

## Immunhistochemie

A. Prinzip.....	258
B. Anwendung der Immunhistochemie .....	259
1. Grundlagen der diagnostischen Anwendung .....	259
2. Anwendung der IHC in der Pathologie .....	259
C. Antikörper .....	260
1. Wichtige Eigenschaften .....	262
2. Marker .....	265
D. Begriffe.....	268
E. Fixierung, Processing, Schneiden in der Immunhistologie.....	270
F. Antigen-Demaskierung .....	272
1. Andauung durch proteolytische Enzyme .....	272
2. Hitze .....	272
3. Kombination von Hitze und Enzymandauung.....	275
G. Methoden.....	275
1. Reaktionspartner.....	275
2. Direkte Methode (Ein-Schritt-Methode) .....	278
3. Indirekte Methode (Zwei-Schritt-Methode) .....	279
4. Drei-Schritt-Methode.....	281
5. Unmarkierte-Antikörper-Methode (PAP, APAAP) .....	281
6. ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) .....	282
7. LAB / LSAB-Methode (Labelled-Strept-Avidin-Biotin) .....	282
8. Doppelfärbungen .....	283
H. Amplifikationsmethoden .....	283
1. Amplifikation durch Wiederholung.....	283
2. Amplifikation durch Imidazol .....	284
3. Amplifikation mit biotinyliertem Tyramid.....	284
4. Amplifikation durch Silberpräzipitation bei Gold-Labeling-Methoden ..	284
I. Hintergrund-Färbung .....	284
1. Hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen .....	284
2. Endogene Enzymaktivität .....	285
3. Endogenes Biotin .....	286
4. Spezifische Hintergrundfärbung .....	286
5. Sonstige Ursachen .....	287
J. Qualitätssicherung in der Immunhistologie.....	287
1. Positivkontrollen .....	288
2. Negativkontrollen .....	288
3. Troubleshooting .....	289
K. Bearbeitung von zytologischem Material und Gefrierschnitten .....	290
L. Protokoll-Beispiel für LSAB-Methode .....	291
M. Automation .....	292

## Immunhistochemie

Die Entwicklung der immunhistologischen Techniken gehört zum größten Fortschritt in der feingeweblichen Befundung seit der Einführung von histochemischen Färbungen im Laufe der letzten hundert Jahre.

In der Mitte der fünfziger Jahre gelang bereits der Nachweis von Mikroorganismen in Gewebeschnitten mittels Antigen-Antikörper-Reaktion durch die „direkte Immunfluoreszenz“. Seit den Sechziger- und Siebzigerjahren befassen sich die Forscher mit Nachweismethoden basierend auf Farbstoffentwicklung am Ort der Ag-AK-Reaktion.

In der Mitte der 80iger Jahre begann der Einzug der Immunhistologie in das Histodiagnostiklabor. Die Idee der **eindeutigen Identifizierung von Gewebeeigenschaften durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen** war vorerst auf Gefrierschnitte beschränkt. Durch intensive Forschungsarbeit auf diesem Gebiet konnten bald routinefähige Techniken für formalin-fixierte, paraffineingebettete Gewebe angeboten werden. Die Anzahl der nachweisbaren Gewebeeigenschaften stieg rasant an. Um dieser Entwicklung Rechnung zu tragen, wurden Automaten zur Unterstützung gebaut, die eine gleichmäßige Behandlung der Schnitte garantieren. Die **Standardisierung** der immunhistologischen Methoden ist von großer Bedeutung, da sich geringe Abweichungen je nach Empfindlichkeit des Epitops entsprechend auswirken können. Eine laborübergreifende Standardisierung ist aufgrund der Variationsmöglichkeiten der Testabläufe noch nicht gegeben.

Durch die **Spezifität der Methode**, die mittlerweile zum Routinerepertoire gehört, wurden viele unspezifischere bzw. weniger stabile Techniken (wie z.B. histochemische Färbungen, Enzymhistochemie) zurückgedrängt. Weiters wurden in verschiedenen Bereichen differenziertere Diagnosen möglich, die mit den bisherigen Methoden nicht erreicht werden konnten. Und die Entwicklung ist weiter in Gang, um eine **höchstmögliche Sensitivität** der Tests zu erreichen. Die Immunhistologie erhält auch zunehmend an Bedeutung für die **therapeutischen Maßnahmen** am Patienten durch die eindeutige Identifikation von Tumoren.

Dieses Thema ist sehr umfangreich und aufgrund der Aktualität in vielen Veröffentlichungen vertreten. Hier alle Einzelheiten zu erläutern würde den Umfang des Buches sprengen, deshalb beschränke ich mich auf allgemeine Beschreibungen der Techniken und verweise auf entsprechende Literatur.

### A. Prinzip

Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (= Epitop; bspw. Aminosäuregruppe, Oligosaccharidkette) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop am Gewebeschnitt. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein auf dem Gewebeschnitt sichtbar macht. Mittels moderner Detektionssysteme können schon geringe Mengen an Epitop verstärkt dargestellt werden. Das Ziel ist es, ein Signal am Ort des Epitops (und nur dort) in ausreichender Stärke zu erkennen.

Das Prinzip der Methode klingt einfach, die praktische Umsetzung ist jedoch mit verschiedenen Schwierigkeiten konfrontiert. Dazu gehört die Stabilität des Epitops bei der Gewebebehandlung, die Erreichbarkeit des Epitops durch den Antikörper, das

Einstellen der optimalen Reaktionsbedingungen für Antigen-Antikörper-Reaktionen, inklusive der idealen Konzentrationen der Reaktionspartner und die Möglichkeit von unspezifischen Bindungen durch die beteiligten Antikörper an andere Gewebestrukturen.

Lektinhistologie: Lektine können ebenfalls in gleicher Weise wie Antikörper eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um Proteine oder Glykoproteine meist pflanzlichen aber auch tierischen Ursprungs. Sie besitzen eine spezifische Affinität zu bestimmten Polysacchariden.

## B. Anwendung der Immunhistochemie

Die immunhistologischen Techniken haben ein breites Anwendungsspektrum. In der Routinehistologie liegt ihre Bedeutung natürlich in der morphologischen Diagnostik. Das große Gebiet der Untersuchungen an Zellen, Geweben und deren Funktionsweisen in der Forschung kommt ohne diese Methoden nicht aus. Hier werden für das jeweilige Experiment die Protokolle erstellt. Die IHC kann durchgeführt werden auf Gefrier-, Kunststoff- und Paraffinschnitten, Vibratomschnitten, frei flottierenden Schnitten und auch auf Zellkulturen.

Neben der Tumordiagnostik ist auch der direkte Erregernachweis im Gewebe eine wichtige Anwendung (z.B. Spirochäten, *Helicobacter pyl.*, Erreger der catscratch disease, u.v.m.)

### 1. Grundlagen der diagnostischen Anwendung

Zellen lassen sich z.B. durch zellspezifische Proteine, sog. Intermediärfilamente, charakterisieren. Dazu gehören: Cytokeratine (Epithelzellen), Vimentin (mesenchymale Zellen), Desmin (glatte, quergestreifte Muskulatur, Herzmuskel), Gliafilament-Protein (bestimmte Gliazellen, Astrozyten), Neurofilament (Neuronen).

Weitere Unterscheidungsmerkmale sind spezifische Zellinhaltsstoffe wie z.B. Hormone, Enzyme oder Glykoproteine. Lymphozyten bzw. Leukozyten exprimieren je nach Differenzierungs- und Aktivierungsgrad andere CD-Marker (= Cluster of Differentiation) an ihrer Zellmembran.

Die Basis für den Einsatz der Immunhistochemie stellt immer die Histomorphologie dar. Der Pathologe setzt den immunhistologischen Nachweis gezielt aufgrund verschiedener „Verdachtsmomente“ ein. Bei der Befundinterpretation muss die Morphologie mit der IHC vereinbar sein.

### 2. Anwendung der IHC in der Pathologie

- **Klassifizierung und Diagnose von wenig differenzierten, malignen Tumoren**
  - Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft können morphologisch ähnlich aussehen.
  - Bei kleinen Biopsien muss die Diagnose an sehr wenigen Zellen erfolgen.

Mithilfe einer Untersuchungskaskade lassen sich die Zelleigenschaften bestimmen und die Zugehörigkeit zu Tumorgruppen darstellen.

- **Identifikation des Primärtumors bei Metastasen**

- Die Morphologie der Metastasenzellen lässt keine Rückschlüsse auf den Primärtumor zu.
- Die Anzahl der Tumorzellen ist zu klein.

Organspezifische bzw. zellspezifische Marker weisen den Weg zum Primärtumor.

- **Identifikation von infektiösen Erregern**

- Eine Verdachtsdiagnose aus dem HE-Schnitt kann bestätigt werden.
- Virennachweis in Tumorgewebe (Lymphom – Epstein-Barr-Virus).

- **Klassifizierung von Lymphomen und Leukämien**

Unterscheidung von B- und T-Lymphozyten. Die genaue Klassifizierung ist für eine adäquate Behandlung unbedingt notwendig.

- **Prognose und Therapie**

Manche Tumorarten exprimieren Zelleigenschaften, die entscheidend für das Ansprechen einer Therapie sind (Östrogenrezeptoren, HER-2 bei Mamma-Karzinom). Andere Antigene geben Auskunft über die Aggressivität des Tumors bzw. das Ansprechen auf Chemotherapie.

## C. Antikörper

Für umfangreichere und detaillierte Informationen über das Immunsystem und über Antikörper verweise ich auf entsprechende Literatur. Hier eine vereinfachte Darstellung:

Verabreicht man einem Versuchstier eine fremde, makromolekulare Substanz (Antigen), wird sie vom Immunsystem als körperfremd erkannt. Es kommt zur Bildung von Antikörpern gegen diese Substanz, um sie zu neutralisieren. Die Substanz bietet dem Organismus diverse Epitope, gegen die jeweils spezifische Antikörper synthetisiert werden. **Immunologisch unterschiedliche** Antikörper binden im Schlüssel-Schloss-Prinzip an die Fremdsubstanz. Es handelt sich dabei um **polyklonale, heterogene Antikörper**, die von verschiedenen Plasmazellen stammen. (Abb. 147)

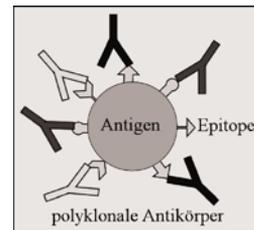


Abb. 147 polykl. AK

Gewonnen werden die Antikörper aus dem Serum der Versuchstiere. Werden mehrere Tiere einer Spezies mit der gleichen Substanz immunisiert, kann man die Seren

**poolen** (sammeln). Durch Salzpräzipitation und Affinitätschromatographie werden die Seren von den übrigen Serumproteinen gereinigt.

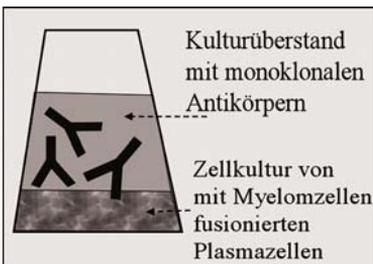


Abb. 148 monoklonale Antikörper

Tiere, die zur Antikörperproduktion eingesetzt werden, sind hauptsächlich Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Schwein oder Ziege. Man verabreicht das Antigen durch sogenannte Inokulation unter die Haut. Dadurch erfolgt die **Immunisierung**. Wiederholte Immunisierung nennt man **Boostern**. Das hat den Effekt einer ver-

mehrten Antikörperbildung (höhere Konzentration im Serum) und einer Verbesserung der Antikörperqualität (= Affinitätsreifung).

Antikörper, die nur von **einer** Plasmazelle stammen, sind nur gegen **ein** bestimmtes Epitop gerichtet. Fusioniert man die Plasmazelle mit einer „unsterblichen“ Myelomzelle, erhält man einen Antikörper-produzierenden **Zellklon**. Die Herstellung der **monoklonalen Antikörper** erfolgt in Zellkulturen, sie werden aus dem Kulturmedium gewonnen (Abb.148). Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist teuer und schwieriger als die Produktion von polyklonalen Antikörpern. Im Histodiagnostiklabor verwendet man industriell hergestellte Antikörper. Die Entwicklung von neuen Antikörpern und Nachweismethoden bleibt der Forschung vorbehalten.

Die Antikörper der immunhistologischen Technik gehören hauptsächlich zur Gruppe der **Gamma-Immunglobuline (IgG)**. Sie sind charakterisiert durch ihre Y-Form mit dem gleichbleibenden Anteil (**Fc, Fragment constant**) als „Stamm“ und den modifizierbaren Anteil (**Fab, Fragment Antibody-binding**) als „Äste“. Das fab-Fragment wird so synthetisiert, dass es genau zu dem Epitop passt. Teilt man den Antikörper der Länge nach in zwei gleiche Hälften, besteht jede Hälfte aus einer langen Kette (**heavy chain, Gammakette**) und einer kürzeren Kette (**light chain, Kappa- oder Lambdakette**) im fab-Bereich. Die einzelnen Teile des Antikörpers sind mit Disulphidbrücken miteinander verbunden. Der Aufbau des fc-Fragments mit seinen angelagerten Oligosacchariden ist für die jeweilige Spezies konstant. (Abb.149)

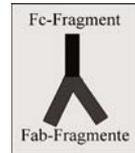


Abb.149 IgG

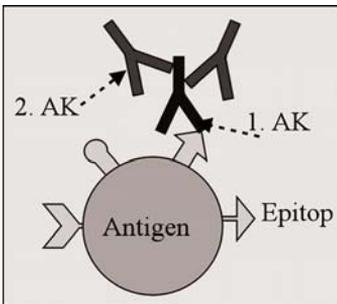


Abb.150 sekundäre Antikörper

Immunglobuline haben als Makromoleküle **selbst antigene Eigenschaften**. Verabreicht man einer anderen Spezies artfremde Antikörper (z.B. Maus-Antikörper in Kaninchen), werden wiederum **polyklonale Anti-Antikörper** gebildet, die gegen das fc-Fragment gerichtet sind. Diese sog. sekundären Antikörper (Abb.150) reagieren im Weiteren mit allen Antikörpern der ersten Tierart (z.B. Kaninchen-anti-Maus-AK). Als polyklonale Antikörper können sie an mehrere Epitope des fc-Fragments ankopeln. Dieser Mechanismus wird bei den mehrstufigen Testabläufen ausgenutzt, um den Nachweis sensitiver zu machen.

- Produktion monoklonaler Primärantikörper**
1. Antigen in Maus (Immunisierung)
  2. Antikörperproduktion
  3. Plasmazellgewinnung / -Fusionierung
  4. Zellklonbildung
  5. Antikörpergewinnung
  6. Reinigung

- Produktion polyklonaler Sekundärantikörper**
1. Maus-Antikörper = 2. Antigen
  2. Kaninchen-Immunisierung
  3. Antikörperproduktion
  4. Poolen von Seren mehrerer Tiere
  5. Antikörpergewinnung
  6. Reinigung

## 1. Wichtige Eigenschaften

### 1.1. Monoklonal – Polyklonal

Der Unterschied bei der Erzeugung wurde schon beschrieben.

#### Vorteile monoklonaler Antikörper:

- Durch die einheitliche Zusammensetzung des Antiserums kann man mit einer gleichbleibenden Qualität rechnen, auch von Charge zu Charge.
- Es kommt zu keinen Reaktionen durch unspezifische Antikörper.
- Kreuzreaktionen treten selten auf.
- Die Ergebnisse sind garantiert reproduzierbar.

#### Nachteil monoklonaler Antikörper:

- teurer
- Der Nachweis ist von den Eigenschaften eines einzigen Antikörpertyps abhängig.
- Wird das nachzuweisende Epitop beim Prozess zerstört, kommt es zu einem falsch negativen Ergebnis.
- Antikörper mit niedriger Affinität führen zu leicht löslichen Antigen-Antikörper-Bindungen und damit zu einem schwachen Ergebnis.

Bei sorgfältiger Auswahl des gesuchten Antikörpers sollte der monoklonale Antikörper dem polyklonalen überlegen sein. In der Praxis führen **vergleichende Testansätze** zur Wahl des optimalen AK. Vom Verhalten der polyklonalen AK darf man nicht direkt auf die Eigenschaften des monoklonalen AK für dasselbe Antigen schließen.

### 1.2. Größe

Es gibt fünf Fraktionen von Immunglobulinen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), mit unterschiedlichen Strukturen und Einsatzbereichen. Gamma-Immunglobuline gehören zu den kleineren mit 150 kD. Kleinere Antikörper haben es einfacher, in das Gewebemaschenwerk einzudringen. Auch kommt es weniger zu gegenseitiger sterischer Behinderung bei der Bindung. In der Praxis wurde aber keine effektive Abschwächung der Reaktion bei Verwendung großmolekularer AK festgestellt.

### 1.3. Protein

Als Protein unterliegt der Antikörper der Beeinflussung durch pH-Wert und Salzkonzentration in der Lösung. Zur Optimierung des Reaktionsmilieus verwendet man Pufferlösungen (als Verdünnungslösung und bei Waschstritten).

- PBS (= phosphate-buffered-saline): 0,8–0,9% ige NaCl-Lösung in 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,2–7,4.
- Tris-Puffer (= TBS): 0,01 M enthält Trizma-Base und NaCl, wird mit 2N HCl auf pH 7,6 eingestellt

An das Makromolekül lassen sich Farbstoffe, Fluorochrome, Enzyme, kolloidale Metalle, Dextran-Polymere, Biotin oder Radioisotope anbinden. Dies geschieht z.B. durch Zugabe von Glutaraldehyd, das ähnlich wie bei der Fixierung zu Vernetzungen zwischen den Reaktionspartnern führt. Man nennt die Antikörper dann **markierte oder**

**konjugierte Antikörper** (Abb.151). Bei der Markierung kommt es auch zur Anbindung der Marker im antigenbindenden Bereich oder in seiner Nähe, wodurch die Antigenbindung ver- oder behindert werden kann. Markierte Antikörper zeigen deshalb eine schwächere Affinität als unmarkierte.

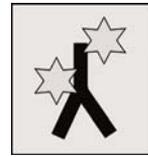


Abb.151

Die Proteine in Lösung neigen dazu, bei der Lagerung **Aggregate** zu bilden, was sich durch vermehrte unspezifische Anbindung am Gewebeschnitt bemerkbar machen kann. Diese Eigenschaft wird durch die Reinigungsart der Antikörper-Seren beeinflusst. Ionenausch-Chromatographie führt hier zu besseren Ergebnissen. Bei der Lagerung der Antikörper verhalten sich isolierte AK gegenüber solchen, denen andere Serumproteine beigemischt wurden, weniger stabil. Auch die nachfolgend beschriebenen Eigenschaften wie Spezifität und Affinität werden durch die Art der Reinigungsverfahren und Lagerung beeinflusst.

### 1.4. Spezifität

Antikörper sollen spezifisch an die entsprechende antigene Determinante (= Epitop) binden. Das heißt, die Aminosäuren- bzw. Oligosaccharidstrukturen müssen ideal zusammenpassen, damit eine starke Bindung entsteht. Man spricht hier vom typischen **Schlüssel-Schloss-Prinzip**. (Abb.152)

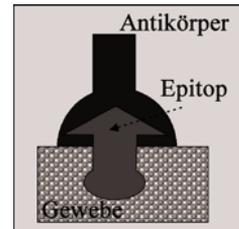


Abb.152 Schlüssel-Schloss-Prinzip

Das Epitop sollte dabei typisch für ein bestimmtes Antigen sein, damit man von einem **spezifischen Nachweis** sprechen kann. Findet man dieselbe antigene Determinante auf verschiedenen Zelltypen, kann man sie durch diese Eigenschaft nicht unterscheiden.

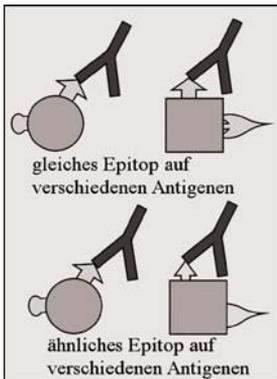


Abb.153 Kreuzreaktionen

Die Spezifität eines Antikörpers ist für bestimmte Bedingungen gegeben. So kann die Spezifität eines Antikörpers, der für Gefrierschnitte entwickelt wurde, am Paraffinschnitt mangelhaft sein (z.B. weil das Epitop durch Fixierung und Paraffineinbettung zerstört oder beeinträchtigt wurde).

Wenn ein Antikörper an ähnliche Epitope koppelt, bzw. wenn der Antikörper an idente Epitope auf verschiedenen Antigenen koppelt, spricht man von **Kreuzreaktivität**. Ein spezifischer Antikörper gegen ein typisches Epitop sollte keine Kreuzreaktivität zeigen. Bindungen der Antikörper an Gewebeelemente, die nicht auf eine Ag-AK-Reaktion zurückzuführen sind (unspezifische Reaktionen), bezeichnet man nicht als Kreuzreaktionen.

### 1.5. Affinität / Bindungsstärke

Die Ag-AK-Bindung beruht auf Wasserstoffbrückenbindung, elektrostatischer Anziehung und Van-der-Waal-Kräfte. Es kommt zu keiner kovalenten Bindung. Die Antigen-Antikörper-Komplexbildung unterliegt den Gesetzen der chemischen Reaktion. Es wird ein Gleichgewicht zwischen antigengebundenen und freien AK angestrebt.

Bei der Testdurchführung muss man bedenken, dass die Antigen-Antikörper-Reaktion reversibel ist und Einflüsse, die die Bindung schwächen, vermieden werden sollen. Dazu gehören hohe Salzkonzentration, hohe Temperatur und niedriger pH-Wert.

Unter **Affinitätsreifung** versteht man, die Verbesserung der Antikörperqualität bei wiederholter Immunisierung der Versuchstiere.

- Je höher die Affinität eines AK ist, desto geringer ist die benötigte Konzentration an freiem Antigen, um alle verfügbaren Bindungsstellen abzusättigen und ein Gleichgewicht zu erreichen.
- Je höher die Affinität eines AK ist, desto rascher bindet er an das Gewebsantigen und ergibt so schon während einer kurzen Inkubation eine intensivere Färbung als ein weniger affiner AK.
- Je höher die Affinität eines AK, umso besser hält die Bindung während der oft „rauen“ Testbedingungen.
- Die Affinität der Bindung hängt bei monoklonalen Antisera von der Qualität eines einzigen Klons ab. Polyklonale Antisera enthalten Antikörper unterschiedlicher Affinität, die sich ausgleichen können.
- Hohe Spezifität bedeutet nicht automatisch hohe Affinität. So kann der Antikörperklon zwar sehr spezifisch, aber von geringer Bindungsstärke sein, was sich bei der Testdurchführung als nachteilig erweist.

### 1.6. Antikörpertiter

In der Immunhistochemie wird der Antikörpertiter als die höchste Verdünnung eines Antiserums definiert, mit der eine optimale, spezifische Anfärbung bei geringstem Hintergrund (= unspezifische Färbung) erzielt wird.

Bei monoklonalen AK wird die **Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$**  angegeben. Sie dient als Basis zur Herstellung der benötigten Verdünnung. Als Verdünnungslösungen sind hauptsächlich PBS bzw. Tris-Puffer im Einsatz. Hier sollte man bedenken, dass PBS die Sensitivität der Immunreaktion zwischen Antigen und monoklonalen AK verringern kann. PBS ist für Testansätze, die mit alkalischer Phosphatase arbeiten, ungünstig, weil die enthaltenen Phosphate das Enzym hemmen.

Verdünnungen werden als Verhältnis des konzentrierten AK-Serums zum Gesamtvolumen angegeben (1:10 = 1 Teil Serum + 9 Teile Verdünnung). Zur Bestimmung der idealen Verdünnung erfolgt eine sogenannte **Titration**. Dabei variiert man den von der Herstellerfirma empfohlenen Verdünnungs-Bereich bei konstanter Inkubationszeit. Das Ziel ist ein Färbegergebnis, das eine möglichst klare, spezifische Färbung bei möglichst geringer Hintergrundfärbung zeigt (**Signal-Rausch-Relation**).

### 1.7. Reaktionstemperatur - Inkubationszeit

Reaktionstemperatur, Antikörpertiter und Inkubationszeit stehen in einem engen Zusammenhang. Änderungen eines Faktors beeinflussen auch die anderen Parameter. (Abb. 154)

Die Geschwindigkeit der Reaktion lässt sich durch Veränderung der AK-Konzentration leicht beeinflussen. Eine doppelte oder dreifache Konzentration kann bereits zu einer Beschleunigung um ein Vielfaches führen. Eine zu hohe AK-Konzentration führt jedoch zu starken, unspezifischen Bindungen (Hintergrundfärbung). Deshalb muss man

hier das optimale Mittelmaß zwischen Geschwindigkeit und gutem Ergebnis wählen. Die gewählte Inkubationszeit ist dann genau einzuhalten, um vergleichbare Resultate zu erhalten. Andererseits kann man durch sehr lange Inkubationszeiten (bis 48 Std.) hohe AK-Konzentrationen bei teuren Seren vermeiden. Über-Nacht-Inkubationen geschehen meist bei 2–8°C.

Höhere Temperaturen beschleunigen die Ag-AK-Reaktion. Beim Austesten der optimalen Ergebnisse (Titrieren) in der Routine-Praxis bleibt man meist bei konstanten Inkubationszeiten (meist zwischen 20–60 min) und konstanter Temperatur (RT oder 25°C/37°C) und variiert die AK-Konzentration.

Wie bei allen Reaktionen spielt auch die Bewegung des Reagens eine Rolle. Durch die Verwendung von Rotatoren bzw. Mischungstechniken in Automaten wird die Zeit verkürzt.

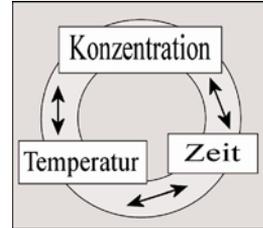


Abb. 154 Relationen

## 1.8. Handhabung im Labor

Käufliche Antiseren haben meist eine garantierte Stabilität über mehrere Jahre. Die genauen Lagerungsvorschriften des Herstellers sind allerdings einzuhalten. Dazu gehört auch die Einhaltung der Kühlkette bei frisch eingetroffenen Reagenzien. Von Vorteil ist eine **Protokollführung**, wo Chargennummern, Lieferdatum und Ablaufdatum verzeichnet werden. Für die Charakterisierung des gekauften Antikörpers bietet sich das Führen eines eigenen Data-Sheets an, wo man die optimalen Testvorschriften (Konzentration, Vorbehandlung) bzw. Erfahrungswerte notiert.

Die wichtigste Komponente bei der **Lagerung** ist die richtige Temperatur. Kühl- und Gefriergeräte sollten hier einem Kontrollsystem unterliegen, um die teure Ware nicht zu gefährden. Unverdünnte Antiseren sollten portioniert bei –20°C gelagert werden. Tiefgefrorene Seren sollen schonend auf Raumtemperatur gebracht werden. Verdünnte Antiseren und Färbekits mit vorverdünnten Komponenten sollten bei 2–8°C gelagert werden, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Verwendete Reagenzien werden möglichst rasch wieder in die optimalen Lagerbedingungen gebracht.

Proteine in Lösung neigen dazu, sich an die Behälterwände anzulagern. Geeignete Materialien bieten deshalb möglichst wenig Adsorptionsmöglichkeiten für die Proteine. Dazu gehören z.B. Polypropylen, Polycarbonat oder Borsilikatglas. Durch die Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA = bovine serumalbumine) als Trägerprotein werden Adsorptionsverluste vermindert.

## 2. Marker

Wie bereits erwähnt kann man an die makromolekularen Antikörper andere Moleküle chemisch binden, mit denen man die Reaktion „sichtbar“ machen kann. Auf die „Bindungsreaktion“ folgen Reinigungsschritte, die die konjugierten Antikörper von anderen konjugierten Serumproteinen befreien sollen.

## 2.1. Enzyme

Enzyme werden am häufigsten zum Markieren von Antikörpern verwendet. Üblicherweise binden mehrere Enzymmoleküle an ein Antikörpermolekül. Diese Enzymmoleküle können ihrerseits eine große Menge an Chromogen zu einem stabilen Farbstoff umsetzen, bis das Reaktionsgleichgewicht erreicht ist.

Am häufigsten in Verwendung ist die **Meerrettichperoxidase** (horseradish peroxidase HRP) in Kombination mit dem gebräuchlichsten Chromogen **DAB** (Diaminobenzidintetrahydrochlorid). Das Farbergebnis ist ein unlösliches, stabiles, braunes Endprodukt am Ort der Reaktion und damit am Ort des Antigens.

Alternativ dazu gibt es andere Chromogene wie **AEC** (Amino-ethyl-carbazol), das ein rotes, jedoch xylo-lösliches Endprodukt ergibt.

Die Schwierigkeit beim Nachweis mit Hilfe von Peroxidase ist das Vorhandensein von natürlicher Enzymaktivität im Gewebe. Diese sog. endogene Peroxidase muss dementsprechend blockiert werden (*siehe Kap. Hintergrund*).

Die gebräuchlichste Alternative zur HRP ist **Alkalische Phosphatase AP** (aus Kälberdarm). Sie wird bei blutreichem Gewebe bevorzugt, um die Beeinflussung durch die endogene Peroxidase zu umgehen. Endogene Phosphatase wird üblicherweise durch Zugabe von Levamisol zur Substratlösung blockiert, bzw. wird sie durch Hitzeeinwirkung bei der Ag-Demaskierung völlig inaktiviert.

Setzt man verschiedene Enzyme gleichzeitig ein, kann man das zur gleichzeitigen Darstellung verschiedener Antigene nützen (Doppelfärbungen).

Siehe auch: Kapitel Enzymhistochemie, Nachweis von Peroxidase bzw. alkal. Phosphatase

## 2.2. Fluorochrome

Die gebräuchlichsten Fluorochrome sind Fluoresceinisothiocyanat (**FITC**) und Tetramethyl-rhodaminisothiocyanat (**TRITC**). In alkalischer Lösung (pH 9–10) binden diese Substanzen kovalent mit Proteinen. Sie reagieren dabei mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin. Im Idealfall binden zehn Fluorochrommoleküle an ein Antikörpermolekül. FITC zeigt sich als grüne Farbe (Anregung bei 490 nm, Emission bei 550 nm), TRITC als rote Farbe (Anregung bei 520–554 nm, Emission bei 582 nm) im Fluoreszenzmikroskop. Die Fluorochrome waren die ersten Marker der Immunhistologie. Als nachteilig gilt, dass man ein entsprechendes Mikroskop zur Auswertung benötigt und das Farbergebnis nicht dauerhaft stabil ist. Es gibt Eindeckmedien, die das Verblassen des Fluorochroms verlangsamen.

**Weitere Beispiele für Fluorochrome:** DTAF (Dichlorotriazinylamino-Fluorescein, gelb-grün), LRSC (Lissamon-Rhodamin-Sulfonylchlorid, rot), Texas Red (rot), AMCA (Amino-Methylcoumarin-Acetat, blau). In der richtigen Kombination lassen sich die Farbstoffe zur Doppelmarkierung einsetzen, um gleichzeitig verschiedene Epitope darzustellen.

Als Kern-Gegenfärbung eignet sich DAPI (Diamino-Phenylindol, blau) oder Propidiumjodid (rot).

### 2.3. Biotin

Antikörper lassen sich mit Biotin markieren (= Biotinylierung). Biotin ist **Vitamin H** und bildet das Coenzym oder die prosthetische Gruppe für mehrere Enzyme, die Carboxylgruppen transferieren. Es zeigt eine sehr **starke Affinität zu Avidin oder Streptavidin**. Avidin ist ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß. Jedes Molekül besteht aus vier identen Untereinheiten, die jeweils ein Molekül Biotin binden können. Die Affinität zwischen Avidin und Biotin ist sehr hoch, obwohl keine kovalente Bindung vorliegt. Streptavidin ist ein Protein bakteriellen Ursprungs mit ähnlichen Eigenschaften wie die von Avidin. Avidin neigt bei physiologischem pH dazu, sich an lektinähnliche, negativ geladene Gewebebestandteile zu binden. Deshalb wird Streptavidin bevorzugt. (Abb.155)

Avidin und Streptavidin lassen sich wiederum mit Enzymen oder Fluorochromen markieren. Das Biotinmolekül ist so klein, dass es die Funktion des Makromoleküls, an dem es hängt, nicht beeinträchtigt. So wie bei der endogenen Peroxidase muss bei manchen Gewebetypen das **endogene Biotin** blockiert werden (Leber, Niere, Darm).

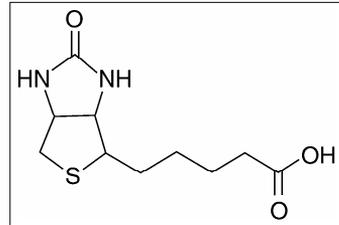


Abb.155 Biotin

### 2.4. Dextran-Polymer

Die Idee hinter diesem Marker ist, dass man an den Antikörper ein möglichst großes Molekül anhängt, auf dem eine Vielzahl an Enzymmolekülen befestigt ist. Diese große Anzahl an Enzymen kann dann eine große Menge an Chromogen umsetzen und macht die Methode dadurch sehr sensitiv. (Kleine Menge an Antigen wird durch eine größere Menge an Chromogen sichtbar gemacht.)

### 2.5. Radioisotope

Der Nachweis von Radioisotopen am Schnitt erfordert das entsprechende, radiologische Equipment und wird meist in der Forschung eingesetzt. Diese Methode ist notwendig zur quantitativen Auswertung von Epitopen.

### 2.6. Kolloidale Metalle

Hier wird üblicherweise **kolloidales Gold** verwendet. Die Lösung besteht aus einem makromolekularen, stabilisierenden Reagens, das die Goldpartikel von definierter Größe (20–150 nm) umgibt und so ein Zusammenklumpen verhindert. Mit kolloidalem Gold lassen sich Immunglobuline, Lektine oder auch andere Substanzen, die Affinitäten zu bestimmten Gewebemolekülen haben, markieren. Zu diesen Substanzen gehört **Protein-A**. Es handelt sich dabei um einen Zellwandbestandteil des *Staphylococcus aureus*, der mit den Immunglobulinen bestimmter Spezies reagiert.

Das Einsatzgebiet von immunhistologischen Techniken mit kolloidalem Gold liegt vor allem in der Elektronenmikroskopie zur Darstellung von Eigenschaften auf ultradünnen Kunststoffschnitten. Für die Lichtmikroskopie müssen die Goldpartikel erst noch durch eine Silberpräzipitationsreaktion sichtbar gemacht werden.

### 2.7. Quantum Dots

QD's sind Nanopartikel aus Halbleitermaterial, umgeben von einer weiteren Schicht eines organischen Farbstoffes (Lumophore) und einer äußeren Kunststoffschicht, die

für die Bindungseigenschaften notwendig ist. Sie emittieren ähnlich wie Fluorochrome nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge Licht in einer anderen definierten Wellenlänge bzw. Farbe. In welcher Farbe diese Emission resultiert, hängt von der Größe des QD's ab. Die Anregungsenergien liegen für alle QD's im ähnlichen Bereich. Die Emissionswellenlängen sind deutlich verschoben, was die Unterdrückung der Hintergrundstrahlung erleichtert. Der Vorteil gegenüber den Fluorochromen liegt darin, dass es zu keinem Photobleaching kommt. Die Anwendung von Quantum Dots hat sehr großes Potential, vor allem im Bereich der Microarray-Technik (siehe auch *in situ Hybridisierung*).

## D. Begriffe

### Affinitätsabsorption

Beschreibt die Entfernung von unerwünschten AK aus einem Serum durch Affinitätschromatographie. Das Serum durchfließt eine Matrix, die die entsprechenden Antigene enthält. Dadurch werden die unerwünschten AK gebunden und zurückgehalten.

### Affinitätsisolierung

Bei der Chromatographie wird dem Serum das Antigen gegen den gewünschten AK angeboten, dieser wird gebunden und zurückgehalten. In einem nachfolgenden Schritt können die Immunglobuline wieder herausgelöst und gewonnen werden.

### Amplifikation

Darunter versteht man die Steigerung der Signalstärke. Je mehr Moleküle des Markers dem Antigen zugeordnet werden können, umso klarer wird das sichtbare Ergebnis. Deshalb werden verstärkt Techniken angewandt, die in mehreren Schritten eine höhere Anzahl an Markermolekülen an den Ort des Antigens bringen. (Abb. 156)

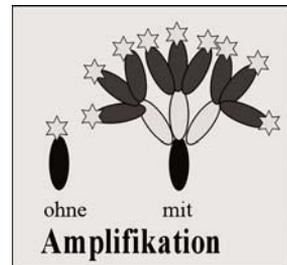


Abb. 156

### Antiserum

Ein Serum, das Antikörper enthält.

### Brückenantikörper

Ist meist mit dem Sekundärantikörper gleichzusetzen und dient als Bindeglied zwischen dem Primärantikörper und den nachfolgenden Reagenzien.

### Chromogen

Das Chromogen wird dem Markerenzym angeboten und in ein bestimmtes, farbiges, stabiles Endprodukt umgesetzt.

### Demaskierung (Retrieval)

Die determinanten Gruppen im Gewebe werden durch Fixierung und Einbettungsprozess beeinträchtigt, sodass ohne Vorbehandlung kein Nachweis gelingt. Diese Vorbehandlung nennt man Demaskierung. Sie kann auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden und ist für die einzelnen Epitope anzupassen.

### **Detektionssystem**

Damit bezeichnet man das Zusammenspiel der einzelnen Testkomponenten, um am Ort des Antigens ein sichtbares Signal zu erzeugen.

### **Epitop**

Das ist derjenige Bereich eines Antigens, an den der Antikörper bindet. Es handelt sich dabei um Gruppen von Aminosäuren innerhalb eines Proteins, oder um Zuckerseitenketten bei Polysacchariden. Man bezeichnet das Epitop auch als **antigene Determinante**.

### **Immunisierung**

Vorerst wurde damit der Vorgang beim Impfen zum Erlangen von Immunität beschrieben. In der Immunhistologie bezeichnet man damit das Einbringen eines Antigens in den Organismus zur Produktion von Antikörpern.

### **Gegenfärbung**

Ähnlich wie bei den anderen histochemischen Färbungen wird zur Orientierung und Kontrastierung eine zweite Farbe auf den Schnitt gebracht (meist Kernfärbung mit Hämalaun).

### **Hintergrund**

Der Hintergrund ist prinzipiell unerwünscht und bezeichnet unspezifische Färbung neben dem gewünschten Signal (Signal-Rausch-Verhältnis).

### **Immunhistochemie, Immuncytochemie**

Je nach Region werden diese Begriffe als Synonym verwendet. Im deutschsprachigen Gebiet versteht man unter Immunhistochemie die immunhistologischen Techniken, die am Gewebeschnitt durchgeführt werden. Immuncytochemie beschäftigt sich mit intrazellulären Vorgängen und dem Nachweis in der Elektronenmikroskopie.

### **Kreuzreaktion**

Der Antikörper reagiert mit identen Determinanten auf anderen Antigenen, bzw. reagiert mit ähnlichen Determinanten.

### **Marker (engl. Label)**

Eine Substanz, die mit einem Antikörper oder Protein konjugiert wird, als Teil eines Detektionssystem. Die Art des Markers bestimmt das Ausmaß der Amplifikation, das durch das Detektionssystem erreicht wird, mit.

### **Monoklonaler Antikörper**

Immunologisch identes Immunglobulin, das von einer Plasmazelle bzw. ihrem Klon stammt (meist von Mäusen, jetzt auch von Kaninchen).

### **Nicht-Immunsrum (= Normalserum)**

Serum, das aus Tieren vor der Immunisierung gewonnen wurde. Sollte alle Komponenten wie das Antiserum außer dem Antikörper enthalten.

### Polyklonale Antikörper

Immunologisch heterogene Antikörper, die von verschiedenen Plasmazellen stammen und bei der Immunantwort auf ein Antigen mit verschiedenen Epitopen gebildet werden (meist von Kaninchen, Ziege).

### Primärer Antikörper

Das ist jener Antikörper, der gegen das nachzuweisende Epitop gerichtet ist. Er wird beim Test als erstes Reagens auf den Schnitt aufgetragen.

### Sekundärer Antikörper

Der sek. Antikörper ist gegen den primären Antikörper (fc) gerichtet. Er wird beim Test als zweiter AK aufgetragen und bildet die Brücke zu weiteren Reagenzien, sofern welche eingesetzt werden.

### Titer

Darunter versteht man die höchste Verdünnung eines Antiserums, die ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis bewirkt.

## E. Fixierung, Processing, Schneiden in der Immunhistologie

Während der Entwicklung der immunhistologischen Techniken wurde auch an einem optimalen Fixans zu diesem Zweck gearbeitet. Neben gepufferten Formaldehydlösungen zeigte sich bei pikrathältigen und zinkhaltigen Fixantien ein sehr gutes Ergebnis. Jedoch wurde kein Mittel gefunden, das für alle Nachweise optimal war.

Bei der Einführung der IHC in die Routine zeigte sich die Beeinflussbarkeit der Testergebnisse durch eine gute oder schlechte Fixierung. Zu kurze Fixierung führt zu Morphologieeinbußen, Empfindlichkeit der Epitope auf die Reagenzien und Temperaturen beim Einbettungsprozess. Eine zu lange Fixierung vor allem durch vernetzende Fixanzien erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass auch das Epitop „miteingebunden“ wird und dass ein zu engmaschiges Netzwerk entsteht. Dies hat zu einem neuen Verständnis im Processing geführt, wo darauf geachtet wird, das Gewebe für die Immunhistologie brauchbar zu erhalten. Standardisierung bei der Wahl des Fixiermittels und der Einbettungsreagenzien, der Temperaturen und Zeiten resultierte in besseren und reproduzierbaren Ergebnissen. Sehr dazu beigetragen hat die Verwendung der Einbettungsautomaten.

Im Endeffekt wurde die Immunhistologie den vorherrschenden, **gebräuchlichen Fixiermitteln** angepasst, um sie in der Histodiagnostik effektiv einzusetzen. Dazu gehören neutral gepufferte Formaldehydlösungen zwischen 4–10 %. Frisches Gewebe soll innerhalb von 30 min in die Formaldehydlösung gebracht werden. Die Fixierzeit soll zwischen 6–24 Std. und nicht über 48 Std. liegen. Bouin'sche Lösung und quecksilberhaltige Lösungen wie B5 oder Zenker zeigen in bestimmten Bereichen Vorteile gegenüber Formalin. Sie benötigen jedoch eine Nachbehandlung und verändern die Gewebeeigenschaften bezüglich der Anfärbbarkeit (*siehe Kap. Fixierung*). Für die Elektronenmikroskopie gibt es glutaraldehydhaltige und paraformaldehydhaltige Fixiermittel.

Das Gewebe sollte in max. 10x10x3 mm große Blöckchen für den Einbettungsprozess geschnitten werden. Für das **Gewebeprocessing** im Einbettungsautomaten ist wich-

tig, dass die Temperatur von Alkoholen und Intermedien nicht über 45°C und die Paraffintemperatur nicht über 60°C ansteigt. Ein regelmäßiges Wechseln der Reagenzien soll eine optimale Behandlung garantieren.

Für die **Herstellung von Schnitten** gelten dieselben Regeln, wie bei der üblichen Mikrotomie. Nachdem es sich um recht teure Tests und manchmal um sehr kleine Gewebeproben handelt, ist natürlich besondere Sorgfalt angebracht. Zerkratzte, faltige oder zu dicke Schnitte sollten nicht vorkommen. Da die Schnitte, besonders bei der Demaskierung, einer recht rauen Behandlung ausgesetzt sind, werden sie auf **Adhäsiv-Objektträgern** aufgezogen. Es gibt Käufliche in unterschiedlicher Qualität. Die Adhäsiv-Objektträger können aber auch selbst hergestellt werden (*siehe Adhäsive: Silanisierung, Poly-L-Lysin, Chromgelatine*). In „Praxis der Immunhistologie, Sabine Noll et al.“ wird sogar das Aufkleben der Schnitte mittels Bastelkleber beschrieben.

Das Abschwimmen der Schnitte während des Tests ist ein öfters vorkommendes Problem. Ein Tipp dazu ist, auf das ordentliche Ablaufen des Wassers beim Aufziehen des Schnittes zu achten. Insbesondere, wenn die Schnitte nicht gleich im Anschluss bei 60°C getrocknet werden. Lufttrocknende Paraffinschnitte schließen Wasser unter dem Gewebe ein und dieses verhindert dadurch die Interaktion der negativen Gewebeladungen mit der positiv geladenen Beschichtung.

Weitere Komponenten einer guten Gewebefixierung sind Retrieval-pH (hoher pH Wert erleichtert das Ablösen, *siehe Kap. Demaskierung*), Retrieval-Dauer und natürlich die Art des Gewebes. Je weniger negativ geladene Gewebekomponenten vorhanden sind, umso weniger Bindungspartner stehen zur Verfügung.

### Trocknen und Entparaffinieren

Die Antrocknungstemperatur sollte 60°C nicht überschreiten. Trockene Hitze über 60°C schadet den Schnitten. Sie sollten mindestens eine Stunde bei dieser Temperatur trocknen, um ein Ablösen vom Objektträger zu vermeiden. Es gibt auch hier in der Handhabung Varianten. Bspw. 60 min bei 60°C und weiters über Nacht bei 37°C, oder die ganze Nacht bei 60°C oder die ganze Nacht bei 37°C mit vorheriger längerer Trocknung bei Raumtemperatur. Auch hier gilt es, die ideale Methode selbst herauszufinden.

Bevor die Immunhistochemie durchgeführt wird, muss das Paraffin aus dem Schnitt entfernt werden. Das beste Mittel dafür ist **Xylol**. Der Einsatz von Xylolersatzmittel ist noch umstritten. Während die einen nur auf Xylol schwören, sehen andere keine negativen Auswirkungen bei Xylolersatzmitteln. Die **Entparaffinierung** soll sehr gründlich sein (mind. 20 min). Anschließend erfolgt die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe bis zu Aqua dest. Die Schnitte werden dann in die Pufferlösung übergeführt und können weiterverarbeitet werden. Wichtig ist, dass die Schnitte im entparaffinierten Zustand **nicht mehr austrocknen**.

Neue Methoden umgehen das kanzerogene Xylol durch Aufheizen der Paraffinschnitte in Pufferlösung (z.B. in der Mikrowelle oder im Immunhistoautomaten). An die Entparaffinierung wird das Epitopretrieval direkt angeschlossen.

Man hat festgestellt, dass die Nachweisbarkeit von Antigenen auf vorgefertigten, noch nicht entparaffinierten Schnitten mit der Lagerungsdauer abnimmt. Die Empfindlichkeit der Epitope ist dabei unterschiedlich. Die Schnitte sollten deshalb innerhalb einer Woche verarbeitet werden. Man untersuchte, ob die Aufbewahrung bei

4°C oder Raumtemperatur bzw. entparaffiniert in Protektionslösung bei -20°C die Nachweisbarkeit verlängert. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Reaktion nach 4 Wochen bei allen Lagervarianten. Die Aufbewahrung tiefgefroren in Sucrose bewahrte das Ergebnis am längsten (Preservation of Estrogen Receptor in Paraffin Sections, Christine M. Bromley et al; The J.Histochemol. 17:115, 1994).

## F. Antigen-Demaskierung

Unter **Maskierung** des Antigens versteht man, dass durch Vernetzungsreaktionen aufgrund der Fixierung bzw. durch Membranen der Zugang des primären Antikörpers zu seinem Reaktionspartner nicht möglich bzw. erschwert ist. Durch die **Demaskierung** werden diese Vernetzungen und Membranen aufgebrochen, das Netz wird lockerer und durchgängiger (= Permeabilitätssteigerung).

Durch die Entwicklung der Demaskierung wurde der routinemäßige Einsatz von Antikörpern auf formalinfixiertem-paraffineingebettetem Gewebe erst ermöglicht. Es gibt verschiedene Varianten der Vorbehandlung. Wichtig ist es, für den jeweiligen Antikörper bzw. Epitop die richtige Methode herauszufinden. Es ist schwierig, hier eine Standardisierung einzubringen, da von Labor zu Labor Nachweismethoden, Antikörper und Fixierung variieren. Firmen, die automatisierte Immunhistogeräte und Reagenzien vertreiben, bieten meist Prozeduren an, die auf die laborspezifischen Bedürfnisse noch angepasst werden können.

Im Routinebetrieb nähert man sich dem optimalen Ergebnis meist durch eine Kompromisslösung an. Es wird für alle AK, die eine Art von Demaskierung benötigen, eine einheitliche Methode und Dauer gewählt. So wird der Arbeitsaufwand bei annehmbarem Ergebnis geringer gehalten.

### 1. Andauung durch proteolytische Enzyme

Als theoretische Grundlage für die enzymatische Demaskierung gilt die Annahme, dass durch die Enzymwirkung die fixierungsbedingten Protein-Vernetzungen aufgebrochen werden und die Permeabilität des Gewebes gesteigert wird (**PIER** = proteolytisch induziertes Epitop Retrieval). Die am häufigsten eingesetzten Enzyme zur Demaskierung sind Protease (0,1%) und Trypsin (0,05%) gelöst in Puffer. Die Dauer der Einwirkung liegt zwischen 15 und 40 min bei Raumtemperatur oder bei 37°C.

Der Nachteil der enzymatischen Einwirkung liegt in der Gefahr der zu starken Andauung, die zu einer schlimmen Morphologiezerstörung führt. Sie wird deshalb auf wenige Antigene beschränkt, wo sie unbedingt notwendig ist. Im Umgang mit Enzymlösungen ist wichtig zu wissen, dass die gelösten Enzyme einen optimalen Zeitraum für ihre Wirkung haben.

Protease- und Trypsinlösungen haben ca. 10 min nach dem Auflösen ihre optimale Wirkung, nach 30 min kommt es zu einem Aktivitätsverlust. Zum Abstoppen der Enzymaktivität setzt man oft eisgekühlte Pufferlösung ein. Ausführliches Spülen sollte auch den gleichen Effekt haben, um ein Nachwirken der Andauung zu verhindern.

### 2. Hitze

Eigentlich nahm man an, dass Hitze in jeglicher Form der immunhistologischen Auswertung schadet. Umso erstaunlicher war die Erkenntnis, dass ausgerechnet sehr heiße Temperaturen die Verwendung der IHC auf formalinfixiertem Gewebe erst ermög-

# Imaging maculopathy in post-mortem human eyes

Christine A. Curcio \*

*Department of Ophthalmology, University of Alabama School of Medicine, Birmingham, AL, USA*

Received 1 July 2005

---

## Abstract

Age-related maculopathy (ARM) remains a poorly understood degeneration. To discover new pathways using contemporary genomics, proteomics, and immunohistochemistry, validate emerging animal models, and validate new imaging modalities, human tissues obtained from donor eyes will be essential to ARM research for the foreseeable future. Because fundus appearance is the clinical diagnostic *lingua franca*, laboratory investigators adapted these standards to the distinctive appearance of post-mortem tissues in order to identify and stage ARM in donor eyes. Post-mortem tissues offer unique advantages and limitations relative to pre-mortem tissues for imaging studies. One fellow eye can be used for imaging and the other for correlative laboratory studies, if some degree of disease stage asymmetry between eyes is acceptable. Histological verification is a necessary, albeit challenging, step in validating a grading system.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Ageing; Degeneration; Drusen; Electron microscopy; Fundoscopy; Histochemistry; Maculopathy

---

## 1. Background

Age-related maculopathy (ARM), the major cause of vision loss in the elderly, is a poorly understood degeneration. Animal models, genetically and surgically induced, abound for choroidal neovascularization, the principal sight-threatening complication (Ambati, Ambati, Yoo, Ianchulev, & Adamis, 2003), but models replicating the early stages of the disease remain an elusive goal, in part because biochemical models of drusen biogenesis are poorly developed. To discover new biochemical pathways using contemporary genomics, proteomics, and immunohistochemistry, validate emerging animal models, and validate new imaging modalities, human tissues obtained from donor eyes will be essential to ARM research for the foreseeable future. It is instructive to note the experience of research in other age-related

diseases. Forty years after the characterization of cholesterol-enriched lesions in coronary artery disease, 20 years after the isolation of tau-protein from Alzheimer brain, and the current widespread availability of animal models and in vitro systems for both diseases, high-impact studies using human tissues are still being published in atherosclerosis and Alzheimer research. Because imaging plays a key role in identifying and staging eyes for subsequent analysis, this topic is appropriate for a neuro-imaging conference. This article will briefly address how maculopathy can be visualized in post-mortem eyes and summarize results pertaining to lesion formation obtained through such studies in my laboratory. It is predicated on the concept that even as retinal imaging approaches previously unimagined levels of technical refinement, histopathology remains an important adjunct approach. Intended for the basic or clinical investigator with access to human eye tissue, this article will not comprehensively review ARM histopathology, nor will it provide detailed clinical information on selected ARM cases.

---

\* Tel.: +1 205 325 8632; fax: +1 205 325 8634.  
E-mail address: [curcio@uab.edu](mailto:curcio@uab.edu).

## 2. Definitions

The human macula, defined epidemiologically (Klein et al., 1991) and anatomically (Polyak, 1941), is ~6 mm in diameter, centered on the fovea, and contained within the vascular arcades. It subserves the central 21° of visual angle. The retinal layers most directly involved in early and late ARM are the retinal pigment epithelium (RPE), Bruch's membrane (BrM), choriocapillaris (ChC), and secondarily impacting on the photoreceptors (Ph). The latter cells, in turn, are segregated within the image plane of the macula into a small cone-dominated fovea surrounded by a large rod-dominated parafovea. BrM, the inner wall of the choroid, a vascular bed with the body's highest blood flow, is a 5-layer connective tissue consisting of the basal laminae of the RPE and ChC on the outside, an elastin layer in the middle, and two collagenous layers between (Marshall, Hussain, Starita, Moore, & Patmore, 1998). Early ARM is typified by the presence of soft drusen (focal extracellular deposits with sloping sides) and an abundance of basal deposits. The latter are diffuse lesions located either between the RPE and its basal lamina (basal laminar deposit, consisting of basement membrane-like material) or, like drusen, between the RPE basal lamina and the inner collagenous layer of the BrM (basal linear deposit, consisting of membranous debris). Choroidal neovascularization in ARM patients consists primarily of in-growth of ChC vessels into a natural cleavage plane external to the RPE (Grossniklaus & Green, 2004). Extensive and sharply defined atrophy of RPE (geographic atrophy) can occur as an end-stage of a non-exudative degeneration or concomitantly with neovascularization.

## 3. Clinical grading systems

To achieve twin goals of objectivity and reproducibility for ARM diagnosis and staging, clinical researchers now rely on standard fundus photographs rather than clinical examination. Features common to clinical ARM grading systems were derived from those developed for diabetic retinopathy (DRSRG, 1981; ETDRS, 1991). These include the use of standard lighting conditions that emphasize drusen or subtle alterations in RPE pigmentation, a fovea-centered grid which defines standard subfields for assignment of lesion location, standard circles (based on choroidal vessel diameter) which can be used to measure diameter and area, and on-going reliability assessment by cross-checking individual graders and by periodic re-grading of a standard test photograph set. Although reliable, these grading systems still await histological validation, a challenging goal, because few ARM eyes come to histopathology. To date only two studies have illustrated micrographs of lesions previously graded using accepted clinical standards

(Curcio, Medeiros, & Millican, 1998; Sarks, Arnold, Killingsworth, & Sarks, 1999).

Population-based epidemiologic studies e.g., (Klein, Klein, & Linton, 1992; Mitchell, Smith, Attebo, & Wang, 1995; Vingerling et al., 1995) rely on the Wisconsin ARM Grading System or the related International System, which defines an early and late stage. Clinical studies and clinical trials following the lead of the N.E.I.-funded Age-related Eye Disease Study (AREDS) (2001) will increasingly utilize the AREDS grading system. This formulation resembles the WARMGS in lesion definition, but differs from the WARMGS in that four stages of maculopathy are assigned rather than two. A progression between the first three stages are implied but not proven by this scheme.

## 4. Previous literature on ARM clinicopathologic correlation

A literature search<sup>1</sup> reveals roughly 130 studies since 1974 (half of which appeared since 1998) that directly examined eyes from known ARM patients with light or electron microscopic tissue methods. These investigations can be divided into several main genres, as illustrated by the following: (1) extensive series of eyes from a single hospital population, supplemented by clinical information with pre-mortem imaging (Sarks, 1976; Sarks et al., 1999), and derivative small sub-series (Penfold, Killingsworth, & Sarks, 1984); (2) extensive series of eyes with clinical information including pre-mortem imaging from eye pathology laboratories working closely with local eye banks (Bressler, Silva, Bressler, Fine, & Green, 1994; Green & Enger, 1993; Green & Key, 1977); (3) extensive series of clinically undocumented eyes from eye pathology laboratories working closely with local eye banks (Biswas & Raman, 2002; Kliffen, Mooy, Luidner, Huijman, & Kerkvliet, 1996; Loeffler & Lee, 1986; Spraul & Grossniklaus, 1997; van der Schaft et al., 1992); (4) extensive series of eyes from eye pathology laboratories working with autopsy services (Gartner & Henkind, 1981; Hoshino, Mizuno, & Ichikawa, 1984); (5) extensive series harvested from local eye banks for research purposes, with varying degrees of clinical documentation (Chong et al., 2005; Curcio, Presley, Millican, & Medeiros, 2005; Olsen & Feng, 2004); (5) series of varying sizes gleaned from an eye bank network coordinated through a non-profit organization, foundation, or individual laboratory (Bhutto et al., 2004; Hahn, Milam, & Dunaief, 2003; Kamei & Hollyfield, 1999; Marmorstein et al., 2002). To date there has been little move towards standardizing ARM histopathologic

<sup>1</sup> PubMed; June 23, 2005; age-related macular degeneration histopathology; abstract in English; human or non-human primate.

diagnostic criteria for human tissue as there has been for standardizing fundus appearance criteria (Bird et al., 2004). Other sources of ARM-relevant tissues consist of aged non-human primates (Chang et al., 1998; Hope et al., 1992; Johnson et al., 2005; Umeda et al., 2005) whose drusenoid-like lesions may well resemble human drusen at the molecular level, and surgically excised sub-macular neovascular membranes (Ambati et al., 2003; Grossniklaus & Green, 2004), which since 1994 provided a gold standard for rapid availability and consistency of tissues for immunohistochemistry and recently, cell culture (Schlunck, Martin, Agostini, Camatta, & Hansen, 2002).

### 5. Differences between pre- and post-mortem fundus imaging

Because fundus appearance is the diagnostic *lingua franca* in the clinic, laboratory investigators developed methods to identify and stage ARM in donor eyes in post-mortem fundus. Another impetus for this effort is the fact that eye bank eyes have limited ophthalmic histories available at the time of accession, because such records are not required by regulatory agencies, at least in the US. Therefore, it is desirable to stage eyes strictly on the basis of features visible within the eye itself. To achieve the same goals of objectivity and reproducibility that motivated clinical researchers to rely on standard fundus photographs rather than clinical examination, it is possible to rely on standard photographs of the post-mortem fundus over gross examination.

Retinal edema and/or detachment can appreciably reduce the visibility of posterior pigmented tissues. Observations in fresh eyes indicate that these changes occur post-mortem and do not worsen markedly with fixation. In addition, choroidal vessels empty after death, making it difficult to assess minor pigmentary variations in the plane of the RPE against the undulating background of pale vessels and dark interstitial tissue. Therefore, applying methods for grading clinical fundus photographs directly to preserved donor eyes is unwarranted, given the distinctly different detail visible in pre- and post-mortem fundus. The challenge, then, is to adapt clinical schemes to the constraints of post-mortem material.

Nevertheless, post-mortem tissues offer *advantages* relative to pre-mortem imaging as a research resource, as follows: (1) the anterior segment and vitreous can be removed to optimize the view of retina and choroid; (2) globes can be illuminated directly, tangentially, and trans-sclerally to maximize contrast of drusen and/or pigmentary changes; (3) the retina can be removed revealing underlying chorioretinal pathology in greater detail; (4) stereoscopic viewing and imaging can reveal

anteriorly elevated structures; (5) accurate internal magnification standards can be used. Through a fellow eye design, one eye can be designated for ARM grading and the other for correlative studies, although not without some compromise in diagnostic precision. Much ARM pathology is bilaterally symmetrical in type if not degree of severity (drusen, RPE hyperpigmentation) (Wang, Mitchell, Smith, & Cumming, 1998), and 36% of early ARM, 26% of late ARM would be missed if only one eye is graded (Klein et al., 2003).

The *challenges* of post-mortem tissues are: (1) post-mortem edema of the inner retina can opacify the tissue and obscure parafoveal pathology; (2) sub-retinal fluid occurs frequently, especially in the peripapillary area and occasionally in conjunction with pre-retinal fluid, and cannot be used as a marker for exudative ARM; (3) intra-retinal hemorrhage occurs frequently; (4) draining of blood from choroidal vessels leaves an undulating dark and light background which obscures visualization of overlying drusen; (4) the retina must be left in situ to localize macular landmarks but should be removed for best viewing of underlying RPE/choroid; (5) individual differences in pigmentation density and hue are compounded by individual differences in post-mortem change.

### 6. MGS and ALARMGS: Methods for post-mortem fundus imaging

Two recent systems seek to document ARM morphology in permanent photographic records paralleling clinical examination: (1) Alabama Age-related Maculopathy Grading System (ALARMGS) (Curcio et al., 1998), based on WARMGS, using 35 mm color film and stereoscopic imaging for preserved eyes destined for histopathology; (2) Minnesota Grading System (MGS), (Olsen & Feng, 2004), based on AREDS, using digital color images, single and stereo, for fresh eyes destined for genomics/proteomics. These approaches are compared in Table 1.

The MGS and ALARMGS *have in common* the use of different illumination techniques—direct (epi-illumination), tangential, and indirect (trans-scleral). Tangential illumination, afforded by angling a gooseneck fiber-optic element (MGS) or using the oblique illumination from a dark-field microscopy base (ALARMGS) highlights focal and diffuse changes in the RPE, similar to the effect of sunlight shining across a mountain range. Specific macular features are best illustrated with a combination of illumination techniques. Drusen, pigment change, and unevenness of elevation are more visible with direct, trans-scleral, and tangential lighting, respectively. Distinctive druse types (calcified, basal laminar) are visible.

Table 1  
Methods for imaging maculopathy in post-mortem retina

	ALARMGS	MGS
ARM knowledge base	Histopathologically defined cases	Clinical observation
Purpose of staging	Histopathological analysis	Genomics/proteomics
Tissue	Horizontal strip with fovea, optic nerve head, nasal & temporal periphery	Whole globe, anterior segment removed by circumferential incision at pars plana
Preservation status	Mixed aldehyde fixation	Fresh
Images obtained	Retina on, stereo	Retina on and retina off, mono or stereo
Stereo microscope	Nikon SMZ-U, side-port extension	Nikon SMZ 1500
Lighting equipment (epi-, light source; trans-, light source)	Fixed location fiber optic ring; halogen; dark-field base; halogen	Gooseneck fiber optic, halogen; flat plate diffuse illumination
Illumination modes	Direct $\pm$ oblique trans-scleral	Direct $\pm$ tangential $\pm$ oblique trans-scleral
Camera	Nikon UFXII	Sony DXC-S500
Media	EPJ320T 35 mm film	Digital camera
Magnification standard	External; photograph of ruler	Internal; 1 mm ruby sphere placed on optic nerve head
Image viewing	Light box, fluorescent, color temperature 5000°	Computer monitor, green filter, 10%, digitally applied
EDTRS/WARMGS grid	On acetate; centered and taped to 35 mm slide	Digital; centered using “retina on” image; proportional triangle and choroidal landmarks indicate sub-foveal RPE on “retina off” image

The ALARMGS and MGS *differ in the tissues used*, as ALARMGS employs a horizontal belt containing the macula stabilized in a polystyrene cup and submerged in buffer to eliminate specular reflections off the tissue surface. Complete removal of macular vitreous was essential for reducing adhesion of dirt and bubbles. In contrast, the MGS employs whole globes with anterior segment removed. The MGS and ALARMGS also *differ in the method used to center and calibrate a grading grid*. The ALARMGS uses a WARMGS grid, its diameter calibrated to match 6 mm on the retina as captured 35 mm film at standard magnifications and printed on a plastic overlay. The overlay is physically affixed to a 35 mm slide. In contrast, the MGS employs a digital proportional triangle that denotes within digital images the fovea and two prominent choroidal landmarks before and after removal of the neurosensory retina. Then, a grid overlay is adjusted for an internal magnification standard on each image (a 1000- $\mu$ m diameter ruby sphere placed on the optic nerve head). By matching the inner circle to the ruby sphere, all other circles are proportionally modified (via Adobe Illustrator software).

## 7. Clinicopathologic correlation using ALARMGS images

Selected images from human eyes accessioned over 10 years are shown in Fig. 1 (gross photographs; see Supplementary Figure for stereo pair versions) and Fig. 2 (histopathology), with the intent of illustrating microscopic correlates of fundus features. Original publications contain more detail and/or additional illustrations (Curcio & Millican, 1999; Curcio et al., 2005; Curcio, Presley, Millican, et al., 2005; Malek, Li, Guidry, Medeiros, & Curcio, 2003; Curcio et al., 1998).

In normal aged maculas (Fig. 1A), the front stereo plane shows intrinsic vessels of the neurosensory retina, deeply pigmented foveal retina, translucent parafoveal retina, and the back stereo plane shows undulating dark and light stripes in underlying empty choroidal vessels. In 1  $\mu$ m-thick sections (Fig. 2A), rod and cone nuclei appear in different sublayers (cones, outer; rods, inner) of ONL, they differ in the relative ratio of euchromatin to heterochromatin (high for cones, low for rods), and the distinctly delicate outer segments are bent.

In an eye with clinically “mild” ARM and 20/30 acuity, small dome-shaped drusen, visible through depth of small fold created by post-enucleation edema (Fig. 1B), has ultrastructurally identified membranous contents that are continuous with a layer of basal linear deposit (Fig. 2B). In an eye with clinically described “dry ARM and pigment changes” and 20/40 acuity, large pale drusen, associated with hyperpigmented RPE, are visible at fovea and less so through edematous parafovea (Fig. 1C). The largest foveal druse is encased by basal laminar deposit, contains membranous debris, and lakes of neutral lipid (Fig. 2C). In a clinically undocumented eye exhibiting a large foveal druse (Fig. 1D), filipin histochemistry reveals esterified cholesterol in lakes within the druse and BrM (Fig. 2D) and unesterified cholesterol in a diffuse pattern within the druse, BrM, and all chorio-retinal cellular membranes. To our knowledge, this druse is the first that is both funduscopically visible and chemically characterized. In a clinically undocumented eye with geographic atrophy of RPE, inactive fibrotic choroidal neovascularization, and intra-retinal pigment migration (Fig. 1E), an unusually thick and pale basal laminar deposit overlies a prominent basal linear deposit comprised of neutral lipid pools

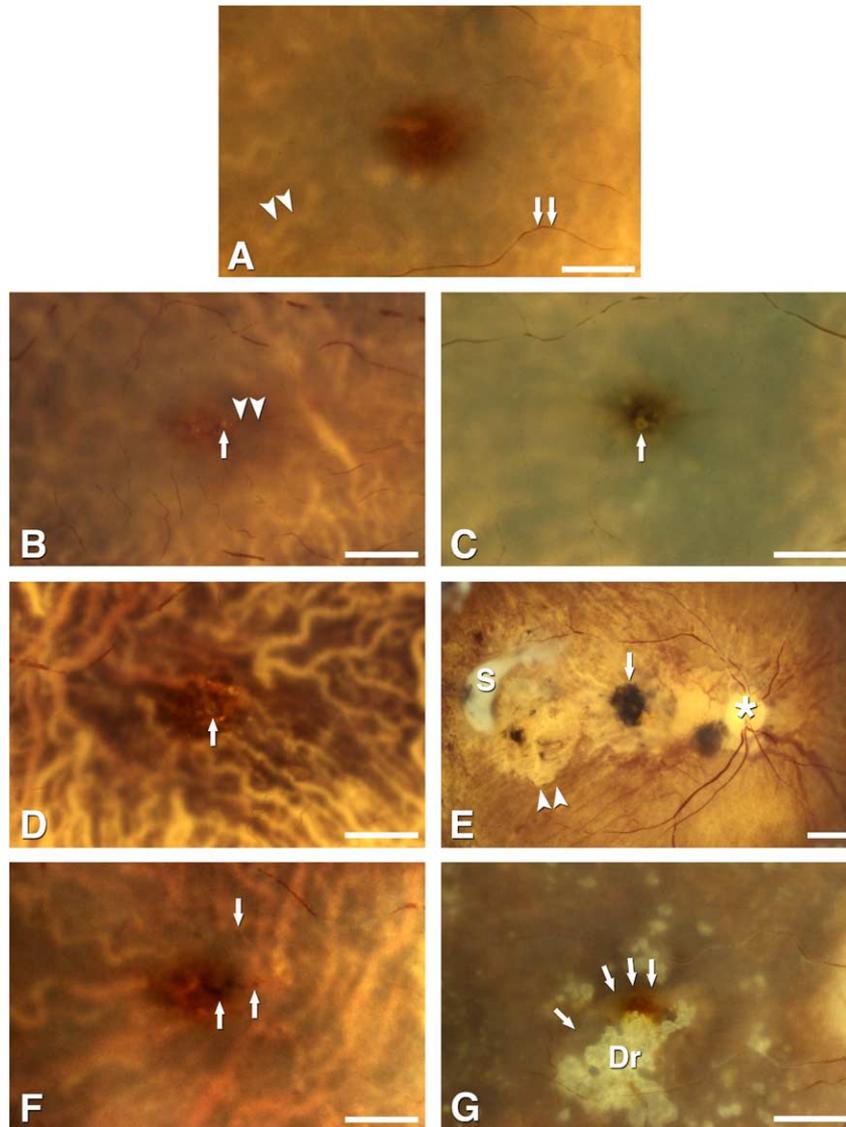


Fig. 1. Post-mortem fundus in aged and ARM eyes. Fovea is at the center of all panels. Bars, 1 mm: (A) right eye shows a normal macula with deeply pigmented foveal retina, translucent parafoveal retina with retinal vessels (arrows), and undulating dark and light stripes in underlying choroid (arrowheads) (87-year-old man). (B) Right eye shows small drusen (arrow) visible through depth of small fold created by post-enucleation edema (arrowheads) (60-year-old man). (C) Right eye shows large drusen (arrow) with hyperpigmented RPE, visible at fovea and less so through edematous parafovea (74-year-old man). (D) Left eye shows prominent drusen in foveal center of eye with little post-mortem change (85-year-old man). (E) Right eye shows geographic atrophy of RPE (arrowheads), scar (s) denoting inactive fibrotic choroidal neovascularization temporal to the fovea, and intra-retinal pigment migration (arrow). Asterisk, optic nerve head. (87-year-old man). (F) Right eye shows anteriorly migrated pigment clumps (arrows) superior-nasal to the fovea (90-year-old-woman). (G) Right eye shows large calcified drusen (Dr) overlying a triangular area of hypopigmentation (arrows) bordered by hyperpigmentation (83-year-old woman).

(Fig. 2E). In a clinically undocumented eye with anteriorly migrated pigment clumps and RPE hypopigmentation nasal to the fovea (Fig. 1F), the most prominent pigmentary change is hyperpigmented/hypertrophic balloon-like RPE cells sloughed from their monolayer overlying basal laminar deposit into the subretinal space (Fig. 2F).

In an eye from a donor with 20/60 acuity and cumulus-like calcified drusen, a triangular area of hypopigmentation bounded by hyperpigmentation (Fig. 1G)

delimits a serous RPE detachment with pigmented cells (presumed RPE) on BrM (Fig. 2G).

## 8. Conclusions and directions

In conclusion, ARM morphology is visible in the post-mortem fundus, enabling the large scale harvesting of ARM eyes from the donor population. Clinical and epidemiologic grading systems are adaptable to the

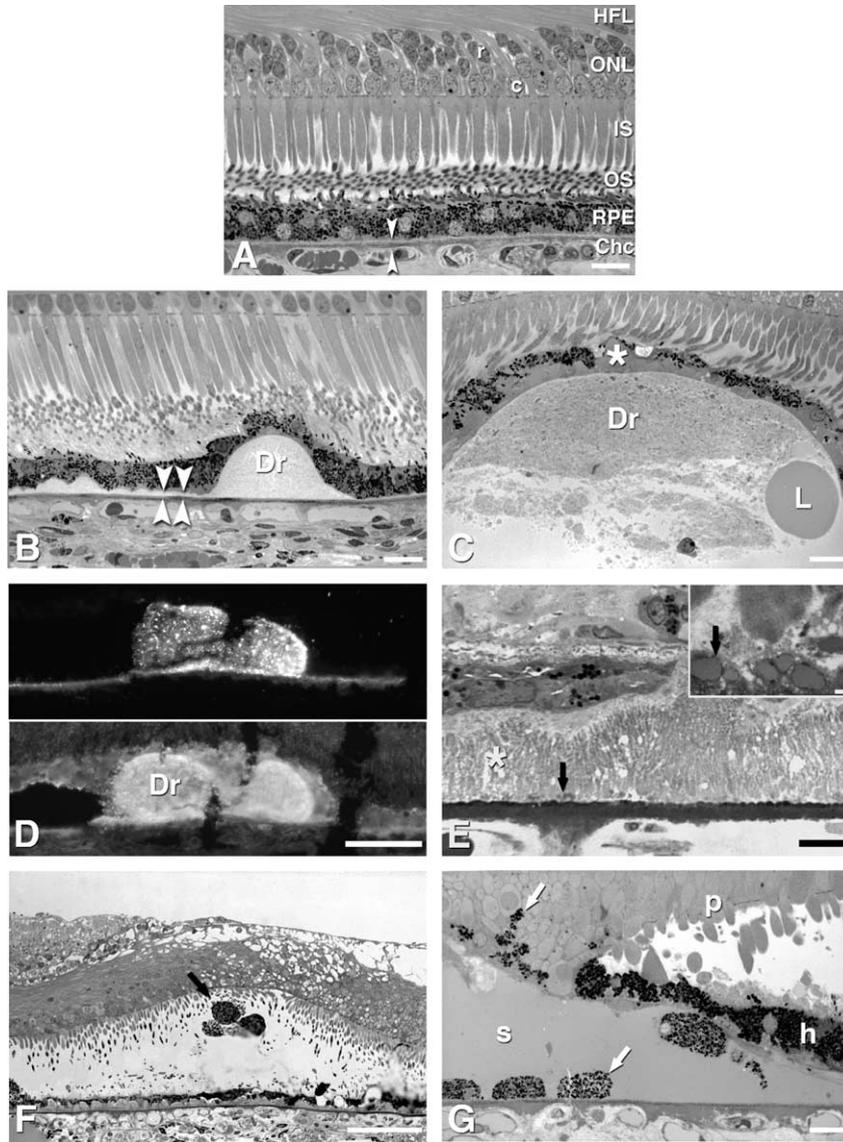


Fig. 2. Histopathology of aged and ARM eyes. 1  $\mu\text{m}$ -thick, toluidine-*O*-blue stained sections (A,B,C,E,F,G); adjacent cryosections stained with filipin (D). Bars, 20  $\mu\text{m}$  unless noted. (A) Parafoveal area of normal macula has mixed rods (r) and cones (c), thin Bruch's membrane (bracketing arrowheads), and choriocapillaris (ChC). HFL, Henle fiber layer; ONL, outer nuclear layer; IS, inner segments; OS, outer segments; RPE, retinal pigment epithelium. (87-year-old man). (B) Druse with membranous contents is continuous with a layer of basal linear deposit (bracketing arrowheads). (60-year-old man). (C) Large druse (Dr), encased by basal laminar deposit (asterisk), contains membranous debris and lakes of neutral lipid (L) (74-year-old man). (D) Esterified cholesterol, in lakes (top panel), and unesterified cholesterol (bottom panel) in the same solitary druse (Dr). Bar, 50  $\mu\text{m}$  (85-year-old man). (E) A thick, pale basal laminar deposit (asterisk) overlies prominent basal linear deposit (arrow) comprised of neutral lipid pools, post-fixed by osmium paraphenylenediamine—tannic acid method (inset, arrow; bar, 0.5  $\mu\text{m}$ ) (87-year-old man). (F) Lower magnification view of fovea with thick basal laminar deposits and RPE cells (arrow) sloughed into the subretinal space. Bar, 100  $\mu\text{m}$  (90-year-old-woman). (G) A serous (s) detachment of the RPE is flanked by hyperpigmented RPE (h), pigment granules in migration (white arrow), and photoreceptors (p) lacking outer segments. Presumed RPE cells line Bruch's membrane (black arrow) (83-year-old woman).

post-mortem fundus. That combined immunohistochemical/histopathologic analysis, fundus visualization, systemic tests, can further focus the power of these correlations, especially given the potential for retrospective screening of archived material, is underscored by recent work linking polymorphisms in complement factor H and ARM (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005). Of the

future challenges, perhaps the most significant is the continued validation of grading systems via histopathology, in part because of the long time-scale over which usable specimens with *bona fide* ARM are obtained from systematic harvesting of donor eyes. Cholesterol localization in lesions should stimulate interest in imaging modalities that provide distinctive signatures for the lipid-rich plaque core in atherosclerotic

arterial intima (Kramer, 2002; Regar, Schaar, Mont, Virmani, & Serruys, 2003; Schoenhagen & Nissen, 2003). These include, but are not restricted to, intravascular ultrasound, optical coherence tomography, and magnetic resonance imaging. Many of these modalities are already commonly used by ophthalmologists or other physicians regularly assessing ophthalmologists' referrals.

## Acknowledgments

We thank the Alabama Eye Bank for timely retrieval of donor eyes, current and former laboratory members (T.A. Bailey, M. Chimento, H. Kapadia, G. Malek, N.E. Medeiros, C.L. Millican, J.B. Presley, X. Zhang) for technical and intellectual contributions, J.O. Dixon, MD., for suggesting stereo photography, and T.W. Olsen, MD, for his input to the conference presentation. This work was supported by NIH grants 1R01EY06109, International Retinal Research Foundation, a Lew R. Wasserman Merit Award and unrestricted departmental funds from Research to Prevent Blindness, and EyeSight Foundation of Alabama.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.visres.2005.07.038](https://doi.org/10.1016/j.visres.2005.07.038).

## References

- Ambati, J., Ambati, B. K., Yoo, S. H., Ianchulev, S., & Adamis, A. P. (2003). Age-related macular degeneration: Etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of Ophthalmology*, *48*, 257–293.
- AREDS (2001). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss. AREDS report no. 8. *Archives of Ophthalmology*, *119*, 1417–1436.
- Bhutto, I. A., Kim, S. Y., McLeod, D. S., Merges, C., Fukai, N., Olsen, B. R., et al. (2004). Localization of collagen XVIII and the endostatin portion of collagen XVIII in aged human control eyes and eyes with age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *45*, 1544–1552.
- Bird, A. C., Bressler, N. M., Bressler, S. B., Carper, D., Chew, E. Y., Csaky, K. G., Davis, M. D. et al. (2004). Age-related macular degeneration phenotype consensus meeting. Available from: [http://www.nei.nih.gov/strategicplanning/amd\\_meetingtables.asp](http://www.nei.nih.gov/strategicplanning/amd_meetingtables.asp).
- Biswas, J., & Raman, R. (2002). Age-related changes in the macula. A histopathological study of fifty Indian donor eyes. *Indian Journal of Ophthalmology*, *50*, 201–204.
- Bressler, N. M., Silva, J. C., Bressler, S. B., Fine, S. L., & Green, W. R. (1994). Clinicopathological correlation of drusen and retinal pigment epithelial abnormalities in age-related macular degeneration. *Retina*, *14*, 130–142.
- Chang, A. A., Morse, L. S., Handa, J. T., Morales, R. B., Tucker, R., Hjelmeland, L., et al. (1998). Histologic localization of indocyanin green dye in aging primate and human ocular tissues with clinical angiographic correlation. *Ophthalmology*, *105*, 1060–1068.
- Chong, N. H., Keonin, J., Luthert, P. J., Frennesson, C. I., Weingeist, D. M., Wolf, R. L., et al. (2005). Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. *American Journal of Pathology*, *166*, 241–251.
- Curcio, C. A., Medeiros, N. E., & Millican, C. L. (1998). The Alabama age-related macular degeneration grading system for donor eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *39*, 1085–1096.
- Curcio, C. A., & Millican, C. L. (1999). Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Archives of Ophthalmology*, *117*, 329–339.
- Curcio, C. A., Presley, J. B., Medeiros, N. E., Malek, G., Avery, D. V., & Kruth, H. S. (2005). Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy. *Experimental Eye Research* (revised and re-submitted).
- Curcio, C. A., Presley, J. B., Millican, C. L., & Medeiros, N. E. (2005). Basal deposits and drusen in eyes with age-related maculopathy: Evidence for solid lipid particles. *Experimental Eye Research*, *80*, 761–775.
- Diabetic Retinopathy Study Research Group (1981). Report 7. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *21*, 210–226.
- Edwards, A. O., Ritter, R., III, Abel, K. J., Manning, A., Panhuysen, C., & Farrer, L. A. (2005). Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*, *308*(5720), 421–424.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991). Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs—an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. *Ophthalmology*, *98*, 786–806.
- Gartner, S., & Henkind, P. (1981). Aging and degeneration of the human macula. I. Outer nuclear layer and photoreceptors. *British Journal of Ophthalmology*, *65*, 23–28.
- Green, W. R., & Enger, C. (1993). Age-related macular degeneration histopathologic studies: The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology*, *100*, 1519–1535.
- Green, W. R., & Key, S. N. (1977). Senile macular degeneration: A histopathological study. *Transactions of American Ophthalmological Society*, *75*, 180–254.
- Grossniklaus, H. E., & Green, W. R. (2004). Choroidal neovascularization. *American Journal of Ophthalmology*, *137*, 496–503.
- Hageman, G. S., Anderson, D. H., Johnson, L. V., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Hardisty, L. I. et al. (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of National Academy of Science USA*.
- Hahn, P., Milam, A. H., & Dunaief, J. L. (2003). Maculas affected by age-related macular degeneration contain increased chelatable iron in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Archives of Ophthalmology*, *121*, 1099–1105.
- Haines, J. L., Hauser, M. A., Schmidt, S., Scott, W. K., Olson, L. M., Gallins, P., et al. (2005). Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*, *308*(5720), 419–421.
- Hope, G. M., Dawson, W. W., Engel, H. M., Ulshafer, R. J., Kessler, M. J., & Sherwood, M. B. (1992). A primate model for age related macular drusen. *British Journal of Ophthalmology*, *76*, 11–16.
- Hoshino, M., Mizuno, K., & Ichikawa, H. (1984). Aging alterations of retina and choroid of Japanese: Light microscopic study of macular region of 176 eyes. *Japan Journal of Ophthalmology*, *28*, 89–102.
- Johnson, M. A., Luttj, G. A., McLeod, D. S., Otsuji, T., Flower, R. W., Sandagar, G., et al. (2005). Ocular structure and function in an aged monkey with spontaneous diabetes mellitus. *Experimental Eye Research*, *80*, 37–42.

- Kamei, M., & Hollyfield, J. G. (1999). TIMP-3 in Bruch's membrane: Changes during aging and in age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *40*, 2367–2375.
- Klein, R., Davis, M. D., Magli, Y. L., Segal, P., Klein, B. E. K., & Hubbard, L. (1991). The Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System. *Ophthalmology*, *98*, 1128–1134.
- Klein, R., Klein, B. E., Marino, E. K., Kuller, L. H., Furberg, C., Burke, G. L., et al. (2003). Early age-related maculopathy in the cardiovascular health study. *Ophthalmology*, *110*, 25–33.
- Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J. Y., Sackler, R. S., Haynes, C., et al. (2005). Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*, *308*(5720), 385–389.
- Klein, R., Klein, B. E. K., & Linton, K. L. P. (1992). Prevalence of age-related maculopathy. *Ophthalmology*, *99*, 933–943.
- Kliffen, M., Mooy, C. M., Luider, T. M., Huijmans, J. G. M., Kerkvliet, S., et al. (1996). Identification of glycosaminoglycans in age-related macular deposits. *Archives of Ophthalmology*, *114*, 1009–1014.
- Kramer, C. M. (2002). Magnetic resonance imaging to identify the high-risk plaque. *American Journal of Cardiology*, *90*, 15L–17L.
- Loeffler, K. U., & Lee, W. R. (1986). Basal linear deposit in the human macula. *Graefes Archives of Clinical and Experimental Ophthalmology*, *224*, 493–501.
- Malek, G., Li, C.-M., Guidry, C., Medeiros, N. E., & Curcio, C. A. (2003). Apolipoprotein B in cholesterol-containing drusen and basal deposits in eyes with age-related maculopathy. *American Journal of Pathology*, *162*, 413–425.
- Marmorstein, L. Y., Munier, F. L., Arsenijevic, Y., Schorderet, D. F., McLaughlin, P. J., Chung, D., et al. (2002). Aberrant accumulation of EFEMP1 underlies drusen formation in Malattia Leventinese and age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, *99*, 13067–13072.
- Marshall, J., Hussain, A. A., Starita, C., Moore, D. J., & Patmore, A. L. (1998). Aging and Bruch's membrane. In M. F. Marmor & T. J. Wolfensberger (Eds.), *The retinal pigment epithelium: Function and disease* (pp. 669–692). New York: Oxford University Press.
- Mitchell, P., Smith, W., Attebo, K., & Wang, J. J. (1995). Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*, *102*, 1450–1460.
- Olsen, T. W., & Feng, X. (2004). The Minnesota Grading System of eye bank eyes for age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *45*, 4484–4490.
- Penfold, P., Killingsworth, M., & Sarks, S. (1984). An ultrastructural study of the role of leucocytes and fibroblasts in the breakdown of Bruch's membrane. *Australian Journal of Ophthalmology*, *12*, 23–31.
- Polyak, S. L. (1941). *The retina*. Chicago: University of Chicago.
- Regar, E., Schaar, J. A., Mont, E., Virmani, R., & Serruys, P. W. (2003). Optical coherence tomography. *Cardiovascular Radiation in Medicine*, *4*, 198–204.
- Sarks, S. H. (1976). Ageing and degeneration in the macular region: A clinico-pathological study. *British Journal of Ophthalmology*, *60*, 324–341.
- Sarks, S. H., Arnold, J. J., Killingsworth, M. C., & Sarks, J. P. (1999). Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age-related maculopathy: A clinicopathological study. *British Journal of Ophthalmology*, *83*, 358–368.
- Schlunck, G., Martin, G., Agostini, H. T., Camatta, G., & Hansen, L. L. (2002). Cultivation of retinal pigment epithelial cells from human choroidal neovascular membranes in age related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, *74*(5), 571–576.
- Schoenhagen, P., & Nissen, S. E. (2003). Assessing coronary plaque burden and plaque vulnerability: Atherosclerosis imaging with IVUS and emerging noninvasive modalities. *American Heart Hospital Journal*, *1*, 164–169.
- Spraul, C. W., & Grossniklaus, H. E. (1997). Characteristics of drusen and Bruch's membrane in postmortem eyes with age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology*, *115*, 267–273.
- Umeda, S., Ayyagari, R., Allikmets, R., Suzuki, M. T., Karoukis, A. J., Ambasadhan, R., et al. (2005). Early-onset macular degeneration with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: Exclusion of 13 candidate genes and loci. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *46*, 683–691.
- van der Schaft, T. L., Mooy, C. M., de Bruijn, W. C., Oron, F. G., Mulder, P. G. H., & de Jong, P. T. V. M. (1992). Histologic features of the early stages of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, *99*, 278–286.
- Vingerling, J. R., Dielemans, I., Hofman, A., Grobbee, D. E., Hijmering, M., Kramer, C. F. L., et al. (1995). The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam study. *Ophthalmology*, *102*, 205–210.
- Wang, J. J., Mitchell, P., Smith, W., & Cumming, R. G. (1998). Bilateral involvement by age-related maculopathy lesions in a population. *British Journal of Ophthalmology*, *82*, 743–747.