das Entwässerungsmedium hat dabei folgende Eigenschaften: 1. es mischt sich vollständig mit Wasser, damit über eine aufsteigende Konzentrationsreihe dem Gewebe schrittweise das Wasser und das Fixationsmittel entzogen werden kann und 2. es mischt sich vollständig mit dem

Einbettungsmedium, welches den Brechungsindex an den des entwässerten Gewebes angleicht.

- 5 In einer alternativen Ausführungsform erfolgt der Entwässerungsschritt a) mit 2,2-Dimethoxypropan (DMP), das durch eine chemische Reaktion mit dem im Gewebe enthaltenen Wasser dieses Wasser aus dem Gewebe entfernt.

- 10 Beim erfindungsgemäßen Verfahren umfasst der Entwässerungsschritt a) in einer Ausführungsform zum Erhalt einer wasserfreien Gewebeprobe die Anwendung von Dehydratisierungs-Zusammensetzungen
- aus wässrigem Ethanol mit steigenden Konzentrationen von Ethanol, wobei die Ethanolkonzentrationen der Dehydratisierungs-Zusammensetzungen von 30% bis 100 Vol-% reichen oder
 - 15 - aus wässrigem Tetrahydrofuran mit steigenden Konzentrationen von Tetrahydrofuran, wobei die Tetrahydrofurankonzentration der Dehydratisierungs-Zusammensetzungen von 30% bis 100 Vol-% reichen oder
 - aus wässrigem Methanol mit steigenden Konzentrationen von Methanol, wobei die Methanolkonzentrationen der Dehydratisierungs-Zusammensetzungen von 30% bis 100 Vol-% reichen oder
 - 20 - aus einer wässrigen Mischung eines anderen Alkohols, Ketons oder Ethers, wobei die Lösungsmittelkonzentration der Dehydratisierungs-Zusammensetzungen von 30% bis 100 Vol-% reichen.

- 25 In einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Entwässerungsschritt a) zum Erhalt einer Gewebeprobe mit einem Restwassergehalt >2 % unter Anwendung von Dehydratisierungs-Zusammensetzungen
- aus wässrigem Ethanol mit steigenden Konzentrationen von Ethanol, wobei die Ethanolkonzentrationen der Dehydratisierungs-Zusammensetzungen von 50% bis 98 Vol-%, bevorzugt 70 % bis 98% , besonders bevorzugt 75 bis 98 Vol.% reichen oder
 - 30 - aus einer wässrigen Mischung eines anderen Alkohols, Ketons oder Ethers, wobei die Lösungsmittelkonzentration der Dehydratisierungs-Zusammensetzungen von 50% bis 98 Vol-%, bevorzugt 70 % bis 98% , besonders bevorzugt 75 bis 98 Vol.% reichen.

- Die eingesetzten Dehydratisierungs-Zusammensetzungen enthalten bevorzugt, auch in der letzten Stufe des Entwässerungsschritts noch 2-30 Vol.-% Wasser. In dieser Ausführungsform
- 35 kann beispielsweise auch vergällter Ethanol mit einem Restwassergehalt von z.B. 4-6 Vol.-% eingesetzt werden.

- In einer weiteren alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Entwässerungsschritt a) in einem Gradientenmischer durchgeführt. Hierzu wird eine Gewebeprobe in ein Mischgefäß (Gradientenmischer) eingebracht. Es wird über einen Eingang ein entwässerndes Lösungsmittel eingebracht bis ein Restwassergehalt von 5 bis 20 Vol.-% erreicht ist. Das entwässernde Lösungsmittel kann eine Lösungsmittelkonzentration von 100 Vol.-% haben oder einen Restwassergehalt zwischen 2 und 50 Vol.-% aufweisen. In einer Variante wird die Gewebeprobe im Gradientenmischer zu Beginn direkt in ein entwässerndes Lösungsmittel mit einer Lösungsmittelkonzentration von 50 Vol.-% eingebracht und der Gradient dann in kleinen Schritten erhöht.
- Bevorzugt wird die Gewebeprobe direkt aus dem Gradientenmischer in das Einbettungsmedium überführt, ohne dass es vorher in hochreinem Lösungsmittel inkubiert wird. Ein Inkubationsschritt in hochreinem Lösungsmittel findet bevorzugt in Schritt a) und Schritt b) nicht statt.
- Es ist überraschend, dass eine Klärung der Gewebeproben auf diese Weise möglich ist. Nach dem Stand der Technik läuft das Verfahren in einem Gradientenmischer wie folgt ab: Eine Gewebeprobe wird in ein Mischgefäß (Gradientenmischer) eingebracht. Dieses hat z.B. einen Eingang oben, und einen Ausgang seitlich. Wenn die Probe in 50% Ethanol in dieses Mischgefäß eingelegt wird und über den Eingang mit einer Dosierpumpe mit hoher Konzentration (> 95 Vol.-% Lösungsmittel) eingebracht wird, dann baut sich ein Gradient auf, der asymptotisch den Wert von 100 Vol.-% zu erreichen versucht. Auf diese Weise wird der Probe ein vorteilhafter stetig ansteigenden Ethanolgehalt angeboten. Da bei der Mischung die 100% nie erreicht werden kann, wird die Probe üblicherweise nachträglich noch in hochreinem Ethanol inkubiert. Nach dem Stand der Technik wird dieser Inkubationsschritt mehrfach wiederholt. Daher kann die Dosierpumpe in der Praxis aus kostentechnischen Gründen mit technischem Ethanol befüllt werden.
- Erfindungsgemäß ist 1. der letzte (gegebenenfalls wiederholte) Inkubationsschritt mit absolutem Ethanol überflüssig geworden und 2. ist der mit dem Gradientenmischer erreichte Endpunkt, so lange er über etwa 80% Ethanol liegt, für die weitere Klärung der Gewebeprobe in Schritt b) ausreichend.
- In einer weiteren alternativen Ausführungsform wird der Entwässerungsschritt a) in einem einzigen Durchgang durchgeführt. Es wird keine Entwässerungsreihe mit mehreren Durchgängen verwendet, sondern die Entwässerung gemäß Schritt a) erfolgt in einem einzigen Durchgang durch Einlegen der Gewebeprobe in entwässerndes Lösungsmittel mit einer Lösungsmittelkonzentration von mindestens 70 Vol.-%. Diese Ausführungsform eignet sich besonders für Gewebeproben mit kompaktem Gewebe, die wenig Wasser aufnehmen. Im nachfolgenden Schritt b)

wird die Gewebeprobe sofort in das Einbettungsmedium gegeben, wiederum ohne Inkubation in einem hochreinen Lösungsmittel zur vollständigen Entwässerung. Dieses führt zu einem deutlichen Zeitgewinn und gleichzeitig auch zu einer deutlichen Einsparung bei den verwendeten Reagenzien. Die Einsparung bei den Reagenzien ergibt sich dabei zum einen aus der geringeren
5 Menge Lösungsmittel, die benötigt wird. Zum anderen ist es nicht mehr notwendig ein hochreines wasserfreies Lösungsmittel einzusetzen, sondern es kann ein Lösungsmittel in technischer Qualität verwendet werden. Bei Ethanol muss beispielsweise nicht teurer 100% hochreiner Ethanol verwendet werden, sondern es kann der deutlich kostengünstigere vergällte Ethanol verwendet werden. Nach dem Stand der Technik wird die Inkubation mit hochreinem wasser-
10 freien Lösungsmittel wiederholt, um die letzten Reste Wasser vollständig zu entfernen, auch wird in vielen Protokollen die Inkubation in dem Einbettungsmedium aus dem gleichen Grund wiederholt. Da erfindungsgemäß in beiden Ausführungsformen die abschließenden Inkubationen zur sicheren Entfernung von Restwasser aus dem Gewebe entfallen, werden gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens Reagenzien eingespart.

15

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Gewebeprobe, bevor sie in Schritt a) dehydriert und Schritt b) optisch geklärt wird,

- fixiert und/oder
- mit Formaldehyd fixiert und/oder
- 20 • gewaschen und/oder
- mit Wasser gewaschen und/oder
- in einer wässrigen alkalischen Lösung mit nicht-ionischem Detergens inkubiert. und/oder
- mit einer Detergenzienlösung delipidiert (Delipidierung) und/oder
- 25 • mit einem organischen Lösungsmittel delipidiert (Delipidierung) und/oder
- mit oxidierenden Reagenzien gebleicht und/oder
- mit Aminoalkoholen entfärbt.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Gewebeprobe, bevor sie
30 in Schritt a) dehydriert und Schritt b) optisch geklärt wird, fixiert und das Fixierungsmittel ausgewählt aus

- vernetzenden Fixantien wie Formaldehyd, Glutaraldehyd, Acrolein, Carbodiimide, Diethylpyrocarbonat, Bisimido-Ester oder Glyoxal oder Mischungen hiervon, und/oder
- koagulierenden Fixantien wie Alkoholen und anderen organischen Lösungsmitteln, Säuren,
- 35 Kaliumdichromat, Bleinitrat, Kupfersulfat und Quecksilberchlorid und Mischungen hiervon.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird bevorzugt nach Gewebevorbereitungsschritten und nach Elektrophorese-Schritten durchgeführt. Die im erfindungsgemäßen Verfahren behandelte

Gewebeprobe ist somit bereits vorbehandelt. Die Vorbehandlung durch Elektrophorese erfolgt bevorzugt gemäß dem in DE 10 2016 123 458 B3 beschriebenen Verfahren zur elektrophoretischen Klärung. Für die Durchführung der elektrophoretischen Klärung wird Bezug genommen auf die Patentschrift DE 10 2016 123 458 B3, deren Inhalt hiermit in diese Anmeldung aufgenommen wird.

Die optisch geklärte Gewebeprobe wird im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt in einem weiteren Schritt unter einem Mikroskop untersucht, um ein Bild der inneren Struktur der Probe zu erhalten, wobei das Mikroskop ein Lichtmikroskop, bevorzugt ein Lichtscheibenmikroskop, ein Konfokal-Mikroskop, ein Zwei-Photonen-Mikroskop oder ein optisches Projektionstomographie-Mikroskop (OPT) ist.

Das bisher verwendete Einbettungsmedium Dibenzylether (DBE) weist einen Brechungsindex von $n = 1.562$ auf. Der zweite Reinstoff Ethylcinnamat besitzt einen Brechungsindex von $n = 1.559$. Von den erfindungsgemäßen Benzaldehyd-Anisol-Ethern besitzt z. B. 3-Methoxybenzaldehyd einen Brechungsindex von $n = 1.552$ und 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd einen Brechungsindex von $n = 1.580$. Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Benzaldehyd-Anisol-Ether als Einbettungsmedium für Gewebeclearing von entwässerten Gewebeproben konnte eine zumindest identische Durchsichtigkeit, teilweise eine verbesserte Durchsichtigkeit gegenüber Gewebeproben erzielt werden, die mit Methylsalicylat/Benzylbenzoat und mit Ethylcinnamat behandelt wurden.

Die Arbeiten von Spalteholz lassen bereits vermuten, dass sich die Brechungsindizes unterschiedlicher Gewebe leicht voneinander unterscheiden. In seiner Originalveröffentlichung von 1911 wird folgende, an Hand des optimalen Mischungsverhältnisses von Methylsalicylat und BB empirisch bestimmten Reihe menschlicher Gewebe mit aufsteigendem Brechungsindex aufgeführt: junge Embryonen (5:1-3:1 je nach Gewicht) < erwachsene entkalkte Knochen (5:3) $n = 1.547$ < erwachsene Muskulatur ungefähr wie ältere Embryonen (2:1) < Gehirn und Rückenmark (1:1). Diese Variabilität hat direkte Folgen für die Durchsichtigkeit der unterschiedlichen Gewebe und deren mikroskopischen Untersuchung und insbesondere für quantitativ-spektroskopische Bestimmungen, welche mit einem Mikroskop durchgeführt werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet den Vorteil, dass verschiedene Reinstoffe als Einbettungsmedium eingesetzt werden, die je nach Gewebe ausgewählt werden können, um sich dem Brechungsindex des Gewebes anzunähern.

Gegenüber den bisher üblicherweise benutzten Einbettungsmedien Benzylbenzoat/Benzylalkohol-Mischungen (BABB) und Methylsalicylat-BenzylBenzoat-Mischungen besitzen die Benzaldehyd-Anisol-Ether somit den Vorteil, dass sie, genau wie Dibenzylether, als reine Substanz

eingesetzt werden können: Da bereits die reine Substanz den gewünschten Brechungsindex erreicht, muss der Brechungsindex nicht durch Anmischen des Einbettungsmediums eingestellt werden. Somit entfällt ein Mischschritt und damit ein überflüssig gewordener Arbeitsschritt und eine mögliche Fehlerquelle.

5

Überraschenderweise dringen die erfindungsgemäßen Benzaldehyd-Anisol-Ether deutlich schneller in das entwässerte Gewebe ein als die bisher bekannten Einbettungsmedien und machen das Gewebe schnell durchsichtig. Bei der Vorbereitung der Probe lässt sich hierdurch Zeit einsparen und die Probe kann schneller der Untersuchung unter dem Lichtmikroskop zugeführt werden. Entsprechend liegen auch schneller die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen vor. Die Dichte des entwässerten Gewebes wird durch die Dichte des noch im Gewebe enthaltenen entwässernden Lösungsmittels, z.B. Ethanol bestimmt. Da das Einbettungsmedium typischerweise eine höhere Dichte aufweist, ist die vollständige Eindringung des Einbettungsmediums in die Gewebeprobe gut durch das Absinken der Gewebeprobe im Einbettungsmedium nachzuverfolgen. Beispielweise wird mit 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd bereits nach 30-45 min ein vollständiges Eindringen des Einbettungsmediums in die Gewebeprobe erreicht d.h. die Gewebeproben liegen auf dem Gefäßboden. Bei herkömmlichen Einbettungsmedien wie Dibenzylether oder und Methylsalicylat-BenzylBenzoat-Mischungen sind dagegen typischerweise mehrere Stunden bis über Nacht für diesen Verfahrensschritt üblich. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet somit den Vorteil, dass das Einbettungsmedium schneller in das Gewebe der Gewebeprobe diffundiert und bei der Vorbereitung der Probe eine deutliche Zeitersparnis erreicht wird. Die Gewebeproben können somit schneller lichtmikroskopisch untersucht werden.

25 Wenn die Gewebeprobe Restwasser enthält und in ein organisches Lösungsmittel als Einbettungsmedium überführt wird, in dem sich dieses Wasser nicht mehr lösen kann, wird das Wasser im Gewebe gefangen und führt auf Grund der unvollständigen Mischbarkeit zu einer die Durchsichtigkeit beeinträchtigenden Turbidität. Die Gewebeproben werden deshalb bisher z.B. üblicherweise mehrfach mit hoch-reinem Ethanol und oft anschließend wiederholt mit Einbettungsmedium inkubiert, um eine Beeinträchtigung der Transparenz der Probe zu vermeiden. Nach dem Stand der Technik wird deshalb, wie bereits erläutert, die Inkubation mit hochreinem wasserfreien Lösungsmittel wiederholt, um die letzten Reste Wasser vollständig zu entfernen, auch wird in vielen Protokollen die Inkubation in dem Einbettungsmedium aus dem gleichen Grund wiederholt.

35

Erfindungsgemäß erfolgt die Klärung des Gewebes mit einem Benzaldehyd-Anisol-Ether. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass eine gute Transparenz auch bei Gewebeproben erreicht werden kann, die Restwasser enthalten. Bei kleinen Restwasseranteilen von 2-5 Vol.-%

ist keinerlei Beeinträchtigung der Transparenz zu beobachten, und selbst bei hohen Wasseranteilen von bis zu 20 % bzw. bis zu 30 Vol.-%, abhängig von der behandelten Gewebearart, wird nur eine sehr geringe Turbidität beobachtet, die noch eine lichtmikroskopische Untersuchung der Probe zulässt.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet daher ein besonders schnelles und einfaches Verfahren zur Entwässerung einer Gewebeprobe, da anders als bei allen bisher bekannten Einbettungsmedien ein geringer Restwasseranteil bis zu 10 Vol.-% keine Beeinträchtigung der lichtmikroskopischen Ergebnisse bedingt und auch größere Restwassermengen noch zu einer akzeptablen Transparenz der Gewebeprobe führen.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt auch eine vereinfachte Verfahrensführung gegenüber Klärungsverfahren mit herkömmlichen Einbettungsmedien. Gemäß Stand der Technik wird die Gewebeprobe beim Entwässern von Gefäß zu Gefäß überführt mit einer dabei steigenden Konzentration des entwässernden Lösungsmittels, also z.B. mit einer steigenden Ethanolkonzentration. Es werden also recht viele Einzelschritte nötig und die Schritte sind diskret. Außerdem muss im letzten Schritt bzw. den letzten Schritten immer hochreines Lösungsmittel z.B. hochreiner Ethanol eingesetzt werden.

15

Beim erfindungsgemäßen Verfahren kann auch ein entwässerndes Lösungsmittel mit einem Restanteil an Wasser verwendet werden. So kann z.B. vergällter 95-97 %-iger technischer Ethanol anstelle des hochreinen Ethanols eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren führt daher auch zu einer Kosteneinsparung bei den eingesetzten Lösungsmitteln.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt auch eine vereinfachte Verfahrensführung bei Verwendung eines Gradientmischers, weil hier ebenfalls keine anschließende vollständige Entwässerung mit einem hochreinen Lösungsmittel erfolgen muss.

25

Die Benzaldehyd-Anisol-Ether weisen zudem eine geringe Toxizität auf. Dieses ist bei der Benutzung als Einbettungsmedium vorteilhaft, da sich die Gewebeprobe im Mikroskop unmittelbar unterhalb der Atemwege des Benutzers befindet und dieser von der Probe aufsteigende Dämpfe einatmen kann. Die Toxizität von para-Anisaldehyd ist laut der Europäischen Chemikalienagentur ECHA toxikologisch unbedenklich, anders als Dibenzylether oder Benzylbenzoat/Benzylalkohol-Mischungen.

30

35

Das erfindungsgemäße Kit zur Präparation von biologischen Gewebeproben für die Lichtmikroskopie, enthält:

- ein entwässerndes Lösungsmittel zum Entwässern der Gewebeprobe und
- ein Einbettungsmedium zum Klären der entwässerten Gewebeprobe durch Einlegen in das Einbettungsmedium,

wobei

- 5 das Einbettungsmedium ein Benzaldehyd-Anisol-Ether, wie vorstehend beschrieben, ist, ausgewählt aus 3-Methoxybenzaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd und 4-Ethoxy-benzaldehyd. Der Benzaldehyd-Anisol-Ether wird bevorzugt in den vorstehend beschriebenen Konzentrationen und Reinheiten eingesetzt.
- 10 Das entwässernde Lösungsmittel im Kit ist ein Ether, Keton oder Alkohol, bevorzugt ist das Lösungsmittel ausgewählt aus Ethanol, Methanol, Isopropanol, tert. Butanol, 2,2' Thiodiethanol, Trichloroethanol, Tetrahydrofuran und Aceton.

Erfindungsgemäß erfolgt die Verwendung eines Benzaldehyd-Anisol-Ethers

- 15 ausgewählt aus 3-Methoxybenzaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd oder 4-Ethoxy-benzaldehyd
als Einbettungsmedium für die Präparation einer biologischen insbesondere humanen Gewebeprobe für die lichtmikroskopische Untersuchung.
Der erfindungsgemäß verwendete Benzaldehyd-Anisol-Ether wird bevorzugt in den vorstehend
20 beschriebenen Konzentrationen und Reinheiten verwendet.

Beispiele

25 Beispiel 1

Es wurden mehrere Gewebeproben (Schweinelunge) mit einem Volumen von etwa 0,25 ml (0,5x0,5x1 cm³) in absolutem Ethanol entwässert und fotografiert. Die mit Ethanol entwässerten Gewebeproben sind in Figur 1, linke Seite dargestellt.

- 30 Die entwässerten Gewebeproben wurden dann für 3 Stunden in 5 ml des jeweiligen Einbettungsmediums gegeben. Als Einbettungsmedien wurden erfindungsgemäß 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd und als Vergleichsbeispiel ein Gemisch von Methylsalicylat mit Benzylbenzoat mit dem 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd angeglichenen Brechungsindex verwendet. Das Resultat des Klärungsschritts wurde ebenfalls fotografiert. Die Ergebnisse sind in Figur 1,
- 35 rechte Seite dargestellt. Es zeigt sich, dass zwar bereits die Klärung mit Methylsalicylat/Benzylbenzoat zu einer guten Durchsichtigkeit der Gewebeprobe führt. Mit dem erfindungsgemäßen 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd konnte aber eine noch bessere Transparenz erzielt werden.

Beispiel 2

Es wurden mehrere Gewebeproben (Schweinelunge) mit einem Volumen von etwa 0,25 ml
5 (0,5x0,5x1 cm³) wie in Beispiel 1 beschrieben, vorbereitet, wobei als Einbettungsmedien 2-Hydroxy-5-Methoxybenzaldehyd, EthylCinnamat und Dibenzylether verwendet wurden.

Dann wurden die Gewebeproben in absolutem Ethanol über Nacht gelagert und das Einbettungsmedium so wieder aus den Gewebeproben rausgewaschen. Die Gewebeproben wurden
10 in Ethanol mit definierten Wassergehalten überführt, um einen definierten Restwasseranteil im Gewebe zu erreichen, 2 Stunden inkubiert und anschließend wieder in das jeweilige Einbettungsmedium gegeben, um fotografiert zu werden. Die Gewebeproben wurden in Ethanol mit 95 Vol.-% Ethanolgehalt, 90 Vol.-% Ethanolgehalt und 80 Vol.-% Ethanolgehalt gegeben. Die Resultate wurden fotografiert und sind in Figur 2 dargestellt. Die erste Reihe zeigt die zu 100 %
15 entwässerten Gewebeproben in den Einbettungsmedien, die zweite Reihe zeigt die in Ethanol mit 5 Vol.-% Wassergehalt inkubierten Gewebeproben im Einbettungsmedium, die dritte Reihe zeigt die in Ethanol mit 10 Vol.-% Wassergehalt inkubierten Gewebeproben im Einbettungsmedium und die vierte Reihe zeigt die in Ethanol mit 20% Wassergehalt inkubierten Gewebeproben im Einbettungsmedium. Die untere Reihe zeigt die gleichen Gewebeproben in absolutem
20 Ethanol, d.h. bevor sie in die jeweiligen Einbettungsmedien gegeben werden. Vollständig entwässert in Ethanol sind alle Proben gleichermaßen undurchsichtig.

Es zeigt sich, dass die aus dem Stand der Technik bekannten Einbettungsmedien Dibenzylether und Ethylcinnamat nur bei keinem Restwasser oder nur einer sehr geringen Restwassermenge die gewünschte Transparenz erreichen. Bei DBE reicht bereits eine Restwassermenge von 5 Vol.-% aus, damit die Probe nicht mehr durchsichtig wird und daher nicht mikroskopiert werden kann. Auch ECI zeigt bei einer Restwassermenge von 95 % schon eine deutliche Eintrübung, und die Gewebeprobe ist nichtmehr vollständig durchsichtig. Die mit 2-Hydroxy-5-Methoxybenzaldehyd geklärten Gewebeproben bleiben hingegen selbst bei einer Restwassermenge von 10 Vol.-% (90 Vol.-% Ethanol) vollständig durchsichtig und zeigen erst bei 20
30 % Restwasser (80% Ethanolgehalt) eine leichte Eintrübung.

Beispiel 3

35 Gewebeproben mit einem Volumen von etwa 0,25 ml (0,5x0,5x1 cm³) wurden in absolutem Ethanol entwässert. Anschließend wurden sie in ein Einbettungsmedium in einem Probengefäß überführt. Als Einbettungsmedien wurden erfindungsgemäß 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd

und als Vergleichsbeispiel Dibenzylether und Mischungen von Methylsalicylat mit Benzylbenzoat verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass bei 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd die Gewebeprobe schon nach 15 min deutlich unter der Oberfläche hing und abhängig von der Art des Gewebes nach 30-45 min auf dem Boden des Gefäßes lag. In Dibenzylether sank die Gewebeprobe erst nach mehreren Stunden zu Boden, vergleichbar mit der Zeit, die Mischungen von Methylsalicylat/Benzylbenzoat und DBE benötigen.

In einem weiteren Versuch wurden die Geschwindigkeit bestimmt, mit der das entwässernde Lösungsmittel Ethanol in einer Gewebeprobe durch die Einbettungsmedien ersetzt wurde. Als Einbettungsmedien wurden das erfindungsgemäße 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd und als Vergleichsbeispiele Dibenzylether und Ethylcinnemat verwendet. Die Gewebeproben wurden für 15 min, 30 min und 70 min in das Einbettungsmedium gelegt und dann fotografiert. Die Ergebnisse sind in Figur 3 dargestellt. In der oberen Reihe sind die Gewebeproben nach 15 min Klärung fotografiert. In der mittleren Reihe sind die Gewebeproben nach 30 min Klärung fotografiert. In der unteren Reihe sind die Gewebeproben nach 70 min Klärung fotografiert. Es ist zu erkennen, dass die mit 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd behandelte Gewebeprobe bereits nach 70 Min durchsichtig ist, während die mit ECi behandelte Probe nur eine leichte Durchsichtigkeit zeigt und die mit DBE behandelte Gewebeprobe noch gar nicht durchsichtig ist. Mit dem erfindungsgemäßen Klärungsverfahren wird somit eine deutlich schnellere Klärung der Gewebeprobe erreicht.

Die Erfindung ist nicht auf eine der vorbeschriebenen Ausführungsformen beschränkt, sondern in vielfältiger Weise abwandelbar.

Sämtliche aus den Ansprüchen, der Beschreibung und der Zeichnung hervorgehenden Merkmale und Vorteile, einschließlich Verfahrensschritten, können sowohl für sich als auch in den verschiedensten Kombinationen erfindungswesentlich sein.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung transparenter Gewebeprobe eines biologischen Gewebes zur
5 lichtmikroskopischen Untersuchung, umfassend die Schritte:
 - a) Entwässern der Gewebeprobe mit einem entwässernden Lösungsmittels und
 - b) Klären der entwässerten Gewebeprobe durch Einlegen in ein Einbettungsme-
dium enthaltend einen Benzaldehyd-Anisol-Ether ausgewählt aus 3-Methoxyben-
zaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd oder 4-
10 Ethoxy-benzaldehyd.
2. Verfahren gemäß Patentanspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass das Einbettungsme-
dium 10 bis 100 Vol.-% des Benzaldehyd-Anisol-Ethers enthält und 0 bis 90 Vol.-% eines
optisch geeigneten, inerten organischen Lösungsmittels mit einem Brechungsindex von
15 etwa 1.3, bevorzugt 1.5 enthält.
3. Verfahren gemäß Patentanspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass das Einbettungsme-
dium 10 bis 100 Vol.-% des Benzaldehyd-Anisol-Ethers enthält und 0 bis 90 Vol.-% eines
optisch geeigneten, inerten organischen Lösungsmittels mit einem Brechungsindex von
20 etwa 2.0, bevorzugt 1.65 enthält.
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
das Einbettungsmedium aus einem Benzaldehyd-Anisol-Ether ausgewählt aus 3-Me-
thoxybenzaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd oder 4-
25 Ethoxy-benzaldehyd besteht.
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
der Entwässerungsschritt a) die Anwendung von Dehydratisierungs-Zusammensetzun-
gen aus wässrigem Alkohol, Keton oder Ether umfasst und die Dehydratisierungs-Zu-
sammensetzungen eine wässrige Mischung eines Alkohols, Ketons oder Ethers mit einer
30 Lösungsmittelkonzentration der Dehydratisierungs-Zusammensetzungen von 50 Vol.-%
bis 98 Vol.-%, bevorzugt 70 Vol.-% bis 98 Vol.-% , besonders bevorzugt 75 bis 98 Vol.-%
ist, bevorzugt eine wässrige Mischung aus wässrigem Ethanol mit steigenden Konzent-
rationen von Ethanol, wobei die Ethanolkonzentrationen der Dehydratisierungs-Zusam-
mensetzungen von 50 Vol.-% bis 98 Vol.-%reichen.
35
6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
der Entwässerungsschritt Schritt a) in einem Gradientenmischer durchgeführt wird und

die Gewebeprobe bevorzugt zu Beginn des Entwässerungsschritts direkt in ein entwässerndes Lösungsmittel mit einer Lösungsmittelkonzentration von 50 % eingebracht und der Gradient dann in kleinen Schritten erhöht wird.

- 5 7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Gewebeprobe, bevor sie in Schritt a) dehydriert und Schritt b) optisch geklärt wird,
- fixiert wird und/oder
 - mit Formaldehyd fixiert wird und/oder
 - gewaschen wird und/oder
 - 10 • mit Wasser gewaschen wird und/oder
 - in einer wässrigen alkalischen Lösung inkubiert wird und/oder
 - mit einer Detergenzienlösung delipidiert wird und/oder
 - mit einem organischen Lösungsmittel delipidiert wird und/oder
 - mit oxidierenden Reagenzien gebleicht wird und/oder
 - 15 • mit Aminoalkoholen entfärbt wird.
8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Gewebeprobe, bevor sie in Schritt a) dehydriert und Schritt b) optisch geklärt wird, fixiert wird und das Fixierungsmittel ausgewählt ist aus
- 20 - vernetzenden Fixantien wie Formaldehyd, Glutaraldehyd, Acrolein, Carbodiimide, Diethylpyrocarbonat, Bisimido-Ester oder Glyoxal oder Mischungen hiervon, und/oder
 - koagulierenden Fixantien wie Alkoholen und anderen organischen Lösungsmitteln, Säuren, Kaliumdichromat, Bleinitrat, Kupfersulfat und Quecksilberchlorid und Mischungen hiervon.
- 25 9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch geklärte Gewebeprobe in einem weiteren Schritt unter einem Mikroskop untersucht wird, um ein Bild der inneren Struktur der Probe zu erhalten, wobei das Mikroskop ein Lichtmikroskop ist.
- 30 10. Kit zur Präparation von biologischen Gewebeproben für die Lichtmikroskopie, enthaltend:
- ein entwässerndes Lösungsmittel zum Entwässern der Gewebeprobe und
 - ein Einbettungsmedium zum Klären der entwässerten Gewebeprobe durch Einlegen in
 - 35 das Einbettungsmedium,
- wobei das entwässernde Lösungsmittel ein Alkohol, Keton oder Ether ist und das Einbettungsmedium ein Benzaldehyd-Anisol-Ether ausgewählt aus 3-Methoxybenzaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd oder 4-Ethoxy-benzaldehyd ist.

11. Kit gemäß Patentanspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Benzaldehyd-Anisol-Ether ausgewählt ist aus 3-Methoxybenzaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd und 4-Ethoxy-benzaldehyd.
12. Kit gemäß Patentanspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass entwässernde Lösungsmittel ausgewählt ist aus Ethanol, Methanol, Tetrahydrofuran, Isopropanol, tert. Butanol, 2,2' Thiodiethanol, Trichloroethanol oder Aceton.
13. Verwendung Benzaldehyd-Anisol-Ethers ausgewählt aus 3-Methoxybenzaldehyd, 4-Methoxybenzaldehyd, 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd oder 4-Ethoxy-benzaldehyd als Einbettungsmedium für die Präparation einer biologischen Gewebeprobe für die lichtmikroskopische Untersuchung.