

III. Material und Methode

1. Gewinnung von Nervengewebe

In dieser Arbeit wurden 17 Nerven verwendet, die Gliedmaßen von Hunden entnommen wurden. Diese Nerven ließen sich einfach präparieren. Aus jedem einzelnen Nerven wurden mehrere parallele, insgesamt 50 Ansätze gebildet.

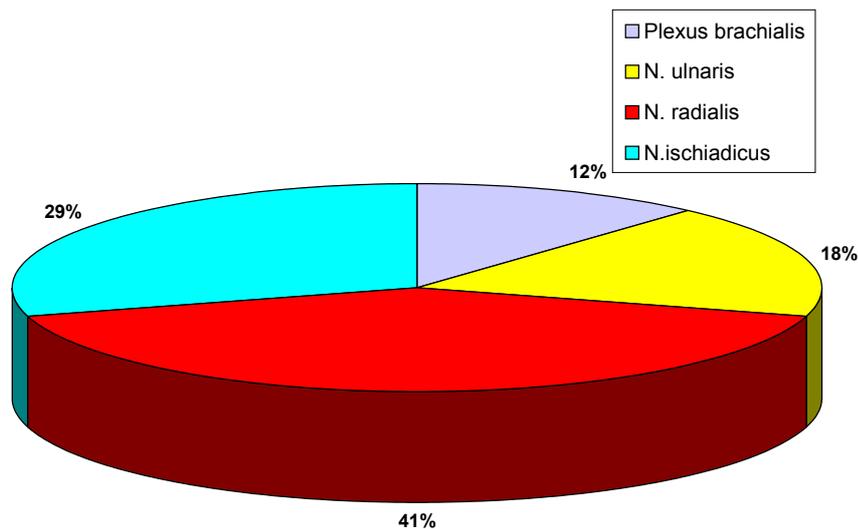
In Tabelle 2 sind die entnommenen Nerven, das Signalement der Spender, gegebenenfalls deren Todesursache und gegebenenfalls die Zwischenlagerung des Materials sowie deren Dauer dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht Material

Nerv	Material	Rasse	Alter	Geschlecht	Erkrankung	Todesursache	Aufbewahrung
1	N.radialis	Mischling	11	wk	Niereninsuffizienz	Euthanasie	Kühlschrank 24h
2	N.radialis	Rottweiler	6	m	Gehirntumor	Euthanasie	Kühlschrank 24h
3	Pl.brach.-Anteil	Jagdhund	2	w	Pl. brach.-Abriß		
4	Pl.brach.-Anteil	Dalmatiner	3	mk	Pl. brach.-Abriß		
5	N.ischiadicus	Mischling	5	mk	Amputation wg. Thrombophlebitis		
6	N.radialis	Rottweiler	6	mk	Amputation wg. Knochentumor		Kühlschrank 24h
7	N.radialis	Mischling	8	wk	Pl. brach.-Abriß	Euthanasie	
8	N.radialis	Mischling	5	wk	Amputation nach Pl.brach.-Abriß		
9	N.ulnaris	Mischling	4	m	Verkehrsunfall	Euthanasie	
10	N.ischiadicus	Boxer	6	mk	Tumor intrathorakal	Euthanasie	
11	N.radialis	DSH	8	m	Amputation wg. Knochentumor		
12	N.radialis	Mischling	4	wk	Amputation nach Pl.brach.-Abriß		
13	N.ischiadicus	DSH	5	m	Magendrehung	verstorben	
14	N.ischiadicus	Mischling	10	mk	rupturierter Milztumor	Euthanasie	
15	N.ischiadicus	Dobermann	7	m	DKMP, dekompensiert	Euthanasie	
16	N.ulnaris	Rottweiler	6	w	Amputation wg. Knochentumor		
17	N.ulnaris	Cockerspaniel	7	wk	multiple Leber- u. Milztumoren	Euthanasie	

Von den 17 Nerven handelte es sich um 7 Nn. radiales, 5 Nn. ischiadici, 3 Nn. ulnares sowie 2 weitere Anteile des Plexus brachialis (Graphik 1).

Graphik 1: Nervenmaterial



Spender waren 7 Mischlinge, 3 Rottweiler, 2 Deutsche Schäferhunde und je ein Jagdhund, Dalmatiner, Boxer, Dobermann und Cockerspaniel.

Der älteste Hund war 11 Jahre, der jüngste 2 Jahre alt. Das Durchschnittsalter lag bei 6 Jahren.

Je fünf der Tiere waren männlich, männlich kastriert oder weiblich kastriert und zwei weiblich.

Als Donatoren kamen nur Tiere in Frage, die an keiner Infektionskrankheit oder systemischen Krankheit litten, die periphere Neuropathien bedingen könnten.

Bei fünf Spendern lag ein Plexus brachialis-Abriß vor, und bei dreien wurde die Gliedmaße wegen eines Knochentumors amputiert.

Neun Hunden wurden die Nerven nach ihrem Tod entnommen. Acht dieser Tiere waren zuvor euthanasiert worden, und eines war gestorben. Um ein Überleben der Zellen möglichst zu gewährleisten, wurde das Gewebe unmittelbar nach dem Tod der Tiere gewonnen.

Details sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Nur drei der 17 gewonnenen Nerven wurden 24 Stunden lang bei Kühlschranktemperaturen (4°C) aufbewahrt bevor sie präpariert wurden.

Die Länge der Nervenbiopsie betrug zwischen 1cm (2 mal) und 15 cm (1 mal), im Durchschnitt 2,5cm.

Der Nerv war bei der Entnahme augenscheinlich intakt und unverändert.

Dies galt auch für die zwei Proben, die während der chirurgischen Versorgung einer Plexus brachialis-Läsion entnommen wurden.

Die Gewinnung der Proben unter diesen Aspekten gewährleistete, dass z.B. eine Konzentration von Fibroblasten, wie sie nach Narbengewebsbildung entsteht, vermieden wurde.

2. Präparieren des Nervengewebes

Das Nervenstück wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO BRL, Karlsruhe) eingelegt und bei Kühlschranktemperaturen (4°C) gelagert. Das DMEM enthielt 10% FCS (fetal calf serum) sowie 2% einer Penicillin-Streptomycin Mischung. Nach maximal 24 Stunden wurde die Nervenbiopsie in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, GIBCO BRL, Karlsruhe) verbracht und durch Präparation mit feinen Pinzetten unter dem Lichtmikroskop von Para- und Epineurium befreit. Mit einem Skalpell wurde sie danach in annähernd 1mm² große Explantate zerteilt. Die Präparation erfolgte unter sterilen Kautelen.

3. Explantieren

Petrischalen (60x15mm) wurden mit drei Millilitern einer Mischung aus Collagen (Collagen G, Biochrom AG, Berlin) und Aqua destillata im Verhältnis 1:2 beschichtet. Nach 1,5 Stunden Einwirkzeit folgte zweimaliges Waschen der Petrischalen mit Aqua destillata sowie einmaliges Waschen mit PBS (phosphor buffered saline, GIBCO BRL, Karlsruhe). Pro Petrischale wurden 10-15 Nervenstücke explantiert. Nach fünfminütiger Wartezeit, die ein Anheften der Explantate am Schalenboden gewährleisten sollte, wurden, je nach Anzahl der Explantate, 2 bis 3 Milliliter DMEM pro Petrischale hinzugefügt.

16 Petrischalen wurde an dieser Stelle Cholera toxin (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 0,1µg/ml Medium hinzugefügt, 8 Petrischalen in der doppelten Konzentration von 0,2µg/ml Medium.

4. Inkubieren

Die Inkubation der Explantate fand unter Standardbedingungen bei 37°C, 5%iger CO₂-Atmosphäre und 90% Luftfeuchtigkeit statt (Inkubator: Modell 3862, Forma Scientific Incorp., Marietta, USA).

5. Passagieren

Einmal wöchentlich, wenn sich durch Auswandern von Zellen ein konfluenten Monolayer um die Explantate herum gebildet hatte, wurden die Explantate in neue kollagenbeschichtete Petrischalen (60x15mm) verbracht. Sie wurden mit 2 bis 3 Millilitern frischem Medium überschichtet. Dadurch gelang es, daß die Fibroblasten, die eine schnellere Teilungsrate als SC aufweisen und daher schneller aus den Explantaten herauswanderten, in der alten Petrischale zurückblieben.

Das morphologische Bild der Zellen konnte durch ein Lichtmikroskop soweit beurteilt werden, daß eine ungefähre Differenzierung zwischen SC und Fibroblasten möglich war.

SC stellen sich schlank, spindelförmig und bipolar dar und liegen häufig in Ketten hintereinander (Abb.12). Fibroblasten haben einen größeren, eher dreieckigen Zellkörper mit unruhig strukturiertem Zytoplasma und bilden untereinander Netzstrukturen mit kurzen Zellfortsätzen aus (Abb. 13). Das wöchentliche Umsetzen der Explantate wurde so lange durchgeführt, bis aufgrund der Morphologie eindeutig auswandernde SC identifiziert werden konnten. Im Durchschnitt wurden 5 Umsetzungen benötigt. Dies bedeutete eine durchschnittliche Inkubation von 6 Wochen.

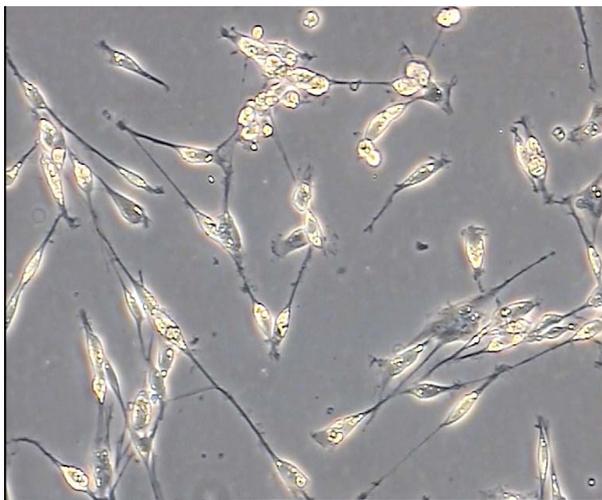


Abb. 12: SC-Morphologie

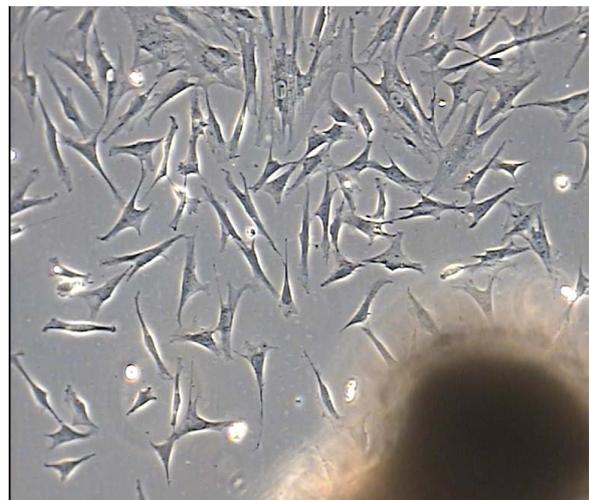


Abb. 13: Fibroblasten-Morphologie

6. Verdauung

Die Zellen, die nach den Passagierungen in den Explantaten verblieben waren, wurden dissoziiert. Alle Explantate einer Petrischale wurden in ein Röhrchen transferiert, in dem sich bereits der Verdauungsansatz befand (Verdauungsenzyme: Firma Sigma, Deisenhofen).

Der Verdauungsansatz setzte sich zusammen aus

- 90µl Trypsin,
- 300µl Hyaluronidase und
- 30µl Collagenase,

verlängert mit PBS auf 3ml Gesamtmenge.

Das Röhrchen wurde 2 Stunden lang im 37°C warmem Wasserbad inkubiert. Alle 10 Minuten wurde die Suspension durch manuelles leichtes Schütteln des Röhrchens durchgemengt, um eine gleichmäßige Verdauung des Gewebes zu gewährleisten. Eine bei RUTKOWSKI et al. (1992) empfohlene Vorrichtung zur permanenten sanften Bewegung des Röhrchens während des Verdauungsvorgangs stand nicht zur Verfügung.

Ziel des Verdauungsvorgangs ist eine gleichmäßige Trübung des Röhrcheninhalts bei langsamer Auflösung des Nervenmaterials.

Nach 2 Stunden wurde der Ansatz zweimal bei 1000rpm 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgesaugt, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen.

Daraufhin wurde das Zellmaterial mit 1 ml DMEM durchmischt, und per Hämocytometer die vorläufige Zellausbeute („Zählung 1“) ermittelt. Als Hämocytometer diente eine Neubauer-Zählkammer. Es wurden jeweils vier große Quadrate der Kammer ausgezählt und daraus der Mittelwert errechnet. Ein großes Quadrat fasst ein Volumen von 0,1µl. Nach Multiplikation der Zellzahl eines Quadrates mit dem Faktor (10^4) ergibt sich die Zellzahl in einem Milliliter der Suspension.

Je nach Größe der Zellzahl wurde die Suspension nach der Zählung mit weiteren 1 bis 2 Millilitern DMEM verlängert, in eine Petrischale (60x15mm) überführt und unter Standardbedingungen inkubiert.

Beginnend mit dem zweiten Nerv wurde den Verdauungsansätzen neben den zuvor genannten Enzymen jeweils 100µl DNase (Firma Sigma, Deisenhofen) hinzugefügt, um ein Verklumpen der Nukleinsäuren während der Verdauung zu verhindern. Als weitere zellschonende Maßnahme wurde die Trypsinkonzentration von 90µl auf 30µl pro Ansatz reduziert.

Die Zentrifugengeschwindigkeit wurde von 1000rpm auf 800rpm verringert.

7. Mediumwechsel zu Mitogenmedium

Am folgenden Tag, nachdem die Zellen sich am Schalenboden festgesetzt hatten, wurde ein Mediumwechsel zu Mitogenmedium vorgenommen.

Dabei wurden die insgesamt 50 Ansätze in sechs Gruppen eingeteilt, die jeweils mit unterschiedlichen Zusätzen versorgt wurden.

Allen 50 Ansätzen wurde Forskolin (1µl/ml) und PEX (1µl/100µl) (Firma Sigma, Deisenhofen) zugegeben, die Gruppen 2 bis 6 erhielten außerdem weitere Zusätze:

Gruppe 1: 22 Ansätze: kein Cholera-toxin, kein Heregulin

Gruppe 2: 12 Ansätze: Cholera-toxin einfache Dosierung (0,1µg/ml)

Gruppe 3: 4 Ansätze: Cholera-toxin doppelte Dosierung (0,2µg/ml)

Gruppe 4: 4 Ansätze: kein Cholera-toxin, Heregulin (10nM)

Gruppe 5: 4 Ansätze: Cholera-toxin einfache Dosierung (0,1µg/ml), Heregulin (10nM)

Gruppe 6: 4 Ansätze: Cholera-toxin doppelte Dosierung (0,2µg/ml), Heregulin (10nM)

Mit diesen Medien wurden die Schalen so lange inkubiert, bis ein gleichmäßiger Zellrasen mit eingestreuten SC sichtbar wurde. Dauerte dies länger als eine Woche, wurde alle paar Tage das Medium erneuert.

8. Abtrypsinieren

Das Mitogenmedium in der Petrischale wurde abgesaugt, ohne die am Boden sitzenden Zellen zu entfernen. Trypsin-EDTA (2ml pro Petrischale) wurde über die Zellkultur gegossen, so daß diese von der Flüssigkeit bedeckt war. Nach 10 Sekunden wurde der Großteil der Flüssigkeit abgesaugt, und es blieb nur ein Film davon auf den Zellen zurück.

Um den Ablösungsvorgang der Zellen vom Schalenboden voranzutreiben, wurde die Schale für fünf Minuten inkubiert und der Schalenboden vorsichtig beklopft. Der Ablösungsvorgang war im Lichtmikroskop anhand der langsamen Abrundung und des Abschwimmens der Zellen zu kontrollieren (Abb. 14). Es wurde mit 1ml PBS trituriert bis alle Zellen abgelöst und suspendiert waren. Die Suspension wurde zentrifugiert (10min bei 1000rpm bzw. 10min bei 800rpm) und zweimal gewaschen. Durch dieses Vorgehen sollte das Trypsin-EDTA herausgewaschen werden.

Per Neubauer-Zählkammer wurde erneut die Zellausbeute ermittelt („Zählung 2“).

Stichprobenartig wurde an dieser Stelle eine Supravitalfärbung („Lebend-Tot-Färbung“) mit Trypanblaulösung 4%ig (Firma Sigma, Deisenhofen) vorgenommen, die einen Überblick über den Anteil der lebenden und der toten Zellen nach Abtrypsinieren ermöglichte. Der Farbstoff dringt durch die Zellmembran von toten Zellen und färbt sie an. Lebende Zellen werden durch Trypanblau nicht markiert.

Die Zellsuspension wurde auf PLL (Poly-L-Lysin)-beschichtete Deckgläschen (DG) verteilt (50-200 μ l/DG), die man in einer Petrischale (20x100mm) anordnete. Nach 1,5 Stunden, die dem Anheften der Zellen auf der PLL-Oberfläche dienen sollen, wurde der gesamte Petrischalenboden mit 10ml DMEM bedeckt. Es folgte die weitere Inkubation.

Sobald sich ein gleichmäßiger Zellrasen auf der Deckgläschenoberfläche ausgebreitet hatte, folgte die Färbung mittels indirekter Immunfluoreszenz. Der Zeitraum zwischen Abtrypsinieren und Färbung betrug je nach Präparat zwischen 3 und 37 Tagen.

Es wurde nach dem Abtrypsinieren auch die Affinität der Schwannschen Zellen zu Laminin untersucht. Die Deckgläschen wurden dafür mit einer Mischung aus Laminin und PBS im Verhältnis 8 μ l:100 μ l beschichtet.



Abb. 14: Abrundung und Abschwimmen der Zellen während des Abtrypsinierens

9. Färbung per indirekter Immunfluoreszenz

Die gesamte Färbung fand bei Raumtemperatur und unter lichtgeschützten Verhältnissen statt, um ein Verblässen zu vermeiden. Abbildung 15 zeigt schematisch die indirekte Immunfluoreszenz.

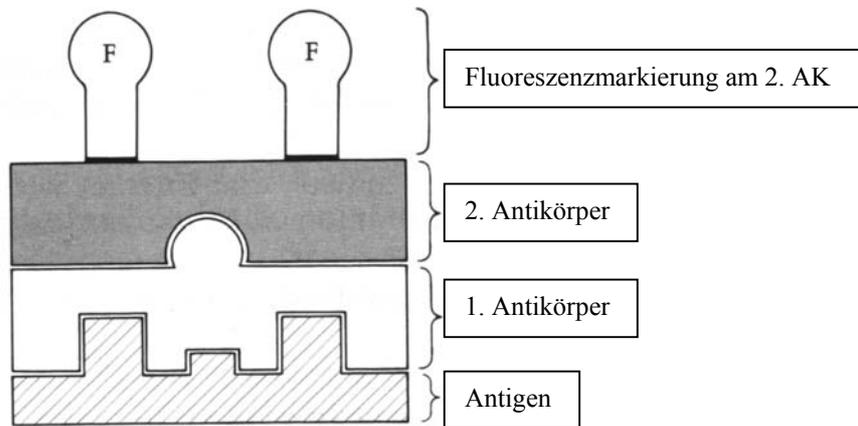


Abb. 15: Schema indirekte Immunfluoreszenz

(modifiziert aus: Brown: Nerve cells and nervous systems. London, 1991)

Die auf den Deckgläschen befindlichen Zellen wurden für mindestens 10 Minuten mit 2%igem Paraformaldehyd (PA, Firma MERCK) fixiert. Es folgte eine dreifache Waschung mit PBS und die 15minütige Eindeckung mit Permeabilisierungspuffer. Der Permeabilisierungspuffer enthielt 0,1% Triton.

Dann wurden die Zellen für 30min mit Blockpuffer behandelt.

Dieser setzte sich pro 25ml zusammen aus:

24ml 0,1molarer PB (Phosphatpuffer: Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 auf pH 7,4 gebracht und 1:1 mit Aqua destillata verdünnt)

0,5ml Ziegenserum,

0,5ml Pferdeserum und

250 μl Triton 10%ig.

Auf den Zellen, die als Negativkontrolle fungierten, wurde der Blockpuffer bis zum Auftragen des zweiten, fluoreszierenden AK belassen.

Es schloss sich die eigentliche Markierung der Zellen mit polyklonalem Antikörper an:

Der S100-Antikörper (Rabbit Anti S100 Protein; Ig-Fraktion; Immunogen: bovine Brain S100 Antiserum; Firma Serotec) wurde in drei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, um die optimale Intensität der Färbung zu eruieren. Es wurden Konzentrationen von 1:20, 1:40 und 1:200 eingesetzt.

Das Anfertigen der Verdünnungen erfolgte in Eppendorfgefäßen mit Hilfe eines Verdünnungspuffers, der dem 1:10 mit PBS verdünnten Blockpuffer entsprach.

Pro Deckgläschen wurden mindestens 50µl der Antikörperlösung benötigt.

Nach Einwirken des Antikörpers für 1,5 Stunden wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte der zweite Antikörper, ein goat-anti-rabbit Antikörper im Verhältnis 1:500µl verdünnt mit Verdünnungspuffer. Nach einer Stunde wurde abgesaugt, und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Auf der Suche nach dem geeignetsten Material zum Eindecken der Zellen wurde Moviol, Citifluor (UKC, Canterbury) sowie Aqua/Poly Mount (Polysciences Inc.) eingesetzt.

Die jeweilige Glycerinverbindung wurde auf einen Objektträger getropft, und das einzelne Deckgläschen mit der beimpften Seite nach unten auf einen der Tropfen plaziert, so daß seine gesamte Fläche gleichmäßig bedeckt wurde.

Die Objektträger wurden anschließend lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

Das Färbungsergebnis sollte möglichst umgehend fluoreszenzmikroskopisch beurteilt werden.

Um die Anfärbbarkeit caniner SC mit S100-Antikörper zu prüfen, wurde zusätzlich einmal eine S100-Färbung von kryopräserviertem caninem Nervenmaterial angefertigt. Das von Bindegewebe befreite Nervenmaterial wurde in PA fixiert, mit PB gewaschen und über Nacht in 30%ige Sucroslösung eingelegt. Waren die Nervenstücke vollgesogen, sanken sie auf den Boden des Gefäßes, so daß sie eingebettet werden konnten. Sie wurden mit „Tissue Tec“-Lösung begossen und in einen in Trockeneis stehenden Becher fallengelassen, der mit auf -20°C gekühltem 2-Methylbutan gefüllt war. Tissue Tec färbt sich weiß, wenn es gefroren ist. Von den so eingebetteten Nerven wurden bei -20°C Schnitte von 10µm Dicke angefertigt, auf Deckgläschen plaziert und dort wie beschrieben gefärbt.

Vergleichend wurde parallel zum S100-Antikörper ein anderes Protein eingesetzt, der p75-Antikörper (low affinity NGF-Rezeptor; Firma Promega: Anti-Human p75, species: rabbit IgG). Das Protein p75 LNTR (=low affinity Rezeptor des NGF) befindet sich in der Plasmamembran der SC. Der Marker wurde bei der ersten Färbung in drei verschiedenen Verdünnungsstufen 1:100, 1:150 und 1:200 eingesetzt. Bei stärkster Verdünnung (1:200) und 1,5 Stunden Einwirkungszeit konnte eine ausreichend intensive Färbung erzielt werden, so daß diese Konzentration beibehalten wurde.

10. Auswertung der Färbung

Das Färbungsergebnis wurde im Phasenkontrast und per Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

Der Phasenkontrast erlaubte oftmals bereits eine morphologische Differenzierung von SC und Fibroblasten anhand von Größe, Form und Anordnung der Zellen. Während SC schmal, länglich, bipolar und häufig in Ketten aneinandergereiht waren, wiesen Fibroblasten ein Vielfaches der Größe von Zelleib sowie Kern auf, hatten häufig eine unruhige Zytoplasmastruktur und bildeten mit ihren zahlreichen Fortsätzen ein Netzwerk aus Verzweigungen untereinander aus.

Die Fluoreszenz ermöglichte eine eindeutige Differenzierung der Zelltypen, vorausgesetzt der Antikörper war spezifisch und markierte ausschließlich die Schwanzzellen.

Um eine genaue Auszählung der Schwanzzellen vornehmen zu können, wurde nach der indirekten Immunfluoreszenzfärbung eine DAPI-Färbung (4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid, Boehringer, Mannheim) angeschlossen.

Die Deckgläschen wurden 5 Minuten lang mit der mit Verdünnungspuffer im Verhältnis 1:5000 verdünnten DAPI-Färbelösung bedeckt, mehrere Male mit PBS gewaschen und anschließend eingedeckt.

DAPI färbt die Zellkerne (Nukleinsäuren) sämtlicher Zellen (Abb. 16). Setzt man die Gesamtzellzahl ins Verhältnis mit der Schwanzzellzahl, die im selben Bildausschnitt mit Hilfe der Fluoreszenz ausgezählt werden kann (Abb.17), erhält man den prozentualen Anteil der Schwanschen Zellen in der Kultur.

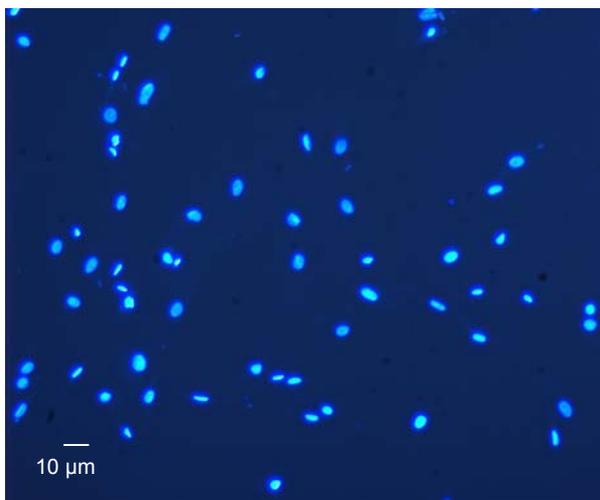


Abb. 16: DAPI-Färbung, Zellkerne

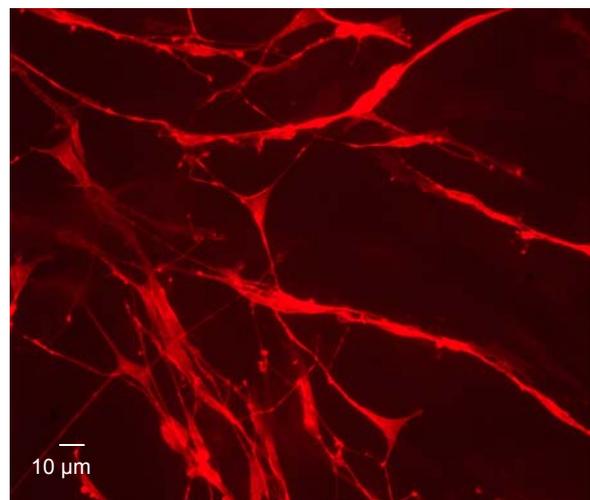


Abb. 17: p75-Fluoreszenzdarstellung des selben Bildausschnittes wie in Abb. 16, SC

11. Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests ausgewertet. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein parameterfreier Test, der für Daten aus mehr als zwei unabhängigen Stichproben die Null-Hypothese prüft, daß die Gruppen im Mittel gleich sind. Im angeschlossenen Dunn-Test für paarweise Vergleiche mit α -Korrektur nach Holm wurde eine statistische Signifikanz akzeptiert für $p < 0,05$. Es wurde mit dem Software-Programm BIAS gearbeitet.

Für die Tabellen und Boxplots wurde das Programm SPSS gebraucht.

