

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Versuchstiere**

Für die Studie wurden insgesamt fünf ausgewachsene Brown Norway Ratten weiblichen Geschlechts, Gewicht 200-250g, verwendet (Harlan, Winkelmann, Borchelt, BRD). Die Tiere wurden unter Standard-Laborbedingungen gehalten.

### **2.2 Verabreichung des retrograden Tracers**

Analgesiert wurden die Tiere durch eine intramuskuläre Injektion mit Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke Davis, Freiburg, BRD; 50mg/kg Körpergewicht) in den Oberschenkel. Zur Relaxation folgte nach einem 5-minütigen Intervall eine intramuskuläre Injektion an der kontralateralen Seite mit Dihydro-Thiazin-Hydrochlorid (Rompun, Bayer, Leverkusen, BRD; 50mg/kg Körpergewicht). Die Trachea wurde mit einem medianen, zervikalen Längsschnitt ventral freigelegt und durch einen kleinen Schnitt zwischen zwei benachbarten Knorpelspannen eröffnet. Durch eine über den ventralen Schlitz bis in den rechten Hauptbronchus eingeführte Kanüle einer 10µl-Mikrospritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) wurden 5 µl des Tracers Fast Blue (2% wässrige Lösung enthält 1% DMSO, Dr. K Illing, Groß Umstadt, BRD) injiziert. Anschließend wurde die Inzision in der Trachea mit einer 7-0 Vicryl Naht (Ethicon, Norderstedt, BRD) und der Hautschnitt mit einer 4-0 Vicryl-Naht (Ethicon) zugenäht. Um die operierten Tiere vor Unterkühlung zu schützen, wurden sie bis zum Aufwachen unter eine IR-Lampe gelegt. Die Tiere erholten sich 2 Stunden nach der Operation und begannen sofort zu fressen. Alle Tiere konnten sich ungestört erholen bis sie nach 7 Tagen getötet wurden.

### **2.3 Gewebeentnahme**

Nach Tötung der Tiere durch CO<sub>2</sub>-Intoxikation wurden die Lunge zusammen mit der Trachea als Thoraxpaket entnommen. Es wurden die beiden sensiblen Vagus-Ganglien, Ganglion jugulare und Ganglion nodosum und die sympathischen Ganglien, Ganglion cervicale superius und Ganglion stellatum, jeweils beidseits präpariert. Prinzipiell wurde der Komplex aus

Ganglion jugulare und Ganglion nodosum getrennt, nur bei einem der Tiere wurde er zu Vergleichszwecken belassen und als Ganzes ausgewertet.

## 2.4 Gewebearbeitung

Das entnommene Gewebe wurde je nach Größe ca. 24 Stunden lang in Zamboni-Lösung (2% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer PH 7,4 ) fixiert. Zur Erleichterung der späteren Bearbeitung wurden die bei Eröffnung des Thorax kollabierten Lungen über die Trachea intraluminal mit Zamboni-Lösung perfundiert.

Anschließend wurde das Gewebe in einem 0,1 M Phosphatpuffer in mehreren Durchgängen gespült und ca. 24 Stunden lang in einer Saccharose-Lösung (18%ige Saccharose-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer) belassen, um es für die Kryoprotektion vorzubereiten.

Zur Erleichterung der weiteren Bearbeitung wurden die einzelnen Gewebeprobe zusammen mit OTC (Optimum Cutting Temperature Compound; Miles Inc., Elkart, IN, USA) auf Filterpapier aufgebracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Mit Hilfe eines Kryostats wurden bei  $-25^{\circ}\text{C}$  Serienschritte der Gewebe angefertigt. Hierbei wurden die Ganglien in  $8\mu\text{m}$  dicke Scheiben und das Lungengewebe in  $12\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten und auf Chromalaun- bzw. Gelatine beschichtete Objektträger aufgenommen. Anschließend mussten die Schnitte in Dunkelheit 30 Minuten trocknen. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5 Immunhistochemie

Das mit Tracer markierte Gewebe musste bei allen Arbeitsschritten vor Lichteinfall geschützt werden. Vor der Weiterbearbeitung mit immunhistochemischen Methoden wurden alle Gewebeschnitte bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte eine einstündige Vorbehandlung mit einer proteinhaltigen Blocklösung. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte in PBS-Pufferlösung für jeweils zehn Minuten wurden die jeweiligen Primärantikörper in den getesteten Verdünnungen aufgetragen. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer belassen.

Nach zweimaligem Spülen in PBS-Pufferlösung wurde zur Detektion des Primärantikörpers der entsprechende Sekundärantikörper aufgetragen und eine Stunde lang inkubiert. Nach einem

erneuten Waschvorgang wurden die Schnitte zur Markierung der biotinylierten Sekundärantikörper eine weitere Stunde lang mit Streptavidin Texas Rot inkubiert. Anschließendem Waschen folgte das Eindeckeln mit gepufferten Glycerol (pH-Wert 8,6), welches die Lichtdurchlässigkeit des unmarkierten Gewebes verbessert.

| Primärer Antikörper   | Verdünnung | Sekundärer Antikörper  | Verdünnung         |
|---|------------|--|--------------------|
| Polyklonales Anti-NOS-Antiserum, aus Kaninchen (Dr.Mayer, Graz, Österreich)         | 1:1000     | FITC-gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG, aus Ziege (Cappel, Ohio, U.S.A.)  | 1:400              |
| Monoklonaler Anti-SP-Antikörper, aus Maus (Dr.J.Y. Couraud, Gif-sur-Yvette, France) | 1:800      | Biotinyliertes Anti-Maus-IgG, aus Schaf (Amersham)   | 1:100              |
| Polyklonales Anti-TH- Antiserum, aus Kaninchen (ETI, Allendale, NJ, U.S.A.)         | 1:400      | Biotinyliertes Anti-Kaninchen-IgG, aus Esel (Amersham)   | 1:100              |
| Polyklonales Anti-NPY-Antiserum, aus Schaf (Dr. Blessing, Bedford Park, Australien) | 1:1000     | FITC-gekoppeltes Anti-Schaf/Ziege-IgG Aus Maus (SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA)<br><br>+ Tertiärantikörper: Streptavidin Texas Rot (Amersham) | 1:200<br><br>1:200 |

Tabelle 2: Antikörper und Immunreagenzien

|  |   |
|--|---|
| Blocklösung                            | 10% normales Schweineserum, 0,5% Tween, 0,1% Rinderserumalbumin in Phosphatpuffer mit 1,8%igem Salzgehalt   |
| Phosphatpuffer 0,1 M                   | 230 ml 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> -Lösung und 770 ml 0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> -Lösung gemischt, pH 7,4  |
| PBS (Phosphatpuffer in Kochsalzlösung) | 28,75 ml 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> -Lösung und 96,2 ml 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> -Lösung gemischt, mit 22,4g NaCl versehen, auf 5l aufgefüllt |
| Fixationslösung                        | 2% Paraformaldehyd und 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4   |
| Saccharoselösung (18%)                 | 180g Saccharose in 1l 0,1 M Phosphatpuffer  |

Tabelle 3: Reagenzien

## 2.6 Mikroskopische Auswertung

Nach Anfertigung der Serienschnitte im Kryostat konnten die luftgetrockneten Ganglienschnitte direkt unter einem Aufricht-Fluoreszenzmikroskop auf retrograd angefarbte Neurone hin untersucht und ausgewertet werden.

Mit Hilfe eines UV-Filters konnten die Fast Blue markierten Neurone unter dem 10er- Objektiv identifiziert werden. Jeder vierte Objektträger der Serienschnitte, auf dem retrograd markierte Neurone zu erkennen waren, wurde mit immunhistochemischer Methode bearbeitet. Anschließend konnten die Ganglienschnitte ausgewertet werden.

Zur Auswertung wurde ein Aufricht-Fluoreszenzmikroskop verwendet: Leica DRMA2 (Leica Microsystems, Wetzlar, BRD). Durch unten aufgeführte Filterkombinationen aus Erregerfilter und Sperrfilter gelang der Nachweis der verwendeten Sekundärantikörper.

|           |  |
|-----------|--|
| Fast Blue | BP 360-370 nm/BA 420-460nm oder BP 470-490 nm/ BA 515-550 nm |
| FITC      | BP 520-560 nm/ BP 450-492 nm                                 |
| Texas Rot | BP 545/580 nm/ BA 610 nm                                     |

Tabelle 4: Filterkombinationen (Erregerfilter/Sperrfilter) der Fluoreszenzmikroskopie

Zu Dokumentationszwecken wurden Aufnahmen mit einer Digitalkamera (Spot inside QE, Visitron Systems, Puchheim, BRD) in Schwarz/Weiß angefertigt.