

## 4. KAPITEL

# MATERIAL UND METHODEN

---

### 4.1. DAS TRAUMAMODELL

#### 4.1.1. Die Versuchstiere

Der Tierversuch wurde in der Abteilung für experimentelle Neurochirurgie der Charité, Campus Virchow-Klinikum der Humboldt Universität zu Berlin unter der Leitung von Andreas Unterberg, durchgeführt (AZ Nr. 0180/96). Als Versuchstiere wurden männliche Ratten der Rasse Sprague Dawley (Fa. Charles River, Deutschland / Sulzfeld) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250-350 g verwendet.

#### 4.1.2. Die Versuchsanordnung

Als Vorlage für das Traumamodell wurde das Konzept des "Controlled Cortical Impact Injury" (DIXON ET AL. 1991) gewählt. Hierbei handelt es sich um ein experimentelles, mechanisches Hirntrauma, bei dem nach parietotemporaler Trepanation ( $\varnothing$  7 mm) ein computergesteuerter, pneumatisch angetriebener Bolzen auf die intakte Dura appliziert wird. Nach der Fixierung in einem Stereotaxierahmen (Stoelting, Wood Dale, IL) wurden die spontan atmenden Tiere über eine Maske mit 2% Isoflurane ( $N_2O:O_2$ , 1:2) narkotisiert, die Körpertemperatur wurde mittels einer Wärmematte konstant bei 37° Celsius gehalten. Die Tiere wurden nach unterschiedlich langer Überlebenszeit in Narkose durch Eröffnung des rechten Vorhofes getötet. Es standen uns Lymphknoten aus drei Versuchsserien, bestehend

aus insgesamt 48 Tieren, bei denen die Eindringtiefe des Bolzens 2,0 mm und die Geschwindigkeit 7 m/s betrug, zur Verfügung. Es wurde Material von zwei Kontrolltieren und sechs sham-operierten Tieren untersucht. In Versuchsserie 1 wurden zunächst nur die submandibulären Lymphknoten beider Seiten und die lumbalen paraaortalen Lymphknoten der rechten Seite nach Überlebenszeiten von 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 16 h, 24 h, 2 d und 3 d entnommen. In Versuchsserie 2 wurden die Lymphknotenlokalisationen um die tiefen cervikalen, die renalen, die inguinalen und die poplitealen Lymphknoten ergänzt und nach Überlebenszeiten von 10 min, 24 h, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d, 10 d und 28 d gewonnen.

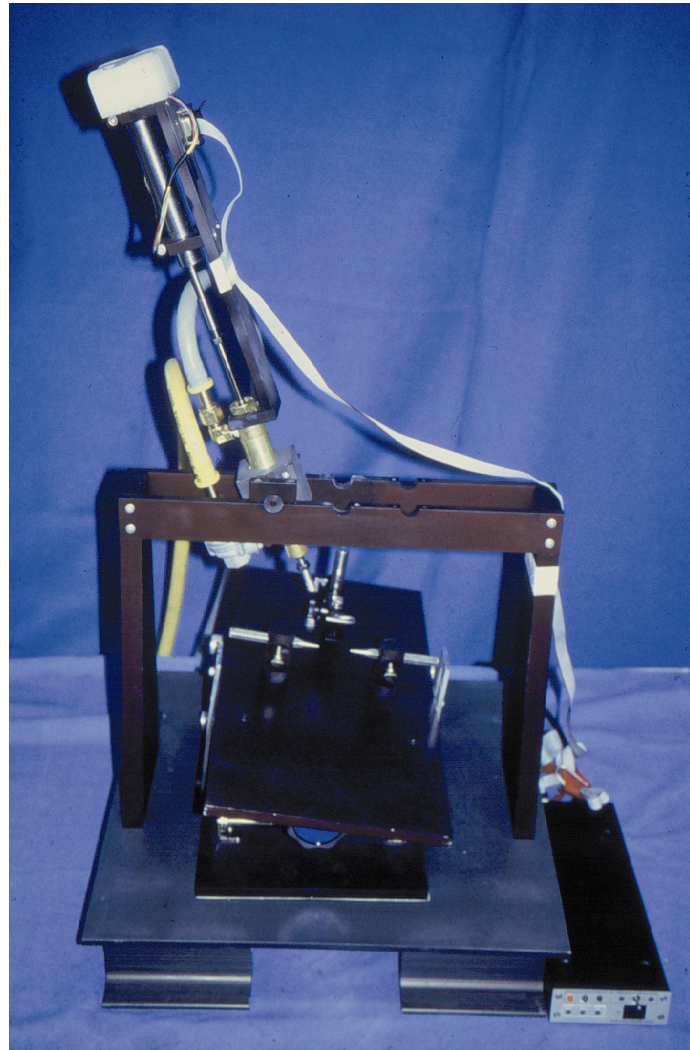


Abb. 7: Kontusionseinheit und Stereotaxierahmen des Controlled Cortical Impact Injury.

In einer weiteren Versuchsserie von 10 Tieren wurde einer Therapiegruppe der NMDA-Antagonist Aptiganel HCl (Cerestat®, CNS 1102, Cambridge, MA) verabreicht. Zwei Tieren wurde 15 Minuten nach dem Trauma Cerestat® in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht intravenös gegeben. Vier Tiere erhielten stattdessen ein Plazebo, zwei Tiere wurden sham-operiert und zwei weitere als Kontrollen verwendet. In dieser Versuchsserie wurden alle sechs traumatisierten Tiere nach einer Überlebenszeit von 24 h getötet und die oben bereits geschilderten Lymphknotenlokalisationen bearbeitet.

## 4.2. HERSTELLUNG VON HISTOLOGISCHEN SCHNITTEN

### 4.2.1. Präparation und Einbettung

Die seitengetrennte Präparation verschiedener Lymphknotenstationen standen im Vordergrund. Es wurden oberflächliche (Lymphnoduli submandibulares) und tiefliegende (Lymphnoduli cervicales profundi) Lymphknotenpakete des Halses und im Bereich der Aortenbifurkation paraaortal (Lymphnoduli lumbales) gelegene Lymphknoten dargestellt und entnommen. Desweiteren wurden als Kontrolle Lymphknoten der Leisten- (Lymphnoduli inguinalis) und Kniekehlenregion (Lymphnoduli poplitealis) verwendet. Zum Studium und zur besseren Abgrenzung der sogenannten Blutlymphknoten gegenüber dem restlichen Material wurden außerdem Lymphknoten im Bereich beider Nierenhili (Lymphnoduli renalis) aserviert. Des weiteren wurde bei zwei Tieren, zur besseren Beurteilbarkeit der Traumagröße, das Gehirn zusammen mit dem Tractus olfactorius und den angrenzenden knöchernen Strukturen der oberen Nasenhöhle entnommen und Frontalschnitte angefertigt. Das histologische Material wurde in 10% Formaldehyd über 1-2 Tage fixiert; zusätzlich wurden einige repräsentative Lymphknoten zur elektronenmikroskopischen Darstellung in Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch nach Karnowsky eingebracht. Das Material des Tractus olfactorius wurde wegen der knöchernen Anteile der Nasenhöhle zusätzlich mit EDTA bei 37° Celsius entkalkt. Die Dauer der Entkalkung richtet sich nach dem Tastbefund, wie weich sich die knöchernen Strukturen nach fortgeschrittener Einwirkzeit anfühlen. Mittels eines Gewebe-Einbettautomaten (DDM-P 800, Medis Weber) wurde das fixierte Gewebe in Kunststoffkapseln über die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol vom wässrigen Milieu in 58° Celsius heißen Paraplast (synthetisches Paraffin) überführt (Abb. 8). Der eigentliche Paraffinblock wird in Edelstahlformen mit flüssigem Paraplast gegossen, die Kunststoffkapseln fungieren nun als Träger des erhärteten Paraffinblockes und können bequem in das Mikrotom eingespannt werden.

70% Äthanol.....	1,5 Std.
70% Äthanol.....	1,5 Std.
80% Äthanol.....	1,5 Std.
80% Äthanol.....	1,5 Std.
96% Äthanol.....	1,5 Std.
96% Äthanol.....	1,5 Std.
100% Äthanol.....	1,5 Std.
100% Äthanol.....	1,5 Std.
Xylol.....	1,5 Std.
Xylol.....	1,5 Std.
Paraplast.....	1,5 Std.
Paraplast.....	1,5 Std.

Abb. 8: Schema zum Ablauf der Entwässerung

#### 4.2.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Aus jedem Paraffinblock wurden an einem Jung®-Rotationsmikrotom (RM 2035 Biocut, Leica®) 13 Schnitte mit einer Schichtdicke von 4-5 µm angefertigt. Um eine günstige Konsistenz für den Zuschnitt zu erhalten, werden die Paraffinblöcke vorher 10 Minuten lang im Eisfach gekühlt. Der hergestellte Schnitt wird schwimmend in destilliertem Wasser auf einem Objektträger<sup>2</sup> positioniert und in einem 30-35° Celsius warmen Wasserbad gestreckt. Über Nacht werden die Schnitte in einem Wärmeschrank bei 37° Celsius getrocknet. In diesem Zustand können die histologischen Schnitte bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

---

<sup>2</sup>Jeweils 10 Schnitte wurden auf APTS-beschichteten Objektträgern aufgezogen. Damit wird das Risiko, daß Gewebe bei Anwendung der Immunhistochemie abschwimmt, vermindert.

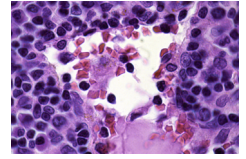
Objektträgerbeschichtung mit 3-Aminopropyl-tri-etoxy-silan (Sigma® Best.-Nr. A 3648):

2% APTS mit Aceton ansetzen (z.B. für eine 250 ml-Küvette 5 ml APTS).

1. Objektträger 5 min in Aceton
2. 5 min in APTS (2%)
3. 5 min in Leitungswasser spülen
4. Bei Raumtemperatur über Nacht trocknen lassen

### 4.3. FÄRBUNGEN

#### 4.3.1. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin nach *Mayer*

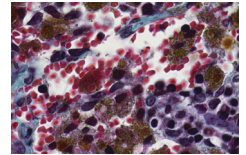


1. Paraffinschnitte über die absteigende Alkoholreihe in wässriges Milieu überführen.
2. In A. dest. spülen.
3. In Hämalauun zur Kernfärbung einstellen.
4. Spülen in A. dest. oder in 0,1%iger HCl.
5. Bläuen in fließendem Leitungswasser.
6. Fünf mal in Eosin tauchen.
7. In A. dest. spülen.
8. Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und Einschließen in Vitro-Clud®<sup>3</sup>

8-10 min

10 min  
5x Eint.

#### 4.3.2. Trichromfärbung nach *Goldner*



1. Paraffinschnitte in wässriges Milieu überführen
2. In A. dest. spülen
3. Kernfärbung mit Eisen-Hämatoxylin nach *Weigert*
4. Bläuen in Leitungswasser
5. In das Ponceau de Xylidine-Säurefuchsin einbringen
6. Kurz in 1%iger Essigsäure spülen
7. In Phosphormolybdänsäure-Orange G bis zur Entfärbung des Bindegewebes belassen
8. Kurz in 1%iger Essigsäure spülen
9. In das Lichtgrün geben
10. Kurz in 1%iger Essigsäure spülen
11. Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und Einschließen in Vitro-Clud®

3-5 min

15 min

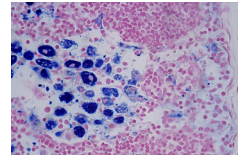
5 min

5-10 min

5-10 min

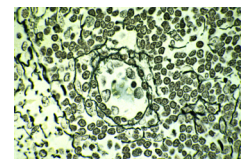
<sup>3</sup> Vitro-Clud®, Fa.R. Langenbrinck / Emmendingen

#### 4.3.3. Berlinerblau und *Turnbulls* Blau



1. Schnitte entparaffinieren und durch die Alkoholreihe in Wasser bringen
2. In eine Mischung aus gleichen Teilen 20%iger HCl und 10%iger Kaliumferrozyanidlösung<sup>4</sup> einstellen. Dieses Reagens darf erst unmittelbar vor Gebrauch gemischt werden. Wenn es sich während der Inkubationszeit verfärbt, muß es erneuert werden. 30 min
3. Sorgfältig in Aqua dest. auswaschen
4. Mit Kernechtrot gegenfärben 5 min
5. Spülen in Aqua dest.
6. Alkoholreihe, Xylol und Einschließen in Vitro-Clud®

#### 4.3.4. Silberimpregnation nach *Gomori*



1. Schnitte entparaffinieren und in Wasser einbringen
2. In 0,5%iger Kaliumpermanganatlösung oxidieren 1-2 min
3. In Leitungswasser auswaschen 5 min
4. In 2%iger Kaliumdisulfitlösung entfärben 1 min
5. In Leitungswasser auswaschen 5-10 min
6. Sensibilisieren in frisch bereiteter 2%iger Eisenammoniumsulfatlösung 1 min
7. In Leitungswasser auswaschen 3-5 min
8. 2x in Aqua dest. spülen 2x2 min
9. Imprägnation mit der ammoniakalischen Silbernitratlösung<sup>5</sup> 1 min
10. Rasch in Aqua dest. abspülen. Die Dauer des Spülens bestimmt die Imprägnation; ist sie zu kurz, fällt die Imprägnation zu dicht aus, ist sie zu lang, umgekehrt. 5-10 s
11. In Formol-Leitungswasser (1:9) reduzieren 5 min
12. In Leitungswasser auswaschen 5 min
13. Tönen in 0,1%iger Goldchloridlösung 10 min
14. In Aqua dest. abspülen
15. Reduktion in 2%iger Kaliumdisulfit-Lösung 1 min
16. In 1%iger Natriumthiosulfat-Lösung fixieren; darauf achten, daß die angegebene Zeit nicht überschritten wird, da sonst die feinsten Fasern entfärbt werden. 1 min
17. Gründlich in Leitungswasser auswaschen, in der Alkoholreihe entwässern und über Xylol, in Vitro-Clud® einschließen.

<sup>4</sup> Bei der Färbung von *Turnbulls* Blau wird statt Kaliumferrozyanid Kaliumferrizyanid verwendet.

<sup>5</sup> Herstellung der ammoniakalischen Silbernitratlösung: Zu 10 ml einer 10%igen Silbernitratlösung, die man in einem 25 ml Becherglas auf dem Magnetrührer stehen hat, setzt man 2 ml 10%ige KOH zu. Es entsteht sofort ein Niederschlag. Tropfenweise Ammoniak zusetzen, wobei man nach jedem Tropfen einige Sekunden die Wirkung abwartet, bis der Niederschlag wieder vollständig gelöst ist, aber nicht mehr zusetzen. Anschließend gibt man wieder tropfenweise Silbernitratlösung zu, bis die entstehenden Niederschläge oder besser Schlieren nur noch langsam verschwinden. Mit Aqua dest. auf das Doppelte des Volumens auffüllen (in dunkler Flasche 2 Tage haltbar.).

#### 4.4. IMMUNHISTOCHEMIE

In histologischen Gewebe lassen sich antigene Strukturen mit ausgewählten Primärantikörpern darstellen. Um die Bindung der Primärantikörper für das Lichtmikroskop sichtbar zu machen, stehen verschiedene immunhistochemische Methoden zur Verfügung. Die neueren Techniken verfügen alle, dank Verwendung von Enzymen, über eine gute Sensitivität, so daß sich die Auswahl einer bestimmten Färbemethode meist an gewebsspezifischen Eigenschaften orientiert.

##### 4.4.1. Die ABC-Methode

Die Abkürzung ABC steht für Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex und repräsentiert eine immunhistochemische Färbemethode (HSU ET AL. 1981), die sich wegen ihrer hohen Sensitivität wachsender Beliebtheit erfreut. Die Vorteile dieser Technik basieren zum einen auf der Bindungsfreudigkeit zwischen Avidin und Biotin und zum anderen auf der chemisch milden Biotinylierung des Sekundärantikörpers, der somit in seiner Bindungsfähigkeit an den jeweiligen Primärantikörper nicht beeinträchtigt wird.

Jedes Avidin-Glykoprotein ist in der Lage, vier Moleküle Biotin zu binden; diese sind jedoch nicht alle belegt, so daß mindestens eine Bindungsstelle des Avidins mit dem biotinylierten Sekundärantikörper reagieren kann. Das Biotin wird kovalent am Sekundärantikörper gebunden, ohne die empfindliche Fab-Region, die für die Erkennung des Primärantikörpers notwendig ist, zu beeinflussen. Die

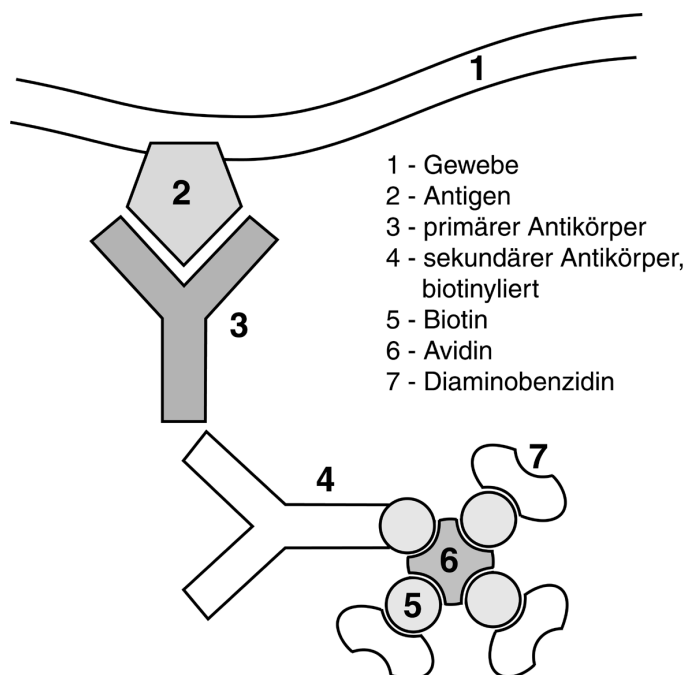


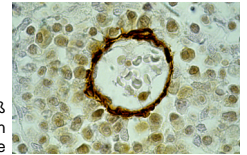
Abb. 9: Schematische Darstellung der ABC-Methode.

eigentliche Farbreaktion kommt beim Umsatz des Enzyms Peroxidase zustande, das am Biotin des präformierten ABC-Komplexes kovalent gebunden ist. Unter Zugabe von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zerfällt die Peroxidase zu Wasser und Sauerstoff; diese Reaktion wird durch die Ergänzung eines Chromogens, in diesem Falle 3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB), in Gang gehalten. Das DAB stellt dabei die Elektronen für den laufenden Zerfall des Enzyms zur Verfügung und wird im gleichen Zug oxidiert. Die Oxidation des DAB zeigt sich in der Ausfällung eines braunen, in Alkohol unlöslichen Reaktionsproduktes.



## 4.4.1.1. Durchführung der ABC-Methode

Lymphknotengefäß  
 $\alpha$ -Smooth-muscle actin  
 ABC-Methode



1. Entparaffinieren: in Xylol		2x5 min
-mit Blockierung der endogenen Peroxidase: absteigende Alkoholreihe bis 100%		
-ohne Blockierung der endogenen Peroxidase: absteigende Alkoholreihe bis 50 %		
2. Blockierung der endogenen Peroxidase: 200ml Methanol + 6ml 30% $H_2O_2$		30 min
3. Spülen mit A. dest.		
4. Mikrowellenbehandlung: Bei 600 Watt in 4°C kaltem Tri-Na-Citrat-Puffer (pH 6.0 genau einhalten!). Nach jedem Durchgang wieder mit Citrat-Puffer auffüllen. (Bei weniger als 3 Küvetten muß ein Ausgleichsgefäß mit in der Mikrowelle stehen.)		4x5 min <sup>6</sup> 3x5 min <sup>7</sup>
5. Küvette mind.15 min bei RT abkühlen lassen.		15 min
6. Spülen in TBS (Spülpuffer, pH 7.4)		5 min
7. Andauung mit 0.001 % Trypsin <sup>8</sup> bei 37°C		15 min
8. Spülen in A. dest.		
9. Spülen in PBS		5 min
10. Normalserum (1:10 in PBS) entsprechend der Herkunft des Sekundärantikörpers.		20 min
11. Nach der Präabsorption nicht spülen, sondern nur den überschüssigen Puffer abwischen.	MP <sup>9</sup> in PBS	
12. Primärantikörper bei 37°C inkubieren		60 min
13. Spülen in PBS		5 min
14. Sekundärantikörper bei RT inkubieren		30 min
15. Spülen in PBS		5 min
16. ABC-Komplex bei RT inkubieren: 20 $\mu$ l Komponente A + 20 $\mu$ l Komponente B mit PBS auf 1000 $\mu$ l auffüllen (das Gemisch 30 min vor Gebrauch ansetzen).		30 min
17. Spülen in PBS		5 min
18. Entwicklung: 50 mg DAB/50 ml 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) + 50 $\mu$ l 10 % $H_2O_2$ (filtrieren)		5 min
19. Fließend wässern		5-10 min
20. Spülen in A. dest.		1-2 min
21. Gegenfärben mit Hämalaun (das Hämalaun vorher filtrieren)		5-10 min
22. Bläuen in fließendem Leitungswasser		
23. Spülen in A. dest.		
24. Aufsteigende Alkoholreihe (5 min im letzten 100% Alkohol) bis in das Xylol		
25. Eindecken mit Vitro-Clud®		

<sup>6</sup> Bei der Darstellung von Desmoplakin: 4x5 min

<sup>7</sup> Bei der Darstellung von Aktin: 3x5 min

Bei Verwendung von ED 1 ist keine Andauung notwendig

<sup>8</sup> Herstellung der Andauungslösung: 1 ml von der 0.1%igen Trypsin-Stammlösung mit 100ml 0.05M Tris-HCl verdünnen. Das verdünnte Trypsin 30min vorher auf 37°C anwärmen.

<sup>9</sup>MP: 2% Milchpulver; dient zur Reduktion der Hintergrundaktivität bei der Färbung von Desmoplakin. Der Färbeablauf bei der Darstellung von Desmoplakin entstand mit der freundlichen Unterstützung des immunhistochemischen Labores von Prof. Moll / Pathologisches Institut, Martin-Luther-Universität, Halle

## 4.4.1.2. Materialien und Stammlösungen der ABC-Methode

Tab. 2: Auflistung der bei der ABC-Methode verwendeten immunhistochemischen Materialien

Material	Details	Referenzen	Hersteller
<u>Primärantikörper:</u>			
Desmoplakin 1 & 2, Multi-Epitope Cocktail Klon: DP 1 & 2-2.15, DP 1-2.17, DP 1 & 2-2.20	monoklonal, Subklasse IgG1, vorverdünnte Lsg. entspr. ca.1:100 (10-15µg/ml)	Schmelz et al., 1994	Progen, Heidelberg, Best.-Nr. 65146
Aktin (Anti- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin) Klon: 1A4	monoklonal, Subklasse IgG2a, unverdünnt	Skalli et al., 1986	DAKO, Hamburg, Best.-Nr. M 0851
Monozyten/Makrophagen ED1 Klon: ED1	monoklonal, Subklasse IgG1 unverdünnt	Demoiseaux et al., 1994	Serotec, Oxford, Best.-Nr. MCA 341 B
<u>Sekundärantikörper:</u>			
Goat Anti-Mouse, IgG1	affinitätsisolierter Sekundärantikörper, biotinyliert, verwendeter Sekundärantikörper bei der Darstellung von DP & ED1		Caltag, Burlingame, Best.-Nr. M 32015
Goat Anti-Mouse, IgG2a	affinitätsisolierter Sekundärantikörper, biotinyliert, verwendeter Sekundärantikörper bei der Darstellung von Aktin		Caltag, Burlingame, Best.-Nr. M 32215
<u>ABC-Komplex:</u>			
ABC-Reagenzien	im Vectastain® Elite ABC- Kit (Universal) enthalten	Hsu et al., 1981	Vector, Best.-Nr. PK 6200
<u>Normalserum:</u>			
Goat	hitzebehandelt, unfiltriert		Vector, Best.-Nr. S-1000
<u>Peroxidase-Substrat:</u>			
DAB-Tabletten	enth. 10 mg 3,3'-Diaminobenzidin- tetrahydrochlorid, stabiles braunes Chromogen		DAKO, Hamburg, Best.-Nr. S 3000

Herstellung von Phosphatpuffer 0,15 M (PBS)

8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l Aqua dest. gelöst (pH 7,4).

Herstellung von Tris-HCl-Puffer-Stammlösung 0,5 M

60,57 g Trishydroxymethylaminomethan (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.08382) werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und mit 1 N HCl (Merck, Darmstadt, Best.-Nr.) auf einen pH von 7,4 eingestellt (ca. 500 ml). Auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen. Die Gebrauchslösung 0,05 M (für Trypsin und DAB) wird 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Herstellung von Trypsin-Stammlösung 0,1%

300 mg Trypsin und 300 mg CaCl<sub>2</sub> mit 300 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer lösen und mit 1 N NaOH auf pH 7,8 einstellen.

Herstellung von 2%iger Milchpulver-PBS-Lösung

2 g Milchpulver (Karstadt) in 100 ml PBS lösen. Diese Lösung muß täglich neu angesetzt werden.

Herstellung von Hämalun

2,5 g Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.04302), 0,5 g Natriumjodat (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.06525) und 125 g Aluminiumkaliumsulfat-dodecahydrat (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.01047) werden in 2,5 l Aqua dest. gelöst. Außerdem werden 125 g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.02425) und 2,5 g Zitronensäure (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.00244) hinzugefügt und gut gelöst. Diese Lösung sollte etwa 4 Wochen bei RT reifen und die Färbedauer entsprechend der Reifung angepaßt werden.

#### 4.4.2. Die Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (APAAP) Methode

Im Gegensatz zur ABC-Methode arbeitet man bei der APAAP-Methode (CORDELL ET AL. 1984) nicht mit markierten (z.B. biotinylierten) Antikörpern, sondern benutzt die sogenannte unmarkierte Antikörpertechnik. Dabei verwendet man präformierte lösliche Enzym-Antikörper-Komplexe, die genau dann entstehen, wenn man Antikörper, die gegen intestinale alkalische Phosphatase gerichtet sind, mit eben dieser im Überschuß inkubiert. Von jedem dieser Antikörper werden zwei Moleküle alkalische Phosphatase gebunden und erhöhen somit die Sensitivität gegenüber herkömmlichen Methoden deutlich.

Diese Enzym-Antikörper-Komplexe, auch APAAP-Komplexe genannt, können dann mit Hilfe eines Brücken- oder Sekundärantikörpers, der gegen die Fc-Region sowohl des Primärantikörper als auch des Enzym-Antikörper-Komplexes gerichtet ist, an Primärantikörpern gebunden werden. Daraus resultiert, daß sämtliche Antikörper, die mit diesem Brückenantikörper verbunden werden sollen, aus dem gleichen

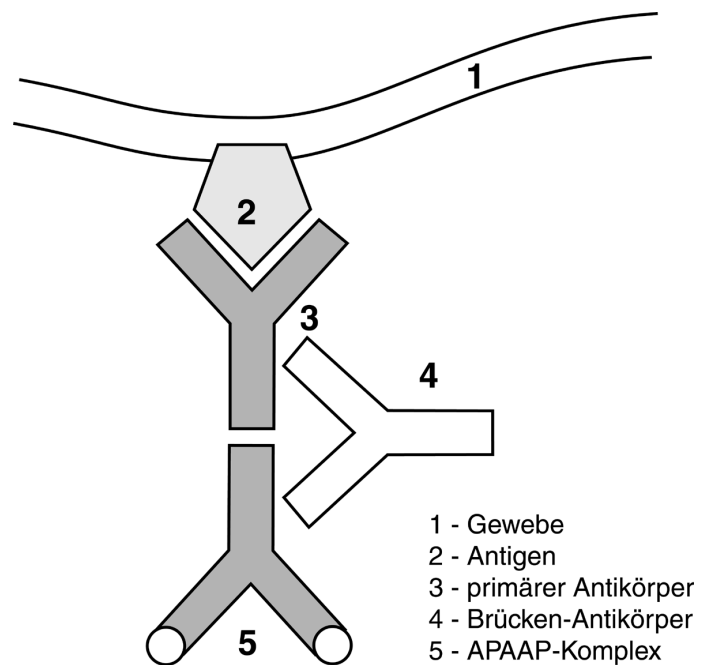


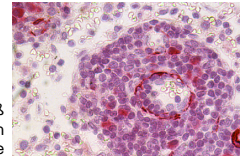
Abb. 10: Schematische Darstellung der APAAP-Methode.

Tier stammen müssen. Da monoklonale Primärantikörper ausschließlich aus der Maus stammen, ist der Brückenantikörper gegen die Fc-Region von Mausimmunglobulinen der IgG-Klasse gerichtet. Dieser Klasse gehören folglich auch die Antikörper der APAAP-Komplexe an. Der Brückenantikörper hingegen ist ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus IgG. Damit der Brückenantikörper nicht mit beiden Fab-Regionen am Primärantikörper bindet, wird dieser im Überschuß zugegeben. So ist garantiert, daß einige Fab-Regionen des Brückenantikörpers zur Bindung der APAAP-Komplexe frei bleiben. Wird ein polyklonaler Primärantikörper, der ausschließlich aus anderen Spezies stammt, verwendet, muß ein „Adapter“ ergänzt werden. Mausantikörper der IgG-Klasse 1, die gegen die jeweilige Spezies

gerichtet sind, aus der die polyklonalen Primärantikörper stammen, erfüllen diese „Adapterfunktion“. Um die Antikörperbindung in Form einer Farbreaktion sichtbar zu machen, wird die alkalische Phosphatase mit einem Substrat (z.B. Naphtol-As-Bi-Phosphat) und einem Chromogen (z.B. Neufuchsin) unter Bildung eines roten Farbstoffes umgesetzt. Zur Blockierung der endogenen Alkalische-Phosphatase-Aktivität eignen sich 1-5 mM Levamisole.

#### 4.4.2.1. Durchführung der APAAP-Methode

Lymphknotengefäß  
 $\alpha$ -Smooth-muscle actin  
 APAAP-Methode



- |  |          |
|--|----------|
| 1. Entparaffinieren: Erst in Xylol, dann in Aceton einbringen.   | 2x10 min |
| 2. Spülen mit Tris-Puffer  | 2x5 min  |
| 3. Präabsorption mit Normalserum (danach nicht spülen, sondern nur überschüssigen Puffer abwischen)                                  | 20 min   |
| 4. Primärantikörper bei RT inkubieren  | 60 min   |
| 5. Spülen in Tris-Puffer   | 2x5 min  |
| 6. Sekundärantikörper bei RT inkubieren  | 30 min   |
| 7. Spülen in Tris-Puffer   | 2x5 min  |
| 8. APAAP-Komplex auftragen und bei RT inkubieren   | 30 min   |
| 9. Spülen in Tris-Puffer   | 2x5 min  |
| 10. Entwicklung: Schnitte in die Entwicklungslösung <sup>10</sup> einbringen und unter dem Abzug bei RT entwickeln                   | 15 min   |
| 11. Spülen in Tris-Puffer  | 3x5 min  |
| 12. Gegenfärbung mit Hämalaun (die Färbedauer ist abhängig von der Reifung des Hämalaunes: 4 Wochen: ca. 2 min, 8 Wochen: ca. 4 min) | 2 min    |
| 13. Bläuen in Leitungswasser   | 10 min   |
| 14. Eindecken in wässrigem Milieu (Aquatex <sup>11</sup> )   |          |

<sup>10</sup> Herstellung der Entwicklungslösung:

Lösung A: 62,5 ml Propandiol (0,2 M = 21,05 g 2-Amino-2-methyl-1,3-Propandiol / 1 l Aqua dest.)  
 175 ml Tris-Puffer

0,1 g Levamisole (mit dem Magnetrührer mischen)

Lösung B: 0,12 g Naphtol-AsBi-Phosphat in 1,7 ml Dimethylformamid lösen

Lösung C: 0,05 g Na-Nitrit in 1,25 ml Aqua dest. lösen, 500  $\mu$ l 5%iges Neufuchsin dazupipettieren und 60 s schütteln lassen

Lösung C mit Lösung A mischen, dann Lösung B hinzugeben. Zum Schluß sollte der pH-Wert (8,7-9) kontrolliert werden und die fertige Entwicklungslösung filtriert werden. Die Lösung ist etwa 1 Stunde haltbar.

<sup>11</sup> Aquatex, Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.08562

## 4.4.2.2. Materialien und Stammlösungen der APAAP-Methode

Tab. 3: Auflistung der bei der APAAP-Methode verwendeten immunhistochemischen Materialien.

Material	Details	Referenzen	Hersteller
<u>Primärantikörper:</u> Aktin (Anti- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin) Klon: 1A4	monoklonal, Subklasse IgG2a, unverdünnt	Skalli et al., 1986	DAKO, Hamburg, Best.-Nr. M 0851
Monozyten/Makrophagen ED1 Klon: ED1	monoklonal, Subklasse IgG1 unverdünnt	Demoiseaux et al., 1994	Serotec, Oxford, Best.-Nr. MCA 341 B
<u>Sekundärantikörper:</u> Rabbit Anti-Mouse, IgG			DAKO, Hamburg, Best.-Nr. Z 0259
<u>APAAP-Komplex:</u> Mouse Anti-Alkalische Phosphatase	monoklonal	Cordell et al., 1984	DAKO, Hamburg, Best.-Nr. D 0651
<u>Normalserum:</u> 1%iges Rabbit-Normalserum			DAKO, Hamburg, Best.-Nr. X 0902

Herstellung von Tris-HCl-Puffer-Stammlösung 0,5 M

60,55 g Trishydroxymethylaminomethan (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.08382) werden in 1 l Aqua dest. gelöst und mit 25%igem HCl (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.00316) auf einen pH von 7,6 eingestellt (ca. 60 ml/l).

Herstellung von NaCl-Stammlösung 1,5 M

87,66 g NaCl (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.06404) werden in 1 l Aqua dest. gelöst.

Herstellung von Tris-NaCl-Spülpuffer

100 ml Tris-Stammlösung und 100 ml NaCl-Stammlösung werden mit 800 ml Aqua dest. aufgefüllt.

Herstellung von Propandiol-Lösung

21,05 g 2-Amino-2-methyl-1,3-Propandiol (Merck-Schuchardt, München, Best.-Nr. 801464) wird in 1 l Aqua dest. gelöst.

Herstellung von Neufuchsin-Lösung

1 g 5 %iges Neufuchsin (Sigma, Deisenhofen, Best.-Nr. N 0638) wird in 20 ml 2 N HCl (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.09063) gelöst und 3 x filtriert.

Herstellung von Hämalaun

2,5 g Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.04302), 0,5 g Natriumjodat (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.06525) und 125 g Aluminiumkaliumsulfat-dodecahydrat (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.01047) werden in 2,5 l Aqua dest. gelöst. Außerdem werden 125 g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.02425) und 2,5 g Zitronensäure (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.00244) hinzugefügt und gut gelöst. Diese Lösung sollte etwa 4 Wochen bei RT reifen und die Färbedauer entsprechend der Reifung angepaßt werden (Je länger das Hämalaun reift, desto weniger Zeit wird benötigt, die gleiche Färbintensität zu erreichen).

## 4.5. ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten sowie deren fotografische Dokumentation wurden von medizinisch-technischen Assistentinnen des elektronenmikroskopischen Labores der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikum Benjamin-Franklin durchgeführt.

### 4.5.1. Vorarbeiten für die Transmissionselektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Weiterverarbeitung müssen histologische Proben in Kunststoff (Araldit) eingebettet werden.

#### 4.5.1.1. Durchführung der Einbettung von histologischem Material

1. Histologisches Material auf einem Korkplättchen befestigen	1 Nacht
2. Fixieren in 2,5%iger Glutaraldehydlösung	60 min
3. Spülung in Cacodylatpuffer	12-24 h
4. Nachfixieren in Osmiumtetroxid 1%	60 min
5. Erneut Spülung in Cacodylatpuffer	
6. Entwässerung in Aceton mit aufsteigender Konzentration; bei 70%igem Aceton zusätzlich Beigabe von 0,5% Uranylacetat und 1% Phosphorwolframsäure	
7. Aralditstammlösung und 2% Beschleuniger	4-5 h
8. Einkapselung in Araldit und 2% Beschleuniger	
9. Brutschrank bei 60°C	2 Tage

### 4.5.2. Technische Vorbereitung der Herstellung von Schnitten

Die Glasmesser zur Herstellung von Semidünnschnitten werden aus Glasstäben gebrochen (SUTTON 1965), der Trog für das Wasserbad wurde mit einseitig klebenden Aluminiumstreifen hergestellt und mit Paraffin abgedichtet. Für die Ultradünnschnitte wurde ein Diamantmesser der Firma Leica verwendet. Für die Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten wurde bei der Arbeit am Mikrotom der Firma Reichert das Prinzip von SITTE (1955) angewandt. Vorher wurden die Aralditkapseln vierseitig pyramidenförmig angeschliffen ("getrimmt") und das überschüssige Material entfernt. Eine Stirnfläche mit etwa 2 mm Kantenlänge wurde belassen.

#### 4.5.3. Herstellung von Semidünnschnitten

Die vorbereiteten Blöcke wurden unter Lupenkontrolle am Ultra-Mikrotom 0,5 µm dick geschnitten. Die Semidünnschnitte wurden aus dem Wasserbad heraus auf Objektträger aufgezogen und zur lichtmikroskopischen Untersuchung mit *Richardson-Lösung*<sup>12</sup> angefärbt (RICHARDSON ET AL. 1960). Die Farbintensität der alkalisierten Toluidinblaulösung ist mit dem Kontrast der Elektronenmikroskopie von osmiumfixiertem und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiertem Gewebe vergleichbar. Zur exemplarischen Darstellung der Lymphknotensinus wurden Areale auf den Semidünnschnitten ausgewählt und zur Orientierung bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung markiert.

#### 4.5.4. Herstellung von Ultradünnschnitten

Nochmal wurde die Stirnfläche der Pyramiden verkleinert und in das Mikrotom eingespannt. Mit der Rasierklinge wird unter der Lupe eine trapezförmige Stirnfläche von 0,1-0,3 mm Kantenlänge zugeschnitten, damit beim Schneiden gerade Schnittbänder entstehen. Ultradünnschnitte von 75 µm Dicke wurden mit dem Diamantmesser unter Lupenkontrolle angefertigt, im Wasserbad aufgefangen und auf Kupfernetze mit einem Durchmesser von 2,5 mm (Firma Lektromesh) übertragen. Die Schnittdicke läßt sich mit der Interferenzfarbe auf der Wasseroberfläche beurteilen. Bei einer Schnittdicke von 75 µm schimmert der Schnitt silbrig auf der Wasseroberfläche (BACHMANN UND SITTE 1958, PEACHEY 1958; zit. nach REIMER 1967 UND REID 1974). Die Nachkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und anschließend Bleicitrat.

---

<sup>12</sup> Zusammensetzung der *Richardson-Lösung*:

A. 1%ige Perjodsäure Lösung (1 g auf 100 ml Aqua bidest.)

B. 1%ige Azur II Lösung (1 g auf 100 ml Aqua bidest.)

C. A und B 1:1 mischen = Mallory's Azur

D. 1%ige Methyleneblau Lösung mit Na-Tetraborat (1 g Methyleneblau auf 100 ml Aqua bidest., 4 g Na-Tetraborat hinzufügen)

E. C und D 1:1 mischen, Lösung filtrieren

## 4.6. AUSWERTUNG UND DOKUMENTATION

### 4.6.1. Elektronenmikroskopie

Zur Erstellung elektronenmikroskopischer Bilder wurde das Zeiss® Elektronenmikroskop EM 10 verwendet. Als Bezugspunkt wird das Zentrum des Trägernetzchens anvisiert und dann die Regionen der vier Ecken (WEIBEL 1979) in den Vergrößerungen 3000fach und 50000fach fotografiert. Die verwendete Strahlspannung betrug 80 KV, als Filmmaterial diente der Planfilm Agfa® Scientia.

### 4.6.2. Lichtmikroskopie

Die gefärbten histologischen Schnitte der einzelnen Lymphknoten wurden bei 1,25-100facher Objektivvergrößerung<sup>13</sup> eingehend untersucht und dabei der Grad der Erythrozytendrainage semiquantitativ bestimmt. Die Graduierung wurde wie folgt eingeteilt:

- 0 = kein Gewebe entnommen oder kein Lymphknotengewebe in der entnommenen Probe enthalten
- = keine Erythrozyten im Sinus darstellbar
- + = einzelne Erythrozyten im Sinus darstellbar
- ++ = Erythrozyten in geringer Anzahl im Sinus darstellbar
- +++ = Erythrozyten in mittelgradiger Anzahl im Sinus darstellbar
- ++++ = Erythrozyten in großer Anzahl im Sinus darstellbar

Die Bezeichnung "einzelne Erythrozyten im Sinus darstellbar" wurde mit dem physiologischen Vorkommen einzelner Erythrozyten in Lymphknotensinus (RAVIOLA, 1986) gleichgesetzt und demzufolge nicht als Erythrozytendrainage gewertet.

### 4.6.3. Fotografie

Die wichtigsten Ergebnisse wurden exemplarisch in Form von Diapositiven festgehalten. Fotografiert wurde mit einem Fotomikroskop der Firma Leitz® vom Typ DM RB, das über den Fotoautomaten Wild MPS 28/32 (Leica®, Bensheim) gesteuert wurde. Der verwendete Film Ektachrome 64T, EPY 135/36 stammt von der Firma Kodak®. Die Optovarvergrößerung betrug 3,3 fach.

---

<sup>13</sup> Die in dieser Arbeit angegebenen Vergrößerungen beziehen sich ausschließlich auf die verwendeten Objektive.