

3. Methoden

3.1. Gewinnung von Parasitenmaterial

3.1.1. Passagierung von *E. falciformis* in Mäusen

Die Passagierung von *E. falciformis* in Mäusen diente der Produktion von Parasitenmaterial. Für die Inokulation wurden sporulierte Oozysten verwendet, welche nicht älter als 3 Monate waren, da sich bei längerer Aufbewahrung des Parasitenmaterials die Infektiösität deutlich verringert (Haberkorn 1970).

Mäuse im Alter von 8-12 Wochen wurden je mit 1000 Oozysten über eine gebogene Knopfkanüle oral infiziert. Zuvor wurden die Oozysten in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt und die Infektionslösung auf 10^4 /ml in PBS eingestellt, wovon jedem Tier 100 μ l inokuliert wurden. Ab Tag 7 p.i. wurde der Gesamtfeces der Tiere gesammelt und nach Zugabe von Wasser mit Mörser und Pistill homogenisiert. Zur Abtrennung grober Partikel wurde der Kot über ein Teesieb in Spitzgläser gegeben. Nach dreimaliger Sedimentation über 2 h wurde das Pellet in Kaliumdichromat-Lösung (2%) aufgenommen. Die Sporulation der Oozysten erfolgte 3-5 d bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler. Mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Sporulationsrate und die Oozystenkonzentration bestimmt. Die Lagerung der Suspension erfolgte bei 4 °C.

3.1.2. Gewinnung und Aufreinigung von *E. falciformis*-Sporozoiten

Für die Aufreinigung wurden ca. 3×10^7 sporulierte Oozysten eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen (1600 x g) erfolgte die Sterilisation der Oozysten mit 200 ml NaOCl (12%) für 15 Minuten (min) auf dem Magnetrührer. Zur Flotation der sterilisierten Oozysten wurde die Suspension auf 50 ml-Röhrchen verteilt und bei 1100 x g, RT für 8 min zentrifugiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nun unter sterilen Bedingungen.

5-7 ml des Flotats wurden abgenommen und dreimal mit 50 ml sterilem Wasser für 10 min bei RT gewaschen (1600 x g). Der Überstand (ÜS) wurde nach mikroskopischer Kontrolle

verworfen. Um die Ausbeute an Oozysten zu erhöhen, wurde die Flotation zweimal wiederholt.

Das sterilisierte Oozystenpellet wurde nun in 10 ml vorgewärmter Hank's-Lösung (37°C) aufgenommen. Durch Zugabe von 30 g Glasperlen (\varnothing 0,5 mm) und kräftiges Schütteln über einen Zeitraum von 15 Sekunden (sec) in der Hand wurden die Oozystenhüllen mechanisch zerstört. Nach mikroskopischer Kontrolle des Zerstörungsgrades der Oozysten wurde der ÜS in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Die Glasperlen wurden dreimal mit 15 ml Hank's-Lösung gewaschen und die ÜS zusammengeführt. Nach Zentrifugation der Sporozysten (800 x g, RT, 5 min) wurde das Pellet in 7,5 ml Hank's-Lösung aufgenommen.

Um die Sporozoiten freizusetzen, wurde die Sporozystensuspension mit 12,5 ml vorgewärmter Exzystierungslösung versetzt und bei 37 °C für 1/2-1 h im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 1600 x g, RT für 10 min zentrifugiert und das Pellet in vorgewärmter Phosphatpuffer/Glukose-Lösung resuspendiert.

Die Reinigung der Sporozoiten erfolgte über eine DE52-Anionenaustauschromatographie-Säule (Eckert et al. 1995). Zur Herstellung der Säule wurden in einer 50 ml-Einmalspritze Glaswolle (0,5 cm), Nylonwolle (3 cm) und DE52-Zellulose (3 cm) übereinander geschichtet. Die DE52-Zellulose wurde tags zuvor zweimal für 1 h in Phosphatpuffer gewaschen, der pH-Wert auf 8,0 eingestellt und bei 4°C über Nacht (ÜN) gelagert. Die Sporozitensuspension wurde auf die Säule gegeben und mit 300 ml Phosphatpuffer/Glukose-Lösung eluiert. Das Eluat wurde in 50 ml-Fractionen aufgefangen und nach Zentrifugation (1600 x g, RT, 10 min) in Kompletmedium resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer improved-Zählkammer erfolgte die Einstellung der Sporozoitenzahl auf 2×10^6 /ml.

Zur Herstellung von Sporozoiten-Gesamtantigen (SpAg) wurden 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff gefrostet und anschließend im Wasserbad (37 °C) wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Diese Antigenlösung wurde äquivalent einer definierten Menge Sporozoiten im Lymphozyten-Transformationstest eingesetzt.

3.1.3. Bestimmung der täglichen Oozystenausscheidungen infizierter Tiere

Zur täglich Bestimmung der Oozystenausscheidungen wurden die Tiere nach Infektion einzeln in Käfigen auf Gitterboden gehalten. Ab Tag 5 p.i. bis zwei Tage nach Ablauf der Patenzzeit wurden die Faeces jeder Maus täglich gesammelt und der benutzte Käfig durch einen

desinfizierten Käfig ersetzt, um einer ungewollten Reinfektion durch Koprophagie entgegenzuwirken. Nach Zugabe von 20 ml Wasser wurde der Kot mit Hilfe von Mörser und Pistill homogenisiert. Aus dieser Suspension wurde 1 ml entnommen und mit 9 ml NaOCl gemischt. Nach gründlicher Resuspension der Lösung wurde 1 ml zum Beladen der McMaster-Zählkammer entnommen und nach einer Wartezeit von 1-2 min im Mikroskop mit einer 200fachen Vergrößerung ausgezählt. Die Oozystenanzahl in der Probe wurde dann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

3.2. Immunologische und zellbiologische Methoden

3.2.1. Isolierung und Aufreinigung von mesenterialen Lymphknotenzellen und Milzzellen

Mesenteriale Lymphknotenzellen (MLNC) sowie Milzzellen von Mäusen wurden zur Überprüfung der zellulären Immunantwort in Lymphozyten-Transformationstests eingesetzt.

Zur Entnahme der lymphatischen Gewebe wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und deren Fell mit Ethanol (70%) durchtränkt. Durch einen Schnitt entlang der Linea alba wurde die Bauchhöhle eröffnet und Milz sowie mesenteriale Lymphknoten (MLN) herauspräpariert. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die entnommenen Gewebe in Kompletmedium auf Eis.

Unter sterilen Bedingungen wurde nun durch Siebpassage eine Einzelzellsuspension der Organe in Kompletmedium hergestellt. Die Entfernung grober Bindegewebspartikel erfolgte durch 3 min Sedimentation bei RT. Anschließend wurde der ÜS in neue Röhrchen überführt.

Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension der Milzzellen frei von Erythrozyten und toten Zellen wurden die Zellen über einen Dichtegradienten aufgereinigt. Dazu wurden 7-8 ml der Suspension über 4 ml des Gradienten (Histopaque 1,09) geschichtet. Nach Zentrifugation (2000 x g, 20 °C, 20 min, ohne Bremse) konnte eine opake Interphase aus den Klarsicht-Zentrifugenröhrchen isoliert werden.

Beide Zellsuspensionen wurden nun zweimal in PBS gewaschen (290 x g, RT, 10 min) und danach in 10 ml Kompletmedium aufgenommen. Die Zellzahl und Vitalität wurden mittels Trypan-Blau-Ausschlussfärbung (Verdünnung 1:10) und Neubauer improved-Zählkammer

bestimmt und beide Einzelzellsuspensionen wurden auf 2×10^6 Zellen/ml in Kompletmedium eingestellt.

3.2.2. Lymphozyten-Transformationstest mit murinen Lymphozyten

Der Lymphozyten-Transformationstest bietet die Möglichkeit, die zelluläre Immunantwort anhand der Proliferation von Lymphozyten *in vitro* zu überprüfen. Verschiedene Substanzen, wie z.B. Mitogene oder Antigene, stimulieren die Zellen und regen sie zur Proliferation an, welche mit einer *de novo*-Synthese von DNA einhergeht. Über den Einbau von radioaktiv markierten DNA-Vorstufen (^3H -Thymidin) kann mit Hilfe einer Szintillationssubstanz die Proliferation der Lymphozyten quantitativ erfasst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden T-Lymphozyten der isolierten MLN- und Milzzell- Populationen auf ihre Reaktionsfähigkeit auf das Mitogen Concanavalin A (Con A) und Sporoziten-Gesamtantigen überprüft. Pro Napf der Flachboden-Mikrotiterplatten wurden 150 μl der Einzelzellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml) gegeben und mit 50 μl der Mitogen- oder Antigenverdünnung ergänzt. Die Außennäpfe wurden mit 200 μl sterilem PBS aufgefüllt, um Verdunstungseffekten entgegenzuwirken. Jede Probe wurde in Triplikaten getestet. Die Inkubationszeiten für die Mitogenproben betragen 3 Tage und für die Antigenproben 6 Tage im Brutschrank (5% CO_2 , 37 °C, 100% Luftfeuchte).

Die Quantifizierung der DNA-Synthese proliferierender Lymphozyten erfolgte durch Zugabe von 20 μl ^3H -Thymidin-Lösung (1 μCi /Napf) 20 h vor Beendigung der Inkubationszeit. Die Zellkulturen wurden nach Ablauf der Inkubation mit einem Zellernter nach Anweisung des Herstellers auf einen Glasfaserfilter überführt und bei 50 °C für 30 min getrocknet. Danach wurde das Szintillationswachs auf einer Heizplatte (95 °C) auf die Filter aufgelegt und eingeschmolzen. Die Messung erfolgte nach Erkalten des Wachses in einem Szintillations-Spektrometer in „counts per minute“ (cpm).

3.2.3. γ -Bestrahlung von Mäusen

Die γ -Bestrahlung mit subletalen Dosen führt zur Abtötung lymphoider Zellen und erleichtert transferierten Zellen die Etablierung im Körper von Versuchstieren (Weber & Mausner 1977). Makrophagen und dendritische Zellen werden in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen durch sublethale Bestrahlungsdosen nicht beeinträchtigt (Kruisbeek & Shevach 1991).

8-10 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse wurden mit einer sublethalen Bestrahlungsdosis von 400 rad (4 Gy) mit Hilfe des Gammastrahlers Biobeam 2000 bestrahlt.

3.2.4. Transfer isolierter Lymphozyten und Infektion der Rezipienten

In der vorliegenden Arbeit sollte durch Transfer isolierter T-Lymphozyten in naive Mäuse und nachfolgender Belastungsinfektion mit *E. falciformis* die Funktion dieser Zellen untersucht werden. Dazu wurden Spendertiere, naiv bzw. mit 1000 Oozysten infiziert, mit CO₂ getötet und deren MLN nach Felldesinfektion und Eröffnung des Abdomens herauspräpariert. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension (siehe Abschnitt 3.2.1) wurde mittels Trypan-Blau-Lösung die Zellzahl und Vitalität der Zellen bestimmt und die Suspension auf $2,5 \times 10^8$ Zellen/ml in PBS eingestellt. 200 μ l (5×10^7 Zellen) dieser Zellsuspension wurden sodann in die tags zuvor sublethal bestrahlten Rezipienten intravenös injiziert. Dazu wurden die Mäuse einzeln für kurze Zeit zur Dilatation der Schwanzvenen in einem Becherglas unter Rotlicht gesetzt. Nach gründlicher Desinfektion des Schwanzes wurde dieser mittels Futterrost auf dem Behandlungstisch separiert und damit gleichzeitig das Tier immobilisiert. Anschließend erfolgte die langsame Injektion der Zellsuspension in eine der lateral gelegenen Schwanzvenen. Nach gründlichem Abdrücken der Injektionsstelle mit einem Tupfer und Kontrolle der Blutungsstillung wurden die Tiere bis zum 5. Tag p.i. zusammen auf Einstreu gehalten.

Einen Tag nach Zelltransfer erfolgte die Infektion der Rezipienten. Die Tiere wurden mit einer moderaten Infektionsdosis von 100 Oozysten infiziert. Zur Herstellung dieser Infektionslösung wurden Oozysten mit Hilfe von NaOCl (12%) aufgereinigt. Nach mehreren Waschschritten mit sterilem Wasser wurde das Pellet in 50 ml NaOCl aufgenommen und zur Sterilisation 15 min. auf dem Magnetrührer verrührt. Danach erfolgte die Flotation der gereinigten Oozysten

durch Zentrifugation (1100 x g, RT, 8 min). 5-7 ml des Flotats wurden abpipettiert, in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt und nach dreimaligem Waschen mit sterilem Wasser in 10 ml PBS aufgenommen. Sodann wurde die Infektionslösung mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer auf 1000 Oozysten/ml in PBS eingestellt. Um nun eine Lösung von 10^3 Oozysten/ml genau einstellen zu können, wurden mehrfach gründlich resuspendierte Aliquots von 10 μ l dieser Suspension auf einem Objektträger aufgebracht und mit 200facher Vergrößerung ausgezählt bis die Infektionslösung nicht mehr als 10% Abweichung in der Oozystenzahl aufwies. Die Mäuse wurden sodann mit 100 μ l dieser Suspension infiziert (100 \pm 10 Oozysten).

3.2.5. Separierung von T-Zell-Subklassen mittels MACS

Um die Funktion von T-Zell-Subklassen bei Transfer in naive Tiere und nachfolgender Infektion mit *E. falciformis* untersuchen zu können, wurden CD8⁺- sowie CD4⁺-T-Zellen aus den MLN mittels MACS (*magnetic cell sorting*)-MicroBeads separiert. Dazu wurden die MLN aus Spendertieren isoliert und Einzelzellsuspensionen in Komplettmedium angefertigt. Nach Abzentrifugation des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS/BSA gewaschen (290 x g, 4 °C, 10 min), mittels Trypan-Blau-Ausschlussfärbung (Verdünnung 1:10) ausgezählt und die Zellen auf 2×10^8 /ml PBS/BSA eingestellt. Danach wurde der Suspension 20 μ g/ml Anti-Fc-Rezeptor-Antikörper zugegeben, um unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren der Makrophagen und dendritischen Zellen zu verhindern. Nach 3 min Inkubation bei RT wurde der Suspension CD8a-(Ly-2)-MicroBeads für die Separation der CD8⁺-T-Zellen bzw. CD4-(L3T4)-MicroBeads für die Separation der CD4⁺-T-Zellen zugegeben. Für $1,5-2 \times 10^8$ Zellen wurden 100 μ l MicroBeads eingesetzt. Diese Beads (\varnothing 50 nm) reagieren als magnetische Antikörper und heften sich spezifisch an Zell-Oberflächenantigene der Lymphozyten. Nach kurzer Inkubation von 15 min bei 4 °C wurde die Suspension mit PBS/BSA gewaschen (290 x g, 4 °C, 10 min). Für die Separation im autoMACS (*automated magnetic cell sorting*) sollte eine Probe maximal 5×10^8 Zellen enthalten. Bei höheren Zellzahlen wurde die Suspension deshalb in mehrere Ansätze aufgeteilt. Die Funktionsweise der positiven Selektion ist in Abbildung 3 dargestellt.

Magnetische Markierung der Zellen mit MACS MicroBeads.

Markierte und unmarkierte Zellen werden über eine Separationssäule gegeben, welche sich im magnetischen Feld eines MACS-Separators befindet. Magnetisch markierte Zellen werden in der Säule zurückgehalten, der Durchfluss enthält die nicht-magnetische Fraktion.

Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld und anschließende Elution der zurückgehaltenen Zellen als positiv selektierte Fraktion.

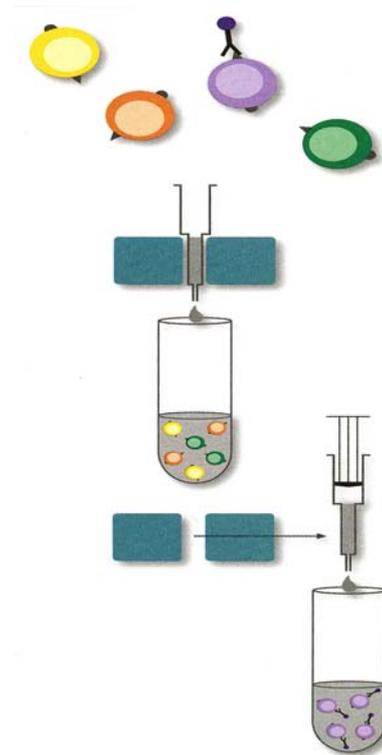


Abb. 3: Positive Selektion von T-Zell-Subklassen mittels MACS MicroBeads.

Schematische Darstellung der Separation spezifischer T-Zell-Subklassen mit Hilfe von magnetisch wirkenden MicroBeads. Pro Separationsansatz wurden 5×10^8 Zellen eingesetzt. Bei ungenügender Reinheit der separierten Zell-Population kann eine zweite positive Selektion durchgeführt werden. (aus Produktkatalog Miltenyi Biotec 2002)

3.2.6. Durchflusszytometrie (FACS) isolierter MLNC

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Analyse von Zellsuspensionen. Die Zellen werden einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeleitet, wobei anhand des Vorwärtstreulichtes des Lasers die Zellgröße und anhand des Rechtwinkelstreulichtes die Zelldichte und Granularität bestimmt werden kann. Mit Hilfe von Fluoreszenzmolekülengekoppelten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenantigene können die Zellen genauer charakterisiert werden.

Zur Untersuchung der Zell-Zusammensetzung sowie der T-Zell-Subklassen isolierter MLNC wurde eine FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Aliquots (1×10^6 Zellen) der zu untersuchenden Zellsuspensionen mit Antikörpern für

spezielle Oberflächenantigene der Zellen inkubiert. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

- anti-Maus CD4-Alexa-405 1:400
- anti-Maus CD8a-PE 1:300
- anti-Maus B220-FITC 1:100
- anti-Maus CD11c-Cy5 1:200
- anti-Maus CD49b(DX5)-FITC 1:20

Da die B- und NK-Zell-Antikörper an die gleichen Fluoreszenzmoleküle gekoppelt waren, wurden zwei Ansätze für die Färbung hergestellt. Die Färbung erfolgte im Endvolumen von 100 µl. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min bei 4 °C wurden überschüssige Antikörper mit 1 ml PBS/BSA abgewaschen (2000 rpm, 4 °C, 5 min). Anschließend wurde das Zellpellet in 300 µl PBS/BSA aufgenommen und im FACS untersucht.

3.2.7. Zytokin-ELISA

Zum Nachweis der Konzentrationen von IFN- γ , TNF- α und IL-6 in Organhomogenisaten infizierter BALB/c-Mäuse nach T-Zell-Transfer wurden ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt. Dabei reagiert ein monoklonaler Primärantikörper mit dem zu messenden Zytokin als Antigen in einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein hinzugegebener, enzymgekoppelter Sekundärantikörper bindet ebenfalls an das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Zytokin-Konzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen wurde die absolute Konzentration der untersuchten Zytokine ermittelt.

Die Organextrakte wurden aus einem ca. 1 cm großen Abschnitt des Duodenum, Caecum und der gesamten Milz hergestellt. Dazu wurden die Organteile nach Entnahme gründlich in PBS gewaschen, auf Filterpapier kurz abgetrocknet, in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff gefrostet und bei -80 °C gelagert. Für die Weiterverarbeitung wurden die Organteile aufgetaut, zwischen mikroskopischen Objektträgern mit angerauten Oberflächen zerrieben und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 4 °C, 10 min) wurden die ÜS in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

Für den ELISA wurden 50 µl der entsprechenden Antikörperverdünnung in Beschichtungspuffer in die Näpfe von Flachboden-Mikrotiterplatten pipettiert und bei 4 °C ÜN in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen, 1 h mit 200 µl Blockierungspuffer bei RT in feuchter Kammer inkubiert und wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde eine Standardverdünnungsreihe nach Angaben des Herstellers angefertigt und 50 µl in Doppelbestimmung aufgetragen. Des Weiteren wurden nun 50 µl der Organhomogenisate (Verdünnung 1:5) jedes Tieres ebenfalls in Doppelbestimmung in die Näpfe pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden wiederum bei 4 °C ÜN in feuchter Kammer inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und 50 µl einer Verdünnung des entsprechenden Detektionsantikörpers mit Zusatz von Streptavidin-Peroxidase (Verdünnung 1:250) dazu pipettiert. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Platten siebenmal mit Waschpuffer gewaschen und 75 µl der Substratlösung (1 TMB-Tablette + 2 µl 30% H₂O₂ in 10 ml Substratpuffer) zugegeben. Nach 15-20 min wurde die Reaktion mit 50 µl 2M Stopplösung beendet und am Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.3. Proteinanalytik

3.3.1. Proteinbestimmung in Organhomogenisaten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Organextrakten von BALB/c-Mäusen nach T-Zell-Transfer diente der Validierung der im ELISA gemessenen Zytokinmenge in Bezug auf die Organmenge. Die Proteinbestimmung Roti-Nanoquant beruht auf einer Modifikation der Methode nach Bradford (1976). Mit Hilfe dieses Testes können in wässrigen Lösungen Proteinmengen ab 200 ng bestimmt werden.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Standardverdünnungsreihe von 3,9 bis 1000 µg/ml BSA hergestellt und je 20 µl in Doppelbestimmung in die Näpfe einer Mikrotiterplatte pipettiert. Des Weiteren wurden 20 µl der Organextrakte jedes Tieres in Doppelbestimmung aufgetragen. Abschließend erfolgte die Zugabe von 80 µl Roti-Nanoquant Arbeitslösung, welche vorher 1:5 verdünnt wurde. Zum Mischen der Proben wurde die Mikrotiterplatte auf einen Plattenrüttler gestellt. Die Inkubation erfolgte ca. 30 min bei 37 °C.

Im Plattenphotometer wurden bei 595 nm und 450 nm die Extinktionen gemessen, aus denen dann der Quotient gebildet und die Standardkurve entwickelt wurde. Nach Ermittlung der Proteingehalte der einzelnen Proben wurde die niedrigste Proteinkonzentration jedes Organs gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte durch diese Konzentration dividiert. Der somit erhaltene Faktor wurde nun zur Validierung der Zytokingehalte der Organextrakte eingesetzt, indem die Zytokinwerte durch diesen Faktor geteilt wurden, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit der untersuchten Proben gewährleistet wurde.

3.4. Histologische Arbeitsmethoden

3.4.1. Gewinnung und Paraffin-Einbettung von Organproben

Zur histologischen Untersuchung von Dünn- und Dickdarm infizierter BALB/c-Mäuse wurden die Organe nach Tötung der Rezipienten mit CO₂ vollständig entnommen. Anschließend wurde der gesamte Dünn- bzw. Dickdarm schneckenförmig von proximal nach distal in Einbettkassetten für histologische Proben eingerollt. Nach Beschriftung der Kassetten mit einem Bleistift wurden sie verschlossen und in 5%iger Formalinlösung bei 4 °C aufbewahrt.

Die Vorbereitung der Organproben für die Paraffin-Einbettung wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Charité-Universitätskrankenhauses Campus „Benjamin Franklin“ in Berlin durchgeführt. Um Dauerpräparate über die Einbettung in Paraffin herstellen zu können, wurden die Organproben zuerst in Leitungswasser gewässert, um das Fixierungsmittel Formalin zu entfernen. Danach erfolgte die vollständige Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Anschließend wurden die Organe zur Entfernung des Alkohols in Xylol gelegt. Die Lagerung der Organproben in flüssigem Paraffin (60 °C) diente der Füllung vorhandener Hohlräume mit Paraffin, welches ihnen nach Erstarren eine gut schneidbare Beschaffenheit gab. Für die Herstellung eines Paraffinblocks wurde nun eine kleine Menge geschmolzenen Paraffins in ein Blockschälchen gegeben und das nun völlig entwässerte und paraffindurchtränkte Präparat mit einer erwärmten Pinzette mit der Schnittfläche nach unten eingesetzt. Danach wurde das Organ vollständig mit Paraffin bedeckt und das Unterteil der Einbettkassette verkehrt herum aufgedrückt. Das Blockschälchen wurde nun bis zum vollständigen Erstarren des Paraffins auf einer Kälteplatte (-9 °C) gelagert.

Danach ließ sich der Paraffinblock leicht aus dem Blockschälchen lösen und konnte für die Anfertigung histologischer Präparate verwendet werden.

3.4.2. Herstellung histologischer Präparate

Das Schneiden der paraffinisierten Organe erfolgte mit Hilfe eines Mikrotoms. Durch Lagerung der Paraffinblöcke auf einer Kälteplatte (-9 °C) erhielten sie die nötige Festigkeit zum Schneiden. Der Block wurde in die Mikrotomklammer eingespannt und das überschüssige Paraffin in 20-30 µm dicken Schnitten abgetrennt. Zum Schneiden des Organs wurden feine Schnitte von 4,5 µm angefertigt. Nach manueller Schnittführung wurde das Präparat über eine mit destilliertem Wasser gespülte Schräge in ein Wasserbad (42 °C) befördert, in dem es sich glatt ausbreitete. Die Schnitte wurden dann durch einen unter sie geschobenen fettfreien Objektträger aufgefangen. Nach Abtrocknung der Präparate wurden die Objektträger in Färbegestellen aufbewahrt und im Inkubator bei 60 °C ÜN gelagert, damit das Paraffin ablaufen kann. Von jedem Organ wurden in drei Ebenen je zwei Schnitte angefertigt und beurteilt.

3.4.3. Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung von histologischen Präparaten

Für die HE-Färbung wurden die Präparate in den Färbegestellen manuell in einer Färbereihe gefärbt (Tab. 1). Nach Entparaffinisierung mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin. Nach Spülung der Objektträger in Leitungswasser wurde mit Eosin gegengefärbt. Das Eindecken der Schnitte mit Deckgläschen erforderte eine nochmalige Entwässerung der geschnittenen und gefärbten Präparate. Dazu wurde die Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge bis zum Xylol verwendet. Abschließend wurden die Organschnitte mit Hilfe des Schnelleindeckmittels Entellan und Deckgläsern eingedeckt. Dazu wurde ein Tropfen des Eindeckmittels mit einem Glasstab auf dem Deckglas verteilt und fest auf den Objektträger gedrückt, um Luftbläschen zu vermeiden. Nach Trocknung wurden die Schnitte in Präparatemappen aufbewahrt.

Tab. 1: Protokoll der HE-Färbung

Schritt	Reagenz	Inkubationszeit
1	Xylol	5 min
2	Xylol	5 min
3	abs. Iso-Propanol	5 min
4	96% Ethanol	5 min
5	80% Ethanol	5 min
6	70% Ethanol	5 min
7	Hämatoxylin	3 min
8	Leitungswasser	5 min
9	Eosin	10 min
10	Leitungswasser	30 sec
11	70% Ethanol	5 min
12	80% Ethanol	5 min
13	96% Ethanol	5 min
14	abs. Iso-Propanol	5 min
15	Xylol	5 min
16	Xylol	5 min

3.4.4. Mikroskopische Auswertung

Die Organschnitte wurden von innen nach außen (proximal nach distal des Darmes) unter dem Photomikroskop Axiophot bei einer 200fachen Vergrößerung durchgemustert. Zur sicheren Identifizierung pathologischer Veränderungen im Darmgewebe wurde die 400fache Vergrößerung verwendet. Die bildliche Dokumentation erfolgte unter Benutzung der Leica DFC480 R2 Digitalkamera und dem Bilderfassungsprogramm IM50.

3.5. Statistische Methoden

Von mehrfach bestimmten Messwerten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

Die Signifikanzprüfung für unabhängige Versuchsdaten bei Normalverteilung wurde mit Hilfe des t-Testes durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Grundgesamtheiten fand der U-Test

Anwendung. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) unterschritten wurde.

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SigmaStat 2.0 verwendet.