

IV. Ergebnisse

1. Qualitative Ergebnisse

Um den Erfolg der SC-Kultivierung erfassen zu können, mussten die SC durch einen spezifischen AK fluoreszenzmarkiert und damit auszählbar gemacht werden. Die Färbung wurde mit dem S100-AK und mit dem p75-AK durchgeführt.

Der in der Literatur in über 80% der Fälle für die Färbung von SC benutzte S100-Antikörper war für die Differenzierung caniner SC unbrauchbar. Er war nicht spezifisch (Abb 18a,b). Dies konnte auch durch die Anfertigung und Färbung von Kryoschnitten caninen Nervenmaterials bewiesen werden. Die für das S100-Protein spezifische Markierung sollte im Längsschnitt des Nerven die typische Färbung der SC zeigen, was im Nerv des Hundes nicht zu sehen war (Abb. 19a,b).

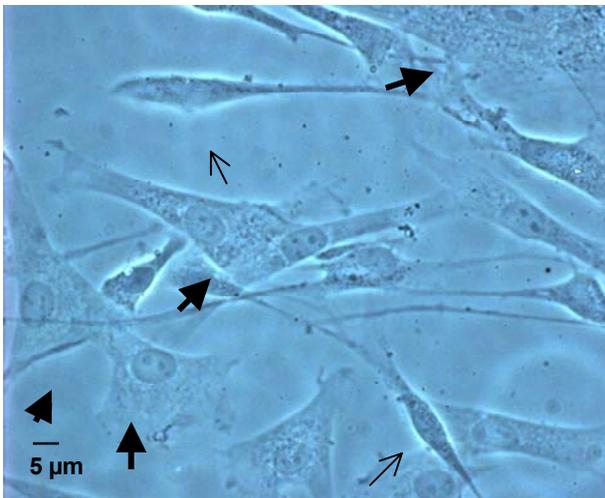


Abb. 18a: Unspezifität S100-Färbung, Phasenkontr., SC schmale Pfeile, Fibroblasten fette Pfeile

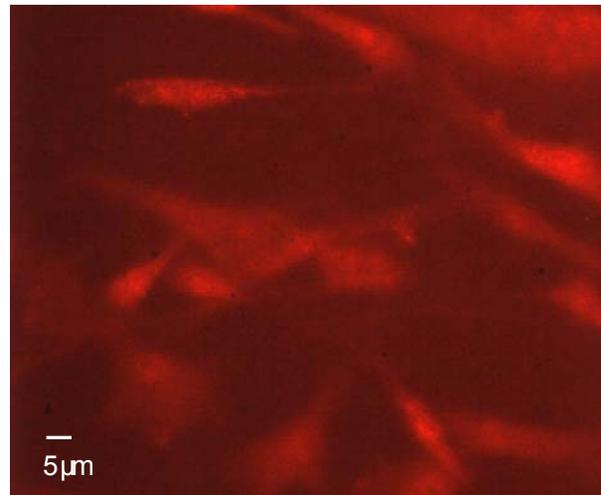


Abb. 18b: Unspezifität S100-Färbung, Fluoreszenz

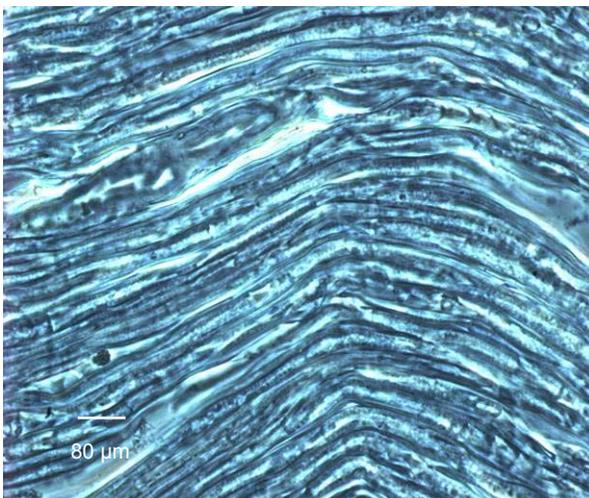


Abb. 19a: Kryoschnitt, Längsschnitt, Phasenkontrast

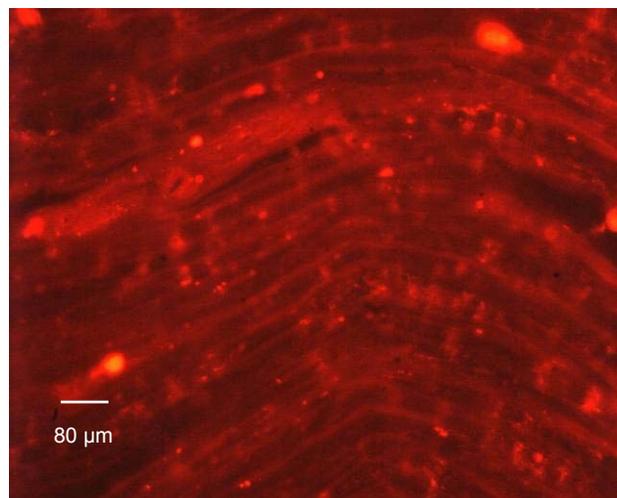


Abb. 19b: Kryoschnitt, Längsschnitt, Fluoreszenz

Die S100-Färbung war wenig intensiv, ungleichmäßig und unregelmäßig. Canine Fibroblasten wurden mit der gleichen Intensität gefärbt wie canine SC (Abb. 20a,b).

Die Negativkontrolle zeigte, wie die mit S100-AK behandelten Zellen, teilweise positive Strukturen, welche auf unspezifische Adsorption des Zweitantikörpers zurückzuführen sind (Abb. 21a,b).

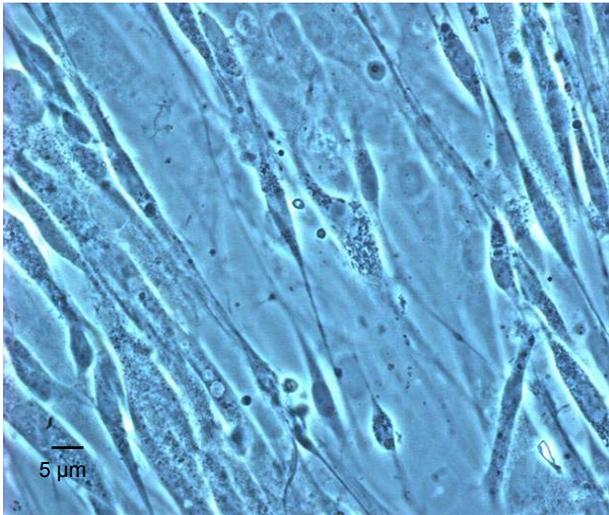


Abb. 20a: Unspezifität S100-Färbung, Phasenkontr., SC und Fibroblasten

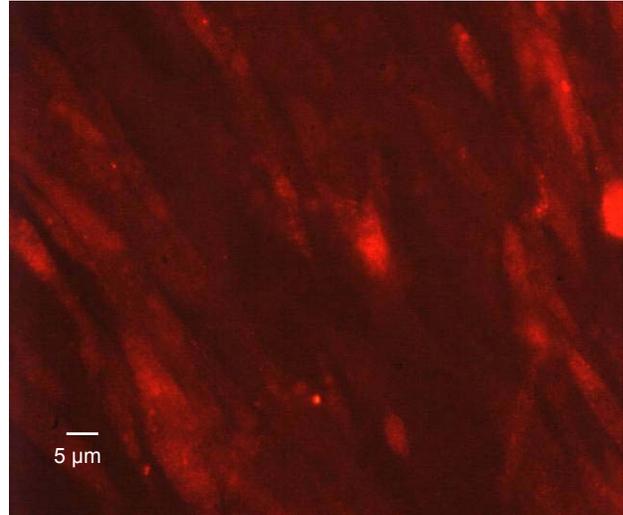


Abb. 20b: Unspezifität S100-Färbung, Fluoreszenz

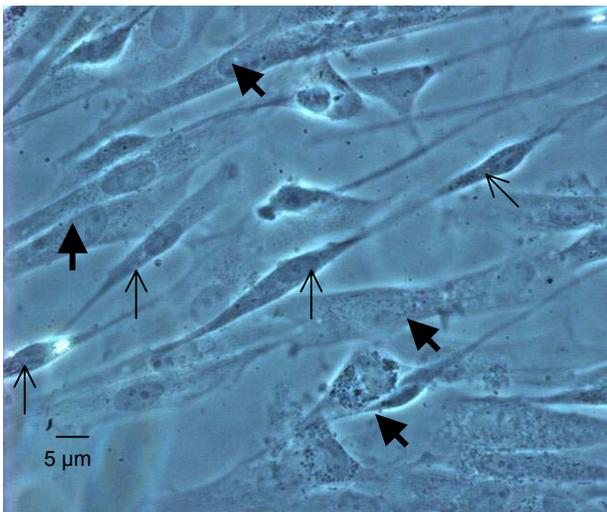


Abb. 21a: Negativkontrolle S100-Färbung, Phasenkontr., SC schmale Pfeile, Fibroblasten fette Pfeile

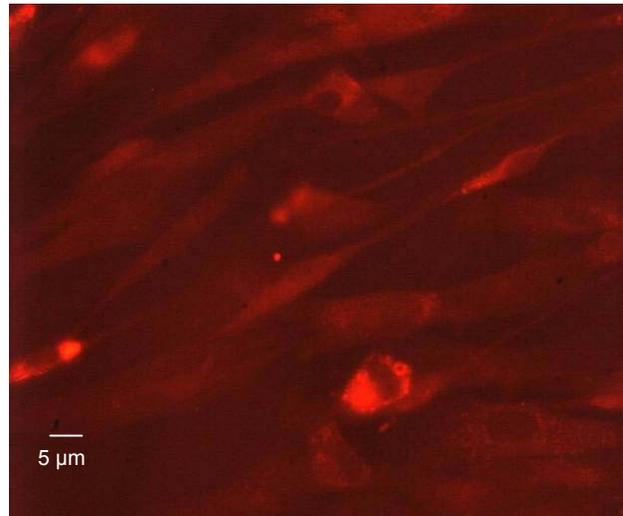


Abb. 21b: Negativkontrolle S100-Färbung, Fluoreszenz

In einigen Ansätzen markierte der S100-Antikörper vor allem die Zellkerne. Zellausläufer und Zellgrenzen waren mit seiner Hilfe nicht abzugrenzen. Die Morphologie der caninen SC blieb bei der S100-Färbung verborgen. Zellkerne von SC und von Fibroblasten wurden in gleicher Weise gekennzeichnet (Abb. 22a,b und 23a,b). Alle diese Beobachtungen wiesen darauf hin, daß der zur Verfügung stehende S100-AK gegen bovines S100-Protein nicht mit caninem S100-Protein kreuzreagierte.

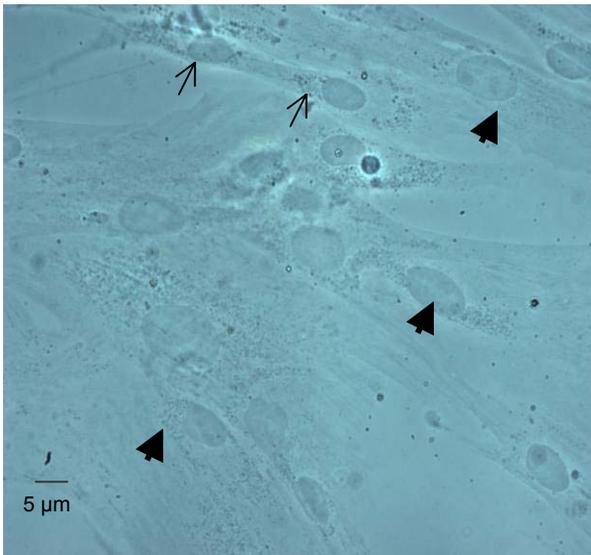


Abb. 22a: S100-Kern-Färbung, Phasenkontrast, SC schmale Pfeile, Fibroblasten fette Pfeile

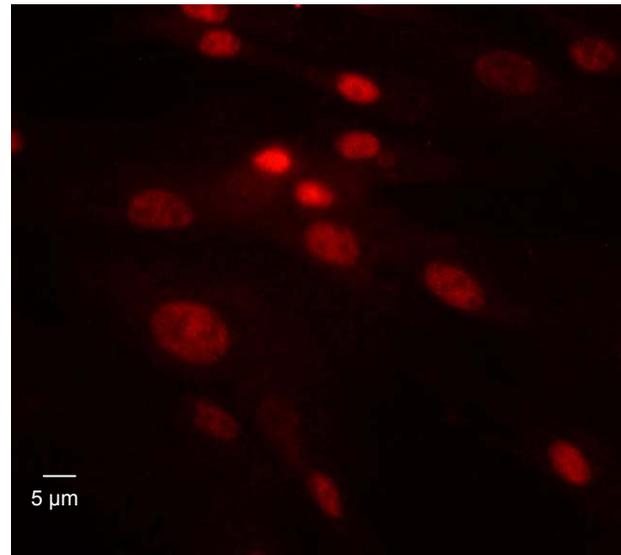


Abb. 22b: S100-Kern-Färbung, Fluoreszenz



Abb. 23a: S100-Kern-Färbung, Phasenkontrast, SC

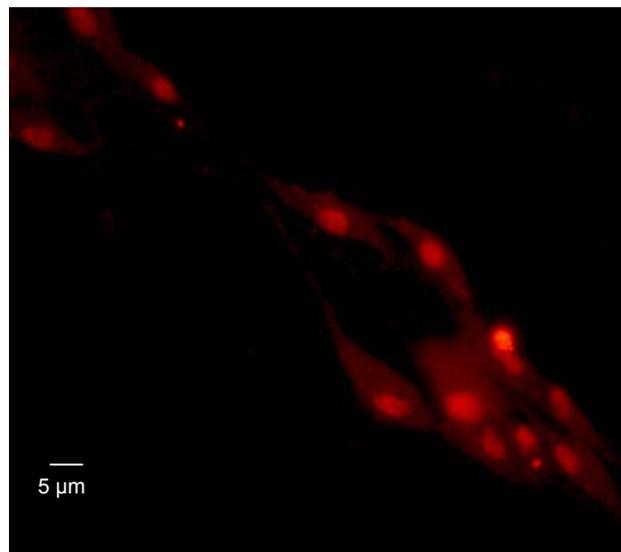


Abb. 23b: S100-Kern-Färbung, Fluoreszenz

Der in der Literatur in weniger als 20% der Fälle und beinahe ausschließlich bei humanen SC benutzte p75-Antikörper, der die low affinity NGF-Rezeptoren markiert, war hingegen

spezifisch für canine SC. Seine Färbung war sehr intensiv, gleichmäßig und regelmäßig. Canine Fibroblasten wurden durch den p75-Antikörper nicht gefärbt (Abb. 24a,b und 25a,b).



Abb. 24a: p75-AK-Färbung, Phasenkontrast, SC schmale Pfeile, Fibroblast fetter Pfeil

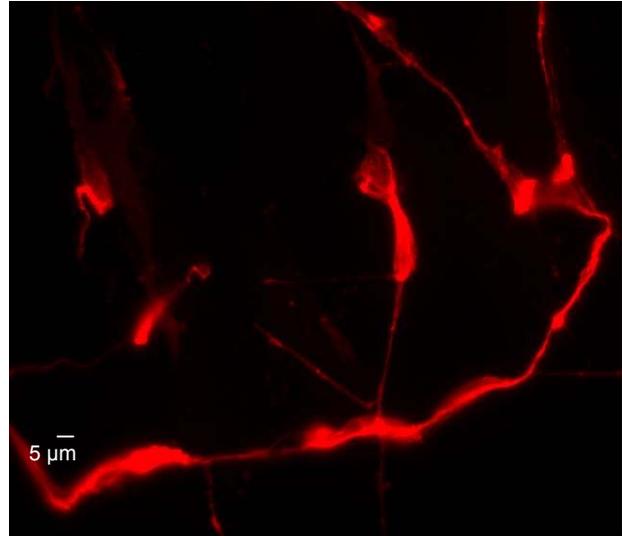


Abb. 24b: p75-AK-Färbung, Fluoreszenz, SC

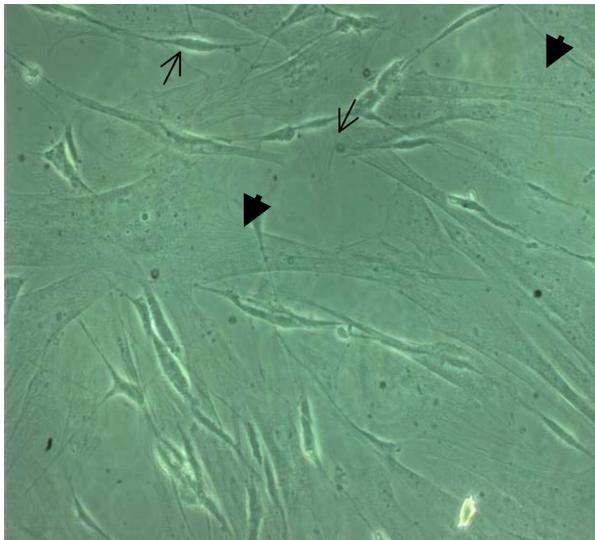


Abb. 25a: p57-AK-Färbung, Phasenkontrast, SC schmale Pfeile, Fibroblasten fette Pfeile

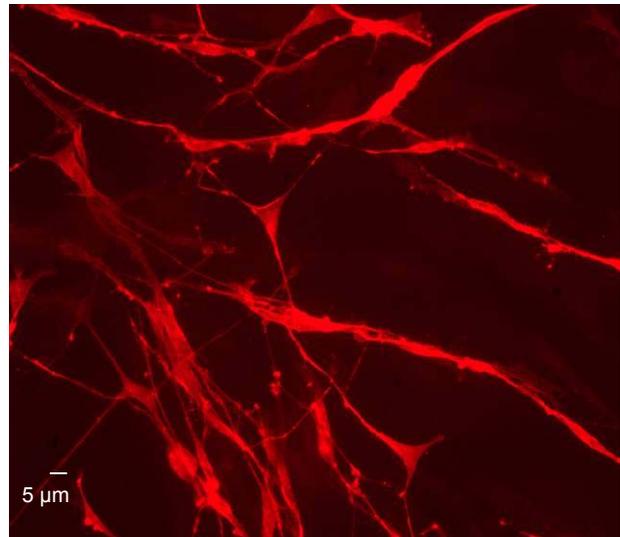


Abb. 25b: p75-AK-Färbung, Fluoreszenz, SC

Der p75-Antikörper färbte die Zellkörper caniner SC samt ihrer Ausläufer. Die Zellgrenzen waren gut erkennbar, was auf eine spezifische Markierung der Zellmembran hinwies. Die SC-Morphologie war gut zu beurteilen. Die Zellkerne der SC wurden nicht markiert und waren nur zu erahnen (Abb. 26a,b). Fibroblasten wurden durch p75-AK nicht gefärbt.



Abb. 26a: p75-AK-Färbung, Phasenkontrast, SC schmale Pfeile, Fibroblasten fette Pfeile

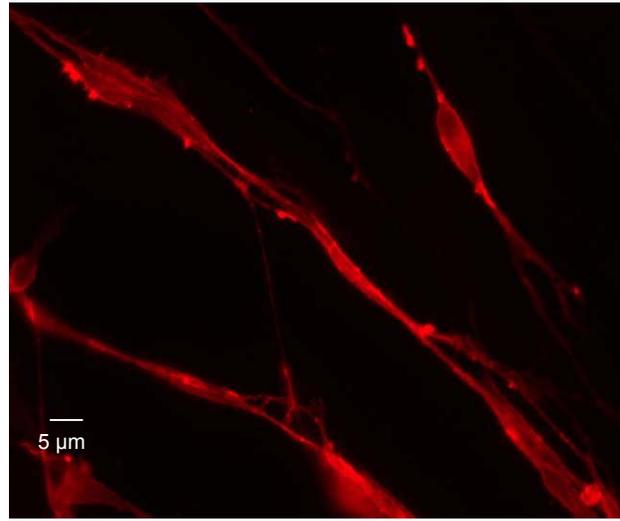


Abb. 26b: p75-AK-Färbung, Fluoreszenz, SC

Um den Fibroblastenanteil in der Kultur zu senken, wurde dem Medium einiger Ansätze während der Passagierung Cholera toxin in zwei verschiedenen Dosierungen zugesetzt. Dabei wurde deutlich, daß Cholera toxin die Morphologie caniner SC beeinflusste.

Bei Zugabe von Cholera toxin zeigten die SC ihre typische bipolare Form in extremem Maße. Sie waren sehr langgestreckt, schmal und spindelförmig, hatten lange Zellausläufer und bildeten filigrane Kettenformationen (Abb. 27a,b). Diese Beobachtung galt sowohl bei Zugabe von Cholera toxin in der einfachen (0,1µg/ml) als auch in der doppelten (0,2µg/ml) Dosierung. Zwischen den beiden Dosierungen war, die Morphologie der SC betreffend, kein Unterschied auszumachen.

Ohne Cholera toxin zeigten die SC ein eher plumpes, polygonales Bild ohne lange Zellfortsätze (Abb. 28a,b).

Um die Affinität caniner SC zu verschiedenen Substraten zu untersuchen, wurden nach dem Abtrypsinieren neben PLL-beschichteten Deckgläschen auch Laminin-beschichtete Deckgläschen beimpft. Es zeigte sich, daß die Affinität der SC zu PLL weitaus größer war. Auf PLL hafteten die SC bereits nach maximal 4 Stunden, während sie sich auf Laminin nach 24 Stunden Inkubation nicht festgesetzt hatten.

