

Aus dem  
Institut für Tierpathologie  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
(Vorstand: Prof. Dr. W. Schmahl)

NERVENZUPFPRÄPARATION ( *NERVE FIBER TEASING*) IN DER DIAGNOSTIK  
PERIPHERER NEUROPATHIEN BEIM TIER  
- METHODIK UND INTERPRETATION -

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinische Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität

von  
LARA ALEXA WIECZOREK  
aus  
Ludwigshafen am Rhein

München  
2002

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
1. Referent:	Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
2. Referent:	Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. W. Kraft
2. Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. P. Kölle
3. Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. T. Göbel

Tag der Promotion: 19.Juli 2002

Meiner lieben Großmutter





---

		Seite
I	<b>EINLEITUNG</b>	1
II	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	3
1	DER PERIPHERE NERV IM VERGLEICH ZU ZENTRALNERVÖSEN BAUELEMENTEN	3
2	ULTRASTRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE MORPHOLOGIE DES PERIPHEREN NERVENS UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER ONTOGENESE	7
2.1	Das Neuroparenchym	7
2.1.1	Das Neuron und seine Fortsätze	8
2.1.2	Die Schwannzellen	13
2.1.3	Gegenüberstellung von myelinisierten und nicht-myelinisierte Fasern	18
2.2	Mesenchymale Komponenten des peripheren Nervens	24
2.2.1	Das Endoneurium	24
2.2.2	Das Perineurium	26
2.2.3	Das Epineurium	27
2.2.4	Die Blutgefäße des peripheren Nervens	27
3	BEARBEITUNGSMETHODEN VON NERVENBIOPSIEN ZUR DIAGNOSTIK	28
4	ALLGEMEINE PATHOLOGIE DES NEUROARENCHYMS IM PERIPHEREN NERVEN	30
4.1	Reaktionen und Regeneration im Vergleich zum ZNS	30
4.2	Beschreibung allgemeiner Phänomene	34
4.2.1	Herkömmliche Klassifikationsmuster geteaster peripherer Nerven	34
4.2.1.1	Klassifikationsschema geteaster peripherer Nerven nach DYCK et al.	34
4.2.1.2	Klassifikationsschema geteaster peripherer Nerven nach KALICH- MANN et al.	35
4.2.2	Axonale Degeneration und ihre Folgeprodukte	36

---

	Seite	
4.2.3	Primäre Veränderungen der Myelinscheide ihre Folgen	38
4.2.3.1	Segmentale Demyelinisierung und Remyelinisierung	39
4.2.3.2	Paranodale Demyelinisierung und Remyelinisierung	40
4.2.3.3	Fokale Schwellungen der Myelinscheide	40
5	SYSTEMATISCHER ÜBERBLICK ÜBER ERKRANKUNGEN DES PERIPHEREN NERVENS	42
5.1	Entzündliche Veränderungen des PNS	42
5.2	Degenerative Veränderungen des PNS	43
5.2.1	Neurodegenerative Erkrankungen im engeren Sinne	43
5.2.2	Speicherkrankheiten	44
5.2.3	Dysmetabolisch-toxische Erkrankungen	44
5.2.4	Ischämische Neuropathien	46
5.3	Neoplastische Veränderungen des PNS	46
6	GRUNDLAGEN DER ELEKTRODIAGNOSTIK	47
III	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	50
1	ZIELSETZUNG	50
2	MATERIAL UND METHODEN	52
2.1	Untersuchungsmaterial	52
2.2	Versuche zur Darstellung fixationsbedingter Artefakte	54
2.2.1	Bearbeitungsprotokolle	54
2.2.2	Beurteilungskriterien	57

---

	Seite	
2.3	Versuche zur Darstellung autolysebedingter Veränderungen	59
2.3.1	Bearbeitungsprotokoll	59
2.3.2	Beurteilungskriterien	60
2.4	Kollagenolyseversuche	60
2.4.1	Bearbeitungsprotokolle	60
2.4.1.1	Einsatz von Glycinpuffer	60
2.4.1.2	Vergleichender Einsatz von Glycinpuffer und Kollagenase	61
2.4.2	Beurteilungskriterien	62
2.5	Fluorochromatische Darstellung geteaster Nerven	63
2.5.1	Bearbeitungsprotokolle	63
2.5.1.1	Einsatz von DPED vor Fixierung	63
2.5.1.2	Einsatz von DPED nach Fixierung	64
2.5.2	Beurteilungskriterien	65
2.6	Versuche zur Darstellung des Axons an Teasingpräparaten mittels <i>whole-mount</i> -Immunhistochemie	66
2.6.1	Bearbeitungsprotokolle	66
2.6.2	Beurteilungskriterien	69
2.7	Versuche zur <i>post-teasing</i> -Licht- und Elektronenmikroskopie	69
2.7.1	Bearbeitungsprotokolle	69
2.7.2	Beurteilungskriterien	70
2.8	Kasuistik	70
3	ERGEBNISSE	76
3.1	Versuche zur Darstellung fixationsbedingter Artefakte	76
3.1.1	Teasbarkeit der Einzelfasern	76
3.1.2	Darstellung der Artefakte in Teasingpräparaten und histo- logischen Kontrollschnitten	76

---

	Seite	
3.1.2.1	Fixationsbedingte Artefakte bei Hundenerven	76
3.1.2.2	Fixationsbedingte Artefakte bei Katzennerven	79
3.1.2.3	Fixationsbedingte Artefakte bei Pferdenerven	81
3.1.2.4	Fixationsbedingte Artefakte bei Schweinenerven	83
3.1.2.5	Fixationsbedingte Artefakte bei Rindenerven	85
3.1.2.6	Speziesübergreifende Zusammenfassung frequent auftretender fixierungsbedingter Artefakte	87
3.1.2.6.1	Verquellung der Myelinscheide	87
3.1.2.6.2	Leopardenartige Tüpfelung der Myelinscheide	87
3.1.2.6.3	Konsolidierung der Nervenfasern in Teasingpräparaten	88
3.1.2.6.4	Paranodale Aufhellungen	88
3.1.2.6.5	Subhernien und Hernien bei Teasingpräparaten	88
3.1.2.6.6	Frakturen bei Teasingpräparaten	88
3.1.2.6.7	Quetschartefakte bei Teasingpräparaten	89
3.1.2.6.8	Fixierungsbedingte Veränderungen der Myelinscheide in histo- logischen Schnitten	89
3.1.3	Einstufung der Auswertbarkeit von Teasingpräparaten und histo- logischen Kontrollschnitten	89
3.1.4	Nicht-artifizielle Veränderungen	90
3.2	Autolyseversuch	92
3.2.1	Autolysebedingte Veränderungen	92
3.2.2	Nicht-autolysebedingte Veränderungen	93
3.3	Kollagenolyseversuche	94
3.3.1	Einsatz des Glycinpuffers	94
3.3.1.1	Artifizielle Veränderungen	95
3.3.1.2	Nicht-artifizielle Veränderungen	96
3.3.2	Vergleichender Einsatz von Glycinpuffer und Kollagenase	97
3.3.2.1	Artifizielle Veränderungen	97
3.3.2.2	Nicht-artifizielle Veränderungen	99
3.4	Fluorochromatische Untersuchungen	99

---

	Seite	
3.4.1	Einsatz von DPED vor Fixierung	99
3.4.2	Einsatz von DPED nach Fixierung	101
3.5	Versuche zur Darstellung des Axons mittels <i>whole-mount-</i> Immunhistochemie	103
3.6	Versuche zur <i>post-teasing</i> -Licht- und Elektronenmikroskopie	103
3.7	Kasuistik	107
IV	<b>DISKUSSION</b>	108
1	GEGENÜBERSTELLUNG VON FIXATIONSBEDINGTEN ARTEFAKTEN UND AUTOLYSE ZU ALTERSBEDINGTEN UND PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN	108
2	VORSCHLÄGE ZUR DIAGNOSTISCHEN AUFBEREITUNG DES PERIPHEREN NERVENS	120
3	DIE BEDEUTUNG VON TEASINGPRÄPARATEN BEI DER DIAGNOSTIK PERIPHERER NEUROPATHIEN	130
4	KORRELATIVE NEUROPATHOLOGIE DES PERIPHEREN NERVENS ANHAND EINIGER FALLBEISPIELE	134
V	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	142
VI	<b>SUMMARY</b>	144
VII	<b>ANHANG</b>	146
VIII	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	169



Abkürzungen

al.	aliter
Abb.	Abbildung
acc.	accessorius
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bd.	beidseits
bidest.	bidestillata
bzw.	beziehungsweise
BV	Braunvieh
ca.	circa
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CNTF	ciliary neurotrophic factor
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destillata
DFV	Deutsches Fleckvieh
DLR	Deutsche Landrasse
DPED	5,5'-Diphenyl-9-ethyl-oxacarbocyanin
DSH	Deutscher Schäferhund
EKH	europäisch Kurzhaar
EMG	Elektromyographie
ER	endoplasmatisches Retikulum
fib.	fibularis
FIP	feline infektiöse Peritonitis
GA	Glutaraldehyd
GDNF	glial cell line derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
Hd.	Hund
HMSN	hereditary motor and sensory neuropathy
HNPP	hereditary neuropathy with pressure palsies
IL-1	Interleukin 1
IGF2	insulin like growths factor 2

Ktz.	Katze
m	männlich
max.	maximal
M.	Musculus
MAG	myelin-associated glycoprotein
MAPs	mikrotubulus-assoziierte Proteine
max.	maximal
MBP	myelin basic protein
mk	männlich kastriert
MPNST	maligne periphere Nervenscheidentumoren
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Myelinscheide
MSAP	Muskelsummenaktionspotential
MYSA	myelin sheath attachment segment
N.	Nervus
NCAM	neural cell adhesion molecule
NF	Neurofilament
NGF	nerve growth factor
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
Nr.	Nummer
NT3	Neurotrophin 3
o.b.B.	ohne besonderen Befund
P0	major peripheral myelin protein
PCR	Polymerase-Ketten Reaktion
PDGF	plateled-derived growth factor
PMP22	peripheral myelin protein 22
Pfd.	Pferd
PNP	paranode-node-paranode
PNS	peripheres Nervensystem
PRRS	porcines respiratorisches und reproduktives Syndrom
Rd.	Rind
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
Schw.	Schwein
SLK`s	Schmidt-Lantermansche Kerben



sMAG	small myelin-associated glycoprotein
STIN`s	stereotype internodale Segmente
Vergr.	Vergrößerung
vgl.	vergleiche
WB	Warmblut
w	weiblich
wk	weiblich kastriert
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Abkürzungen - Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
J.	Jahre
L	Liter
m	Meter
M	Mol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
Mon.	Monate
sek	Sekunde
Std.	Stunden
Tg.	Tage
Wo.	Wochen



## I EINLEITUNG

Nervenbiopsien stellen in der Humanmedizin bereits seit den sechziger Jahren ein nützliches Verfahren zur Diagnostik peripherer Neuropathien dar (161). Mittlerweile sind die Indikationen hierfür aufgrund hochspezifischer klinisch-elektrodiagnostischer und genomanalytischer Untersuchungsmöglichkeiten rückläufig. In tierexperimentellen Ansätzen hingegen, wie beispielsweise in der Toxikologie oder bei der Phänotypisierung von genmanipulierten Versuchstierstämmen, findet die Untersuchung peripherer Nerven regelmäßig ihre Anwendung. Desweiteren ist sie in der Tiermedizin als sinnvolle Ergänzung zu klinisch-elektrodiagnostischen Untersuchungen anzusehen, da diese meist nicht derart differenziert wie in der Humanmedizin durchgeführt werden können. Darüberhinaus kann auf Basis der pathomorphologischen Befunde zumeist eine eindeutige Zuordnung der geschädigten Bereiche und des Grades der Schädigung erfolgen und bereits bei einmaliger Untersuchung die regenerationsfähige Kapazität festgestellt werden. Hierbei können neben licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen insbesondere Nervenzupfpräparate einen wertvollen Beitrag leisten (27). Voraussetzung für das Verständnis der Pathomorphologie am peripheren Nerven ist jedoch eine genaue Kenntnis seiner ultrastrukturellen und funktionellen Anteile sowie der möglichen Reaktionsmuster geschädigter Kompartimente. Diese Grundlagen zur Erkennung und Interpretation von Befunden werden im Literaturteil vorangeschickt. Ein systematischer Überblick von Krankheiten, die derartige Phänomene hervorrufen können, schließt sich an.

Voraussetzung für die Beurteilung von Nervenbiopsien ist jedoch auch eine Kenntnis über artifizielle und autolysebedingte Veränderungen, da sie nicht nur die Diagnostik erschweren, sondern auch zu Fehldiagnosen führen. Daher wurden solche Veränderungen im Rahmen dieser Arbeit in ihrer Reinform dargestellt und Protokolle zur Minimierung der diagnostischen Fehlerquote vorgeschlagen. Da sich die Untersuchungen in erster Linie auf die Darstellung gezupfter Nervenfasern konzentrieren, wurde der Versuch unternommen mit Hilfe kollagenolytischer Substanzen die Trennbarkeit der Fasern zu erhöhen.

Bei der Untersuchung von Nervenbiopsien kann mitunter eine geringe Ausgangsmenge des Probenmaterials limitierend für Diagnostik sein. In wie weit die sogenannte *post-teasing*-Licht- und Elektronenmikroskopie in der Lage ist, der geringen Materialmenge mit seiner hohen Spezifität entgegenzuschreiten, wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls erprobt. Allerdings kann nicht nur eine kleine Probenmenge, sondern auch der Untersuchende selbst der

limitierenden Faktor einer korrekten Diagnosefindung sein, denn die Beurteilung von Einzelfasern ist, sofern sie nicht morphometrisch erfolgt, stets durch die erfahrungsabhängige Subjektivität des Untersuchers gefährdet. Aus diesem Grund wird hier ein Erfassungsschema vorgeschlagen, das eine Hilfestellung zur Differenzierung pathognomonisch relevanter Veränderungen geben soll.

Um eine möglichst detaillierte und spezifische pathomorphologische Diagnostik zu ermöglichen, wurden zudem neue Verfahren zur selektiven Darstellung neuroparenchymatöser Komponenten an Nervenzupfpräparaten evaluiert. Hierbei fanden fluorochromatische und immunhistologische Färbemethoden ihren Einsatz.

## II LITERATURÜBERSICHT

### 1 DER PERIPHERE NERV IM VERGLEICH ZU ZENTRALNERVÖSEN BAUELEMENTEN

Die wichtigste funktionstragende Einheit des peripheren wie auch des zentralen Nervensystems ist das Neuron, an dem morphologisch folgende Abschnitte zu unterscheiden sind: einerseits eine kernnahe Zytoplasmazone, das Perikaryon, andererseits seine Zytoplasmaausläufer, die Nervenzellfortsätze (134). Die Perikaryen der Nervenzellen liegen in der grauen Substanz des Zentralnervensystems (ZNS) oder in den peripheren cerebrospinalen, vegetativen oder intramuralen Ganglien (168). Zu den Nervenzellfortsätzen zählen die afferent leitenden Dendriten, sowie das vorwiegend efferent leitende Axon, das im sogenannten Axonhügel (146) aus dem Perikaryon austritt. Es wird auch als Nervenfasern bezeichnet. Seine Länge kann, je nach Spezies, 1m überschreiten. Die Fortsätze sind über Synapsen mit dem jeweiligen Erfolgsorgan verbunden, wobei man zwischen neurosensorischen, neuroglandulären, interneuronalen (axoaxonale, axodendritische, axosomatische, dendodendritische) und neuromuskulären Synapsen unterscheidet (109).

Die Nervenzellfortsätze eines Neurons können in unterschiedlicher Anzahl vorliegen, wonach die Einteilung in verschiedene Nervenzelltypen erfolgt. Am häufigsten ist die multipolare Nervenzelle (109), bei der viele, breitbasig aus dem Perikaryon entspringende und sich in dessen Umgebung bäumchenartig ausbreitende Dendriten nervale Impulse zum Perikaryon leiten. Apolare Nervenzellen, die zwar keine Fortsätze ausbilden, jedoch funktionell polarisiert sind, kommen als Sinneszellen im Innenohr und in den Geschmacksknospen vor (109). Unipolare Nervenzellen, wie die Stäbchen und Zapfen der Retina, besitzen nur einen einzelnen, axonalen Fortsatz (146). Dagegen sind bipolare Nervenzellen, beispielsweise als 2. Neuron der Retina oder auch im Innenohr, durch ein Axon und einen gegenüberliegenden Dendriten gekennzeichnet (109).

Bei pseudounipolaren Nervenzellen verlässt ein Fortsatz das Perikaryon, um sich dann in ein Axon und einen Dendriten zu gabeln. Die sensiblen Spinal- und Kopfganglien werden vorwiegend von pseudounipolaren Nervenzellen gebildet. Ursprünglich handelt es sich hier um bipolare Nervenzellen. Im Falle der Spinalganglien wächst das Axon ins Rückenmark und der Dendrit in die Peripherie, wobei sich beide bereits in der Embryonalphase auf einer Seite des Nervenzelleibes zu einem gemeinsamen Ursprung vereinigen. Der Dendrit unterliegt daraufhin Umbauvorgängen, wodurch er zum dendritischen Axon wird (146).

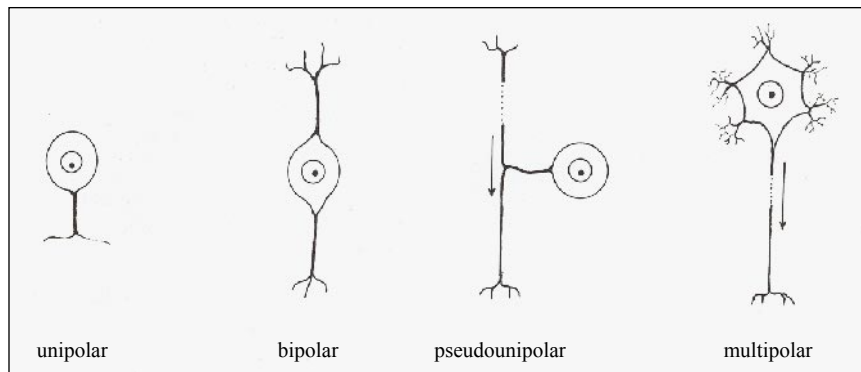


Abb. 1: Schemata von Nervenzellformen. Der Pfeil gibt die Richtung des elektrischen Impulses an. (modifiziert nach 109)

In peripheren Nerven sind die Fasern zu Bündeln zusammengeschlossen. Diese Bündel werden auch als Faszikel bezeichnet (201). Innerhalb dieser Faszikel kommen die Nervenfasern im feinfibrillären Netz des lockeren endoneuralen Bindegewebes zu liegen (237). Jeder Faszikel wird vom Perineurium, einer zarten mehrschichtig-lamellären, zirkulär orientierten Zelllage zusammengefasst (175). Die Gesamtheit aller Faszikel wird ihrerseits von dem bindegewebigen Epineurium umschlossen (175). Dieses besitzt als Abgrenzung zum umgebenden Gewebe eine etwas derbere Struktur als zwischen den Faszikeln (109).

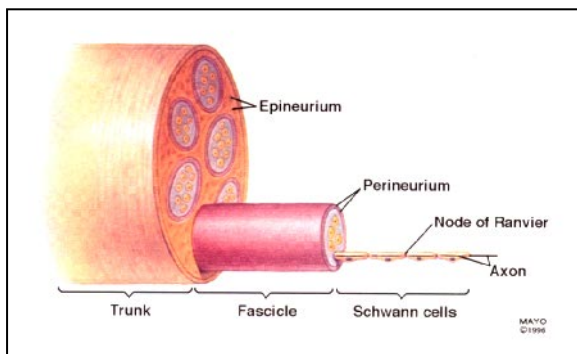


Abb. 2: Schematischer Querschnitt eines peripheren Nerven (201)

Im ZNS hingegen fehlt ein derartiges mesenchymales Interstitium. Das Parenchym wird hier durch eine innige, filzartige Verflechtung der dort vorkommenden neuroektodermalen Zellen und insbesondere deren Fortsätze gebildet und wird als Neuropil bezeichnet (50).

Das mesenchymale Äquivalent zu Hüllen des peripheren Nerven stellen im ZNS die Meningen dar. Auf Höhe der Nervenwurzeln setzt sich die Dura mater als epineurales Bindegewebe fort, und die arachnoidalen und subarachnoidalen Zelllagen gehen in die sogenannte Perineuralscheide über (42). Bei Labornagern wird hingegen ein zum Teil ektodermaler Ursprung der Meningen diskutiert (8).

Im Gegensatz zum peripheren Nerven machen im ZNS Blutgefäße den Hauptanteil mesenchymaler Strukturen aus. Sie senken sich unter Mitnahme pialen und adventitiellen Bindegewebes von der Organoberfläche her ins Parenchym ein (42). Auf Kapillarniveau stehen

die sogenannten Astrozyten über eine Basalmembran in direktem Kontakt mit dem Gefäßendothel. Ergänzt durch besondere Zellkontakte im Endothel repräsentieren diese ungewöhnlichen Gefäß-Parenchym-Verhältnisse das morphologische Substrat der Blut-Hirn-Schranke (109), deren Aufgabe die enge Regulation der Homöostase des Hirnparenchyms ist. Unter anderem werden die Astrozyten deshalb auch als Ammenzellen des ZNS bezeichnet (146).

Neben der Blut-Hirn-Schranke kommen im ZNS weitere Barrieren vor. Zum einen die Blut-Liquor-Schranke innerhalb der Plexus choroidei der Ventrikel. Zum anderen die Liquor-Hirn-Schranke, die einem ungehinderten Eindringen von im Liquor befindlichen Substanzen in das zentralnervöse Parenchym vorbeugt (258).

Im peripheren Nerven befinden sich demgegenüber zwei funktionelle Schrankensysteme. Erstens die Blut-Nerven-Schranke des Endoneuriums, die mit der Blut-Hirn-Schranke vergleichbar ist, und zweitens die als Diffusionsbarriere wirkende Gewebs-Nervenschranke. Sie wird durch das Perineurium gebildet. Unter 2.2.1 wird auf diese Schrankensysteme genauer eingegangen.

Dem Gehirn ist ein spezielles System zur Drainage extrazellulärer Flüssigkeit zu eigen. Im Gegensatz zum peripheren Nervengewebe fehlt hier ein eigenes Lymphgefäßsystem, insgesamt kommuniziert es aber über perivaskuläre Räume und die Liquorräume mit dem zervikalen und abdomino-thorakalen Lymphgefäßsystem (258). Nach PETERSON (179) findet aber auch eine Drainage von Molekülen aus dem Subarachnoidalraum in die peripheren Nerven statt. So konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Evans-Blau-Albumin als auch Lanthanum-Tracer aus dem Subarachnoidalraum entlang des Epineuriums in die Peripherie gelangt.

Generell kann die einzelne Nervenfasern von einer Markscheide umgeben sein oder aber als marklose Faser vorliegen (12). Markhaltig sind vor allem die Gehirn- und Rückenmarksnerven. Marklos sind hingegen die postganglionären Fasern des vegetativen Nervensystems und die Fila olfactoria des Riechhirns (168). Die Markscheidenbildung der Nervenfasern im ZNS erfolgt durch Oligodendrozyten. Diese lichtmikroskopisch fortsatzarm erscheinenden Gliazellen bilden die weiße Substanz des ZNS. Elektronenmikroskopisch lassen sich zehn bis fünfzig extrem abgeplattete und flächenartig ausgebreitete Zellausläufer darstellen (146), die sich bisquitrollenartig um das Axon legen, um so die Markscheide des Neurons zu bilden. Zwei benachbarte Wicklungen sind jeweils durch einen Ranvierschen Schnürring (Hinweis bei 42) voneinander getrennt. Ein Oligodendrozyt kann, im Gegensatz zu seinem Äquivalent im PNS, der Schwannzelle, mehrere Axone (bis zu 50, (146)) einschließen. Der Übergang myelinisierter

Axone vom ZNS ins PNS findet am sogenannten Übergangsschnürring statt. Dabei reicht die Myelinscheide des ZNS in weniger als 1% für einige 100  $\mu\text{m}$  in das PNS hinaus, wo sie ihrerseits von der peripheren Markscheide überlagert wird (14).

Bei den Hüllzellen des PNS unterscheidet man wiederum zwischen drei Zelltypen: a) die Schwannzelle im engeren Sinne als myelinbildende Scheidenzelle, b) die Remakzelle als Nervenhüllzelle markarmer (vegetativer) Axone und c) die Mantelzelle (Amphizyt oder Satellitenzelle) im Spinalganglion (50).

Innerhalb der durch Schwannzellen gebildeten Myelinscheide sind bereits lichtmikroskopisch die Schmidt-Lantermanschen Kerben (143, 205) als schräge Einschnitte, die Schwannzellzytoplasma enthalten, zu erkennen. Diese Strukturen fehlen im ZNS. Dies könnte auf die fehlende mechanische Beanspruchung der Axone im ZNS zurückzuführen sein, da die Schmidt-Lantermanschen Kerben möglicherweise Biegebeanspruchungen des Nerven ohne Beeinträchtigung des Axons zulassen (109). Als weiteres mesenchymales Element im ZNS ist die Mikroglia zu nennen. Hauptaufgabe dieser im Neuropil phasenweise amöboid beweglichen Zellen ist die Gewebsreinigung durch aktive Resorption abräumbedürftiger Materialien (50). Dies geschieht gemeinsam mit emigrierten Monozyten. Die Fähigkeit zur Neuronophagie können darüberhinaus auch Astrozyten und Oligodendrozyten entwickeln.

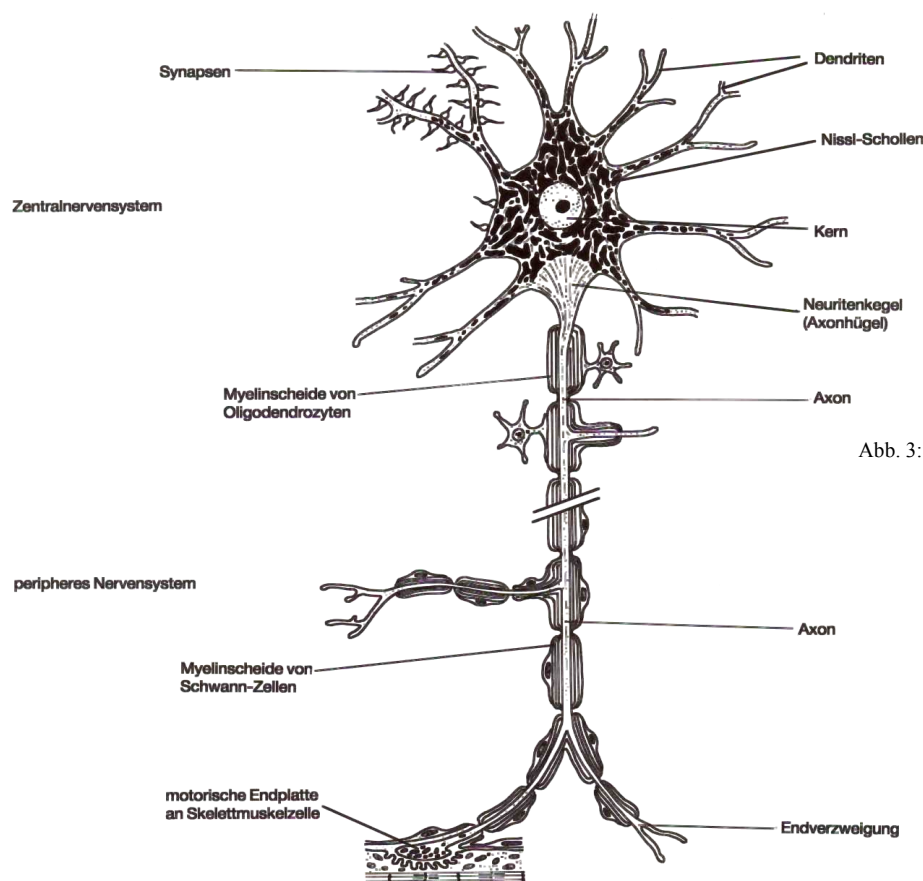


Abb. 3: Ausdehnung eines Motoneurons vom ZNS ins PNS (modifiziert nach 146)



Am peripheren Nerv übernehmen hingegen vor allem immigrierte Monozyten, Bindegewebszellen des Endoneuriums, sowie auch die Schwannzellen resorptive Tätigkeiten (201). Eine mit dem ZNS vergleichbare ortsständige Mikroglia gibt es im peripheren Nerven nicht.

Tabelle 1: Zusammenfassende Gegenüberstellung

ZNS	PNS
keine interstitiellen Bauelemente	Endo-, Peri- und Epineurium
kein Lymphgefäßsystem	Lymphgefäßsystem
3 funktionelle Schranken: Blut-Hirn-Schranke Blut-Liquor-Schranke Liquor-Hirn-Schranke	2 funktionelle Schranken: Blut-Nerven-Schranke Gewebs-Nerven-Schranke
Neuroparenchym gebildet von Nervenzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten	Neuroparenchym: gebildet von Nervenzellen und Schwannzellen
Markscheidenbildung durch Oligodendrozyten	Markscheidenbildung durch Schwannzellen
Fehlen von Schmidt-Lantermanschen Kerben	Schmidt-Lantermansche Kerben
Mikroglia	alle Makrophagen aus dem Knochenmark

## 2 ULTRASTRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE MORPHOLOGIE DES PERIPHEREN NERVENS UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER ONTOGENESE

### 2.1 Das Neuroparenchym

Sowohl die Nervenzellen selbst, wie auch die Schwannzellformen entspringen dem äußeren der drei embryonalen Keimblätter, dem Ektoderm. Im Rahmen der Organogenese entsteht aus der ektodermalen Neuralplatte durch Aufwölbung von Neuralwülsten die Neuralrinne und schließlich das Neuralrohr (207). Dieses bildet die histogenetische Grundlage sowohl aller Nervenzellen, deren Perikarya in Hirn und Rückenmark zu liegen kommen, als auch der Neuroglia des ZNS. Sämtliche Ganglien hingegen (Spinal-, vegetative und Paraganglien), sowie die Schwannzellformen differenzieren sich aus den bilateral zum Neuralrohr angeordneten Neuralleisten (197). Letztere werden in der Literatur daher auch als Ganglienleisten bezeichnet (50).

### 2.1.1 Das Neuron und seine Fortsätze

Im peripheren Nerven kommen funktionell gesehen somato- und visceromotorische, wie auch somato- und viscerosensorische Nervenfasern vor. Somatische Nervenfasern sind, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung markhaltig, ebenso wie die viscerosensorischen Nervenfasern (146). Weitere markhaltige Fasern können auch durch präganglionäre, efferent leitende vegetative Fasern gebildet werden, da Ganglien auch in distalen Gliedmaßenabschnitten gefunden werden (151). Marklos hingegen sind die efferenten, postganglionären Fasern vegetativer Neurone (168). Fasern sowohl somatomotorischer, als auch präganglionärer vegetativer Efferenzen stammen aus dem Neuralrohr. Ihre Kerne kommen daher in der grauen Substanz des ZNS zu liegen. Alle afferenten Nervenfasern, wie auch die postganglionären vegetativen Efferenzen gehen aus dem Material der Neuralleiste hervor. Die Perikaryen dieser Neurone kommen daher in den cerebrospinalen bzw. vegetativen Ganglien zu liegen. Neben diesem „Geburtsort“ soll allerdings auch der Zeitpunkt der letzten Mitose ausschlaggebend für die spätere Funktion einer Nervenzelle sein (3).

Nachdem das junge Neuron von seinem Geburtsort emigriert ist und sich an seinem endgültigen Platz niedergelassen hat, beginnen Axon und Dendriten auszuwachsen. Dabei entstehen am Ende der sich ausbreitenden Nervenzelle irreguläre, stachelig erscheinende Verdickungen, die sogenannten Wachstumskegel (34). Einer von diesen legt an Geschwindigkeit zu und bildet so den axonalen Wachstumskegel. Hierbei ermöglichen fingerartige Mikrospiques und Filopodien Vorwärtsbewegungen (163). Berühren diese eine falsche Zielzelle, ziehen sie sich zurück. Bei der Richtigen hingegen verbleiben sie, und die Wachstumsrichtung des gesamten Wachstumskegels orientiert sich dementsprechend.

Nun stellt sich die Frage, nach welchen Kriterien die axonalen Wachstumskegel einen bestimmten Weg einschlagen. Einerseits wird eine gewisse genetische Determination angenommen. Andererseits üben bestimmte extrinsische Faktoren einen großen Einfluss aus (201). Man nimmt an, dass Wachstumskegel entlang existierender Routen, wie bereits bestehenden Axonen, in die Peripherie auswachsen. Daher lässt sich nachvollziehen wie die im adulten Nerv sichtbaren Faserbündel entstehen (166). Das Wachstum wird dabei durch Adhäsionsmoleküle vermittelt (161). Diese befinden sich sowohl auf den Wachstumskegeln selbst, als auch auf bereits „ausgewanderten“ Axonen und anderen Zellen, über die die Wachstumskegel wandern (z.B. gliale Zellen und Muskelzellen). Die Zell-zu-Zell Kontakte lösen dann wiederum intrazelluläre Signale zum Wachstumsstop oder Weiterwachsen aus.

Wachstumskegel wachsen allerdings ebenso entlang extrazellulärer Matrix wie z.B. Kollagen, Fibronectin oder Laminin, für die sie entsprechende Rezeptoren besitzen (201).

Dieses gezielte In-die-Peripherie-Wachsen der Axone unterliegt in seiner Gesamtheit jedoch der Abhängigkeit trophischer Faktoren (29). Diese werden einerseits von Schwanzzellen und Schwanzzellvorläufern gebildet und sind neben der Entwicklung auch für das Überleben der Neurone verantwortlich (120). Andererseits werden bestimmte Neurotrophine auch von den Zielzellen produziert (29).

Das Überleben von Dorsalwurzelganglien hängt während der Nervenentwicklung zunächst von Signalen der Schwanzzellvorläufer ab. Hierbei handelt es sich vermutlich um Neurotrophin 3 (120). Bei Erreichen der Zielzelle sind es deren Signale, die diese Aufgabe übernehmen. Bei Motoneuronen wirken Schwann- und Targetzellensignale zur gleichen Zeit. Hierbei bilden junge Schwanzzellen unter anderem Neurturin und GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) (120). Dies konnte im Versuch mit ERBB3-Knockout-Mäusen bestätigt werden (193). ERBB3 ist Rezeptor für  $\beta$ -Neuregulin in jungen Gliazellen.  $\beta$ -Neuregulin wird axonal gebildet und ist seinerseits für die Differenzierung und das Überleben der Schwanzzellen verantwortlich. Motoneurone von ERBB3-Knockout-Mäusen sterben spät ab, Dorsalwurzelganglien jedoch früh.

Die klassische neurotrophe Theorie macht hingegen in erster Linie von Targetzellen gebildete und freigesetzte Faktoren für Nervenzellwachstum und –überleben verantwortlich. Der wohl bekannteste dieser Faktoren ist NGF (nerve growth factor) (29), ein spezifisches Protein, das an komplementäre transmembrane Rezeptorproteine mit Tyrosinkinaseaktivität bindet (3). Auch im reifen Nerven hat NGF eine herausragende Bedeutung. Er bewirkt nach Verletzungen das sogenannte *axonal sprouting* (239) und ist somit wichtig für die Reinnervation von Haut und Muskeln. Diese axonalen Sprossungsmechanismen werden im Kapitel 4.1 genauer aufgegriffen. Inzwischen hat sich allerdings herausgestellt, dass NGF ebenso von Schwanzzellen gebildet wird (201). Dass es sich trotz allem eher um einen von ihnen gebildeten Neurotrophinen- „Cocktail“ als um einzelne Faktoren handelt, die das axonale Überleben steuern, wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass viel mehr Neuronen absterben, wenn gar keine Schwanzzellvorläufer bzw. junge Schwanzzellen vorhanden sind, als wenn einzelne Faktoren fehlen (120). Neurone, die nicht genügend neurotrophe Faktoren aufnehmen, unterliegen der Apoptose (180). Hieraus erklärt sich, weshalb von den im Überfluss produzierten Neuronen nur etwa 50% überleben, nachdem sie die Zielzelle erreicht haben, obwohl sie keinerlei pathologische Merkmale aufweisen (30).

Ebenso werden Synapsen mit der Zielzelle vorerst im Überfluss gebildet. So erhält beispielsweise eine embryonale Muskelzelle viele Neuronen, übrig bleibt allerdings nur eines. Der Grund hierfür liegt darin, dass das Überleben von Synapsen von elektrischer Aktivität im Neuron sowie von synaptischen Signalen abhängig ist. Wenn es nun durch einen elektrischen Impuls in der Nervenfasern zur Muskelzellerregung kommt, schickt die erregte Muskelzelle einen „*rebuff*“ an alle Axonterminale, die an ihr Synapsen bilden. Synapsen, deren Axon nicht elektrisch erregt war, werden dadurch geschwächt und bei nachfolgenden Erregungen wird immer weniger Neurotransmitter freigesetzt (119).

Der bei Nervenzellen in der Regel sehr große Zellkern kommt mit seinem deutlichen Nukleolus meist zentral im Soma zu liegen, bei vegetativen Neuronen häufig auch exzentrisch (109). Im Zellkern von Nervenzellen finden zwar Transkription und Bildung der mRNA wie in anderen Körperzellen statt, aber die Nervenzelle ist wohl aufgrund ihres hohen Differenzierungsgrades nicht mehr zur Zellteilung befähigt. Eine Ausnahme bilden hierbei Neurone in definierten Hirnregionen (157). Folglich können - zumindest alle peripheren Nerven betreffend - keine neuen Nervenzellen mehr im Organismus entstehen und Neurone, die irreversibel geschädigt worden sind, werden nicht mehr ersetzt.

Aufgrund des Unvermögens der Nervenzellen, sich zu teilen, ist es nicht weiter verwunderlich, dass Zentriolen in Neuronen adulter Individuen meist nicht mehr vorhanden sind. Allerdings wird auf die Bedeutung des Zentriolenpaares bei der Organisation des Zytoskeletts hingewiesen, indem es „...seinen Einfluss über die vielen Mikrotubuli, die in das perizentrioläre Material einstrahlen, ausübt.“ (109). Um den Zellkern herum befindet sich die dem Perikaryon im Lichtmikroskop sein typisches Aussehen verleihende, basophile Nissl-Substanz (175). Sie ist schollig verteilt und wird vom rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) gebildet. Elektronenmikroskopisch stellt sich das rER als ein membranstapelartig aufgebautes Zisternensystem dar, an dessen Außenseite Ribosomen anhaften. Im Axon und in den feineren Verzweigungen der Dendriten fehlt ein rER. Ebenso kommt der Golgi-Apparat nur im Perikaryon vor. Proteine und Membranbestandteile, die zur Erneuerung des Axons und der Nervenendigungen benötigt werden, werden also nur im Zellkörper gebildet. Sie gelangen dann, verpackt in membranumhüllte Vesikel, per anterograden Transport in die Nervenzellfortsätze (3).

Das glatte endoplasmatische Retikulum, dessen Aufgabe in der Synthese von komplexen Lipiden, Steroiden und Glykogen besteht, ist hingegen sowohl im Perikaryon als auch im Zytoplasma der Nervenzellfortsätze vorhanden. THOMAS und OCHOA (237) sowie

BERTHOLD und SKLOGUND (15) beschreiben das axonale glatte ER als mehr oder weniger flach-röhrenartiges Zisternensystem, das weniger als 2,5% der axonalen Querschnittsfläche ausmacht. Es reicht als kontinuierliches retikuläres Netzwerk vom Axonhügel bis in die Nervenendigungen und teilt sich vor den Axonaufzweigungen in ein primäres und sekundäres System. Ersteres besteht aus dickeren Röhren, die direkt am (237) bzw. im (15) Axolemm zu liegen kommen und bis in die Nervenendigungen reichen. Das sekundäre, aus kleineren Röhren bestehende System kommt eher zentral im Axon zu liegen, und zerfällt in Untereinheiten, die in etwa der Größe der synaptischen Vesikel entsprechen. Es wird diskutiert, ob das glatte ER des Axons neben den Neurotubuli an axonalen Transportvorgängen beteiligt ist (109, 61).

Freie Ribosomen, deren Aufgabe vor allem die Synthese von Strukturproteinen und Enzymen ist, sind in erster Linie im Perikaryon zu finden. THOMAS und OCHOA (237) beschreiben gelegentlich vorkommende, an Ribosomen erinnernde Partikel distal des Axonhügels.

Mitochondrien kommen sowohl im Perikaryon als auch im Zytoplasma der Nervenzellfortsätze vor. Sie werden im Zellkörper gebildet und dann entlang der Neurotubuli in Axon und Dendriten transportiert. Bei diesem, wie auch bei jedem anderen mikrotubulären Transport, handelt es sich um einen aktiven Transportmechanismus durch mikrotubuläre Transportproteine. Das für den axonalen Transport nötige ATP wird durch die Mitochondrien bereitgestellt. Vereinzelt können bereits bei lichtmikroskopischer Darstellung Mitochondrien als winzige Punkte im Axon angesprochen werden. Detaillierte Angaben über die Ultrastruktur der axonalen Mitochondrien finden sich bei DONOSO et al. (59) und BERTHOLD und SKLOGUND (15). Im Gegensatz zu den meisten anderen Organellen kommen Lysosomen im Perikaryon und im Axon, aber nicht in den Dendriten zu liegen. Mit Hilfe von hydrolytischen Enzymen bauen sie zelleigenes Material ab. In der Literatur (12, 237) werden sie als lamellenartige, dichte, osmiophile Strukturen beschrieben. Als membranumhüllte Gebilde tauchen weiterhin kleine, dichte, katecholaminhaltige Vesikel in postganglionären, nicht myelinisierten Nervenfasern auf. Glykogenpartikel kommen in erster Linie in Axonterminalen, aber auch in Nervenwurzeln vor.

Das Zytoskelett der Nervenzelle wird von Mikrotubuli und Neurofilamenten, deren Aggregate als Neurofibrillen bezeichnet werden, gebildet. Neurofibrillen sind häufig bereits lichtmikroskopisch anzusprechen.

Die Mikrotubuli der Nervenzelle werden auch als Neurotubuli bezeichnet. Axoplasmatische Neurotubuli kommen häufig in Gruppen zusammen mit Mitochondrien und glattem ER zu liegen (237). Sie stellen sich als zylindrische Röhren mit einem Durchmesser von etwa 24-25 nm dar (12), deren Wand von Tubulin gebildet wird. Im geeigneten Milieu können

Tubulinmoleküle rasch zu Mikrotubuli aggregieren (78). In Axonen ist der Großteil der Mikrotubuli stabil und modifiziert (3). Andererseits können die Mikrotubuli durch pathologische Faktoren wieder in Tubulinmoleküle zerfallen. Zudem hat man beobachtet, dass sowohl die Anzahl an Mikrotubuli, als auch ihre Verbindung zu anderen Organellen durch die Zusammensetzung des Puffers im Glutaraldehydfixativum beeinträchtigt wird (137). Daher müssen Angaben über die Anzahl an Neurotubuli im Axon, die zwischen 50 und 100/ $\mu\text{m}^2$  in nicht-myelinisierten, und zwischen 10 und 20/ $\mu\text{m}^2$  in großen, myelinisierten Axonen schwankt (169, 12), mit Vorsicht beurteilt werden. In feineren Verzweigungen treten sie zurück. Neben Tubulin enthalten Mikrotubuli noch mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAPs), die die Bildung der Mikrotubuli beschleunigen, ihre Stabilität unterstützen (109) und ihre Interaktionen mit anderen Zellkomponenten vermitteln (3).

Wie ihre Ultrastruktur erkennen lässt, ist die Funktion der Mikrotubuli im peripheren Nerv vielgestaltig: Sie tragen zur Formerhaltung der Zelle bei und sind für Bewegungsvorgänge von Zellen mitverantwortlich (3). In erster Linie jedoch sind sie wesentlich an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt. In dem vom Perikaryon ausgehenden, kontinuierlichen zentrifugalen Axoplasmastrom leiten sie verschiedene Zytoplasmabestandteile in die Peripherie. Dieser langsame Transport beträgt etwa 1,5 mm pro Tag (109). Daneben gibt es noch einen schnelleren Axoplasmatransport (250-400mm/Tag), durch den unter Energieaufwand Überträgersubstanzen und deren Abbauenzyme bis zum Axonende bewegt werden (109). Für diesen Transport von Organellen und synaptischen Vesikeln wird das Motorprotein Kinesin benötigt. Seine schweren, ATP-haltigen Ketten binden dabei an die Mikrotubuli, und seine leichten Ketten verankern die zu transportierenden Zellkomponenten. Neben diesem anterograden Transport gibt es auch einen retrograden Transport vom Axon Richtung Perikaryon. Hierbei fungiert das zytoplasmatische Dynein als Motorprotein. Zusätzlich sollen die Mikrotubuli an der Ausformung des Axonhügels (262) sowie am transmembranösen Ionenaustausch (12) und der Verteilung von Ionenkanälen auf der Zelloberfläche (205, 252) beteiligt sein.

Als Neurofilamente werden die Intermediärfilamente der Neurone bezeichnet. Diese unverzweigten, longitudinal orientierten Strukturen bestehen aus faserigen Polypeptiden und haben einen Durchmesser von 10 nm. Im Abstand von etwa 50 nm entsenden sie speichenartige Strukturen, die in Verbindung mit benachbarten Filamenten stehen (237). Durch diese Quervernetzungen bestimmen sie maßgeblich den Axondurchmesser. Die Neurofilamentdichte beträgt zwischen 100 und 300/ $\mu\text{m}^2$  (267). Neurofilamente sind die stabilsten Komponenten des Zytoskeletts und verleihen so besondere Widerstandsfähigkeit

gegen Zug- und Druckkräfte (109). Inwieweit sie in axonale Transportmechanismen involviert sind, ist ungeklärt (12, 61). In den Endverzweigungen der Dendriten ziehen sie sich zurück. Als weitere Filamente befinden sich aktinartige Filamente mit einem Durchmesser von etwa 5nm (Mikrofilamente) in den Pseudopodien axonaler Wachstumskegel (163).

Tabelle 2

<b>Organellen</b>	<b>Perikaryon</b>	<b>Axon</b>	<b>Dendriten</b>
Zellkern	+	-	-
raues ER	+ als Nissl-Substanz	-	nicht in feineren Ästen
glattes ER	+	+	+
Ribosomen	+	im Axonhügel	-
Mitochondrien	+	+	+
Golgi-Apparat	+	-	-
Zentriolen	im erwachsenen Nerv meist nicht mehr	-	-
Lysosomen	+	+	-
Neurotubuli und -filamente	+	+	nicht in feineren Ästen
Pigmente	+	+	+

### 2.1.2 Die Schwannzellen

Die Schwannzelllinie beginnt im Sinne von Schwannzellvorläufern mit migrierenden Neuralleistenzellen, aus denen sich jugendliche Schwannzellen entwickeln. Von diesen unreifen Schwannzellen leiten sich die myelinisierten und nicht-myelinisierten, reifen Populationen ab (123). Als Marker für die Schwannzelllinie kann P0 (*major peripheral myelin protein*) dienen, da alle Neuralleistenzellen, die sich später zu Schwannzellen differenzieren, dieses Protein - wenn auch nur in verhältnismäßig geringer Konzentration - exprimieren (120). Diese Expression ist völlig unabhängig davon, ob sie als reife Zellen Myelinscheiden bilden oder nicht. Unter den adulten Schwannzellen hingegen exprimieren nur noch die myelinbildenden P0, da bei nicht-myelinisierenden Schwannzellen die P0-Expression durch axonale Signale supprimiert wird. P0 macht über 50% des peripheren Myelinproteins aus (161). Als Adhäsionsmolekül stabilisiert es die Myelinscheide und ist zudem für das axonale Wachstum mitverantwortlich.

Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten denkbar, wie Schwannzellen sich von anderen Zellen der Neuralleiste differenzieren. Einerseits scheint ihr Weg zum Zeitpunkt des Migrationsbeginnes bereits determiniert (110). Andererseits erhalten sie instruktive Signale. So blockiert das axonale

gebildete  $\beta$ -Neuregulin die Entwicklung von Neuronen, die ebenfalls der Neuralleiste entstammen (120). Als trophischer Faktor regelt  $\beta$ -Neuregulin aber nicht nur die Differenzierung, sondern auch das Überleben der Schwannzelllinie. Es bindet dabei, wie bereits erwähnt, an den ERBB3-Rezeptor der Schwannzellen (193).

Weiterhin besitzen Schwannzellen einen Rezeptor für NGF. Da neben den Targetzellen der Nervenfasern auch die Schwannzellen selbst NGF bilden, können sie via autokrine Loops ihre eigene Entwicklung mitbestimmen (201).

Die postnatale Differenzierung in myelinisierende und nicht-myelinisierende Schwannzellen wird wiederum axonal gesteuert, wobei genaue Mechanismen unbekannt sind (120). Dabei finden sowohl morphologische als auch biochemische Veränderungen der Schwannzellen, insbesondere der myelinbildenden, statt. So wird die Expression neuer Gene hochreguliert, und die für myelinbildende Schwannzellen typischen Proteine P0, MBP (*myelin basic protein*), und PMP22 (peripheral myelin protein 22) werden vermehrt gebildet. Im Gegenzug wird die Expression anderer Gene, wie z.B. für NCAM (*neural cell adhesion molecule*), den Neurotrophinrezeptor p75, und GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) herunterreguliert. Von reifen nicht-myelinisierenden Schwannzellen hingegen werden diese Proteine weiterhin gebildet (124).

Schwannzellen fungieren bei Axonen jeder Größe als Hüllzellen (201). Bei nicht-myelinisierten Nervenfasern werden Abschnitte mehrerer Axone zwar einzeln, aber von einer einzigen Schwannzelle manschettenartig umhüllt. Dabei senken sich die Axone in das Plasmalemm der Schwannzelle ein, das entsprechende Einstülpungen bildet (109). Die Duplikatur der Schwannzell-Membran wird als Mesaxon bezeichnet (12). Solche Schwannzellen, die eine Vielzahl an nicht-myelinisierten Nervenfasern einschließen, werden auch als Remakzellen bezeichnet (129).

Die myelinbildende Schwannzelle stellt man sich am einfachsten als flache, trapezoide Zelle vor (Abb. 4), die spiralig um ein einzelnes Axon gewunden ist (237), und so ein Axonsegment bestimmt. Ihr innerster Anteil, der dem kürzeren Trapezende entspricht, wird dabei von der schmalen Zone des adaxonalen Schwannzellzytoplasmas gebildet. Diesem schließt sich nach außen eine Zone kompakten Myelins an, die beidseits von einem schmalen, lateralen Zytoplasmarrand umgeben wird. Das Myelin ist von Zytoplasmakanälen durchzogen. Diese können, wenn sie senkrecht zum Axon verlaufen, das adaxonale Schwannzellzytoplasma mit dem sich an das Myelin anschließende, breiteren abaxonale Zytoplasmasaum verbinden. Im abaxonalen Schwannzellzytoplasma kommt der Zellkern und ein Großteil der Organellen zu liegen.



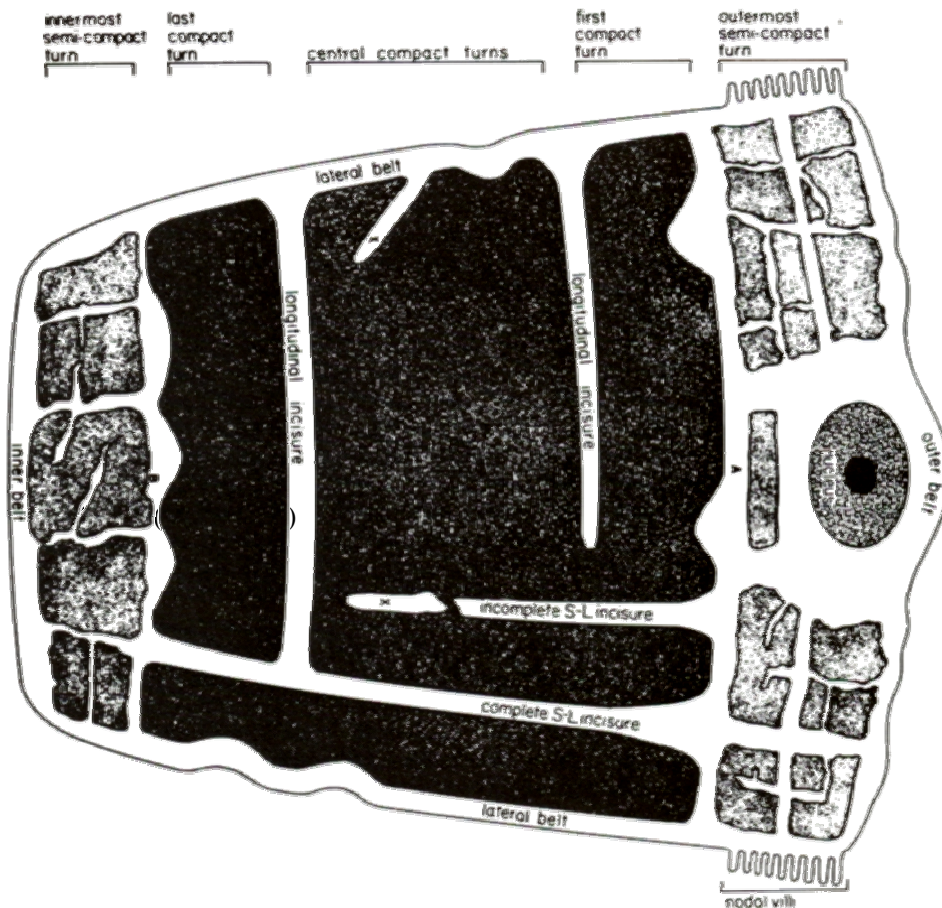


Abb. 4:  
zweidimensionale  
Darstellung einer  
Schwannzelle  
(237)

Der adaxonale Anteil der Schwannzelle schiebt sich um das Axon herum immer weiter vor, so dass im Querschnitt folgendes Bild entsteht: um das Axon kommt das adaxonale, kaum Organellen enthaltende Schwanzzellzytoplasma zu liegen. Es führt etwas mehr als eine Wicklung aus, wobei Bereiche, an dem die Schwanzzell-Oberflächenmembranen überlappen und über eine *tight junction* verbunden sind (237). Diese Stelle wird als inneres Mesaxon bezeichnet (12).

Die angrenzende, lamellär geschichtete Myelinscheide besteht zu 75% aus Lipiden (Cholesterin, Sphingomyelin und Galaktolipide) und zu 25% aus Proteinen, dessen größten Anteil das Glykoprotein P0 ausmacht (201). Sie weist alternierend dunkle Zonen, die *major dense lines*, und helle Lamellen, sogenannte *intraproduct lines* auf (81, 221). Letztere sind genauer genommen zwei Linien, die durch eine schmale Lücke von 2 nm (*intraproduct gap*) voneinander getrennt werden (201). Im gemischten peripheren Nerven besteht die Myelinscheide dünner Nervenfasern insgesamt aus etwa 30, die dicker Nervenfasern aus bis zu 120 Myelinlamellen (6). Die osmiophilen *major dense lines* entstehen durch Fusion intrazellulärer Teile der gegenüberliegenden Schwanzzellmembranen einer Wicklung. Dementsprechend befand sich vor ihrer Vereinigung Zytoplasma im Bereich der *major dense*

*lines*, und sie stellen den ehemals intrazellulären Schwanzzellanteil dar. Die *intermediate lines* entsprechen dem Mesaxon, und stellen damit den ehemals extrazellulären Raum dar (237).

Außen an das Myelin schließt sich das organellenreiche, den Zellkern enthaltende abaxonale Schwanzzellzytoplasma an. Es besteht ebenfalls aus etwas mehr als einer Wicklung und bildet im Überlappungsbereich das äußere Mesaxon. Zytoplasmaanteile in diesem Bereich werden in der Literatur vereinzelt auch als zytoplasmatische Lippen (237) bezeichnet.

Das Schwanzzellplasmalemm besteht aus einer dreischichtigen symmetrischen Membran (237). Gegenüber dem umliegenden Bindegewebe grenzt sich die äußere Schwanzzellmembran sowohl bei myelinisierten als auch in nicht myelinisierten Nervenfasern durch eine kontinuierliche Basalmembran ab (201). Interessanterweise kann die Basalmembran in *freeze-fracture*-Präparaten nicht nachgewiesen werden (6).

In bestimmten Regionen der Myelinscheide öffnen sich die *major dense lines* und bilden zytoplasmatische Taschen. Diese wurden erstmals 1884 von SCHMIDT (205) und 1877 von LANTERMAN (143) als Inzisuren der Myelinscheide beschrieben, und werden daher als Schmidt-Lantermansche-Kerben (SLK) bezeichnet (Abb. 5). In ihnen sind einzelne Mikrotubuli enthalten, gelegentlich werden auch elektronendichtes Material und multivesikuläre Körper beschrieben (105). Nach Glutaraldehydfixierung erscheinen die SLK's häufig osmiophil, und ihre Anzahl steht in direkt proportionalem Zusammenhang mit der Myelindicke (237). Sie bilden zur Myelinlamelle einen Winkel von annähernd  $9^\circ$  (88). Die Funktion der SLK's wird vielgestaltig beschrieben:

ROBERTSON (195) führt ihre Existenz auf Scherdefekte eines dynamischen Prozesses zurück. Andere Autoren schreiben ihnen eine der Myelinscheide Plastizität verleihende Funktion zu (88, 109). Darüberhinaus wurde ihnen die Beteiligung an der axoplasmatischen Peristaltik und am Zytoplasmafluss innerhalb der Myelinlamellen unterstellt, indem sie sich langsam rhythmisch öffnen und schließen sollen (219). In anderen Untersuchungen (105) konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Durch das Vorkommen zytoskelettaler Anteile in den Kerben tragen sie möglicherweise zur strukturellen Beständigkeit des Myelins bei (237). Weiterhin wird eine metabolische Bedeutung der SLK's, wie die Passage von Metaboliten durch die Myelinscheide zum Axon, in Betracht gezogen. So konnte man beispielsweise Peroxidase als Marker zuerst in den Kerben, dann im adaxonalen Zytoplasma und letztendlich im Axon nachweisen (195, 220). Darüberhinaus nehmen einige Autoren an, dass die SLK's in das Längenwachstum des Myelins einbezogen sind (39).

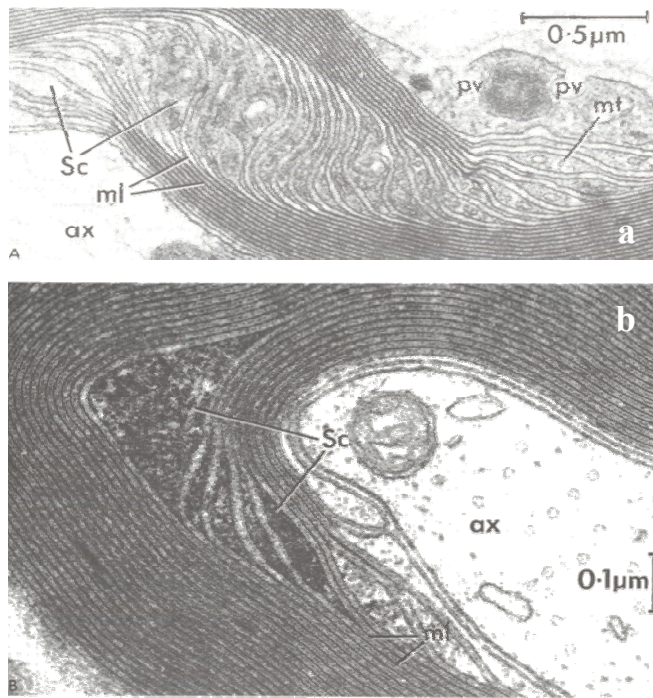


Abb. 5 A und B: Feinstruktur der SLK's  
(ax= Axon; ml= Myelinlamellen; S= Schwannzellzytoplasma; mt=  
Mikrotubuli; pv= pinozytotische Vesikel) (237)

Der Zellkern der Schwannzelle besitzt eine deutliche Kernmembran. Als zytoplasmatische Organellen sind schwach differenzierte Mitochondrien, der Golgi-Apparat, Zentriolen, ein raues und ein glattes endoplasmatisches Retikulum sichtbar. Des Weiteren werden Glykogenpartikel, Lysosomen, die als Telolysosomen häufig Lipofuszin enthalten, und mikropinozytotische Vesikel beschrieben (237). Als Einschlüsse sind von REICH die sogenannten  $\pi$ -Granula beschrieben worden (188).

Die daher auch als Reich-Granula benannten stabförmigen Gebilde sind bei einem Durchmesser von etwa 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  1  $\mu\text{m}$  lang (6, 237), und kommen vorwiegend perinukleär zu liegen. Elektronenmikroskopisch bestehen sie aus lamellenartigen Membranstapeln. Sie sind gelegentlich mit dichtem osmiophil-amorphem Material assoziiert und stets von einer Membran umgeben. Da sie eine saure Phosphataseaktivität beinhalten werden sie als Lysosomen klassifiziert (259, 6).

Sie entstehen durch Speicherung und Strukturierung gewisser Lipide oder Lipidgemische. Es wird angenommen, dass die  $\pi$ -Granula aus nicht weiter metabolisierbaren Lipiden des Myelinstoffwechsels resultieren (6). In diesem Sinne ist ihr Vorkommen auf bemerkte Nervenfasern beschränkt. Es wurde mehrfach beobachtet, dass sie im Alter akkumulieren (237, 240). Eine Anfärbung der  $\pi$ -Granula mit der histochemischen Färbung nach MARCHI (7) ist möglich. In der Literatur wurden vielfach auch Marchi-positive-Körper oder Granula beschrieben, die in erster Linie paranodal zu liegen kommen (45, 178). Sie sind ebenfalls Zeichen von Myelinkatabolismus. Sie werden auch bei jungen Individuen, hier allerdings in erster Linie in Oligodendrozyten beobachtet (189).

Daneben kommen Marchi-positive Lipidtropfen als sogenannte Elzholtz-Körper oder  $\mu$ -Granula vor (237). Bei einem Durchmesser von 0,5 bis 2  $\mu\text{m}$  sind sie von sphäroider Form (6). Ihr Inhalt ist homogener als der der  $\pi$ -Körperchen. Manchmal kann er als Lipofuszin-Komponente

angesprochen werden. In Makrophagen werden Partikel von ähnlicher Struktur gefunden, die als Abbauprodukte von Neutralfetten zu identifizieren sind. Mit zunehmendem Alter treten sie häufiger in Erscheinung (6). Im Zytoplasma der Schwannzellen sind bei alternden Rattennerven außerdem Anhäufungen von Hirano-Körpern beschrieben (208). Sie bestehen aus überlappenden Lagen paralleler Filamente, die gemeinsam mit Axonschwanzzell-Netzwerken in Erscheinung treten. Ihre Bedeutung ist nicht genau bekannt, man vermutet sie als ein Proteinabbauprodukt (236).

### 2.1.3 Gegenüberstellung von myelinisierten und nicht-myelinisierten Fasern

Im nun folgenden Abschnitt sollen Axon und Schwannzellen nicht mehr als einzelne Strukturen, sondern als Funktionseinheit betrachtet werden.

Bei nicht-myelinisierten Nervenfasern bilden sich zwischen aufeinanderfolgenden Schwannzellen 10 bis 30  $\mu\text{m}$  weite, leer erscheinende Lücken, die durch Ineinandergreifen der Schwannzellen bzw. deren Fortsätze, die mitunter desmosomenartige Verbindungen ausbilden, überbrückt werden (12).

Die Markscheide myelinisierter Nervenfasern ist in regelmäßigen Abständen durch die Ranvierschen Schnürringe (42) in Segmente zerlegt. Der Schnürringbereich wird auch als Knoten oder Nodium bezeichnet, die Abschnitte dazwischen als Internodien. Letztere entsprechen je einem Schwannschen Zellbezirk und sind deshalb durch den Zellkern einer Schwannzelle markiert (168).

Der schmale Raum, der zwischen dem Axolemm und dem Plasmalemm der Schwannzelle entsteht, wird als periaxonaler Raum oder Klebsscher Raum bezeichnet (175). Er kann entweder diffus-feingranuläres Material enthalten, oder mehr oder weniger leer erscheinen (169). An einigen Stellen berühren sich Axolemm und Schwannzellmembran und bilden mehrschichtige Membrankomplexe (149). Bei nicht-myelinisierten Nervenfasern stellt der Klebssche Raum die unmittelbare Außenseite der erregbaren Membran dar. Obwohl Meerrettichperoxidase ungehindert in ihn penetrieren kann (149), darf daraus nicht geschlossen werden, dass der periaxonale Raum offen für freie Diffusion ist. So zeigt es sich, dass bei permanenter Impulsweiterleitung  $\text{K}^+$  außerhalb der erregbaren Membran akkumuliert (97). Bei der myelinbildenden Schwannzelle ist der periaxonale Raum durch eine *tight junction* des inneren Mesaxons vom extrazellulären Raum der *intraperiod lines* entlang des ganzen

Internodiums abgegrenzt (237). Am Schnürring liegen besondere Verhältnisse vor, die an späterer Stelle genauer erläutert werden.

Beim Menschen beginnt die Myelinisierung in der 18. Gestationswoche (201). Bei der Katze setzt BERTHOLD (13) den Zeitraum der Bildung der Ranvierschen Schnürringe und der angrenzenden Paranodien, die sogenannte Nodalisation, von pränatal bis zum ersten Lebensmonat, wobei die Faserdicke danach noch etwa um das Vierfache zulegen wird.

Verschiedene Schwanzzell-assoziierte Oberflächenmoleküle sind an der Formung der Myelinscheide beteiligt (161). P0 und PMP 22 sind für die Spiralisierung des Myelins um das Axon mitverantwortlich. Auch das *myelin associated glycoprotein* (MAG) spielt hierbei, zumindest unter Abwesenheit von P0 eine Rolle (150). MAG dient auch der Aufrechterhaltung der Myelinstruktur. Es existieren zwei zytoplasmatische Isoformen, von denen die kleine auch als *small* oder sMAG bezeichnet wird und mit dem Tubulin der Schwanzzelle assoziiert ist. Auf diese Weise ist die axonale Oberfläche mit dem Zytoskelett der Schwanzzellen verbunden. Die Kompaktierung des Myelins wird durch P0 und das *myelin basic protein* (MBP) vermittelt (161). Die Myelindicke wird durch P0, MBP und PMP 22 festgelegt, wobei die beiden erstgenannten das Myelinwachstum vorantreiben, PMP 22 es dagegen hemmt (150).

Für die Aufrechterhaltung der Schwanzzell- und Myelin-Axon-Verbindung sind in erster Linie die Myelinbestandteile P0, PMP 22 und Connexin 32 essentiell (150). Liegt eine Mutation der Gene für eine dieser drei letztgenannten Schwanzzell-Oberflächenmoleküle vor, kommt es zur Demyelinisierung. Dieses Krankheitsbild entspricht verschiedenen Formen der beim Menschen vorkommenden *Charcot-Marie-Tooth* Erkrankung (CMT) (101, 19).

Bei myelinisierten Nervenfasern variiert die Länge der Internodien generell mit dem Kaliberdurchmesser der Fasern, wobei dünnkalibrige Fasern eine Internodienlänge von 200 bis 300µm, und dicke Nervenfasern bis zu 2000µm aufweisen (263). Dabei kann die Internodienlänge bei Fasern gleichen Kalibers allerdings deutlich variieren (165).

Die Internodien selbst sind wiederum in stereotype internodale Segmente (STIN's) und paranodale Anteile zu untergliedern. Dabei macht das zentral gelegene STIN-Segment 95% des Internodiums aus (13). In Längsschnitten (vgl. Abb. 5) und Teasingpräparaten (siehe Kapitel 3) können in dieser Region kompaktierten Myelins die SLK's in ihrer typischen fischgrätenartigen Form dargestellt werden. Im Querschnitt stellt sich das Axon rund und die Myelinscheide ringförmig dar (237).

In Bezug auf den Zellkörper schließen sich proximal und distal an das STIN-Segment paranodale Bereiche an. Bei dünnmyelinisierten Nervenfasern endet das Myelin am Knoten eher im spitzen Winkel (Phillips-Typ 1, 181), bei dickeren Fasern hingegen häufig kolbenartig aufgetrieben, in einem bis zu 90° stumpfen Winkel (Phillips-Typ 2, 181). LUBINSKA und LUKASZEWSKA beschreiben eine stete paranodale Asymmetrie, wobei das proximale Paranodium dicker erscheinen soll (148).

Die Paranodien können ihrerseits in ein Haupt- und ein Endsegment unterteilt werden (13). In älteren Standardwerken (237) wird das Hauptsegment auch als juxtapanodale Region, und nur die Endsegmente selbst als Paranodium bezeichnet. Das Endsegment ist durch terminale Myelinscheidenanteile und deren Berührungszone mit dem Axonabschnitt der an den Knoten angrenzt, gekennzeichnet. Dieser Teil des Axons wird als *myelin sheath attachment* (MYSA)-Segment bezeichnet (13). Sein Durchmesser ist hier im Vergleich zu STIN-Segmenten um etwa die Hälfte bis ein Drittel bei dünnen, und bis auf ein Sechstel bei dicken Fasern reduziert (12), wobei er im Nodium selbst wieder an Dicke zunehmen kann. Daher scheint im paranodalen Bereich die Organellendichte höher zu sein, wobei insbesondere ein zunehmender Mitochondrienreichtum zu beobachten ist. Zusätzlich findet hier eine Umorganisation des glatten ER's von seinem retikulären Muster in ein eher longitudinales statt.

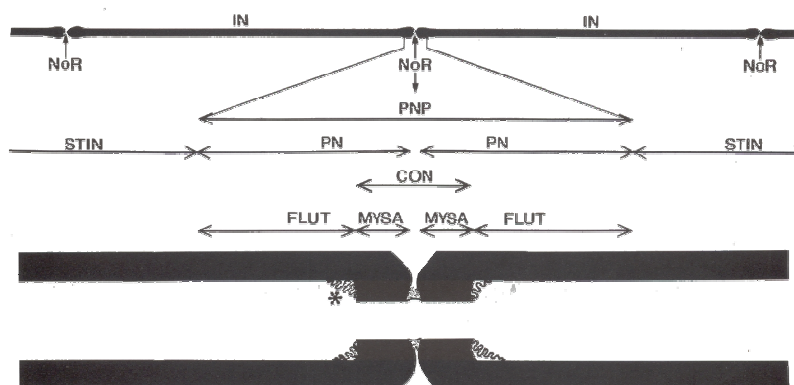


Abb. 6: Schematische Darstellung von Nodium und Paranodium (13)

(IN= Internodium; NoR= Ranvierscher Knoten, PNP= Paranodium-Nodium-Paranodium-Segment; STIN= stereotypes internodales Segment; CON= verengtes Axonsegment; FLUT= paranodales Hauptsegment; MYSA= myelin sheath attachment segment)

Im paranodalen Bereich ist die Myelinscheide bei dünnen Nervenfasern von drei, bei dicken von bis zu sieben tiefen Längsfurchen durchzogen (237). So entsteht im Querschnitt die häufig unregelmäßige kleeblattartige Kontur paranodaler Abschnitte. Im Bereich des Hauptsegmentes enthalten die Furchen mitochondrienreiches Schwanzzellzytoplasma (161). Sie sind ein wichtiger ATP-Lieferant für energieabhängige Ionentransportprozesse bei der Aufrechterhaltung und Weiterleitung der Erregungsleitung in Knotenbereichen ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe). Diese als paranodale Mitochondrientaschen bezeichneten Zytoplasmaanteile (13) beherbergen unter anderem auch häufig Glykogen, Lipidtropfen und Marchi-positive



Myelinkörper. Das Axon passt sich in dieser Region der Form der Myelinscheide an. Im paranodalen Endsegment (MYSA-Segment) hingegen stellt sich das Axon rund dar. Die Anteile, die kammartig die Myelinscheide im Hauptsegment ausfüllen, sind hier als dünne, spiralige Fortsätze innerhalb des inneren zytoplasmatischen Schwanzzell-Kompartiments sequestriert und bilden so Axon-Schwanzzell-Netzwerke (19) aus, die mit dem Alter in ihrer Zahl zunehmen (13). THOMAS und SPENCER (226) zeigten, dass diese Axon-Schwanzzell-Netzwerke bei Neuropathien, die mit axonaler Degeneration einhergehen, auch internodal gehäuft auftreten. Es ist anzunehmen, dass auf diese Weise Axoplasmabestandteile von Schwanzzellen phagozytiert werden. Im Gegensatz dazu verliert das äußere Schwanzzell-Kompartiment gegen den Knoten zunehmend an Mitochondrienreichtum (13).

Im Längsschnitt ist das Paranodium durch terminale zytoplasmatische Taschen der Myelinlamellen gekennzeichnet, die gelegentlich desmosomenartig miteinander verbunden sind (106). Sie entsprechen dem lateralen Zytoplasmaraum, der ad- und abaxonales Schwanzzellzytoplasma miteinander verbindet (237). Von diesen auch als paranodale Schwanzzellloops bezeichneten Taschen reichen nur etwa 20% bis zum MYSA-Segment des Axons hinab (13). An den Berührungspunkten mit dem Axolemm bildet das transmembrane Schwanzzell-Protein Connexin 32 einen *gap junction*-ähnlichen Membrankomplex (101). Zusätzlich besitzt die paranodale Axonmembran ein transmembranes Glycoprotein (CASPR oder Paranodin), das einerseits mit dem axonalen Zytoskelett, andererseits mit den paranodalen Schwanzzellloops interagiert (160).

Sowohl zwischen den Schwanzzelltaschen selbst, als auch zwischen ihren Berührungspunkten mit dem Axolemm sind schmale Lücken, über die der periaxonale Raum mit dem extrazellulären Bereich des Nodiums verbunden ist.

Der Ranviersche Schnürring wird im reifen Nerven beidseits von der jeweils terminalsten zytoplasmatischen Schwanzzelltasche begrenzt (13), wobei zytoplasmatische abaxonale Schwanzzellfortsätze bzw. Mikrovilli aufeinanderfolgender Schwanzzellen derart ineinanderzugreifen scheinen, dass der Knoten fast versteckt wirkt. Dabei berühren sich aber die Zytoplasmafortsätze weder gegenseitig noch das Axolemm (6). Die zwei bis fünf dem Knoten am nächsten liegenden Taschen bilden gemeinsam mit dem Axon die Schnürringnische (13). Vom angrenzenden Bindegewebe ist der Schnürring durch die Basalmembran, die sich wie ein Schlauch um die gesamte Nervenfasern legt, getrennt (6). Der Raum, der so entsteht, wird als Ring des Nemiloff (175) bezeichnet. Hierin befinden sich in erster Linie sulfatveresterte (12) und carboxylierte, proteingebundene Mukopolysaccharide (142, 237). Sie

bilden ein polyanionisches Milieu, das aktiv am Kationenaustausch und somit an der Ausbreitung des Aktionspotentials beteiligt ist. Der endoneurale Raum, der über der Basalmembran entsteht, wird als perinodaler Raum bezeichnet (12).

Die Ranvierschen Schnürringe werden von Schwannzellen formiert (120). Hierbei antworten Axone zuerst auf ein lösliches Schwannzellprodukt mit erhöhter Produktion von  $\text{Na}^+$ -Kanälen in ihrer Membran, wie HINSON et al. (112) experimentell belegen konnte. Im Anschluss unterliegen die  $\text{Na}^+$ -Kanäle einer Clusterung. Interaktionen zwischen diesen Clustern und Schwannzell-Oberflächenmolekülen bewirken, dass die  $\text{Na}^+$ -Kanäle mit dem Schwannzellwachstum das Axon entlang geschoben werden, und im Schnürring zu liegen kommen (120). Diese „Wanderung“ der  $\text{Na}^+$ -Kanäle findet nicht nur während der Entwicklung, sondern auch bei regenerativen Prozessen statt. Es sind letztendlich also Schwannzell-Signale, die für Induktion und Positionierung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle am Ranvierschen Schnürring verantwortlich sind. Verankert sind die  $\text{Na}^+$ -Kanäle dort durch Ankyrin, ein Protein, das Hauptbestandteil des axonalen Zytoskeletts im Nodium ist. Diese Verbindung kommt über die als Adhäsionsmoleküle wirkenden integralen Membranproteine Neurofascin und NrCAM zustande. LAMBERT et al. (140) konnten feststellen, dass der Clusterung von  $\text{Na}^+$ -Kanälen und Ankyrin eine Clusterung von Neurofascin und NrCAM vorangeht.

Das Axolemm stellt sich elektronenmikroskopisch als asymmetrische dreilagige Membran dar. Ihr inneres Blatt ist osmiophiler und etwas breiter als das äußere, und beide sind durch eine klare Zone voneinander getrennt (77). An ihrer Innenseite werden, insbesondere bei myelinisierten Nervenfasern, Akkumulationen von kleinem, elektronendichtem Material beschrieben, die sich vor allem in nodalen und paranodalen Bereichen häufen (237).

Die paranodale Schwannzellmembran besitzt des Weiteren spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle, die hier, im Gegensatz zu den  $\text{K}^+$ -Kanälen am angrenzenden Axolemm, gehäuft und in Clustern vorliegen. Sie dienen wahrscheinlich der  $\text{K}^+$ -Pufferung am Knoten (203). Typische, dem Paranodium zueigene Oberflächenmoleküle sind weiterhin das Adhäsionsmolekül E-Cadherin und MAG (161).

Neben seinen bereits erwähnten Funktionen induziert MAG die Phosphorylierung der Neurofilamente durch Regulierung des Kinase-Phosphatase-Zyklus (120). Ob Neurofilamente phosphoryliert sind oder nicht, könnte in engem Zusammenhang mit der Neurofilamentdichte und dem Axonkaliber in diesem Bereich stehen (123). Untermuert wird diese Hypothese durch einen Versuch mit MAG-Knock-Out Mäusen (266), bei denen myelinisierte Axone im Kaliber reduziert sind, und dichter gepackte und in geringerem Maße phosphorylierte Neurofilamente aufweisen. Zudem wurde mehrfach beobachtet, dass nicht- bzw. hypomyelinisierte



Nervenfasern einen geringeren Axondurchmesser bei einer vermehrten Neurofilamentdichte und geringerer Neurofilamentphosphorylierung aufzeigen (120). Somit scheint MAG letztendlich mitverantwortlich für die Ultrastruktur der markhaltigen Nervenfasern zu sein. Am Schnürring, der ja frei von myelinisierenden Schwannzell-Abschnitten ist, zeigt das Axon dementsprechend einen geringeren Durchmesser als in internodalen Bereichen.

Die Markscheiden myelinisierter Nervenfasern wirken als Isolierschicht, so dass Depolarisationsvorgänge nur noch an den Ranvierschen Schnürringen stattfinden können. Dadurch kommt eine saltatorische Erregungsleitung zustande (134). Die Nervenleitgeschwindigkeit wird so gegenüber nicht-myelinisierten Fasern immens erhöht. Das zum Aktionspotential benötigte  $\text{Na}^+$  stammt dabei nicht nur aus dem Extrazellularraum, sondern auch aus den paranodalen zytoplasmatischen Schwannzelltaschen (76). Es gelangt von dort in die Knotenregion selbst und wird letztendlich über die Schwannzellmikrovilli wieder aufgenommen. Markhaltige Fasern leiten mit sehr hohen Geschwindigkeiten von bis zu 120 m/Sekunde (134). Bei klinischen Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit bei Hunden werden Werte bis zu 60 m/Sekunde als noch im physiologischen Bereich angesehen. Bei Tieren unter einem Jahr und über 10 Jahren kann die Nervenleitgeschwindigkeit auch ohne ein krankhaftes Geschehen unter diesen Wert sinken (0084). Bei nicht myelinisierten Nervenfasern sind die  $\text{Na}^+$ -Kanäle gleichmäßig über das ganze Axon verteilt und ein Ladungsausgleich folgt dem nächsten. Marklose Nervenfasern sind daher mit einer Nervenleitgeschwindigkeit von ca. 1m /Sekunde (134) eher langsam leitend.

Tabelle 3

Fasertyp	Funktion	Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Leitungsgeschwindigkeit (m/sek)
A $\alpha$	efferent und afferent leitend an Muskulatur	15 markhaltig	70-120
A $\beta$	Berührungsempfindungen	8 markhaltig	30-70
A $\gamma$	efferent leitend an Muskelspindeln	5 markhaltig	15-30
A $\delta$	Schmerz-, Kälte- und Wärmeempfindungen	3 markhaltig	12-30
B	vegetativ präganglionär	3 markhaltig	3-15
C	vegetativ postganglionär	1 marklos	0,5-2

(A $\alpha$ -Fasern werden auch als Ia- (Muskelspindeln) oder IIa-Fasern (Golgische Sehnenorgane), A $\beta$ - und A $\gamma$ -Fasern als II-Fasern, A $\delta$ - als III-Fasern, und die C- als IV-Fasern bezeichnet)

Nicht nur die Markscheide, sondern auch der Axondurchmesser hat Einfluss auf die Leitgeschwindigkeit. Generell gilt: je dicker die Nervenfasern, desto schneller leitet sie. Eine

Differenzierung in unterschiedliche Nervenfasertypen kann daher aufgrund verschiedener Durchmesser und Leitungsgeschwindigkeiten erfolgen (134, 146).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei myelinisierten Nervenfasern die Paranodien zusammen mit dem Ranvierschen Schnürring als *paranode-node-paranode* (PNP)-Region die sowohl strukturell als auch funktionell spektakulärste Untereinheit des Nerven ausmachen (13). Hier befindet sich nicht nur die Maschinerie zur Erzeugung und Aufrechterhaltung des Aktionspotentials, es stellt auch den stoffwechselaktivsten Anteil dar. Viele Neuropathien manifestieren sich vermutlich daher in diesem Bereich (13).

## 2.2 Mesenchymale Komponenten des peripheren Nervens

Alle mesenchymalen Anteile des peripheren Nervens entstammen dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm (207).

### 2.2.1 Das Endoneurium

Das Endoneurium ist das direkt die Nervenfasern umgebende Gewebe und wird von diesen durch die Basalmembran der Schwannzellen abgegrenzt. 20-30% des Endoneuriums bestehen aus albuminhaltiger Flüssigkeit und Bindegewebsmatrix (201). Die endoneurale Matrix wird vorwiegend von Kollagen 1-, aber auch von Kollagen 2- und -3-Fasern gebildet. Hierbei kann zwischen der inneren Endoneuralscheide, nach PLENK und LAIDLAW (175), und der Äußeren, nach KEY und RETZIUS (133), unterschieden werden. Letztere besteht aus longitudinal orientierten, dicken Kollagen-Fasern. Die innere Endoneuralscheide setzt sich hingegen aus wesentlich feineren, die Nervenfasern quer umhüllenden Kollagenfasern zusammen (175). Sie bildet mit der Basalmembran der Schwannzellen das sogenannte Neurilemm (5). Bei einigen peripheren Neuropathien, wie der diabetischen Polyneuropathie und einer Form der *hereditary motor and sensory neuropathy* (HMSN) des Menschen wird über eine veränderte Zusammensetzung der Kollagentypen berichtet (21).

Die längsorientierten Kapillaren des Endoneuriums sind von Perizyten umgeben. Zusammen mit der Basalmembran und den Endothelzellen, die ihrerseits über *tight junctions* miteinander

verbunden sind, bilden sie die Blut-Nerven-Schranke. Andere Autoren schreiben ausschließlich der innigen Verbindung zwischen den Endothelzellen die Schrankenfunktion zu (176). In Dorsalwurzel- und autonomen Ganglien fehlt die Blut-Nerven-Schranke völlig (201). Lymphgefäße kommen im Endoneurium nicht vor (175).

Zelluläre Bestandteile des Endoneuriums schließen Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen ein (201). Fibroblasten besitzen im Gegensatz zu den Schwannzellen keine Basalmembran, und ihr Kern ist größer und runder und wirkt kondensierter als der der Schwannzellen (6). GREHL und SCHRÖDER berichten in einer Studie über die Bedeutung von degenerierenden Endoneuralzellen für die Diagnostik peripherer Polyneuropathien (98), dass es sich bei den betroffenen Zellen vorwiegend um Fibroblasten handelt. Degenerierende Fibroblasten sind als unspezifisches Zeichen vieler peripherer Neuropathien, und hier insbesondere als Indiz für entzündliche Veränderungen zu werten. Sie besitzen im Normalfall phagozytotische Fähigkeit und spielen eine Rolle beim Abbau von Myelin und axonaler Debris (238).

Makrophagen machen 2-9% der endoneuralen Zellen aus (238). Sie befinden sich meist in der Nähe von Blutgefäßen. Makrophagen sind die Antigen präsentierenden Zellen des PNS, und können extrazelluläres Protein aus dem Endoneurium phagozytieren. Die Rolle einwandernder Makrophagen bei Neuropathien ist in Kapitel 4 erläutert. Makrophagen produzieren eine Reihe von Zytokinen, unter anderem IL-1, das als Promotor zur Expression von NGF wirkt (238).

Eine weitere Abwehrzellpopulation stellen die Mastzellen dar. Sie zeichnen sich durch die für sie typischen Granula aus. Die Anzahl der Mastzellen scheint bei einigen pathologischen Veränderungen, wie der Wallerschen Degeneration und einigen neoplastischen Erkrankungen (z.B. von Recklinghausen Neurofibromatosis) erhöht zu sein (175). Über die Ausschüttung biogener Amine können Mastzellen die Permeabilität der Blut-Nervenschranke erhöhen. Zudem wirken Mastzell-Proteasen myelinolytisch und ihre Rolle bei demyelinisierenden Neuropathien wird diskutiert (125).

Subperineural sind nicht selten die sogenannten Renaut-Körper (191, 190) anzutreffen. Im Querschnitt stellen sie sich als rundliche Körper dar, die aus scheinbar willkürlich orientierten Kollagenfasern und elastischen Fasern, Fibroblasten und Perineuralzellen bestehen (175). Es wird vermutet, dass sie als Schutzpolster im Nerven dienen, da sie in Gelenkbereichen ebenso wie nach Kompressionen vermehrt auftreten (201). Beim Pferd sind sie leicht unter dem Präpariermikroskop zu erkennen (175). DINES, SHELTON et al. ziehen über die Aktivierung von Fibroblasten und Perineuralzellen eine mögliche Beteiligung von Mastzellen an der Bildung von Renaut-Körpern in Betracht (56).

### 2.2.2 Das Perineurium

Das Bindegewebe, das die einzelnen Faserbündel des peripheren Nervens umgibt, wird als Perineurium bezeichnet (238). Es besteht aus Lagen von konzentrisch orientierten, flachen polygonalen Zellen, die durch dünne Lagen an Kollagen voneinander getrennt sind (201). Elektronenmikroskopisch lässt sich neben dem schmalen Zytoplasmasaum der wenig ER, Filamente und viele Pinozytische Vesikel beherbergt, auf beiden Seiten jeder Perineurallage eine Basalmembran darstellen (261). Die Perineuralzellen einer Lage sind untereinander durch *tight junctions* verbunden (175). So bildet das Perineurium als Diffusionsbarriere das zweite Schrankensystem im peripheren Nerven. Es ist bereits kurz nach der Geburt ausgebildet (175) und verhindert das Eindringen schädlicher Substanzen wie Toxine, Antigene oder Infektionserreger ins Neuroparenchym (238). Es reguliert das endoneurale Milieu, da es die Passage von Ionen (z.B. Kalium und Kalzium) und kleinen Molekülen (z.B. Glukose) beschränkt (238). Solch eine Diffusionsbarriere fehlt im Bereich der Dorsal- und autonomen Ganglien, wodurch diese Bereiche für verschiedene Noxen anfällig werden (z.B. *grass sickness* beim Pferd, (182)).

Die Anzahl der Perineurallagen variiert von Nerv zu Nerv und hängt direkt proportional vom Durchmesser der Faszikel ab. Durchschnittlich befinden sich im peripheren Nerven 8 bis 12 Lagen (175) pro Faszikel. An distalen Nervenabschnitten wird mitunter ein nur noch einlagiges Perineurium gefunden (201, 175). Bei sensorischen Nervenendigungen ist das Perineurium überdies an der Bildung von sensorischen Endorganen wie den Muskelspindeln oder Pacinischen Körperchen beteiligt (5). In motorischen Nervenendigungen hingegen öffnet sich das Perineurium trichterartig um die Motorischen Endplatten (175).

Da im Perineurium sensible Nervenendigungen terminieren, lassen sich unter anderem die bei der sensorischen Perineuritis auftretenden Parästhesien erklären (172).

BUNGE et al. konnten im In vitro-Versuch mit einem retroviralen Marker nachweisen, dass die Perineuralzellen trotz ihrer Basalmembran von Fibroblasten abstammen (32). Die Differenzierung von Fibroblasten zu Perineuralzellen wird unter anderem von Schwannzellen gesteuert. Dabei spielt das von Schwannzellen gebildete Protein *desert hedgehog* eine zentrale Rolle (120). Auch bei der Regeneration des Perineuriums nach der Einwirkung von Noxen sind Schwannzellen unabdingbar. POPOVIC et al. (183) diskutieren die zusätzliche Abhängigkeit von regenerierenden Axonen zur vollkommenen morphologischen und funktionellen Restrukturierung eines geschädigten Perineuriums.

Darüberhinaus wird auch von einem möglichen Einfluss von *desert hedgehog* Protein auf die Formierung von Endo- und Epineurium berichtet (32, 174). So bilden bei Nichtvorhandensein von *desert hedgehog* endoneurale Fibroblasten multiple Minifaszikel im Nerv, die den Minifaszikeln von regenerierenden Nerven gleichen (103).

### 2.2.3 Das Epineurium

Das die Gesamtheit aller Faszikel umgebende Gewebe wird als Epineurium bezeichnet. Es besteht aus Lagen von Kollagen 1 und Kollagen 2, sowie elastischen Fasern. Letztere sind vor allem um die Faszikel herum konzentriert (201). Das eher fettreiche, Fibroblasten und Histiozyten enthaltende Epineurium führt Blut- und Lymphgefäße. Mitunter sind auch Mastzellen zu verzeichnen. In Gelenkregionen scheint es besonders ausgeprägt zu sein (175).

### 2.2.4 Die Blutgefäße des peripheren Nervens

Die *Vasa nervorum*, die den Nerv nutritiv versorgen, stammen von regionalen Arterien, die ins Epineurium eindringen. Dort verlaufen sie longitudinal und bilden zahlreiche Anastomosen (201). Daher scheint ein kompletter Infarkt im peripheren Nerven selten aufzutreten (175). Thrombosen und Entzündungen epineuraler Arterien werden im Zuge von Vaskulitiden beschrieben (20). Durch die hierbei resultierende Ischämie kann es zur axonalen Degeneration und folglich zu einer peripheren Neuropathie kommen (94).

Zweige der epineuralen Arterien gelangen via Perineurium unter Mitnahme von kurzen Anteilen von Perineurallagen ins Endoneurium, wo Kapillaren schließlich ein längsorientiertes Netzwerk bilden (201). Die Venen verlaufen ebenso wie die Arterien stets längsorientiert zum Nerven. Epineurale wie transperineurale Gefäße werden durch Plexus nicht-myelinisierter Axone innerviert. BEGGS et al. berichten über eine gestörte Innervation dieser Gefäße bei Menschen mit Diabetes mellitus (9).

### 3 BEARBEITUNGSMETHODEN VON NERVENBIOPSIIEN ZUR DIAGNOSTIK

Die Nervengewebsprobe sollte so schnell wie möglich unter höchst vorsichtiger Manipulation in das Fixiermedium überführt werden (60), wobei vorher das eventuell umgebende Fettgewebe zu entfernen ist (60). Häufig wird empfohlen den Nerven unter leichtem Zug gerade ausgerichtet an beiden Enden fixiert in das Fixativum zu verbringen (87, 213, 27).

Im Weiteren existieren unterschiedliche Protokolle zur Bearbeitung von Nervenbiopsien. BRAUND et al. (27) empfehlen für lichtmikroskopische Untersuchungen die Fixierung in gepufferter 10%iger Formalinlösung. Ein Teil des Nerven wird in Paraffin eingebettet und histologischen Routinefärbungen unterzogen (z.B. Hämatoxylin und Eosin). Eine Spezialmethode zur selektiven Anfärbung bestimmter neuroparenchymatöser Anteile kann fluorochromatisch durchgeführt werden (204). Längs- und Querschnitte der in Paraffin eingebetteten Nerven bieten sich besonders zur Beurteilung interstitieller Komponenten und der darin vorkommenden Zellen an (213). Die Beurteilung pathologischer Vorgänge am Neuroparenchym ist hingegen limitiert, da die Myelinscheide großen Artefakten unterworfen ist (60).

Der zweite Teil der Nervenprobe wird nach BRAUNDS Protokoll (27) über Nacht mit Millonings' Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 4°C gewaschen, um dann für 1 Stunde in 1%igem Osmiumtetroxid nachfixiert zu werden. Osmium ist ein Element der Platinmetalle, das der Fixierung und Schwarzfärbung von Lipiden dient (7). Dann wird der Nerv abermals gewaschen und mit Hilfe von steigenden Alkoholreihen in Kunststoff bzw. Kunstharz eingebettet. Im folgenden können Semidünnschnitte von 1-2  $\mu\text{m}$  werden angefertigt und mit Paraphenylendiamin oder Toluidinblau gefärbt werden. Längs- und Querschnitte von Kunststoffeinfaltungen sind Mittel der Wahl um Neuroparenchym und Interstitium aussagekräftig im Lichtmikroskop beurteilen zu können. Eine neue, kombinierte Bodian-Luxol Färbung soll eine gute lichtmikroskopische Beurteilung von nicht-myelinisierten Nervenfasern ermöglichen (54), was ansonsten elektronenmikroskopischen Untersuchungen vorbehalten ist. Zur Elektronenmikroskopie werden Ultradünnschnitte der Kunststoffeinfaltung angefertigt und mit Uranylacetat oder Bleizitrat kontrastiert. Nicht-myelinisierte Fasern, zytoplasmatische Organellen und Speicherprodukte können so optimal dargestellt werden (60). Mit einer initialen Fixierung in 2,5%igem phosphatgepuffertem Glutaraldehyd anstelle des Formalins können allerdings wesentlich bessere, mit weniger Artefakten beladene Semi- und Ultradünnschnitte angefertigt werden (27).

Ein weiterer Teil der Nervenprobe wird nach BRAUND (27) in 1%igem Osmiumtetroxid über Nacht postfixiert, gewaschen, für 12-24 Stunden in 66%iges Glycerin, und letztendlich zur Anfertigung von Nervenzupfpräparaten in 100%iges Glycerin überführt. Das Zupfen von Nervenfasern (*nerve fiber teasing*) ist Mittel der Wahl zur Beurteilung von pathologischen und regenerativen Vorgängen myelinisierter Fasern (60) über längere Strecken (27). Nach BRAUND sollten unter einer Stereolupe auf einer Glasplatte von jeder Biopsie ungefähr 100 Einzelfasern von unterschiedlichen Faszikeln isoliert werden, ohne dabei nach Größe oder Veränderungen zu selektieren. Je 15 bis 20 Einzelfasern sind auf saubere Objektträger zu überführen, wobei jede eine Mindestlänge von vier bis sechs Internodien umfassen sollte. KALICHMANN et al. (128) setzen bei der Beurteilung ihrer humanen Biopsien eine Mindestlänge von drei Internodien bei 300 Fasern voraus. Auf die Objektträger mit den gezupften Einzelfasern wird 100%iges Glycerin getropft und ein Deckglas aufgelegt, dessen Ecken beispielsweise mit Nagellack versiegelt werden können (87).

Der nicht geteaste, mit Glycerin infiltrierte Nerv kann auch bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und dann zu einem späteren Zeitpunkt bearbeitet und untersucht werden (87). Nach FRANKL und DENARO (87) ist es möglich, die glycerin-infiltrierten Proben zur elektronenmikroskopischen Untersuchung einer Paraffin- oder Kunstharzeinbettung zu unterziehen.

Eine neue Methode zur Korrelation innerer und äußerer Strukturen bei der Beurteilung einzelner myelinisierter Nervenfasern wurde von ZHAO und Mitarbeitern beschrieben (268). Hierbei wird ein Einzelfaserteasing in Kunstharz durchgeführt. Morphologisch interessante Abschnitte werden markiert, isoliert und zu licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen aufbereitet.

Spezielle Anfärbungen zur Viabilitätsprüfung von Schwannzellen am geteasten Nerven wurden von DECHERCHI und Mitarbeitern etabliert (53).

SCHRÖDER schlägt zur Anfertigung von Kunststoff-Semidünnschnitten, Ultradünnschnitten und Nervenzupfpräparaten eine initiale Fixierung in mit 0,1 molarem Sörensen Phosphatpuffer versetztem 3%igem Glutaraldehyd vor (213). Dagegen fixieren DOUGLAS et al. (60) initial in 4%igem Glutaraldehyd mit 0,1 mol/L Cacodylate Puffer bei einem pH von 7,4 für 4 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$ . KALICHMANN et al. fixieren zur Anfertigung von Teasingpräparaten eine Stunde in 2,5%igem Glutaraldehyd, gefolgt von 2 Stunden in 2%igem Osmiumtetroxid, bevor er die Probe in Glycerin überführt (128). Das Standardprotokoll von CASH und BLUMBERGS (35) beschreibt hingegen eine zweistündige Fixierung in mit 0.05 mol/L Natriumcacodylat

gepuffertem 2,5%igem Glutaraldehyd, mit einer Postfixierung in 1%igem Osmium für 2 Stunden.

Einige Autoren (213, 60) schlagen vor, zusätzlich chemisch unfixierte Gefrierschnitte für Spezialuntersuchungen wie Immunhistochemie und molekulargenetische Untersuchungen anzufertigen. Je nach zu untersuchendem Antigen können immunhistochemische Untersuchungen allerdings auch an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Nervenproben durchgeführt werden (40).

Routinemäßig werden Antikörper zur Phänotypisierung von Lymphozyten (40), Identifizierung von Zytokinen und ihren Rezeptoren (222), Immunglobulinen und einigen anderen Komponenten des peripheren Nervens wie Neurofilamente (265) und PMP22 (241) eingesetzt. Ebenso werden Antikörper zur Typisierung von Schwannzellen, Perineuralzellen und Fibrozyten verwendet, was insbesondere in der Tumorklassifizierung große Bedeutung erlangt. Molekulargenetische Techniken wie Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und In situ-Hybridisierung (147) können wie an jedem anderen Gewebe auch eingesetzt werden. So erwiesen sich PCR-Versuche zur Identifizierung mutierter Gene, die für PMP22 codieren, als erfolgreich. Die DNA wurde hierzu aus Paraffinschnitten der Nervenprobe extrahiert (210).

#### 4 ALLGEMEINE PATHOLOGIE DES NEUROARENCHYMS IM PERIPHEREN NERVEN

##### 4.1 Reaktionen und Regeneration im Vergleich zum ZNS

Prinzipiell muss bei den möglichen Reaktionsmustern des Neuroparenchym differenziert werden, welche Anteile des Gewebes zerstört werden. Handelt es sich hierbei um das Neuron selbst, muss man zwischen perikaryalen und axonalen Läsionen unterscheiden. Ist das Perikaryon betroffen, kommt es sowohl im ZNS als auch im PNS zum Absterben der ganzen Nervenzelle, d.h. also dass eine Axondegeneration immer als Folge auftreten muss. Dem Schwund des Axons folgt im ZNS wie auch im PNS eine Atrophie der Hüllzellen, die im Bereich des PNS in der Regel von einer Schwannzellproliferation begleitet ist. Unmittelbare Folge ist jedoch stets ein sekundärer Myelinscheidenzerfall (251).

Ist das Perikaryon hingegen verschont geblieben, und das Axon der Angriffspunkt der Noxe, zeigen sich in ZNS und PNS unterschiedliche Reaktionsmuster. Axonale Degenerationen



können prinzipiell von axoplasmatischen Anteilen – und hier insbesondere dem Zytoskelett – wie auch von Veränderungen des Axolemmes herrühren.

Vereinfacht sollen die Vorgänge am Beispiel einer Nervenfaserdurchtrennung erläutert werden: Kontinuitätsunterbrechungen haben immer die Bildung eines proximalen, aus dem Perikaryon entspringenden, und eines distalen, nicht mehr mit dem Perikaryon, dafür aber mit der Zielzelle in Verbindung stehenden Stumpfes zur Folge. Proximal schließt sich die Axonmembran am distalsten intakt gebliebenen Ranvierschen Schnürring. Das Perikaryon stellt sich funktionell auf regenerationsfähige Syntheseleistung um, was man als Nisslsche Reizung bezeichnet (211). Es kommt zur Abrundung des Zelleibs und zur Chromatolyse (Bildung von Polyribosomen, auch unter Dissoziation der Ribosomen vom rauen endoplasmatischen Retikulum). Der Zellkern kommt exzentrisch zu liegen und ein *synaptic stripping*, d.h. eine Abnabelung von Afferenzen (96), setzt ein. Neurotubuli, Filamente und Mitochondrien sammeln sich im proximalen Axonstumpf an, der dadurch aufgetrieben wirkt. Der distale Axonstumpf atrophiert, woraufhin die Myelinscheide zerfällt. Dieses Phänomen wurde erstmals von WALLER beschrieben und wird daher als Wallersche Degeneration bezeichnet (251).

Im ZNS folgen distal mikroglial-makrophagische Resorptionen und astrozytäre Proliferationen, die in ein Narbenäquivalent übergehen. Diese Vorgänge dauern wenige Tage bis etliche Monate. Die Regenerationsbestrebungen der Nervenzelle vom proximalen Stumpf ausgehend erschöpfen, und es kommt zur Zytonekrose (50). Im peripheren Nerven ist dagegen eine Regeneration sehr wohl möglich. Das Axon sprosst regelrecht aus (*axonal sprouting*), wobei der Großteil der Sprosse letztendlich keinen Anschluss ans Zielorgan bekommt und degenerieren wird. TOFT et al. (239) haben axonale Verzweigungen nach einer Nervenquetschung bei der Ratte untersucht und festgestellt, dass zwei bis vier Wochen nach der Quetschung die Anzahl der distalen Axone um das zwei- bis dreifache zunimmt. Danach nimmt die Anzahl wieder ab. Schließlich ist die Zahl der regenerierten markhaltigen Nervenfasern nicht höher als im proximalen Stumpf, während die Zahl der marklosen Axone noch nach 12 bis 19 Wochen um 18 bis 60% höher bleibt als im normalen Nerv. Das mag daran liegen, dass markhaltige Axone durch vorhandene Schwannzellen geleitet werden und die marklosen Axone nicht einem vorgegebenen Weg folgen, wodurch sie eine größere Tendenz zur Verzweigung haben (211). Bei den markhaltigen Nervenfasern kommt es durch die Zerfallsprodukte der Wallerschen Degeneration am distalen Stumpf zur Proliferation der hier befindlichen glialen Zellen und endoneuralen Fibroblasten. Innerhalb von 5-9 Tagen (50)

entstehen auf diese Weise die sogenannten Hanken-Büngnerschen Bänder, die als Bandfaserstrukturen den Regenerationsweg vorgeben. Hierbei durchdringen regenerierende Axone die Membran der Schwannzellsäulen und heften sich selektiv an die innere Oberfläche der Basalmembran (231). Die Schwannzellen dieses Bereiches unterliegen nicht nur radikalen morphologischen Veränderungen, sondern auch Veränderungen in ihrer Gen-Expression. Das Resultat ist vergleichbar, wenn auch nicht identisch, mit unreifen Schwannzellen im neonatalen Nerv (122). Relativ viel neurotrophe Faktoren - unter anderem NGF - und Zell-Adhäsions-Moleküle enthaltend, bilden sie ein Milieu, das das axonale Wiedereinwachsen einleitet (121). Auf diese Weise, gekoppelt mit der Eigenschaft der Schwannzellen über autokrine Mechanismen auch ohne Axonkontakt überleben zu können, wird die Basis für Regeneration im PNS gebildet.

Im Gegensatz zu Schwannzellvorläufern, die axonales  $\beta$ -Neuregulin benötigen, um zu überleben, können reife Schwannzellen dieses auch ohne Anwesenheit des Axons. Hierbei sezernieren die Schwannzellen selbst ein Gemisch an Wachstumsfaktoren wie IGF2 (*insulin like growth factor 2*), PDGF-BB (*platelet-derived growth factor BB*) und NT3, die synergistisch wirkend den Schwannzelltod verhindern (159). Die Möglichkeit, dass diese Wachstumsfaktoren auch an der Differenzierung bzw. am Überleben anderer Zellen, inklusive der Neuronen, verantwortlich sind, wird diskutiert (120). Auf diese Weise bilden Schwannzellen distal von Verletzungen die Leitschiene für das wieder einwachsende Axon. Entlang dieser Leitschiene gelangen die Axone zu ihren Zielzellen.

Wird der distale Stumpf beispielsweise bei Amputationen ganz entfernt, und der massiv regenerierende proximale Stumpf findet keinen Anschluss, so entstehen schließlich die durchaus sehr schmerzhaften Amputationsneurome (50).

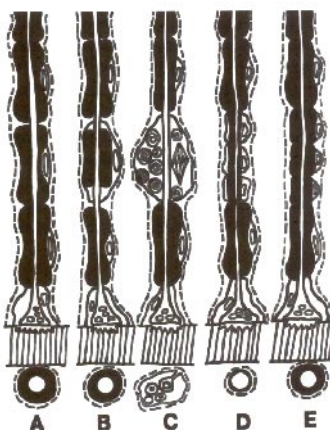


Abb. 7: Stadien der axonalen Degeneration und Regeneration (175)

(A: normaler Nerv. B: 7 Tage nach axonaler Schädigung; Schwannzellen enthalten axonale und Myelindebris; und haben sich zur Formierung von Hanken-Büngnerschen Bändern geteilt. C: Axonsprossung vom proximalen Stumpf aus. D: Remyelinisierung des Axons. E: wiederhergestellte Verbindung mit dem Endorgan; regenerierende Internodien sind kürzer als normal.)

Funktionell kann bei der Graduierung der Nervenschädigung zwischen Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis unterschieden werden. (215). Neurapraxie ist ein vollständig reversibler Funktionsausfall, der sich als Leitungsblock ohne anatomische Unterbrechung darstellt. Bei der Axonotmesis handelt es sich um eine schwere Schädigung des Nervens mit Kontinuitätsunterbrechung der Axone bei erhaltener Nervenhülle. Distal der Schädigung kommt es zur Wallerschen Degeneration, Axonregeneration und funktionelle Wiederherstellung sind jedoch möglich. Neurotmesis beschreibt eine vollständige Durchtrennung der Nervenfasern und ihrer Hüllstrukturen, die eine anhaltende Aufhebung der Leitfähigkeit zur Folge hat.

Nicht nur vom Neuron selbst, auch von glialen Strukturen können pathologische Veränderungen ausgehen. Hierbei können die Schwannzellen bzw. die Oligodendrozyten ebenso wie die Myelinscheide per se betroffen sein (50). Ergebnis ist hierbei ein primärer Markscheidenzerfall und eine Demyelinisierung des Axons. Früher wurde postuliert, dass mit dem Untergang der Markscheide keine Atrophie oder Zerstörung des dazugehörigen Axons verbunden sei und es lediglich zu einem Verlust der Erregungsleitung kommt. Neuere Literatur (19) belegt hingegen, dass axonale Schäden durchaus auch als Folge von Erkrankungen des Myelins auftreten können, da myelinbildende Zellen verschiedene für das Axon trophische Faktoren exprimieren. So wird beispielsweise der von Schwannzellen gebildete *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) nur bei axonalem Kontakt exprimiert (89). Fehlt dieser wie auch andere trophische Faktoren in Folge einer primären Schwannzellschädigung, so geht das Axon zugrunde (19).

Strukturelle Veränderungen des Axons können nicht nur durch Fehlen neurotropher Faktoren zustandekommen. So konnte bei Mäusen mit MAG-Defizit aufgrund einer Modulation des axonalen Zytoskeletts eine progressive axonale Atrophie nachgewiesen werden (266).

Bei Myelinscheidenverlust ist der Organismus versucht, durch Gliazellproliferation und vermehrter Myelinbildung dem demyelinisierenden Prozess eine Remyelinisierung entgegenzusetzen (231). Im Allgemeinen sind hierbei Schwannzellen aktiver als Oligodendrozyten einzuordnen (162). Die Schwannzellen, die die Remyelinisierung einleiten, können aus Teilung der Schwannzellen der angrenzenden Internodien hervorgehen, sowie von benachbarten nicht-myelinisierten Fasern, also ehemaligen Remakzellen, stammen. Ebenso kann sich in einigen Fällen die ursprüngliche Schwannzelle des Internodiums wieder regenerieren (260).

Schwanzzell-Axon-Interaktionen bei remyelinisierenden Prozessen sind vergleichbar mit denen bei einer sich entwickelnden myelinisierten Nervenfasern. Auch hier schieben die Schwanzzellen, wenn sie sich am Axon entlang ausbreiten, die  $\text{Na}^+$ -Kanäle in der axonalen Membran vor sich her (120).

Je nach Ursache, Lokalisation an der Myelinscheide selbst und Häufigkeit der Demyelinisierung, sowie dem Erfolg der Remyelinisierung entstehen die unterschiedlichsten Bilder, die im folgenden Abschnitt bei der Beschreibung allgemeiner Phänomene dargelegt werden sollen.

## 4.2 Beschreibung allgemeiner Phänomene

### 4.2.1 Herkömmliche Klassifikationsmuster geteaster peripherer Nerven

Geteaste Nervenfasern werden seit über 100 Jahren zur Beurteilung von Nervenschädigungen herangezogen (68). Die Einzelfaserdiagnostik wird zur Charakterisierung myelinisierter Fasern in tierexperimentellen (192) und klinischen (126) Studien sowie zur klinischen Routine-Diagnostik (161) durchgeführt.

#### 4.2.1.1 Klassifikationsschema geteaster peripherer Nerven nach DYCK et al.

Das wohl bekannteste Schema zur Klassifizierung geteaster Nervenfasern basiert auf den 9 Kategorien, die von DYCK et al. (68) beschrieben wurden. In Form einer Summationsklassifizierung bestimmt er die Häufigkeit pathologischer Veränderungen einer Nervenbiopsie.

Hier beinhaltet *Kategorie A* Fasern mit normalem Erscheinungsbild. Ist das Myelin extrem irregulär oder gefaltet, wird die Faser der *Kategorie B* zugeordnet. Sind paranodal oder internodal Demyelinisierungen zu verzeichnen, gehört die Faser *Kategorie C* oder *D* an, abhängig von der Dicke des am geringsten myelinisierten Internodiums. Dabei können Myelinovoide im Zytoplasma der Schwanzzellen auftreten oder auch nicht, und das Myelin der

Internodien regelmäßig oder unregelmäßig erscheinen. Eine Degeneration der Gesamtfaser, bestehend aus einer linearen Anordnung von Myelinovoiden beschreibt *Kategorie E*.

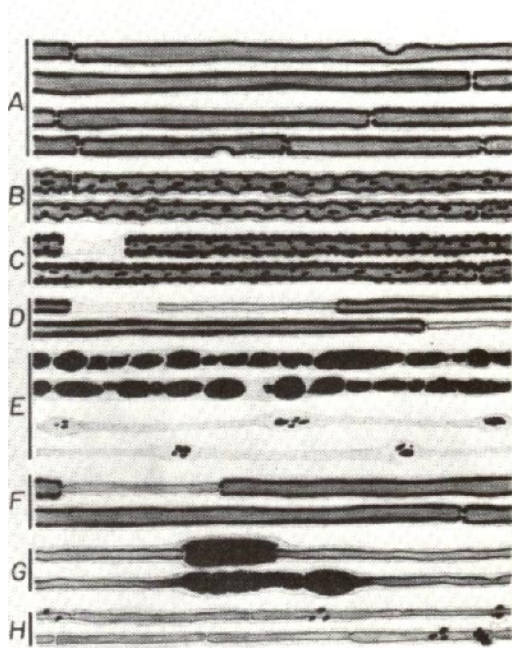


Abb. 8: Klassifikationsschema nach DYCK et al. (68)

*Kategorie F* sind Fasern, deren am dünnsten myelinisiertes Internodium einen um mehr als die Hälfte geringeren Durchmesser aufweist als ihr am dicksten myelinisiertes Internodium. Dabei zeigen die Fasern aber keine segmentale Demyelinisierung auf. Das internodale Myelin kann regelmäßig oder unregelmäßig sein. Sind innerhalb der Internodien keine segmentalen Demyelinisierungen aber globuläre oder tomakuläre Strukturen als „Wurstformationen“ zu verzeichnen, handelt es sich um *Kategorie G*. In *Kategorie H* werden Fasern normalen Erscheinungsbildes aber mit an mindestens zwei Internodien anhaftenden Myelinovoiden eingeteilt.

*Kategorie I* beschreibt eine frühe distale Degeneration, bei der proximale Faserabschnitte intakt oder paranodal oder internodal demyelinisiert sind, und die an distalen Abschnitten Myelinovoide aufweisen.

#### 4.2.1.2 Klassifikationsschema geteaster peripherer Nerven nach KALICHMANN et al.

KALICHMANN et al. (128) üben an den Summationskategorien von DYCK et al. dahingehend Kritik, als dass hier durch die große Variabilität innerhalb der einzelnen Kategorien Information verloren gehen kann. Daher nehmen sie eine konkrete Beschreibung von Einzelfaserveränderungen vor, die sie folgendermaßen einteilen:

Eine Kategorie stellt die *Wallerische Degeneration* mit ihrer linearen Reihe von mindestens drei Myelinfragmenten entlang eines degenerierenden Axons dar.

Bei der *Demyelinisierung* kommt es zum teilweisen oder ganzen Myelinverlust mindestens eines Internodiums, beim ansonsten intakten Nerven. Die Länge der Internodien spielt dabei keine Rolle. Die *Hypomyelinisierung* ist definiert als ein im Vergleich zu seinem benachbarten

Internodium mindestens um 50% weniger myelinisiertes Internodium, wobei die Länge des Internodiums mindestens 60% des längsten Internodiums der Faser beträgt.

Bei der Kategorie der *Remyelinisierung* der Einzelfaser muss wenigstens ein Internodium mindestens 60% kürzer als das längste Internodium sein. Die Dicke der Myelinscheide kann hierbei normal oder reduziert sein. KALICHMANN bezeichnet den Übergang von demyelinisierten zu remyelinisierten Nervenfasern als fließend, weshalb er in Zweifelsfällen die Hypomyelinisierung vorschlägt.

Als *abnormale paranodale Myelinisierung* wird ein Paranodium mit einer Myelinscheidendicke von weniger als 50% im Vergleich zum restlichen Internodium, oder aber ein geweiteter Schnürringbereich bezeichnet, wobei mechanische Artefakte ausgeschlossen werden müssen.

In die Kategorie der *unklassifizierbaren* Nervenfasern fallen diejenigen, welche inadäquat osmiumgefärbt, zu kurz (weniger als drei Internodien) oder mit anderen Fasern verflochten sind. Eine Faser, die in keine der genannten Kategorien fällt, ist als *normal* zu bezeichnen.

#### 4.2.2 Axonale Degeneration und ihre Folgeprodukte

Die Ausprägung axonaler Reaktionen auf Noxen hängt von Alter, Spezies, Art des Neurons ebenso ab, wie von der Art der Läsion und ihrer Nähe zum Zellleib. So verursacht beispielsweise eine Axonotomie bei Jungtieren abrupte und stärkere Veränderungen als bei erwachsenen Individuen. Genauso verursacht eine Kontinuitätsunterbrechung des Axons in proximalen Bereichen eine beschleunigte und schwerwiegendere Reaktion als eine weiter distal gesetzte Läsion (229).

Frühe Stadien axonaler Degeneration zeigen sich durch progressive Modifikationen des Axoplasmas (161). Es kommt zur elektronenmikroskopisch nachvollziehbaren Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums. Das Axon schwillt zunehmend an und die Neurofilamente werden durch Proteolyse rarifiziert und auseinandergerissen (41). An ihre Stelle tritt ein lockeres Netzwerk, bestehend aus fein zerstreutem, granulärem Material. Pathogenetisch wird bei der axonalen Degeneration  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cystein-Proteasen (Calpaine) eine bedeutende Rolle zugeschrieben (253). THOMAS und SPENCER (226) vermuten, dass Axoplasmabestandteile von Schwannzellen phagozytiert werden und so Axon-Schwannzell-Netzwerke bei axonaler Degeneration auch internodal gehäuft auftreten (vgl. auch

Kapitel 2.1.3). Man nimmt an, dass es sich beim Säuger um einen synchronen Zusammenbruch des Axoplasmas entlang des gesamten distalen Stumpfes handelt (58). Das Axolemm degeneriert in etwa zur gleichen Zeit (41).

Folge einer axonalen Degeneration ist stets der bereits angesprochene sekundäre Myelinscheidenzerfall. Je nach Stadium kann die Wallersche Degeneration in Stadium I bis IV unterteilt werden. Elektronenmikroskopisch lassen sich zwei bis drei Stunden nach einer Durchtrennung der Nervenfasern Fragmentationen des Zytoskeletts nachweisen, die die beginnende Wallersche Degeneration anzeigen. Der sekundäre Myelinscheidenzerfall nimmt an den Ranvierschen Schnürringen seinen Ursprung, indem sich das Myelin hier zurückzieht (229). Nach 12 bis 36 Stunden beginnt das internodale Myelin sich im Bereich der Schmidt-Lantermanschen-Kerben zuerst aufzublättern (Stadium I) (90), um sich anschließend zu segmentieren (Stadium II) (255). Eine lineare Reihe an Ovoiden entsteht, die nach Cajal auch als Digestionskammern bezeichnet werden (Hinweis bei 229). Sie enthalten degeneriertes Myelin und zentral Axonsegmente (Stadium III). Die Myelinovoide zerfallen, und ein Axon ist nicht mehr zu erkennen (Stadium IV).

BIGNAMI et al. (17) wiesen bei Rattennerven anhand einer Immunfluoreszenzmethode mit Neurofilamentantiserum axonale Debris nach gesetzten Nervenläsionen nach. Im Falle des N. opticus war noch nach 4 Monaten axonale Debris nachweisbar. Beim N. ischiadicus fiel die Immunfluoreszenz bereits 10 Tage nach Nervendurchtrennung nahezu negativ aus. Im peripheren Nerven wird die Myelindebris innerhalb von kurzer Zeit zuerst von ortsständigen, dann vor allem von einwandernden Makrophagen ebenso wie von Schwannzellen selbst phagozytiert. Auch endoneurale Fibroblasten können phagozytotisch aktiv sein. Diese *myelin clearance* beginnt proximal und setzt sich nach distal fort. Beim Nager ist nach drei Wochen nahezu keine Myelindebris mehr vorhanden, wohingegen beim Menschen sieben Monate nach Nervendurchtrennung noch Debris enthaltende schaumige Makrophagen nachzuweisen waren (41). Im ZNS ist die Entfernung des Myelins auch bei Ratten ein eher langwieriger Prozess (141). So wurde nachgewiesen, dass das Myelin, das 90 Tage nach Degeneration des N. opticus isoliert wurde, noch aus normalen Protein- und Lipidkomponenten bestand (18).

Ausschlaggebend für den Myelinscheidenzerfall scheint ein Signal des degenerierenden Axons zu sein (108). Die Initiierung des Axonzerfalls ist wiederum von der baldigen Einwanderung hämatogener Makrophagen abhängig (91). Wird dies unterbunden, verlängert sich die „Überlebenszeit“ des Axons nach der Neurotomie (229).

Als häufigste Form der axonalen Erkrankung sei die sogenannte distale Axonopathie genannt (37). Besonders betroffen sind hierbei die distalen Anteile sehr langer Nerven. Wirken in diesen Bereichen Noxen, gleich welcher Genese, ein, so ist die Aufrechterhaltung bzw. die Wiederherstellung weit vom Perikaryon entfernter, geschädigter Bereiche in erster Linie ein logistisches Problem und es kommt an dieser Stelle zur axonalen Degeneration. Diese setzt sich retrograd Richtung Zellkörper fort (37) und wird daher auch als *dying back neuropathy* bezeichnet (36).

Im vorangegangenen Abschnitt wurden bereits die Regenerationsmechanismen beschrieben. Das typische Bild einer regenerierten Nervenfasers setzt bereits zwei Tage nach Läsion (102) in Form von axonaler Sprossung als Folge der distalen Degeneration ein. Typischerweise sind in diesem Bereich die Internodien kürzer und dünner myelinisiert als im proximalen Stumpf (128).

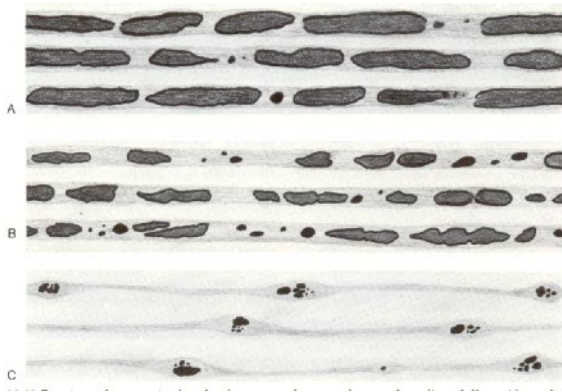


Abb. 9: Stadien der Wallerschen Degeneration im Teasingpräparat von proximal (A) nach distal (C) bei einer *dying back neuropathy* (68)

#### 4.2.3 Primäre Veränderungen der Myelinscheide und ihre Folgen

Prinzipiell kann bei demyelinisierenden Prozessen das kompaktierte oder das nicht kompaktierte Myelin betroffen sein. Beim nicht kompaktierten Myelin gehen Veränderungen von den Schmidt-Lantermanschen Kerben oder den Paranodien aus. Von Demyelinisierung wird jedoch erst gesprochen, wenn die Veränderungen auf benachbartes kompaktiertes Myelin übergreifen.

Rein deskriptiv kann die Demyelinisierung segmental, also ein ganzes Internodium betreffend, oder interkalierend sein. Gemäß der Definition nach KALICHMANN et al. (128) nehmen interkalierende Veränderungen ihren Ursprung paranodal.

Die Myelindebris wird auch hier von Makrophagen, Fibroblasten und nicht geschädigten Schwannzellen resorbiert. Zudem wirken Mastzellproteasen myelinolytisch, und ihre Rolle bei demyelinisierenden Neuropathien wird diskutiert (125)



Veränderungen des Schwannzellzytoplasmas können sich ebenfalls derart auswirken, dass es zur Demyelinisierung kommt. Sie sind mit Hilfe von Elektronenmikroskopie zu klassifizieren. Eine ausführliche Bezugnahme würde den Rahmen an dieser Stelle sprengen. Es sei nur soviel erwähnt, dass prinzipiell intrazisternale (242) und mikrotubuläre Einschlüsse (211), vakuoläre Erweiterungen (248), Kernveränderungen und mitochondriale Anomalien (211) beschrieben sind.

#### 4.2.3.1 Segmentale Demyelinisierung und Remyelinisierung

Die segmentale Demyelinisierung kann als Myelinverlust eines oder mehrerer Internodien bei einer ansonsten intakten Nervenfaser definiert werden (128). In der Regel handelt es sich hierbei um primäre Vorgänge. Sie können allerdings im Falle von urämischen Neuropathien beim Menschen (67), der Friedreichs Ataxie (71) oder als Ergebnis permanenter Axotomie (72) infolge axonaler Atrophien auftreten.

Nach KALICHMANN et al. sind segmentale Demyelinisierungen am eindeutigsten in ihrer Anfangsphase zu erkennen, wenn von Makrophagen phagozytierte Myelinfragmente um ein intaktes Axon herum akkumulieren. Kurz darauf wird das demyelinisierte Internodium remyelinisiert und ist dann häufig schwer von einer Hypomyelinisierung zu unterscheiden (128). Dies geschieht indem zwei oder mehrere benachbarte Schwannzellen einspringen (128). Resultat ist daher zunächst die Verkürzung des Internodiums und, zumindest in Anfangsstadien, eine dünne Myelinscheide.

Kommt es zur übersteigerten segmentalen De- und Remyelinisierung, proliferieren die Schwannzellen derart, dass sich sogenannte Zwiebelschalenformationen (*onion bulbs*) bilden (211, 66). Diese sind im peripheren Nerven jedoch im Rahmen ganz unterschiedlicher hyper-, dys- oder neoplastischer Proliferationen nicht nur von Schwann- sondern auch von Perineuralzellen beschrieben (144). So ist beim Beurteilen dieser histologisch gut aufzeigbaren Zwiebelschalenformationen differentialdiagnostisch beispielsweise ein Perineurinom, wie auch ein intraneurales Fibrom oder aber ein besonders konzentrisch geschichteter Renaut-Körper in Erwägung zu ziehen (144). Abgrenzungen können durch elektronenmikroskopische sowie immunhistochemische Untersuchungen erfolgen.

#### 4.2.3.2 Paranodale Demyelinisierung und Remyelinisierung

Bei vielen Erkrankungen des peripheren Nervens beginnen pathologische Veränderungen sich in der paranodalen Region darzustellen. Hierbei kann das paranodale Myelin dünner erscheinen oder aber der Schnürringbereich länger wirken. Das restliche Internodium zeigt ein normales Erscheinungsbild (128). Die Veränderung kann demnach als interkalierende Veränderung beschrieben werden.

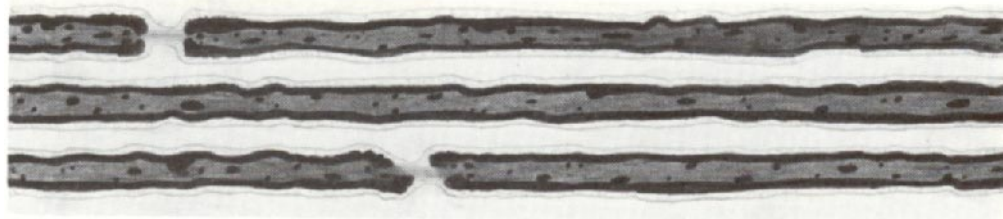


Abb.10:  
beginnende  
paranodale  
Demyelinisierung  
(68)

Ist die paranodale Demyelinisierung weit genug fortgeschritten, wird an dieser Stelle eine neue Schwannzelle ihren Platz einnehmen und das Ergebnis wird ein sehr kurzes und häufig auch dünnes Internodium sein. KALICHMANN et al. bezeichnen solche Internodien als *interkalierende Internodien* (128). SUMMERS et al. (229) hingegen bezeichnet remyelinisierte Internodien nach segmentaler Demyelinisierung als interkalierende Internodien.



Abb.11:  
interkalierende  
Internodien  
(68)

#### 4.2.3.3 Fokale Schwellungen der Myelinscheide

Bei diversen demyelinisierenden Neuropathien sind fokale Schwellungen und tomakuläre Strukturen der Myelinscheide in geteaseten Einzelfaserpräparaten beschrieben (200; 33). Diese Prozesse können sich sowohl paranodal als auch segmental manifestieren und letztendlich als Zeichen einer Demyelinisierung gewertet werden. Dabei sind nur Myelinverdickungen die über 50% des Gesamtfaserdurchmessers betragen als tomakulär zu bezeichnen (245). Im Gegensatz zu den Myelinovoiden der Wallerschen Degeneration sind Tomakula nicht abgesetzt und somit als wurstartig zu umschreiben.

Die Ursache der Myelinverdickungen kann vielgestaltig sein. Meist führen genetische oder immunologische Defekte von Myelinkomponenten (200) zur derartigen Umstrukturierung der Myelinscheide.

Ursprünglich geht der Begriff „tomakuläre Neuropathie“ auf die HNPP (*hereditary neuropathy with pressure palsies*) des Menschen zurück (11). Hierbei liegt ein Defekt des für das Myelinprotein PMP22-exprimierenden Gens vor. PMP22 ist unter anderem an der Festlegung der Myelinscheidendicke beteiligt, indem es das Myelinwachstum supprimiert. Tomakuläre Strukturen entstehen folglich durch Vermehrung von Schwannzellloops und Hypermyelinisierung aufgrund exzessiver Bildung von Myelinlamellen (200). Prinzipiell kann die Veränderung eines jeden Myelinproteins eine Umformierung der Myelinscheide bewirken. So sind beim Menschen verschiedene Formen der HMNS bzw. CMT beschrieben, bei denen es unter anderem durch Myelinausstülpungen zur Bildung tomakulärer Strukturen kommt. Ebenso können Myelineinfaltungen zu fokalen Schwellungen der Myelinscheide führen. Eine lamellenartige Aufsplitterung der Myelinscheide, wie sie bei der Ablagerung von Autoantikörpern gegen das MAG beschrieben ist (249,194), kann ebenfalls eine Ursache darstellen.

Ebenso können Myelinschwellungen und wurstartige Verdickungen durch Myelinscheidenödeme, im Zuge entzündlich-demyelinisierender Neuropathien auftreten (199), bedingt sein.

Inwieweit eine von verschiedenen Untersuchern beschriebene lichtmikroskopisch darstellbare paranodale Schwellung mit dem Phänomen der elektronenmikroskopisch darstellbaren axoglialen Ablösung einhergeht ist umstritten. Hierbei lösen sich die terminalen loops des Schwannellzytoplasmas vom paranodalen Axon ab (218).

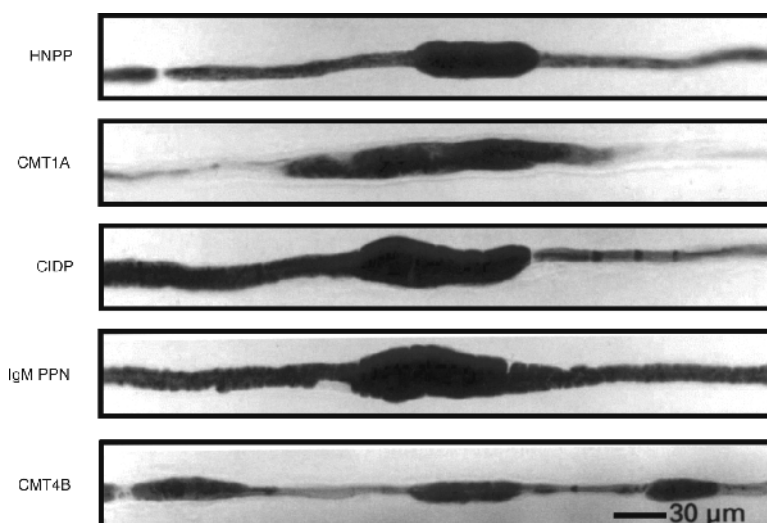


Abb.12: tomakuläre Veränderungen in Teasingpräparaten bei unterschiedlichen hereditären Neuropathien des Menschen (200)

## 5 SYSTEMATISCHER ÜBERBLICK ÜBER ERKRANKUNGEN DES PERIPHEREN NERVEN

Die Einteilung von peripheren Neuropathien kann unter verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen: die *Topik* betreffend unterscheidet man die reine Neuropathie von einer Radikuloneuropathie (233), und nach *Anzahl* der beteiligten Nerven Mono- und Polyneuropathien (209).

*Morphologisch* ist eine Differenzierung in bevorzugt interstitielle und bevorzugt parenchymatöse Läsionen sinnvoll (20), wobei hier wiederum zwischen axonalen, demyelinisierenden und gemischten Neuropathien unterschieden werden muss. Interstitielle Veränderungen sind meist entzündlicher Natur (254). Mitunter gehen aber auch Stoffwechselstörungen mit einer Speicherung von Metaboliten im Interstitium einher (94, 93).

*Funktionell* sind sensorische, motorische, sensomotorische und autonome Neuropathien zu unterscheiden (50, 209).

Des Weiteren ist eine Einteilung nach *ätiologischen Gesichtspunkten* möglich (50). In diesem Sinne können hereditäre Neuropathien den erworbenen gegenübergestellt werden. Hierzu zählt man dysmetabolische, toxische, nutritive, endokrinopathische, paraneoplastische, infektiöse, autoimmune, traumatische, vaskuläre und idiopathische Nervenerkrankungen.

Darüberhinaus ist rein *deskriptiv* eine Unterteilung in entzündliche, degenerative und neoplastische Neuropathien sinnvoll.

### 5.1 Entzündliche Veränderungen des PNS

Von entzündlichen Erkrankungen sind am peripheren Nerven radikuläre Strukturen oft massiver betroffen als nachgeschaltete Anteile (229). Hierbei stehen bei den meisten Entzündungen primär interstitielle Veränderungen im Sinne von Vaskulitiden und entzündlichen Ödemen mit Infiltraten von mononukleären Entzündungszellen und Makrophagen im Vordergrund, wobei auch die Anzahl von Fibroblasten und Mastzellen häufig steigt (254). Nach GREHL und SCHRÖDER (98) sind degenerierende Fibroblasten als Indiz für entzündliche Veränderungen zu werten. Entzündliche Infiltrate können aber auch als rein resorptives Phänomen ohne vaskulitische und ödematöse Komponenten auftreten. Am Neuroparenchym kann es bei interstitiellen Entzündungen sekundär zu demyelinisierenden Prozessen, seltener auch zur axonalen Degeneration kommen. Manchmal unterliegt das

Perineurium ebenfalls entzündlichen Veränderungen. Als in erster Linie perineurale Strukturen betreffende Entzündung gilt die sensorische Perineuritis des Menschen (172). In der Literatur sind vor allem bei Hund (243, 47, 16) und Katze (217, 86) akut und chronisch verlaufende idiopathische Poly(radikulo)neuritiden beschrieben. Daneben werden auch infektiös bedingte Poly(radikulo)neuritiden viraler Genese wie z.B. bei Tollwut, caninem Herpesvirus und Pseudotollwut (229) aufgeführt. Insbesondere bei Jungtieren kommen protozoäre Polyradikuloneuritiden, beispielsweise bei Infektion mit *Toxoplasma gondii* (75, 167) und *Neospora caninum* (48, 62) vor.

Seltener ist das Neuroparenchym selbst Angriffspunkt der Entzündung. Bei entzündlich demyelinisierenden Neuropathien ist histopathologisch eine Myelinclearance durch Makrophagen und eine variierende Anzahl an infiltrierenden Lymphozyten zu verzeichnen (104). Mit Hilfe von immunzytochemischen Untersuchungsmethoden können in einigen Fällen IgG-Antikörper und Komplementfaktoren in der Myelinscheide nachgewiesen werden (95, 28). In Teasingpräparaten zeigen sich bei chronisch entzündlichen demyelinisierenden Polyneuropathien neben Infiltraten deutliche, in erster Linie paranodale Demyelinisierungen, sowie interkalierende Internodien und remyelinisierte Fasern (28). Entsprechende Befunde findet man häufig in protrahierten Stadien des Guillain-Barré-Syndroms (4, 115) des Menschen beschrieben. Als Tiermodell dieser Erkrankung dient die experimentelle autoimmune Neuritis (269). Pathogenetisch wird bei beiden eine autoimmune Komponente gegen noch nicht genau definierte Anteile der Myelinscheide postuliert (4, 269). Einige Autoren (49, 113) ziehen Vergleiche zu der in Nordamerika auftretenden *Coonhound Paralysis* (229) und zur akuten idiopathischen Polyneuritis des Hundes (84).

In seltenen Fällen können derartige Autoimmunreaktionen auch gegen axonale Strukturen gerichtet sein (4, 115).

## 5.2 Degenerative Veränderungen des PNS

### 5.2.1 Neurodegenerative Erkrankungen im engeren Sinne

Neurodegenerative Erkrankungen im engeren Sinne sind hereditäre Veränderungen des Neuroparenchyms. Schwannzellen können aufgrund genetischer Defekte von Myelinproteingenen unfähig sein, eine stabile Myelinscheide zu bilden bzw. aufrecht zu erhalten (200). In Teasingpräparaten finden sich hierbei fokale Schwellungen und tomakuläre Erweiterungen der Myelinscheide (200; 33). Ultrastrukturell lassen diese sich als überschüssige

Schwanzzellloops und als exzessive Bildung von Myelinlamellen (200) sowie Myelinausstülpungen oder Myelineinfaltungen (33) darstellen. In der Tiermedizin kommt dahingehend die Canine Hereditäre Hypertrophe Neuropathie beim Tibetischen Mastiff vor (227). Nach primärer Demyelinisierung kommt es durch Schwanzzellproliferation zur Formierung primitiver Zwiebelschalenformationen. Kongenitale Schwanzzelldefekte können aber genauso zu einer rein hypomyelinisierenden Polyneuropathie führen. (26, 156)

Manchen neurodegenerativen Erkrankungen liegen andererseits axonale Veränderungen zugrunde. Hierbei kann es durch eine Anhäufung von Neurofilamenten zur deutlichen axonalen Schwellung kommen (135). Im Extremfall führt diese zur Riesenaxon neuropathie, die sich unter den Haustieren gelegentlich beim Hund als eine sensomotorische Nervenerkrankung manifestiert (64, 65).

### 5.2.2 Speicherkrankheiten

Speicherkrankheiten sind hereditäre Enzymdefekte, die den Gesamtorganismus betreffen. Mitunter beziehen sie das periphere Nervensystem ein bzw. manifestieren sich hier besonders deutlich (50). Dabei reichern sich die Stoffwechselprodukte, die nicht abgebaut werden häufig in phagozytisch aktiven Zellen an (131, 107). So können wie beispielsweise bei der globoidzelligen Leukodystrophie (246) diffuse Myelindegenerationen in großen globoiden Makrophagen oder wie bei der feline Form der Niemann-Pick-Krankheit (46) auch in Schwannzellen beobachtet werden. Mitunter kommt es im Zuge von Speicherkrankheiten auch ohne Veränderungen der Myelinscheide zur Speicherung membrangebundener Vesikel in Schwannzellen (127). Darüberhinaus kann bei Speicherkrankheiten, wie beispielsweise der atypischen GM2-Gangliosidose des Hundes (229), eine Degeneration myelinisierter Axone auftreten.

### 5.2.3 Dysmetabolisch-toxische Erkrankungen

Auch systemische dysmetabolische Zustände manifestieren sich mitunter am peripheren Nerven. Die hierbei häufig einsetzende axonale Degenerationen mit sekundärer Myelinveränderung (74, 267,23) zeigt sich besonders gut in Zupfpräparaten (211), was bereits aus der Erstbeschreibung der segmentalen Demyelinisierung bei Urämischer Neuropathie

hervorgeht (235). Elektronenmikroskopisch findet man hier zusätzlich feinvesikuläre Schwellungen und Zerfall paranodaler Markscheidenlamellen (186).

Im Zuge von Diabetes mellitus kann eine distale axonale Degeneration auftreten (229), die mit Hilfe der Einzelfaserdiagnostik ebenfalls schön darzustellen ist. Sie entsteht durch Reduktion der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaseaktivität (211), wodurch es zum gestörten Proteinmetabolismus in den Perikaryen und zur *dying-back* Neuropathie kommt (23). Die Pathomechanismen und Primärlokalisationen der diabetogenen Neuropathie sind jedoch multifaktoriell. So schreiben einige Untersucher verschiedenen Schwanzzell- und Myelinscheidenveränderungen per se die Hauptrolle zu (164). Neben paranodalen Demyelinisierungen sind anhand von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen Myelinscheidentrennungen und –*ballooning*“ beobachtet worden (164). Es ist anzunehmen, dass Myelindefekte durch eine abnorme Proteinglykolyse (198) oder eine veränderte Expression von Myelinproteinen zustandekommen (164). Im Zusammenhang mit diabetischen Neuropathien wird auch eine vaskuläre Genese diskutiert (9, 234). Strukturelle Alterationen von Mikrogefäßen und gestörte Innervation der Vasa nervorum können zu Hypoxie führen und somit ischämische Veränderungen (vgl. 5.2.4) hervorrufen. Im Endoneurium ist zudem eine starke Erhöhung der Kollagendichte zu verzeichnen, die BRADLEY et al. (21) immunhistochemisch als Vermehrung von Kollagenfasertypen IV, V und VI identifizierten.

Bei der hypothyreoten Neuropathie des Menschen (158) und des älteren Hundes (23) sind anhand von Licht- und Elektronenmikroskopie dystrophische und regenerative Veränderungen der Axone mit Regenerationsgruppen kleiner, dünnbemerkter Fasern zu beobachten. Mukoide Substanzen im Sinne eines ausgeprägten Myxödems können Kompressionen des Neuroparenchyms bewirken (216). In gleichem Maße sind segmentale De- und Remyelinisierung in Teasingpräparaten festzustellen.

Im Zuge von Cushing-Neuropathien sind beim Hund lichtmikroskopisch hypomyelinisierte Fasern und Zwiebelschalenformationen, und in Teasingpräparaten segmentale Demyelinisierung und kurze interkalierende Internodien beschrieben (24).

Neben diesen endogenen Noxen haben viele exogene Substanzen ähnliche neurotoxische Effekte. Verschiedene Giftstoffe greifen an neuroparenchymatösen Strukturen des PNS an. Es würde an dieser Stelle den Rahmen sprengen, auf einzelne Substanzen genauer einzugehen. Daher seien hier nur exemplarisch einige Schwermetalle angeführt, deren Schädigungsmuster

Modellcharakter für andere PNS-Erkrankungen besitzt. Distale Axonopathien werden in diesem Sinne insbesondere bei Organophosphat- (224) und chronischen Thalliumvergiftungen (132) beobachtet. Quecksilbervergiftungen können dagegen durch Degeneration der Zellkörper und anterograde Axondegenerationen ebenfalls distale Symptomatiken hervorrufen (229). Bei der chronischen Bleivergiftung wird neben der axonalen Degeneration zusätzlich eine Schädigung von Schwannzellen beschrieben (184, 264).

Ebenso ist bei Einsatz zahlreicher Medikamente auch in therapeutischen Dosen eine Neurotoxizität vorprogrammiert. Chemotherapeutika wie Vincristin (253) und Taxol (2) greifen beispielsweise am Zytoskelett an. Anhand immunhistochemischer Untersuchungen mit monoklonalen MAP-Antikörpern wurden Parallelen zwischen Pathomechanismen der Wallerschen Degeneration und der Vincristin-induzierten Neuropathie aufgezeigt (253).

#### 5.2.4 Ischämische Neuropathien

Zur Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung kann es durch Thrombosen, Embolien, Entzündungen wie beispielsweise einer Polyarteritis nodosa (247), Gefäßspasmen und Tumoren kommen (185). Ischämien treten ebenso als Folgeerscheinungen von Krankheiten, die sekundär mit Gefäßalterationen einhergehen, auf (234).

Bei der Katze ist eine ischämische Neuromyopathie nicht selten durch Aorten- oder Femoralisthromben bedingt (99). Als Folgeerscheinung kommt es in erster Linie zur Nekrose faszikulärer Komponenten (136). Degenerative axonale Veränderungen stehen hierbei im Vordergrund und liegen meist im Zentrum der Faszikel (229,247). Elektronenmikroskopisch stellen sich axonale Läsionen als Schwellungen infolge Akkumulation vesikulärer Strukturen, Filamenten oder abnormen Mitochondrien dar (247). Die Vulnerabilität von Schwannzellen gegenüber Ischämien zeigt sich durch segmentale Demyelinisierungen (247, 111). Je nach Ausmaß der Schädigung können Remyelinisierung und axonale Regeneration zur Wiederherstellung der neuronalen Funktion führen (229).

#### 5.3 Neoplastische Veränderungen PNS

Klinische Bedeutung erlangen neoplastische Erkrankungen in erster Linie beim Hund, bei dem Neoplasien der peripheren Nerven und ihrer Wurzeln rund 16% aller Nerventumoren ausmachen (152). Prinzipiell können sowohl die Hüllstrukturen des peripheren Nervens, wie



auch das Neuron selbst tumorös entarten (202). Tumore neuronalen Ursprungs sind bei Tieren eher selten (22, 116).

Bösartige Veränderungen der Hüllstrukturen sind lichtmikroskopisch als maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) anzusprechen (79). Zur Differenzierung in Schwannzell-, Fibroblasten- oder Perineuralzellursprung sind weitere diagnostische Untersuchungen wie Elektronenmikroskopie oder Immunhistochemie vonnöten (229). Schwannzellproliferationen sind immunhistochemisch anhand ihrer S-100- und Leu 7-Positivität zu identifizieren (177). Bei Perineuralzelltumoren ist eine deutliche Laminin- und Kollagen-IV-Positivität und, zumindest in der Humanmedizin, eine Expression von *epithelial membrane antigen* darstellbar (256, 152).

Ein meist gutartiger Tumor der Schwannzellen wird als Schwannom bezeichnet (229, 202). Beim Neurofibrom handelt es sich ebenfalls um einen Tumor der Schwannzelllinie, der mit Beteiligung von Fibroblasten oder Perineuralzellen einhergeht (202). Als in der Regel benigne Veränderung der Perineuralzellen gilt das Perineurinom (202).

An dieser Stelle seien noch Neoplasien außerhalb des PNS angesprochen, die im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms periphere Neuropathien verursachen. Beim Hund sind sie häufig nicht mit klinischen Symptomen korreliert, sondern nur pathomorphologisch zu beobachten (25). In Nervenzupfpräparaten waren Myelinovoide im Zuge von axonalen Degenerationen (244) ebenso nachweisbar, wie paranodale und segmentale Demyelinisierungen und deren Regenerationsprodukte (25). Als Ursache werden hierfür metabolische Faktoren und immunologische Störungen diskutiert (25, 118). Die immunologische Pathogenese beruht wahrscheinlich auf der Ähnlichkeit zwischen Tumorantigenen und Myelinproteinen (85, 139)

## 6 GRUNDLAGEN DER ELEKTRODIAGNOSTIK

Strukturelle Veränderung des Neuroparenchyms gehen mit entsprechenden elektrophysiologischen Konsequenzen einher. Sie können sowohl zur Verminderung der Nervenleitgeschwindigkeit wie auch zur insuffizienten Innervierung von Endorganen führen. Diese pathophysiologischen Veränderungen lassen sich mit Hilfe der Elektrodiagnostik erfassen.

Im Gegensatz zur Nervenbiopsie stellt die Elektrodiagnostik eine nicht-invasive Methode in der Diagnostik peripherer Neuropathien dar. Grundsätzlich ist hierbei zwischen Elektromyographie, die elektrische Muskelaktivität aufzeichnet, und Elektroneurographie, bei

der Geschwindigkeit und Homogenität der Nervenleitung gemessen werden, zu differenzieren (250). Veränderungen der Myelinscheide manifestieren sich in einer Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit oder im Leitungsblock. Erkrankungen von Axonen führen zur Denervation der Muskelfasern und zu reduzierter Erregbarkeit der Muskulatur. Die Denervation von Muskelfasern wird im Rahmen der elektromyographischen Untersuchung in der Tiermedizin in erster Linie anhand von pathologischen Spontanaktivitäten erfasst. An Hand von elektroneurographischen Untersuchungen kann die Erregbarkeit der Muskulatur getestet werden (83). Die Untersuchung sensibler Nerven wird in der Tiermedizin nicht durchgeführt.

Bei der elektromyographischen Untersuchung werden mit Hilfe von Nadelelektroden (250) Muskelpotentiale aufgezeichnet, die in Form akustischer Signale ertönen und in Kurven auf den Bildschirm projiziert werden. Beim Tier beschränkt sich die Diagnostik wie bereits erwähnt im Wesentlichen auf den Nachweis pathologischer Spontanaktivität, die prinzipiell neuro- oder myogen bedingt sein kann. Das bedeutet, dass ein Aktionspotential aus der Muskelzelle selbst heraus entsteht, oder durch unphysiologische nervale Impulse hin auftaucht. Pathologische Spontanaktivitäten sind als Fibrillationen, positiv scharfe Wellen, Faszikulationen, myotone Entladungen oder komplex repetitive Entladungen beschrieben. Aber auch eine Veränderung Einstichaktivität kann Hinweise auf Erkrankungen geben. Bei einer verminderten Anzahl funktionsfähiger Muskelzellen durch Denervation oder Entzündung ist sie reduziert.

Zur Untersuchung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) wird der Nerv an mindestens zwei Stellen stimuliert. Die Muskelantwort ist distal an der Gliedmaße an einem von dem untersuchten Nerven innervierten Muskel abzuleiten (173). Durch die Untersuchung in mehreren Teilstücken ist eine Lokalisierung der Schädigung möglich, da die NLG distal der Läsion normal sein kann.

Anhand des sogenannten Muskelsummenaktionspotentials (MSAP) wird die Erregbarkeit des Muskels nach elektrischer Stimulation seines motorisch innervierenden Nervens abgeleitet (83). Die Zeit, die zwischen Stimulation und Muskelantwort vergeht, wird als Latenzzeit bezeichnet. Sie hängt von der Übertragung des Stimulus auf den Nerven, der Leitungszeit im Nerven, der neuromuskulären Übertragung und der Ausbreitung des Aktionspotentials im Muskel ab. Zu einer verlängerten Dauer der MSAP-Kurve kommt es vor allem bei demyelinisierenden Erkrankungen, da die langsam leitenden Fasern zur späteren Erregung der Muskelzellen führen. Die Amplitude der MAPS ist vor allem bei axonalen Veränderungen

---

vermindert, da die Anzahl der erregten motorischen Einheiten sich verringert (83). Auch neuromuskuläre Übertragungsstörungen und ein Leitungsblock bei demyelinisierenden Erkrankungen können niedrige Amplituden bewirken (44). Am aussagekräftigsten ist hier letztendlich die Messung der Fläche unter der MSAP-Kurve, die der Anzahl der erregten Muskelfasern direkt proportional ist.

### III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 1 ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll ein Beitrag zur Interpretation von Veränderungen am peripheren Nerven unter besonderer Berücksichtigung der Einzelfaserdarstellung in Nervenzupfpräparaten geleistet werden. Darüberhinaus wird eine Methodenanalyse herkömmlicher und neuer Verfahren zur Bearbeitung von Nervenbiopsien durchgeführt, deren Ergebnisse Grundlage für eine verbesserte pathomorphologische Diagnostik bieten sollen.

Ziel des ersten Teils der Arbeit ist es daher chemisch, mechanisch und autolytisch bedingte Veränderungen in ihrer Reinform darzustellen. Um den Einfluss der Fixation in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkzeit zu überprüfen, werden Nervengewebsproben nach unterschiedlichen Protokollen inkubiert. Anschließend erfolgt eine Beurteilung ihrer Bearbeitungsfähigkeit und Auswertbarkeit im *single fiber teasing*, und die induzierten Artefakte sollen beschrieben werden. Zu jedem Präparat werden Kontrollschnitte zur lichtmikroskopischen Untersuchung angefertigt, wobei fragliche Bereiche zusätzlich einer Elektronenmikroskopie zu unterziehen sind.

Zur Darstellung autolysebedingter Veränderungen sollen Teilproben von Nerven frisch toter Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Entnahme fixiert werden, damit eine Abschätzung möglich wird, zu welchen Zeitpunkten post mortem bzw. post excisionem mit bestimmten Veränderungen an gezupften Nervenfasern und Schnittpräparaten gerechnet werden muss.

Um eine Möglichkeiten zur Erleichterung der Einzelfaserdarstellung zu evaluieren, soll der kollagenolytische Einfluss von Glycinpuffer und Kollagenase untersucht werden. Ziel ist ein Protokoll zu etablieren, das eine Bearbeitung unfixierter und bereits fixierter Proben ohne Qualitätsverlust ermöglicht.

Anhand der bisher aufgezählten Versuche soll nicht nur eine Verbesserung der Verfahrenstechniken vorgeschlagen, sondern auch ein Katalog an artifiziellen und autolytischen Veränderungen erstellt werden, die ihrerseits altersbedingten und pathologischen Veränderungen gegenüberzustellen sind.

Um die Möglichkeiten der diagnostischen Aussagekraft zu erweitern, sollen Verfahren zur selektiven Darstellung neuroparenchymatöser Kompartimente an gezupften Einzelfasern untersucht werden. Hierzu werden Protokolle zur Anfärbung mit dem Fluorochrom 5,5'-

Diphenyl-9-ethyl-oxacarbocyanin (DPED) variiert und der prä- und postfixative Einsatz des Farbstoffes untersucht.

Zur selektiven Darstellung der Axone werden des weiteren immunhistologische Versuche im Sinne einer *whole-mount*-Immunhistochemie durchgeführt. Hierbei soll überprüft werden inwieweit die Art der Immersionsfixierung vor Antikörper- und Chromogenapplikation Einfluss auf die Darstellbarkeit hat.

Ziel der sogenannten *post-teasing*-Licht- und Elektronenmikroskopie ist es, zu untersuchen, ob und wie bereits gezupfte Nervenfasern licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zugeführt werden können, und inwieweit mit dieser Methode nicht nur neuroparenchymatöse, sondern auch interstitielle Komponenten erfassbar sind.

Neben der bereits erwähnten Katalogisierung autolytischer und artifizieller Veränderungen soll auch eine Kategorisierung pathologischer Phänomene an gezupften Einzelfasern erfolgen. Als Grundlage dient hier eine Reihe an Kasuistikfällen. Somit wird die Voraussetzung für ein Erfassungsschema von artifiziellen, autolytischen und pathologischen Veränderungen an Einzelfasern geschaffen.

Darüberhinaus soll dargelegt werden, inwieweit pathomorphologische Befunde an Teasingpräparaten es ermöglichen, Dysfunktionen des peripheren Nervens nicht nur zu spezifizieren, sondern auch prognostisch zu bewerten.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungskollektiv erstreckt sich auf das laufende Sektions- und Einsendungsmaterial des Instituts für Tierpathologie, wobei der Großteil der Überweisungen von der Universitäts-Tierklinik der LMU München und von praktizierenden Kollegen stammte. In wenigen Fällen sind Biopsien direkt von anderen Institutionen und Kliniken eingeschickt worden. Die Verteilung auf die einzelnen Tierarten ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit 436 Nervenproben mit insgesamt etwa 112400 Einzelfasern aus 84 Tieren untersucht.

Tabelle 4

	<b>Autopsieproben</b>	<b>Biopsieproben</b>	<b>insgesamt</b>
<b>Hund</b>	34	6	40
<b>Katze</b>	13	1	14
<b>Pferd</b>	9	2	11
<b>Rind</b>	5		5
<b>Schwein</b>	5		5
<b>sonstige</b>	9		9

Bei Autopsien wurde der zu untersuchende Nerv in der Regel in toto entnommen. Einsendungen waren dagegen meist Faszikularbiopsien. Hierbei wurden im herkömmlichen Verfahren nach BRAUND (27) Nervenfaserbündel über eine bestimmte Distanz unter Schonung des verbleibenden Nervengewebes entnommen.

Bei Polyneuropathien war für Untersuchungszwecke der Nervus fibularis superficialis Nerv der Wahl. Konnten aufgrund klinischer und elektrophysiologischer Untersuchungen neurologische Defizite anderer Nerven festgestellt werden, so wurden zusätzlich bzw. stattdessen Proben von diesen genommen. Eine Ausnahme stellt hier das Pferd dar, bei dem Nervenbiopsien stets an einem Hautast des Nervus accessorius durchgeführt wurden (187, 117).

Zur Entnahme des N. fibularis superficialis wurden die Tiere in Seitenlage verbracht und ein Schnitt über dem Fibulaköpfchen gesetzt (92). Der Nerv zieht hier unter der Faszie nach proximokaudal und liegt dabei über dem Musculus gastrocnemius (168).

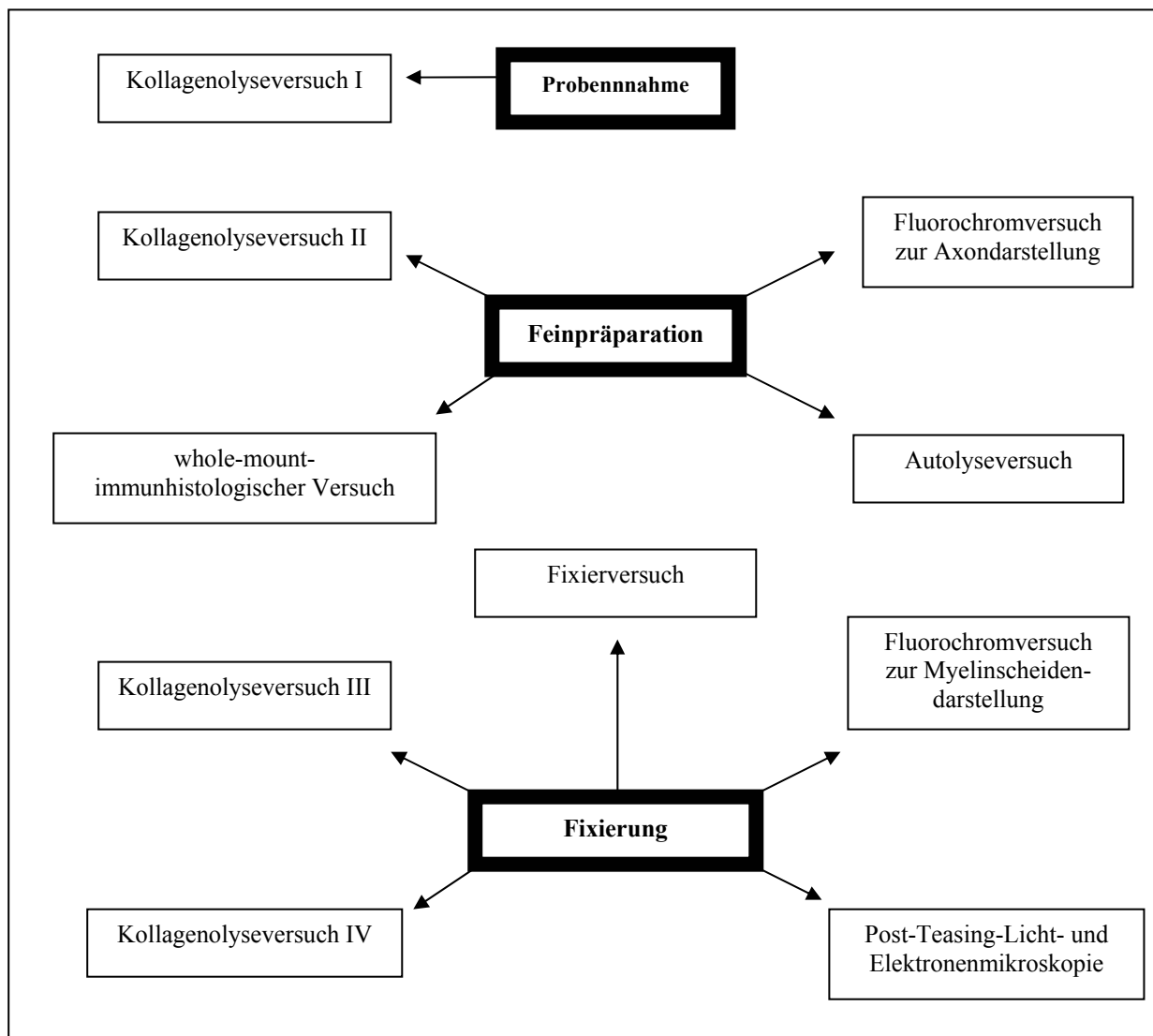
Zur Entnahme des N. accessorius superficialis (dorsalis) beim Pferd konnte man sich etwa eine Hand breit hinter den Ganaschen orientieren und zwei Finger breit oberhalb der Drosselrinne einen zu ihr parallelen Schnitt setzen (187).

Für sämtliche Manipulationen am empfindlichen Nervengewebe diente ein Besteck aus der Augenchirurgie.

Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde der Nerv nach der Entnahme umgehend in eine mit kardioplegischer HTK-Lösung (Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH) angefeuchtete Gaze gewickelt und zur weiteren Bearbeitung schnellst möglich ins Labor verbracht. Mit Hilfe einer Kopflupe (PEAK Head Lupe) konnte die Feinpräparation vorgenommen werden. Nachdem das umgebende Fettgewebe entfernt war, wurde das Epineurium eingeschnitten, um dann vom übrigen Nervengewebe vorsichtig abgezogen zu werden. Einzelne Nervenfaserbündel konnten nun voneinander isoliert werden. Weitere Arbeitsschritte sind den unten genannten Versuchsprotokollen zu entnehmen.

Die Einsendungen befanden sich in der Regel in einer mit NaCl angefeuchteten Gaze oder waren bereits in Formalin fixiert.

Abb. 13: Organigramm der Versuchsanordnung



## 2.2 Versuche zur Darstellung fixationsbedingter Artefakte

### 2.2.1 Bearbeitungsprotokolle

Die unten angeführten Fixierprotokolle wurden an 171 Einzelproben bzw. 51300 geteaseten Einzelfasern untersucht. Dafür wurde von 15 Tieren (vgl. Tabelle 6) je nach zur Verfügung stehendem Nervenmaterial bis zu 12 Einzelproben gewonnen, um diese in 1%igem, 2,5%igen und 6,25%igem Glutaraldehyd für je 1, 2, 4 und 24 Stunden zu inkubieren. Nach Fixierung wurden diese bei 4°C für 24 Stunden in Waschlösung belassen. Alternativ bestand die Möglichkeit, sie 4 Stunden auf dem Rüttler zu waschen.

Die Herstellung der Fixativa und der Waschlösung erfolgte nach folgenden Protokollen:

<b>6,25% Glutaraldehyd</b>		
Glutaraldehyd 25% (Serva GmbH, Nr. 23115)		25 ml
ad Sörensen-Phosphatpuffer		100 ml

<b>2,5% Glutaraldehyd</b>		
Glutaraldehyd 25% (Serva GmbH, Nr. 23115)		10 ml
ad Sörensen-Phosphatpuffer		100 ml

<b>1% Glutaraldehyd</b>		
Glutaraldehyd 25% (Serva GmbH, Nr. 23115)		4 ml
ad Sörensen-Phosphatpuffer		100 ml

<b>Sörensen-Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4)</b>		
Lösung A:	Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Nr. 1.04873.0250)	9,078 g
	Aqua dest.	1000 ml
Lösung B:	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat (AppliChem, Nr. A2006)	11,876 g
	Aqua dest.	1000 ml
192 ml der Lösung A auf 808 ml der Lösung B geben.		

<b>Waschlösung</b>		
0,2 m gepufferte D(+)-Saccharose:		
	D(+)-Saccharose (AppliChem, Nr. A1125)	6,84 g
	ad Sörensen-Phosphatpuffer	100 ml

Zur Haltbarmachung 1-2 Tropfen 1%ige Merthiolatlösung auf 100 ml Zuckerlösung .



Mit einem scharfen Skalpell war je nach Gesamtlänge der Probe an einem Ende ein 1 bis 5 mm langes Stück abzuschneiden und zu verwerfen. Von der neu entstandenen Schnittstelle wurden 2 bis 3 mm lange Nervenstücke abgesetzt, die bei Bedarf zusätzlich in Längsrichtung halbiert wurden, so dass sie eine Dicke von ungefähr 0,25 bis 0,5 mm aufwiesen. Von den je nach Ausgangsmaterial insgesamt 4 bis 12 erhaltenen Einzelstücken wurden routinemäßig 3 quer und 1 längs in Epoxidharz eingebettet (Tabelle 5). Überzählige Stücke wurden asserviert. Die so eingebetteten Proben polymerisierten bei 60°C im Brutschrank ca. 48 Stunden aus. Anschließend wurden sie getrimmt (Reichert Jung, ULTRATRIMM®), und mit einem Ultramikrotom (Reichert Jung, ULTRACUT®) Semidünnschnitte von 1 µm angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträgern hitzefixiert, um dann mit Azurblau und Safranin gefärbt zu werden. Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte. Unklare Bereiche wurden markiert, so dass von den entsprechenden Blöcken Ultradünnschnitte von etwa 70 nm Dicke angefertigt werden konnten. Es folgte hierbei eine Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat und die Schnitte wurden für die anschließende elektronenmikroskopische Untersuchung auf Kupferringe und -netze (Stork Veco, NL) aufgebracht.

Tabelle 5: Epoxidharzeinbettung mit Glycidäther-Mischung

Lösung	Konzentration	Dauer	Inkubationsbedingungen
Osmium	1%	2 Std.	Kühlschrank
Waschlösung	nach Protokoll	3x spülen	
Aceton	50%	3x spülen	
Aceton	70%	10 Min.	Kühlschrank
Aceton	70%	10 Min.	Kühlschrank
Aceton	90%	10 Min.	Kühlschrank
Aceton	90%	10 Min.	Kühlschrank
Aceton	100%	20 Min.	Kühlschrank
Aceton	100%	20 Min.	Kühlschrank
Aceton	100%	20 Min.	Zimmertemperatur
Aceton 100% / Glycidäther-Mischung	1:1	1 Std.	Zimmertemperatur ohne Deckel
Glycidäther-Mischung	pur	30 Min.	Zimmertemperatur ohne Deckel
Glycidäther-Mischung	pur	30 Min.	Zimmertemperatur ohne Deckel

Herstellungsprotokolle für die Lösungen der Epoxidharzeinbettung:

#### 1%iges Osmium

Saccharose (AppliChem, Nr. A1125)	0,45g
Aqua bidest.	1,0 ml
0,1 m HCL (Merck, Nr. 1.09060.1000)	2,0 ml
Veronalacetat-Puffer	2,0 ml
2%iges Osmium	5,0 ml

**Veronalacetat-Puffer (ph-Wert 10,3)**

5,5-Diäthylbarbitursäure Natriumsalz (Merck, Nr. 6318)	1,47 g
Natriumacetat (Merck, Nr. 6267)	0,97 g
Aqua bidest.	50 ml

**2%iges Osmium Tetroxid**

Osmiumtetroxid (Plano W. Plannet GmbH )1g	
Aqua bidest.	50ml

**Glycidäther-Mischung**

Lösung A:	Glycidäther 100 (Serva, Nr. 21045)	38,82 g
	2-Dodecenylnsuccinicacid-4- anhydrid (Serva, Nr. 10755)	5,3 g
Lösung B:	Glycidäther 100 (Serva, Nr. 21045)	61,80 g
	Methylnacidanhydrid (Serva, Nr. 29452)	56,34 g
Mischverhältnis:		
	Lösung A	41,20 g
	Lösung B	75,00 g
	2,4,6-Trisdimethylaminomethylphenol (Serva, Nr. 36975)	1,5 ml

Der längere Teil der Nervenprobe wurde für 1-2 Stunden in 2%igem Osmiumtetroxid postfixiert. Die Osmiumfixierung erfolgte unter dem Abzug bei Lichtausschluss und Zimmertemperatur. Danach wurden die Proben 10 Sekunden in Waschlösung geschwenkt und über Nacht in frische Waschlösung gelegt oder vergleichsweise 4 Stunden auf einem Rüttler gewaschen. Anschließend wurden sie in mindestens 99,5%igem, wasserfreiem Glycerin (AppliChem GmbH, Nr. A3552,1000) für 10 Sekunden geschwenkt und anschließend in ein zweites Gefäß mit frischem Glycerin gelegt. Hierin verblieben sie für mindestens 24 Stunden. Die Nervenprobe wurde auf eine Glasplatte verbracht und mit einigen Tropfen des Glycerins benetzt. Unter einer Stereolupe (Olympus SZH, Zeiss Stemi DV4) sind mit feinen Pinzetten die Faszikel eines Endes erfasst und auseinandergezogen worden, um verbleibende epi- und perineurale Anteile zu entfernen. Dann wurden kleinere Stränge voneinander getrennt, von welchen wiederum Einzelfasern separiert und unter kontinuierlichem, vorsichtigem Zug auf einen angrenzenden sauberen Objektträger verbracht wurden. Die Reibung der Einzelfasern entlang des Glases ermöglichte eine gerade Ausrichtung und eine Lösung von der Pinzettenspitze. Pro Präparat wurden zwischen 200 und 300 Einzelfasern geteast, wobei jeweils 12 bis 25 Fasern auf einen Objektträger zu liegen kamen. Anschließend wurde

vorsichtig ein Deckglas aufgelegt und mit einer Glaspipette einige Tropfen 95%iges Glycerin aufgebracht, das durch die Kapillarwirkung zwischen Objektträger und Deckglas gesogen wurde. Dann erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung.

Tabelle 6

Nr.	Tierart	Rasse	Geschlecht	Alter	klinische oder pathologische Diagnose	Zeit vom Tod bis zur Probennahme	Nerv	Probenanzahl
VV1	Hd.	Mix	wk	10 J.	Myasthenia gravis	ca. 48 Std.	N. fib.	6
VV2	Schw.	Trollschwein	mk	4 Mon.	malignes Melanom	max. 12 Std.	N. fib.	9
VV3	Pfd.	Andalusier	mk	6 J.	Borna'sche Krankheit	frisch tot	N. acc.	12
VV4	Rd.	BV	w	5 Wo.	Kongenitale Myopathie	max. 8 Std.	N. fib.	12
VV5	Rd.	BV	m	5 Wo.	Kongenitale Myopathie	max 8 Std.	N. fib.	12
VV6	Ktz.	Maine-Coon	w	8 Mon.	FIP	ca. 36 Std.	N. fib.	12
VV8	Ktz.	EKH	wk	18 J.	Otitis media, Meningeom	ca. 24 Std.	N. fib.	12
VV9	Rd.	DFV	w	13 Tg.	Immundefizienz, Kryptosporidien	max. 4 Std.	N. fib.	12
VV10	Rd.	DFV	w	3 J.	Labmagenerlagerung	ca. 24 Std.	N. fib.	12
VV11	Schw.	DLR	mk	12 Wo.	PRRS	max. 4 Std.	N. fib.	12
VV12	Hd.	Dackel	w	12 J.	Adenokarzinom der Niere und Nebenniere; Mammamischttumor	ca. 24 Std.	N. fib.	12
VV13	Hd.	Beagle	w	2 Mon.	Kardiomyopathie	max. 8 Std.	N. fib.	12
VV15	Schw.	DLR	w	4 J.	Panaritium	max. 4 Std.	N. fib.	12
VV16	Pfd.	Quarter Horse	m	14 Tg.	Herzmißbildung	max. 24 Std.	N. acc.	12
VV17	Pfd.	WB	mk	8 J.	COPD	frisch tot	N. acc.	12

(BV= Braunvieh; DFV= Deutsches Fleckvieh; DLR= Deutsche Landrasse; EKH= Europäisch Kurzhaar; WB= Warmblut)

## 2.2.2 Beurteilungskriterien

Als Erstes wurde die **Teasbarkeit von Einzelfasern** systematisch untersucht. Die Beurteilung setzt sich aus folgenden Kriterien zusammen:

1. Fassbarkeit der Einzelfasern
2. Trennbarkeit der Einzelfasern
3. Fragilität der Einzelfasern.

Dementsprechend erfolgte ein *scoring* für den Gesamteindruck der Teasbarkeit nach folgendem Schema:

Tabelle 7

sehr schwer teasbar	-
schwer teasbar	+ -
teasbar	+
leicht teasbar	++
sehr leicht teasbar	+++

Die Ergebnisse für die jeweiligen Fixierstufen einer Probe wurden tabellarisch zusammengefasst, wobei besondere Auffälligkeiten zusätzlich in diesen Tabellen aufgeführt werden.

Beim Kollagenolyseversuch erfolgte ebenfalls ein *scoring* für die Teasbarkeit nach den gleichen Kriterien. Bei allen anderen Versuchen wurden nur dann Auffälligkeiten bezüglich der Teasbarkeit vermerkt sofern sie vorlagen.

Die **Beurteilung der Einzelfasern** erfolgte mit 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axioplan Lichtmikroskop. Morphologische Auffälligkeiten wurden mit 630 -und 1000-facher Vergrößerung in Öl betrachtet.

Der Einfluss unterschiedlicher Fixierungsstufen wurde an folgenden Kriterien bemessen:

1. Anfärbarkeit der Myelinscheide
2. Kontrast zwischen Myelinstrukturen und Axon
3. Außenkontur der Myelinscheide
4. Kompaktheit der Myelinscheide
5. Myelinscheidenzeichnung
6. Kaliberstärke des Axons
7. Detailerkennbarkeit

Alle weiteren morphologischen Auffälligkeiten wurden in Art und Ausmaß beschrieben. Bei dem Kollagenolyseversuch und beim Autolyseversuch wurden Veränderungen an den Teasingpräparaten nach den gleichen Kriterien (1.-7.) erfasst.

Die Beurteilung von Befunden erfolgte bei allen Versuchen in Anlehnung an die Beurteilungsschemata von KALICHMANN et al. (128) und DYCK et al. (68) (vgl. II., 4.2.1.1 und 4.2.1.2), wobei nur Positivbefunde verzeichnet wurden. Neben diesen kategorisierbaren Befunden wurden auch jegliche anderen Auffälligkeiten vermerkt.

Zur **Beurteilung der histologischen Kontrollschnitte** wurden pro Probe mindestens 3 Quer- und 1 Längsschnitt am ZEISS Axioplan Lichtmikroskop beurteilt. Einen groben Überblick über die Repräsentativität des Gewebes erhielt man mit 200- facher Vergrößerung. Präparate die nur Fett enthielten oder deren Integrität aufgrund schlechter Schnitteigenschaften nicht erhalten war, gingen nicht in die Beurteilung ein. Bei 400- und 600-facher Vergrößerung wurden zuerst epi-, peri- und subperineurale Anteile betrachtet. Bei der gleichen Vergrößerungsstufe wurde die Faseranzahl und -verteilung sowie die Form und der Myelinisierungsgrad markhaltiger Fasern, und die Häufigkeit und die Größe von Schwannzellen beurteilt. Bei 1000-facher Vergrößerung in Öl wurden auffällige Myelin- und Schwannzellstrukturen, das Axon sowie

Zellen und Blutgefäße und bei Auffälligkeiten auch die extrazelluläre Matrix des Endoneuriums beurteilt. Es wurden auch hier nur Positivbefunde notiert. Feinstrukturen, die der Lichtmikroskopie nicht zugänglich waren, wurden unter einem ZEISS EM10 Elektronenmikroskop bei 2500- bis 80.000 Vergrößerung beurteilt, wobei auch hier der Erhalt des Gewebes während der Bearbeitung Voraussetzung ist.

Die lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte bei allen anderen Versuchen nach den gleichen Kriterien. Eine Ausnahme wurde bei den Versuchen zur *post-teasing*-Licht- und Elektronenmikroskopie gemacht, die unter diesem Punkt genauer erläutert ist.

In diesem experimentellen Ansatz wurde bei jedem Tier sowohl für die Teasingpräparate als auch für die Kontrollschnitte ein *score* für ihre **Auswertbarkeit** in den einzelnen Fixierstufen vergeben. Diese wurden mit dem *score* für die Teasbarkeit in einer Tabelle zusammengefasst. Dabei war die Auswertbarkeit der Einzelfasern nicht durch die Faserzahl eingeschränkt, da pro Probe 300 Fasern geteast wurden. Die *scores* wurden folgendermaßen verteilt:

Tabelle 8

sehr schlecht auswertbar	-
schlecht auswertbar	+ -
auswertbar	+
gut auswertbar	++
sehr gut auswertbar	+++

## 2.3 Versuche zur Darstellung autolysebedingter Veränderungen

### 2.3.1 Bearbeitungsprotokoll

Um die unterschiedlichen Erscheinungsbilder der Autolyse zu dokumentieren, wurden insgesamt 37 Einzelproben bzw. etwa 9300 Einzelfasern untersucht. Sie stammten von den Tieren der Tabelle 9. Die Proben sind sofort, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96 und in einem Fall 120 Stunden nach Entnahme für 1-2 Stunden in 2,5%igem Glutaraldehyd fixiert worden. Bis dahin befanden sie sich bei Zimmertemperatur in einer mit Custodiol® befeuchteten Gaze. Nach der Fixierung wurden die Proben wie unter 2.2.1 beschrieben weiterverarbeitet. Pro Präparat wurden 200 bis 300 Einzelfasern geteast und histologische Kontrollschnitte angefertigt.

Tabelle 9

Nr.	Tierart	Rasse	Alter	Geschlecht	Diagnose	Nerv	Probenanzahl	Autolysedauer in Stunden
VA1	Ktz.	EKH	8 J.	wk	Ataxie (Kleinhirnödem), Stupor	N. fib. bds.	13	0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96, 120
VA2	Hd.	Mix	12 J.	wk	Verdacht auf Leishmaniose	N. fib. bds.	12	0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96
VA3	Pfd.	WB	10 J.	mk	COPD	N. acc. bds.	12	0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96

### 2.3.2 Beurteilungskriterien

siehe 2.2.2.

## 2.4 Kollagenolyseversuche

Um die Trennbarkeit von Fasern bei der Herstellung von Teasingpräparaten zu verbessern, wurde der Einsatz von Glycinpuffer bzw. Kollagenase untersucht. Ein Ziel war die Feinpräparation zu erleichtern. Dazu wurden bindegewebige Anteile vor der Behandlung mit Glycinpuffer und Kollagenase stets am Nerven belassen. Um andererseits ihren Einfluss auf die Teasbarkeit und auf die Darstellbarkeit neuroparenchymatöser Strukturen möglichst unverfälscht bewerten zu können, wurde in einem weiteren Ansatz das umgebende Bindegewebe vor Inkubation weitgehend entfernt. Dabei wurden bei beiden Versuchsansätzen sowohl unfixierte als auch bereits fixierte Proben herangezogen.

### 2.4.1 Bearbeitungsprotokolle

#### 2.4.1.1 Einsatz von Glycinpuffer

Grundlage der Beurteilung zu diesem Versuchsansatz bildeten 27 Proben bzw. etwa 6750 Einzelfasern. Dazu wurden Nervenproben unterschiedlicher Tierspezies (vgl. Tabelle 10) weitgehend von bindegewebigen Anteilen befreit. Anschließend erfolgte eine Unterteilung jedes Nerven in 9 Einzelproben, die für 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 und 120 Minuten in Glycinpuffer inkubiert wurden. Je eine Kontrollprobe pro Tier blieb unbehandelt. Eine

einstündige Fixierung in 2,5%igem Glutaraldehyd folgte. Nach der Fixierung wurden die Proben wie unter 2.2.1 beschrieben weiterverarbeitet. Pro Präparat sind 200 bis 300 Einzelfasern und histologische Kontrollschnitte angefertigt worden. Protokoll zur Herstellung des Glycinpuffers:

<b>Glycinpuffer</b> (nach ADAMS et al., 1) (ph-Wert 6,0)	
0,05 M Triethylamin-HCl (Fluka, Nr. 371056/1 43897)	3,4415 g
0,7 M Glycin (Sigma, Nr. G7126) ad Aqua bidest.	26,2745 g 1000 ml

Tabelle 10

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Diagnose	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Nerv	Proben-anzahl
GPA1	Ktz.	Perser	mk	15 J.	Herzversagen	max. 24 Std.	N. fib. bds.	9
GPA2	Hd.	DSH	m	14 J.	Magendrehung	max. 12 Std.	N. fib. bds.	9
GPA3	Pfd.	Kaltblut	mk	19 J.	Ileumobstipation	max. 24 Std.	N. acc. bds.	9

#### 2.4.1.2 Vergleichender Einsatz von Glycinpuffer und Kollagenase

Von allen Proben der Tabelle 10 wurde auch der entsprechende Nerv der anderen Körperseite entnommen. Mitsamt des umgebenden Bindegewebes wurde je die Hälfte sofort in Glycinpuffer, und die andere Hälfte sofort in Kollagenase geschwenkt und auf veränderte Eigenschaften bei der Feinpräparation beurteilt.

Andererseits wurden Nervenproben (V4 und V3, Tabelle 12) sofort nach Entnahme mitsamt dem umgebenden Bindegewebe für 2 Stunden in 2,5%igem Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden sie für 4 Stunden auf dem Rüttler in Waschlösung gewaschen. Die Proben wurden in drei Teile getrennt. Ein Teil wurde für 1 Stunde in Glycinpuffer und ein zweites für 1 Stunde in Kollagenase inkubiert. Eine mit der Kontrollprobe vergleichende Feinpräparation wurde durchgeführt.

In einem weiteren Ansatz dienten 45 Einzelproben bzw. etwa 9000 Einzelfasern dem vergleichenden Einsatz von Glycinpuffer und Kollagenase. Dazu wurden von Nervenproben (V1 bis V3, V5 bis V10, Tabelle 12) soweit wie möglich bindegewebige Anteile entfernt, um sie dann in je 5 Einzelproben zu unterteilen. Je eine Probe wurde vor der Fixation für 5 Minuten in Kollagenase (Vx/K5a) und eine weitere für 5 Minuten in Glycinpuffer (Vx/G5a) inkubiert. Je eine weitere Probe wurde in Anlehnung an TATKE und DOYLE (230) erst nach

der Fixation für eine Stunde in Kollagenase (Vx/K60p) und eine weitere Probe für 1 Stunde in Glycinpuffer (Vx/G60p) gelegt. Als Kontrolle diente bei jedem Tier eine unbehandelte Probe (Vx). (vgl. Tabelle 11). Alle Proben wurden wie unter 2.2.1 nach der Fixierung beschrieben weiterverarbeitet. Von jeder Probe wurden etwa 200 Fasern geteast und histologische Kontrollschnitte angefertigt. Protokoll zur Herstellung der Kollagenase:

**Kollagenase**  
Kollagenase Typ I (Sigma, Nr. CO130-)  
ad Ringer-Infusionslösung  
zur Herstellung einer 0,3%igen Lösung

Tabelle 11

	Vx	Vx/G60p	Vx/K60p	Vx/G5a	Vx/K5a
Kollagenase 5 Min.	-	-	-	-	+
Glycinpuffer 5 Min.	-	-	-	+	-
Schwenken in Waschlösung	-	-	-	+	+
1-2 Std. Fixierung in 2,5% GA	+	+	+	+	+
in Waschlösung 24 Std. im Kühlschrank oder 4 Std. auf dem Rüttler	-	+	+	-	-
Kollagenase 60 Min.	-	-	+	-	-
Glycinpuffer 60 Min.	-	+	-	-	-

Tabelle 12: Versuchstiere für den Glycinpuffer-Kollagenase-Vergleich

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Diagnose	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Nerv	Probenanzahl
V1	Hd.	Mix	mk	5 J.	Verdacht auf Cumarinvergiftung	max. 24 Std.	N. fib.	5
V2	Ktz.	EKH	m	17 J.	Intrathorakale Masse	max. 24 Std.	N.fib.	5
V3	Pfd.	Fjordpferd	w	12 J.	Blind, multiple Arthrosen	frisch tot	N.acc. bds.	5
V4	Hd.	Mix	m	12 Wo.	Staupe	max. 12 Std.	N. fib.	1
V5	Pfd.	WB	w	18 J.	Kolik	frisch tot	N.acc.	5
V6	Ktz.	EKH	wk	12 J.	Leukose	max. 18 Std.	N. fib.	5
V7	Hd.	DSH	m	14 J.	Trauma	max. 12 Std.	N. fib.	5
V8	Ktz.	EKH	mk	9 J.	Akutes Nierenversagen	frisch tot	N. fib.	5
V9	Hd.	Mix	w	14 J.	Multiple Mammatumore	max. 24 Std.	N. fib.	5
V10	Pfd.	WB	mk	17 J.	COPD	max. 8 Std.	N.acc. bds.	5

#### 2.4.2 Beurteilungskriterien

Die Beurteilung der Teasbarkeit, der geteasten Einzelfasern sowie der histologischen Kontrollschnitte erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben.



## 2.5 Fluorchromatische Darstellung geteaster Nerven

Zur selektiven Darstellung neuroparenchymatöser Kompartimente an geteasten Nerven wurde das Fluorochrom 5,5'-Diphenyl-9-ethyl-oxacarbocyanin (DPED) in unterschiedlichen Protokollen eingesetzt. In diesem Sinne erfolgte die Färbung an unfixierten und bereits fixierten Nerven, wobei insgesamt 62 Einzelproben bzw. etwa 15500 Fasern untersucht wurden.

### 2.5.1 Bearbeitungsprotokolle

#### 2.5.1.1 Einsatz von DPED vor Fixierung

a) Um die Auswirkung der Inkubationsdauer von DPED auf die Darstellbarkeit und den Strukturhalt des Neuroparenchyms zu untersuchen, wurden 8 Einzelproben bzw. etwa 2400 Einzelfasern untersucht. Direkt nach der Entnahme wurden die Nerven (Tabelle 14) in Einzelproben unterteilt, die dann unterschiedlich lange in das fluorochromhaltige Medium verbracht und danach einheitlich weiterverarbeitet wurden (vgl. Tabelle 13). Bei jedem Tier diente ein zusätzliches Teasingpräparat, das zuerst 4,5 Stunden in 2,5%igem Glutaraldehyd und anschließend 2 Stunden in 2%igem Osmium fixiert wurde, der Kontrolle.

Tabelle 13: Protokoll zum Präfix-Versuch

Lösung	Dauer	Inkubationsbedingungen
DPED	a) 20 Min. b) 90 Min. c) 24 Std.	abgedunkelt, Zimmertemperatur
Alkohol 30%	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Alkohol 100%	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Aqua bidest.	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Glutaraldehyd 2,5%	4,5 Std.	abgedunkelt, Zimmertemperatur
Waschpuffer	24 Std.	Kühlschrank
Glycerin, reinst	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Glycerin, reinst	mind. 24 Std.	Zimmertemperatur

Protokolle zur Herstellung der DPED-Lösung:

#### DPED-Lösung, pH 5,4

FS VI (Nr.Rr 340, 30.6.1997, Berlin)	0,001g
ad Methanol (AppliChem, Nr. A0688)	50 ml
8 Stunden rühren	
ad Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 5,4	50 ml

**Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH-Wert 5,4**

Lösung A:	Zitronensäure, kristallwasserfrei (Merck, Nr. 241.1000)	19,21 g
	ad Aqua dest.	1000 ml
Lösung B:	Dinatriumhydrogenphosphat (Roth GmbH, Nr. 4984.1)	35,6 g
	ad Aqua dest.	1000 ml

Mischung Lösung A: B = 44,4: 55,6

Tabelle 14: Nervenproben für den Präfix-Versuch

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Diagnose	Nerv	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Anzahl gewonnener Proben
VFA1	Hd.	Husky	mk	4 J.	Trauma	N. fib.	ca. 12 Std.	4
VFA2	Schw.	DLR	m	14 Tg.	Pneumonie	N. fib.	ca. 2 Std.	4

b) In Anlehnung an vorhergegangene Ergebnisse aus Protokoll a) sind unfixierte Proben (VFB1, Tabelle 18) 2 Stunden in DPED inkubiert worden. Anschließend wurden Lösungsmittel in unterschiedlicher Abfolge eingesetzt (Tabelle 15). Es erfolgte wiederum eine Beurteilung bezüglich der Auswirkung auf Darstellbarkeit und Strukturerehalt des Neuroparenchyms an insgesamt etwa 1800 Einzelfasern von 6 Proben.

In Aqua bidest und Alkohol erfolgte jeweils ein 10-sekündiges Schwenken. Die Fixierung in Glutaraldehyd betrug 1 bis 2 Stunden.

Tabelle 15: Lösungsmiteleinsetz beim Präfix-Versuch

Nr.	DPED	Aqua bidest.	Alkohol 30%	Alkohol 100%	Alkohol 30%	Aqua bidest.	2,5% Glutaraldehyd
A	+	+	+	+	-	+	+
B	+	+	-	+	+	+	+
C	+	-	+	+	-	+	+
D	+	-	-	+	+	+	+
E	+	+	-	-	-	-	+
F	+	-	-	-	-	-	+

### 2.5.1.2 Einsatz von DPED nach Fixierung

Bereits fixierte Proben wurden mit DPED gefärbt und anschließend mit verschiedenen Kombinationen an Alkoholkonzentrationen gewaschen (Tabelle 16 und 17). Als Kontrolle dienten Präparate, die 1 bis 2 Stunden in 2,5%igem Glutaraldehyd und anschließend 2 Stunden in 2%igem Osmium fixiert waren. Insgesamt wurden 48 Einzelproben bzw. etwa 9600 Einzelfasern untersucht. Die Nerven stammten von den Tieren aus Tabelle 18.

Tabelle 16: Protokoll zum Postfix-Versuch

Lösung	Dauer	Inkubationsbedingungen
Glutaraldehyd 2,5%	1-2 Std.	Zimmertemperatur
Waschlösung	24 Stunden	Kühlschrank
DPED	2 Std.	abgedunkelt, Zimmertemperatur
Waschlösung	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Alkohol I	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Alkohol II	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Aqua bidest.	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Glycerin, reinst	10 Sek. schwenken	Zimmertemperatur
Glycerin, reinst	mind. 24 Std.	Zimmertemperatur

Tabelle 17: Lösungsmiteleinsetz beim Postfix-Versuch

	Konzentration	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
	Alkohol I	30%	+									
50%			+									
70%				+								
80%					+							
96%						+						
100%								+	+	+	+	+
Alkohol II	100%	+	+	+	+	+	+					
	96%							+				
	80%								+			
	70%									+		
	50%										+	
	30%											+

Tabelle 18: Nervenproben für den Postfix-Versuch

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Diagnose	Nerv	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Probenanzahl
VFB1	Elch		m	adult	Enterotoxämie	N. fib. bds.	max. 1 Tg.	18
VFB2	Hd.	Pekinese	wk	10 Mon.	gestorben nach Ovarihysterektomie	N. fib. bds.	ca. 1 Tg.	12
VFB3	Hd.	DSH	w	11 J.	Malignes Lymphom, Chemotherapie	N. fib. bds.	ca. 1 Tg.	12
VFB4	Rd.	DFV	m	0 Tg.	Totgeburt zum Geburtszeitpunkt	N. fib. bds.	ca. 12 Std.	12

Bei allen Versuchsreihen wurden pro Präparat 200 bis 300 Einzelfasern geteast. Dunkelblaues Tonpapier unter der Glasplatte der Stereolupe ermöglichte hier eine leichtere Erkennung der nicht-kontrastierten Nervenfasern.

### 2.5.2 Beurteilungskriterien

Die Beurteilung der fluorochromgefärbten Einzelfasern erfolgte stets abgedunkelt und bei den gleichen Vergrößerungsstufen wie die der osmiumgefärbten Präparate, wobei einige Spezialvorrichtungen des ZEISS AXIOPLAN Mikroskops eingesetzt werden mussten:

Tabelle 19: Technische Daten zur Fluoreszenzmikroskopie

Quecksilberlampe	200 Watt
Exzitationsfilter	450-490 nm
Dichroic-Spiegel	510 nm
Barriere-Filter	520nm

Dabei wurden die Fasern nach folgenden Kriterien beurteilt:

1. welche Komponenten des Neuroparenchyms färben sich an?
2. Veränderungen bezüglich der Stärke und der Farbe der Emission.
3. Detailerkennbarkeit angefärbter Strukturen.

## 2.6 Versuche zur Darstellung des Axons an Teasingpräparaten mittels *whole-mount*-Immunhistochemie

Bei der *whole-mount*-Methode wird die Probe als Ganzes in den Reagenzien der immunhistochemischen Untersuchung inkubiert. Bei der hier angewandten Methode handelt es sich um eine indirekte Darstellung der Neurofilamente. Nachdem eine Inkubation in Normalserum zur Verhinderung unspezifischer Reaktionen durchgeführt worden war, erfolgte die Beschickung mit primärem und anschließend biotinyliertem sekundären Antikörpern. Den Lösungen war stets Triton-X-100 beigefügt, um die Permeabilität für die Antikörper zu erhöhen. An den sekundären Antikörper bindet Avidin, an das eine Peroxidase gekoppelt ist. Als Chromogen diente DAB mit einer  $H_2O_2$ -Starterlösung.

### 2.6.1 Bearbeitungsprotokolle

Zu dieser experimentellen Studie wurden insgesamt 36 Einzelproben bzw. 3600 Fasern beurteilt, die von den Tieren der Tabelle 22 stammen.

Nach Entnahme wurden die Nerven in jeweils 12 Teile zerlegt. Alle Einzelproben wurden einem Vortearing unterzogen. Dann wurden je 4 der Proben in Glutaraldehyd, 4 in Formalin und 4 in Paraformaldehyd fixiert. Von jeder Fixierart wurde eine Probe vor dem Teasing in Glycinpuffer geschwenkt. Die fixierten Nervenproben aus Tabelle 20 wurden der Immunhistochemie nach Tabelle 21 unterzogen. Die übrigen Proben dienten als Negativkontrollen, wobei bei drei Proben (je eine in Glutaraldehyd, eine in Formalin und eine in Paraformaldehyd fixiert) kein Primär-, und bei den anderen drei Proben (je eine in

Glutaraldehyd, eine in Formalin und eine in Paraformaldehyd fixiert) kein Sekundärantikörper verwendet wurde. Das Protokoll zu dieser *whole-mount*-Immunhistochemie wurde eklektisch aus mehreren publizierten Arbeiten zusammengestellt (82, 80, 31).

Tabelle 20: Fixierprotokolle für die Immunhistochemie

Probe	PF	PF/GP	F	F/GP	GA	GA/GP
In Glycinpuffer schwenken	-	+	-	+	-	+
Vorteasing	+	+	+	+	+	+
1 Std. Paraformaldehyd 4%	+	+	-	-	-	-
1 Std. Formalin 10%	-	-	+	+	-	-
1 Std. Glutaraldehyd 2,5%	-	-	-	-	+	+

Tabelle 21: Markierungs- und Färbeprotokoll für die *whole-mount*-Immunhistochemie

Reagenz	Dauer	Inkubationsbedingungen
30%ige Sucrose-PBS-Lösung	10 Sekunden schwenken	
30%ige Sucrose- PBS-Lösung	48 Std.	Kühlschrank
1%ige Triton-X-PBS-Lösung mit 1% Ziegen Serum (Vector S-1000)	1 Std.	Raumtemperatur
1%ige Triton-X-PBS-Lösung mit 1% Ziegen Serum	1 Std.	Raumtemperatur
1%ige Triton-X-PBS-Lösung mit 1% Ziegen Serum	1 Std.	Raumtemperatur
Primär-AK gegen NF160 Maus (Sigma, Nr. N 5264), 1: 300 in 1%iger Triton-X-PBS-Lösung	über Nacht	Brutschrank, 37°C
	3 Tg.	Raumtemperatur, Rüttler
1%ige Triton-X-PBS-Lösung	6-8 Std.	8-10x wechseln, Raumtemperatur
Sekundär-AK: biotinylierter Ziege-Anti-Maus-AK (DAK, Nr. E-0433) 1:100 in 1%iger Triton-X-PBS-Lösung	über Nacht	Kühlschrank
1%ige Triton-X-PBS-Lösung	mehrmals waschen	Raumtemperatur
1%ige Triton-X-PBS-Lösung	über Nacht	Raumtemperatur
Avidin-Biotin-Komplex (mit Peroxidase) in 1%iger Triton-X-PBS-Lösung	2 Std.	Raumtemperatur, im Dunkeln
1%ige Triton-X-PBS-Lösung	1-2 Std.	Raumtemperatur, im Dunkeln
0,5mg/ml DAB in Tris-HCL-Lösung	3 Std.	Raumtemperatur, im Dunkeln, unter Abzug
0,5mg/ml DAB in Tris-HCL-Lösung mit 0,01% H2O2	wenige Minuten, bis gewünschte Anfärbung unter Stereolupe	Raumtemperatur, im Dunkeln, unter Abzug
Aqua dest.	mehrmals waschen	Raumtemperatur

Von jeder Probe beließ man die Hälfte über Nacht in mindestens 99,5%igem Glycerin bei Raumtemperatur, und die andere Hälfte in Aqua dest. im Kühlschrank. Dann erfolgte ein Teasing von etwa 100 Fasern pro Einzelansatz.

## Protokolle zur Herstellung der Reagenzien:

**Paraformaldehyd 4%**

4mg Paraformaldehyd (Merck, Nr. 4005.1000)  
ad 100ml 0,1 M PBS-Lösung, ph 7,3

**30%ige Sucrose-PBS-Lösung**

30g Sucrose (AppliChem, Nr. A1125)  
ad 100 ml 0,1 M PBS-Lösung, pH 7,3

**1%ige Triton X-PBS-Lösung**

1ml Triton-X-100 (Calbiochem, Nr. B33458)  
ad 100 ml 0,01 M PBS-Lösung, ph 7,3

**PBS (Phosphatgepufferte Kochsalz)-Lösung, 0,01 M**

Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Nr. 1.06580.1000)	1,48 g
Kaliumhydrogenphosphat (Merck, Nr. 4873)	0,43 g
Natriumchlorid (AppliChem, Nr. A1149)	7,2 g

ad 11 Aqua dest.  
mit NaOH und HCl auf den entsprechenden ph-Wert titrieren

**Avidin-Biotin-Komplex (Vector) in 1%iger Triton-X-PBS-Lösung**

1 Tropfen Lösung A  
1 Tropfen Lösung B  
ad 5 ml 1%iger Triton-X-PBS-Lösung  
Vor Gebrauch 30 Minuten im Dunkeln reifen lassen !

**0,5 mg/ml DAB (Diaminobenzidin) in Tris-HCl**

1 Tablette DAB 10 mg (Kem-En-Tec, Nr. 4170)  
ad 20 ml Tris-HCl

**Tris-HCl**

Trishydroxymethylaminomethan (Sigma, Nr. T-1503) 3,05 g  
in 25 ml Aqua dest lösen  
1n HCl 18,5 ml  
ad 500 ml Aqua dest.  
mit NaOH und HCl auf einen ph-Wert von 7,4 titrieren

Tabelle 22: Nervenproben für die Immunhistochemie

Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Diagnose	Nerv	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Probenanzahl
Hd.	Mix	wk	2 J.	Pleuritis, Peritonitis	N. fib. bds.	frisch tot	12
Ktz.	EKH	wk	12 J.	Trauma	N. fib. bds.	frisch tot	12
Pfd.	WB	mk	16 J.	Ileumobstipation	N. acc. bds.	frisch tot	12

## 2.6.2 Beurteilungskriterien

Bei der immunhistologischen Darstellung der Neurofilamente wurde beurteilt ob und mit welcher Intensität und Regelmäßigkeit sich die Axone oder gegebenenfalls andere Strukturen immunhistochemisch anfärben.

## 2.7 Versuche zur *post-teasing*-Licht- und Elektronenmikroskopie

Bei den Versuchen zur *post-teasing*-Licht- und Elektronenmikroskopie wurde untersucht, ob es möglich ist, in Glycidäther geteaste Nervenfasern der Licht- und Elektronenmikroskopie zuzuführen, und inwieweit es gelingt, definierte Veränderungen der Teasingpräparate in den Schnittpräparaten darzustellen.

### 2.7.1 Bearbeitungsprotokolle

Die Nervengewebsprobe wurde nach 1-2 stündiger Fixierung in 2,5%igem Glutaraldehyd und 24 Stunden im Waschpuffer in ihrer ganzen Länge dem unter 2.1.1 beschriebenen Einbettungsverfahren unterzogen. Anstelle einer Auspolymerisierung beließ man die Probe für 24 Stunden in reiner Glycidäther-Mischung, um sie darin einer Nervenzupfpräparation zu unterziehen. Gezupfte Fasern wurden hierbei auf eine dünne Plastikplatte (Melinex Polyester Film, 175µm dick, Plano W. Plannet GmbH, Nr.4103) überführt und auf dieser 24 Stunden im Brutschrank ausgehärtet. Eine lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte. An 11 willkürlichen Stellen (Präparat 9,10, 12-20) sind Nervenfasern und das umgebende Kunstharz dann entweder mit einem scharfen Skalpell vorsichtig von der Plastikplatte abgehoben oder mitsamt einem Plastikstück ausgeschnitten worden.

Ebenso verfuhr man mit 9 morphologisch veränderten Stellen (Präparat 1-8, 11), die vorher mit einem dünnen Folienstift auf der Plastikplatte über eine Länge von etwa 1mm markiert worden waren. Die freipräparierten Teilstücke der geteasten Nervenfasern wurden in die für die Kunststoffeinbettung üblichen, mit Glycidäther gefüllten Einbettungsbehältnisse gebracht und 2 Tage im Brutschrank auspolymerisiert. Es folgte die unter 2.2.1 beschriebene Aufbereitung für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen. Dabei wurden die markierten Präparate 1 bis 8 und 11 – soweit möglich – in 6 Ebenen geschnitten, um die „Trefferquote“ der Veränderungen zu ermitteln.

Histologische Kontrollschnitte wurden bereits nach Fixation separiert, und einer eigenen Einbettung ( nach 2.2.1) unterzogen.

Tabelle 23: Nervenprobe für die PTEM

Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Diagnose	Probe	Zeit vom Tod bis zur Entnahme
Hd.	Mix	mk	13 J.	Hepatopathie	N. fib.	12- 24 Std.

## 2.7.2 Beurteilungskriterien

In diesem Versuch wurde beurteilt, wie gut die Proben mit und ohne Plastikunterlage semi- und ultradünn zu schneiden waren. Anschließend sind die Schnitte mit und ohne Plastikunterlage licht- und elektronenmikroskopisch auf ihre Qualität hin untersucht worden. Dabei verglich man den Erhaltungszustand und die Detailerkennbarkeit neuroparenchymatöser Strukturen mit dem vorher nicht geteasten Schnittpräparat.

Anhand mehrerer Schnittebenen pro Präparat wurde beurteilt, ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit gekennzeichnete Veränderungen an geteasten Nerven in *post-teasing* Schnittpräparaten wiederzufinden sind. Darüberhinaus sollte getestet werden ob sich interstitielle Strukturen darstellen lassen.

## 2.8 Kasuistik

Zur Kasuistik wurden Fälle herangezogen, bei denen eine elektrodiagnostisch bestätigte, oder durch klinische Untersuchung vermutete periphere Neuropathie vorlag, oder bei denen aufgrund anderer Erkrankungen sekundär pathomorphologische Veränderungen am peripheren Nerven zu erwarten waren. Insgesamt wurden etwa 17000 Einzelfasern aus 57 Nervenproben aufgearbeitet und beurteilt.

Die Nervenproben wurden standardmäßig, wie unter 2.2.1 beschrieben, für die Teasingpräparation und für histologische Kontrollschnitte bearbeitet. Einzelheiten zur Fixierung sowie zusätzliche Untersuchungen sind der Tabelle zu entnehmen.

Die Beurteilung erfolgte ebenfalls in Anlehnung an Kapitel 2.2.2, wobei von jeder Nervenprobe 200-300 Fasern geteast wurden. Es wurden stets nur Positivbefunde aufgezeichnet.



Tabelle 24-1: Kasuistik

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Vorbereitung und Diagnose	Probe und Handling	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Untersuchungen
VK 1	Hd.	Leonberger	m	2J.	Chronisch progressive Schwäche der Nach- und Vorhand; Muskelatrophie insbesondere im Bereich distal des Knie- und Ellbogengelenks; Haltungs- und Stellreaktionen aller Gliedmaßen verzögert; Spinale Reflexe generalisiert abgeschwächt bis fehlend; EMG: pathologische Einstichaktivität im allen untersuchten Muskeln va. distal des Knie- und Ellbogengelenks, weiter proximal nur sehr milde Veränderungen; NLG: deutlich erniedrigt; MSAP: große zeitliche Dispersion, keine Amplitude meßbar.	N. fib. Nativeinsendung; Fixierung in 2,5% GA für 2 Std.	Biopsie	Osmiumteasing DPED-Teasing (Protokolle zur Myelinscheiden-darstellung vgl.2.1.4.2) Semidünnschnitt Elektronenmikroskopie
VK 2	Hd.	Pyrenäen-Schäferhund	m	adult	chronisch progrediente Parese und Ataxie, NLG der Hintergliedmaßen beidseits reduziert; MSAP: deutliche zeitliche Dispersion	N. fib. 2,5% GA 1,5 Std.	Biopsie, frisch fixiert	Osmiumteasing Semidünnschnitt (Schnellschnitt)
VK 3	Hd.	Belgischer Schäferhund	mk	13 J.	nicht-produktives Schilddrüsenkarzinom; Hypothyreote Polyneuropathie mit fehlender Propriozeption der Hintergliedmaßen und reduzierter Propriozeption der Vordergliedmaßen, bds. fehlendem Patellarreflex, und fehlendem Flexorreflex an der rechten Vordergliedmaße; EMG: geringgradige Denervation in Muskeln unterhalb des Kniegelenks und distaler Abschnitte der Vordergliedmaßen; NLG: N. tibialis bds. nicht stimulierbar, N. ulnaris bds. polyphasisch verbreitertes und amplitudenreduziertes MSAP	N. fibularis N. tibialis N. ulnaris 2,5% GA 1 Std.	sofort nach Euthanasie entnommen	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 4	Hd.	Bobtail	w	12 J.	akute Tetraparese; zu Beginn Reflexe nur an den Vordergliedmaßen reduziert; Elektrodiagnostik: Vordergliedmaßen: EMG: hochgradige Spontanaktivität; NLG: 40 m/sek; MSAPs amplitudenreduziert und verbreitert, nach proximaler Stimulation stärker verbreitert als nach distaler; Hintergliedmaßen: 1-2 Stellen mit verlängerter Insertionsaktivität im M. interosseus; NLG: 36 m/sek.; MSAPs hochgradig amplitudenreduziert, sowohl nach proximaler als auch nach distaler Stimulation	N. ischiadicus proximal und distal N. fib. N. tibialis N. ulnaris 2,5% GA 1 Std.	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 42	Hd.	Mix	wk	6,5 J.	Diabetes mellitus	N. fib.	12-24 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 43	Hd.	Mix	w	4 J.	Verdacht auf diabetische Polyneuropathie	N. fib. Formalinfixiert	Einsendung, Biopsie	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 11	Huhn		w	Mon.	Hypothyreose, fragliche verminderte Propriozeption, fragliche reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit	N. fib. 2,5% GA 2 Std.	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 12	Huhn		w	Mon.	Hypothyreose, keine neurolg. und elektrodiagnost. Veränderungen	N. fib. 2,5% GA 2 Std.	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt

Tabelle 24-2: Kasuistik

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Vorbericht und Diagnose	Probe und Handling	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Untersuchungen
VK 35	Hd.	Bobtail	m	9 J.	Verdacht auf Hypothyreose; Chron. Tetraparese, NLG red., patholog. Einstichaktivität an dist. Gldm.	N. fib. 2,5%GA 1,5 Std.	Biopsie; nativ eingeschickt	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 36	Hd.	Border Terrier	mk	9	M. Cushing, fgl. Hypothyreose, multiple Ausfälle peripherer Nerven	N. fib. sofort in 2,5% GA 1 Std.	Biopsie	Osmiumteasing Semidünnschnitt Elektronenmikroskopie
VK 37	Hd.	West Highland White Terrier	m	adult	Cushingneuro/myopathie	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	ca. 18 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt Elektronenmikroskopie ?
VK 38	Hd.	RHD	w	adult	Cushingneuro/myopathie	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	ca. 12 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 39	Hd.	Collie-Mix	w	adult	Cushingneuro/myopathie	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	frisch tot	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 40	Pfd.	VB	w	18 J.	Cushingneuro/myopathie	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	frisch tot	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 41	Hd.	Pudel	w	13 J.	bilaterale Nebennierenrindenhypertrophie (Adenome)	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	ca. 24 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 18 n	Ktz.	EKH	wk	13 J.	Mastzell-Leukose	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	12 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 48	Hd.	Deutscher Schäferhund	w	11 Jahre	malignes Lymphom, Chemotherapie	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	ca. 18 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 17	Pfd.	WB	w	1 J.	Ligustervergiftung: primär Festliegen mit Kolik, anschließend progressive Ataxie	N. fib. 2,5% GA 2 Std.	frisch tot	Osmiumteasing Semidünnschnitt Elektronenmikroskopie
VK 21 n	Ktz.	EKH	wk	adult	Verdacht auf Organophosphatvergiftung; massiver Magenculus	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 23	Elefant		m	5 J.	TBC, Urämie	N. ulnaris 2,5% GA 1,5 Std.	ca. 24 Stunden	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 9 n	Schw.	DLR	mk	Absatzferkel	Verdacht auf Vit.E- und Selenmangel	N. fib. 2,5% GA 2 Std.	max. 2 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt

Tabelle 24-3: Kasuistik

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Vorbericht und Diagnose	Probe und Handling	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Untersuchungen
VK 10 n	Hd.	Kuvacz	m	Mon.	Progressiv-degenerative multifokale Neuroopathie (Eosinophilie, Monozytose)	N. fib. bds. N. facialis bds. 2,5% GA 2 Std.	ca. 3 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 13	Hd.	DSH	mk	10 J.	Cauda equina Kompressionssyndrom, Polyneuropathie NLG herabgesetzt	N. fib. li N. ulnaris li 2,5% GA 2 Std.	ca. 12 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 16 a	Maus	NP28			Glycinrezeptordefekt	N. fib. bds. 2,5% GA 2 Std	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt DPED -Teasing (Protokoll e zur Myelinscheidendarstellung vgl. 2.1.4.2)
VK 16 b	Maus	NP29			Glycinrezeptordefekt	N. fib. bds. 2,5% GA 2 Std.	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt DPED -Teasing (Protokoll e zur Myelinscheidendarstellung vgl. 2.1.4.2)
VK 16 c	Maus	NP30			Glycinrezeptordefekt	N. fib. bds. 2,5% GA 2 Std.	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt DPED -Teasing (Protokoll e zur Myelinscheidendarstellung vgl. 2.1.4.2)
VK 16 d	Maus	NP31			Glycinrezeptordefekt	N. fib. bds. 2,5% GA 2 Std.	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt DPED -Teasing (Protokoll e zur Myelinscheidendarstellung vgl. 2.1.4.2)
VK 16 e	Maus	NP32			Glycinrezeptordefekt	N. fib. bds. 2,5% GA 2 Std.	Entnahme sofort nach Euthanasie	Osmiumteasing Semidünnschnitt DPED -Teasing (Protokoll e zur Myelinscheidendarstellung vgl. 2.1.4.2)
VK 22	Ktz.	EKH	wk	4 J.	Hyperthyreose	N. fib. 2,5% GA 2 Std.	ca.18 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 44	Hd.	Airedale Terrier	m	4 J.	Polymyositis	N. fib. 2,5% GA 2 Std.		Osmiumteasing

Tabelle 24-4: Kasuistik

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Vorbericht und Diagnose	Probe und Handling	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Untersuchungen
VK 46	Ktz.	EKH	m	1 J.	Plexusabriss (distal der Spinalganglien) vor 9 Tagen	N. radialis superficialis 2,5% GA 2 Std.	Biopsie, nativ eingeschickt	Osmiumteasing Semidünnschnitt DPED (Protokoll a aus Versuch b) zur Axondarstellung vgl. 2.1.4.1)
VK 47	Pfd.	Warmblut	w	13 J.	Verdacht auf EMND	N. access. 2,5% GA 1 Std.	Nerv ausgetrocknet, einige Tage per Post unterwegs gewesen ca 24 Std.	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VV 7	Hd.	Bordeaux Dogge	m	Mon.	Neosporose	N. fib. 2,5% GA 2 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt Elektronenmikroskopie
VK 50	Pfd.	Quarterhorse	mk	10 J.	Malignes Lymphom	N. acc. 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 51	Hd.	Mix	wk	12 J.	Malignes Lymphom, Chemotherapie	N. fib. 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 52	Hd.	Boxer	w	9 J.	abnorme Kopfbewegung, Zittern, Azotämie, Herzbastistumor	N. fib. 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 53	Hd.	Papillon	m	10 J.	Mastzelltumor	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	frisch tot	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 54	Hd.	Mix	mk	9 J.	Karzinom der Niere mit Metastasen in Leber und Lunge	N. fib. 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 57	Ktz.	EKH	mk	16 J.	chronische Niereninsuffizienz, Gallengangskarzinom	N. fib. 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 58	Hd.	Pudel	wk	13 J.	Übergangszellkarzinom der Harnblase	N. fib. 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 59	Hd.	DSH	m	8 J.	Hämangioendotheliom	N. fib. 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 61	Hd.	Borderterrier	w	7 J.	malignes Lymphom	N. fib. 2,5% GA 1,5 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 62	Ktz.	EKH	wk	12 J.	Schilddrüsenkarzinom, Nebennierenrindadenom	N. fib. 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt

Tabelle 24-5: Kasuistik

Nr.	Tierart	Rasse	Geschl.	Alter	Vorbericht und Diagnose	Probe und Handling	Zeit vom Tod bis zur Entnahme	Untersuchungen
VK 63	Hd.	Königspudel	m	10 J.	akut progressive Polyneuropathie	N. ischiadicus N. fib. N. ulnaris 2,5% GA 1 Std.		Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 64	Pfd.	Lusitano	m	13 J.	seit 4 Wo. Muskelzittern, überwiegend Hinterhand, Schwäche	N. acc. 2,5% GA 1 Std.	Biopsie, sofort fixiert	Osmiumteasing Semidünnschnitt
VK 65	Hd.	Schweizer Sennenhund	wk	9 J.	seit 2 Jahren progrediente Ataxie; Verdacht auf Polyneuropathie	N. fib. 2,5% GA 1 Std.	Biopsie, sofort fixiert	Osmiumteasing Semidünnschnitt (Schnellschnitt)

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Versuche zur Darstellung fixationsbedingter Artefakte

Als Grundlage dienten diesen Untersuchungen 171 Einzelproben bzw. 51300 geteaste Einzelfasern von 14 Tieren. Zu jeder Probe wurden histologische Quer- und Längsschnitte angefertigt. Im Rahmen der Auswertung zeigte sich, dass es sinnvoll ist im Ergebnisteil die einzelnen Inkubierzeiten den Fixierkonzentrationen zuzuordnen.

##### 3.1.1 Teasbarkeit der Einzelfasern

Tendenziell kristallisierte sich heraus, dass bei kurzen Fixierzeiten in 1%igem Glutaraldehyd die Nerven häufig sehr weich und dadurch fragil waren. Bei langen Einwirkzeiten in höheren Konzentrationen kommt es zu einer durch Rigidität und Konsolidierung bedingten Fragilität. Das war am deutlichsten bei 24-stündiger Fixation in 6,25%igem Glutaraldehyd. Einzelheiten zu den jeweiligen Proben sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

##### 3.1.2 Darstellung der Artefakte in Teasingpräparaten und histologischen Kontrollschnitten

###### 3.1.2.1 Fixationsbedingte Artefakte bei Hundenerven

Bei dem 12 Jahre alten Hund **VV12** war an den Teasingpräparaten bei Fixierung in *1%igem Glutaraldehyd* für alle Inkubationszeiten eine bestenfalls mittlere, eher ungleichmäßige Anfärbbarkeit zu erreichen, wobei sich die Kontraste von Myelinscheide zum Axon mit steigender Inkubationszeit verbesserten. Ab einer Inkubationszeit von 4 Stunden schienen die Fasern etwas verquollen. Die Außenkontur der Myelinscheide war stets rau. Bei 2-stündiger Fixierung in 1%igem Glutaraldehyd kamen viele axonale Subhernien vor. Subhernien beschreiben sich aus der Myelinscheide stülpende Axone ohne Axoplasmaustritt. Bei Hernien tritt hingegen immer Axoplasma mit aus. Derartige Subhernien und Hernien traten auch bei anderen Proben bei kurzen Inkubationszeiten in 1%igem Glutaraldehyd auf (vgl. VV8, VV6, VV2, VV4). In den histologischen Kontrollschnitten waren bei einer Stunde vereinzelt „Hufeisenbildungen“ zu beobachten. Hierbei scheint ein Teil des Axons die Myelinscheide zu durchbrechen. Elektronenmikroskopisch war zu belegen, dass hier die Myelinscheide komplett

fehlt, und das Axon sich hernienartig vorwölbt. Das gleiche Phänomen war auch bei VV3, VV16, VV10 und VV11 zu beobachten. Bei VV12 waren lichtmikroskopisch weiterhin Invaginationen und extreme Myelinscheidenfaltungen zu erkennen, die bei 24-stündiger Fixierung im Zirkularitätsverlust myelinisierter Fasern gipfelten. Hierbei war das Interstitium zumeist zerrissen.

Bei Inkubation in 2,5%iger *Glutaraldehyd* wurde in allen Teasingpräparaten prinzipiell eine gute Anfärbbarkeit bei gutem Kontrast erzielt, wobei die bereits bei 4-stündiger Inkubation einsetzende Verquellung, sowie eine beginnende leopardenfällähnliche Tüpfelung der Myelinscheide („Leopardentüpfelung“) die Detailerkennbarkeit bei 24-stündiger Inkubation deutlich herabsetzte. In den histologischen Kontrollschnitten resultierte bei 1-stündiger Inkubation eine gute Anfärbung, nach 2 Stunden wirkten die Schnitte bereits überfärbt und bei 24-stündiger Inkubation war eine Verquellung der Myelinscheiden zu verzeichnen. Elektronenmikroskopisch war in diesen Bereichen die Periodizität der Myelinlamellen nicht mehr nachvollziehbar. Invaginationen der Myelinscheide traten vor allem bei 24-stündiger Inkubation auf. Im Gegensatz zur 1%igen Fixierung war das Interstitium bereits ab 2 Stunden Einwirkzeit zunehmend zerklüftet.

1-, 2- und 4-stündige Inkubation in 6,25%iger *Glutaraldehyd* ergab bei den Teasingpräparaten eine relativ gute Anfärbung und deutliche Kontraste. Bei 24-stündiger Inkubation war die Anfärbung jedoch nur mittelmäßig. Darüberhinaus waren Kontrast und Detailerkennbarkeit hier durch die mit der Inkubationszeit zunehmenden Konsolidierung von Fasern, sowie der stärkeren Verquellung und Leopardentüpfelung der Myelinscheide als schlecht zu beurteilen. Eine sich mit der Inkubationszeit verstärkende Konsolidierung bei 6,25%iger *Glutaraldehyd*fixierung war tierartenübergreifend bei fast allen anderen Nervenproben ebenso zu beobachten (VV1, VV2, VV4, , VV8-10, VV11, VV13, VV15-17). Bei 4-stündiger Inkubation stellten sich Verschiebungen des Myelins bis zur nächsten Schmidt-Lantermanschen Kerbe dar, so dass Einzelfasern ein proglottidenähnliches Aussehen erhielten. Im Gegensatz zu den geteasten Fasern zeigte sich in histologischen Kontrollschnitten generell eine Überfärbung. Myelinscheidenverquellungen und Zirkularitätsverlust der myelinisierten Fasern waren bereits bei 1-stündiger Inkubation aufzuzeigen. Bei zunehmender Inkubationszeit kam es zu Leopardentüpfelungen. Elektronenmikroskopisch liegen ihnen eine Trennung der *intraperiod lines* mit Verquellung der zusammenhängend verbleibenden Lamellen zu Grunde. Ab 4 Stunden Fixierung war das Interstitium verdichtet und auseinandergerissen.

Bei *1%iger Glutaraldehydfixierung* der Probe des jungen Hundes **VV13** verbesserte sich die Anfärbbarkeit der Teasingpräparate bei stets gutem Kontrast mit zunehmender Inkubationszeit. Die Paranodien waren stark aufgehellt, wobei erst eine 24-stündige Fixierung ermöglichte, dass sich diese Bereiche nicht mehr hell darstellten. Dies war auch in anderen Präparaten anderer Spezies zu beobachten (VV1, VV2, VV6, VV9, VV10). Myelinscheideneinfaltung und Leopardentüpfelung nahmen bei VV13 mit zunehmender Inkubationszeit zu, bei 2-stündiger Fixierung zeigte die Myelinscheide sich zusätzlich vakuolisiert. Die Anfärbung der histologischen Schnitte war gut und kontrastreich. Ab 2 Stunden Inkubation zeigten sich in den Randbereichen Myelinverquellungen. Myelinscheidenaufblätterung paranodaler Abschnitte waren, den hellen Paranodien des Teasingbefunds entsprechend, bis auf den 24-Stundenwert zu verzeichnen, wobei hier zusätzlich Myelinscheideneinschlüsse und Schwanzzellvakuolisierungen auffielen.

Bei Fixierung in *2,5%igem Glutaraldehyd* waren Anfärbung und Kontrast der Teasingpräparate durchwegs gut, bei 24-stündiger Einwirkzeit sogar sehr gut. Eine Leopardentüpfelung trat stets auf und beim 2-Stundenwert erschien die Myelinscheide zusätzlich vakuolisiert. Bei 1-stündiger Fixierung waren die Paranodien aufgehellt und zahlreiche Quetschartefakte konnten beobachtet werden. Bei 24-stündiger Fixierung zeigte sich die Myelinscheide verquollen und stark gefaltet. Darüberhinaus fielen Längs- und Querfrakturen auf. Bei den histologischen Kontrollschnitten erschienen bei allen Inkubationszeiten die Myelinscheiden aufgequollen und aufgeblättert, bei 24-stündiger Fixierung regelrecht frakturiert. Bei 1-stündiger Fixierung waren tropfenförmige Einschlüsse in der Myelinscheide erkennbar.

Bei Fixierung in *6,25%igem Glutaraldehyd* war die Anfärbung der geteasten Einzelfasern nach 1 Stunde paranodal eher schlecht, und ab 4 Stunden insgesamt unregelmäßig. Der Farbkontrast blieb dagegen gut. Die Myelinscheide schien stets aufgequollen und ab 2 Stunden traten Leopardentüpfelung, Vakuolisierung und Faltung der Myelinscheide, ab 4 Stunden zusätzlich Querfrakturen auf. Einzelne Fasern waren teilweise miteinander verbacken. In den histologischen Schnitten waren vor allem in den Randbereichen eine deutliche Verquellung und Aufblätterung des Myelins mit Einschlüssen in der Myelinscheide auffallend.

Bei dem Hund **VV1** wurden auf Grund von mangelndem Ausgangsmaterial für jede Fixierstufe nur der 1- und 2-Stunden-Wert ermittelt.

Bei Fixierung in *1%igem Glutaraldehyd* war die Anfärbung in den Teasingpräparaten ungleichmäßig, wobei vor allem paranodal Aufhellungen zu verzeichnen waren. Nach 2-stündiger Fixierung kam es zur leichten Leopardentüpfelung. Die Außenkontur der



Myelinscheide schien hier stets aufgeraut. Histologisch zeigte sich bereits bei 1 Stunde eine leichte Leopardentüpfelung und sowohl bei 1 wie auch bei 2 Stunden waren vorwiegend paranodal gelegene, vakuolisierte Aufhellungen zu beobachten.

Bei Fixierung in *2,5%igem Glutaraldehyd* waren sowohl Anfärbung als auch Kontrast der Teasingpräparate besser als bei der 1%igen Fixierung, und die Außenkontur der Myelinscheide war weniger aufgeraut. Vereinzelt paranodale Aufhellungen traten bei 2 Stunden auf, die sich auch in den histologischen Kontrollschnitten zeigten. Die Myelinscheide war im Teasing und in den Kontrollschnitten leopardenartig getüpfelt.

Bei *6,25%iger Glutaraldehydfixierung* war die Detailerkennbarkeit der gezupften Einzelfasern durch Verquellung, Konsolidierung und stärkerer Leopardentüpfelung der Myelinscheide stark reduziert. Zudem traten Längs- und Querfrakturen wieder gehäuft auf. Die Außenkontur der Myelinscheide blieb hier jedoch glatt. Histologische Kontrollschnitte spiegelten die Leopardentüpfelung wider, die teilweise mit einer Vakuolisierung der Myelinscheide einherging.

### 3.1.2.2 Fixationsbedingte Artefakte bei Katzennerven

Bei der 18 Jahre alten Katze **VV8** waren bei Fixierung in *1%igem Glutaraldehyd* die geteasten Einzelfasern bis auf den 4-Stunden-Wert von guter Anfärbung bei gutem Kontrast. Die Außenkontur der Myelinscheide war stets rau. Hier neigten die Fasern bei 1-stündiger Fixierung zu Subhernien. Ab 4 Stunden schienen die Fasern geringgradig aufgequollen, bei 24-stündiger Fixierung etwas vakuolisiert und vermehrt quer-frakturiert. Bei den histologischen Kontrollschnitten war die Anfärbung mit steigender Inkubationsdauer zu verbessern. Die Myelinscheide zeigte zunehmend Aufblätterungen, die elektronenmikroskopisch als Separierung der *intraproduct lines* zu identifizieren waren. Im Bereich um das Axon stellten sie sich wabenartig dar. Bei 4 Stunden war in vielen Querschnitten eine Doppelringbildung der Myelinscheide zu erkennen, die sich ultrastrukturell ebenfalls als Separierung der *intraproduct lines* erwies. Diese Doppelringbildung war auch bei 1%iger Glutaraldehydfixierung bei den Tieren VV10 und VV3 reproduzierbar.

In Teasingpräparaten der *2,5%igen Glutaraldehydfixierung* waren die Anfärbung und der Kontrast ab 4 Stunden schlechter und die Myelinscheide immer stärker aufgequollen. Ab einer Inkubationszeit von 2 Stunden nahm die Leopardentüpfelung zu, wobei nach 24 Stunden zusätzlich eine Vakuolisierung der Myelinscheide auftrat. Die 1-stündige Fixierung wies

Subhernien und Querfrakturen auf. In histologischen Kontrollschnitten war die Anfärbung prinzipiell gut, wobei die Myelinscheide mit steigender Inkubationsdauer eine intensivere Leopardentüpfelung zeigte. Außer beim 4-Stundenwert war die Myelinscheide insgesamt aufgeblättert. Diese Aufblätterung zeigte sich in Querschnitten mitunter auch hier als Doppelring.

Bei Fixierung in *6,25%igem Glutaraldehyd* waren Anfärbung und Kontrast der Teasingpräparate zunehmend schlechter und unregelmäßiger. Eine stete Leopardentüpfelung war von geringer Aufquellung der Myelinscheide und geringgradiger Verbackenheit von Einzelfasern begleitet. Die histologischen Kontrollschnitte zeigten eine starke Myelinscheidenaufblätterung, die bei 24-stündiger Inkubation von einer deutlichen Aufquellung der Myelinscheide mit Leopardentüpfelung überdeckt wurde.

Das Jungtier **VV6** hatte bei *1%iger Glutaraldehydfixierung* nach 2 Stunden das beste Ergebnis für Anfärbbarkeit und Kontrast der Teasingpräparate, wobei sich die histologischen Schnitte nach 1 Stunde am deutlichsten anfärben ließen. Bei 1 und 2 Stunden waren paranodale Aufhellungen und eine unregelmäßige Außenkontur der Myelinscheide zu beobachten, die sich in der Querschnittshistologie gleichermaßen darstellten. Axonale (Sub-)hernien waren nach 1 und 4 Stunden an den Teasingpräparaten zu erkennen. Ab 4 Stunden Inkubation setzte hier eine geringgradige Leopardentüpfelung ein. In den Kontrollschnitten war eine in erster Linie paranodale, mit steigender Inkubationszeit stärker werdende Aufblätterung der Myelinscheide vorhanden.

Teasingpräparate der *2,5%igen Glutaraldehydfixierung* zeichneten sich durch eine mit steigender Inkubationsdauer verbessernde Anfärbung und zunehmenden Kontrastreichtum aus. Die Myelinscheide schien bei 1-stündiger Fixierung eingefaltet, was sich ebenso in Kontrollschnitten nachvollziehen ließ. Eine geringgradige Leopardentüpfelung war bei allen Inkubationszeiten sowohl an Einzelfaser-, wie auch Schnittpräparaten vorhanden. Bei letzteren schienen die Myelinscheiden stets etwas aufgeblättert, wobei ab 4 Stunden eine derartige Überfärbung vorlag, dass Axon und Myelinscheide kaum voneinander bzw. vom zusammengeschrumpft erscheinenden Endoneurium zu unterscheiden waren.

Bei *6,25%igem Glutaraldehyd* wurden Anfärbung und Kontrast bei Teasingpräparaten mit steigender Inkubationsdauer besser. Zu Querfrakturen und axonalen Hernien traten bei längerer Fixierzeit die Verbackung einzelner Fasern, Leopardentüpfelung und bei 24 Stunden eine deutliche Aufquellung der Myelinscheide hinzu. In allen Schnitten war neben der Leopardentüpfelung eine hochgradige Einfaltung und Aufblätterung der Myelinscheide zu

verzeichnen, die mit der Inkubationszeit jeweils zunahm. Durch eine zusätzliche Überfärbung, die ab der 4. Stunde auftrat, war eine Beurteilung kaum noch möglich.

### 3.1.2.3 Fixationsbedingte Artefakte bei Pferdenerven

Bei dem Fohlen **VV16** waren die Teasingpräparate bei *1%iger Glutaraldehydfixierung* bis auf den 24-Stundenwert mittelgut anzufärben, wobei der Kontrast ab 4 Stunden zunehmend unklar und die Fasern etwas verbacken wirkten. Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden war die Myelinscheide aufgequollen. Histologische Kontrollschnitte waren gut anfärbbar. Bei 1- und 2-stündiger Fixierung zeigten sich Myelinscheidenaufblätterungen. Nach einer Fixierung von 2 Stunden konnte eine Vakuolisierung des Schwanzzellzytoplasmas festgestellt werden.

Bei Fixierung in *2,5%igem Glutaraldehyd* waren innerhalb der 2- und 4-Stundenwerte Anfärbbarkeit und Kontrast sehr gut. Beim 1- und 2-Stundenwert faltete sich die Myelinscheidenaußenkontur geringgradig. Ab 4 Stunden wirkten die Fasern zunehmend aufgequollen und bei 24 Stunden sehr verbacken. Histologische Kontrollschnitte waren bis auf vereinzelte Hufeisenbildung nach 4 Stunden unauffällig.

Die Teasingfasern ließen sich in *6,25%igem Glutaraldehyd* bei gutem Kontrast deutlich anfärben. Die Konsolidierung der Einzelfasern nahm mit steigender Inkubationszeit massiv zu und bei 24 Stunden kam es vermehrt zu Quetschartefakten. Die Fasern wirkten ab 2 Stunden zunehmend verquollen, wobei sich hier noch einige Frakturen zeigten. Ab einer Inkubationsdauer von 4 Stunden trat eine Leopardentüpfelung auf. In den histologischen Längsschnitten stellten sich Bereiche nicht-kompaktierten Myelins schollig dar, und die Myelinscheide wirkte im Querschnitt zunehmend eingefaltet. Wie bei der 1%igen Fixierung war das Schwanzzellzytoplasma schaumig vakuolisiert.

Bei dem 8 Jahre alten Pferd **VV17** schienen Teasingpräparate *1%iger Glutaraldehydfixierung* bei 1 Stunde extrem und bei 24 Stunden mäßig überfärbt, so dass keine klaren Kontraste darstellbar waren. Bei 2 und 4 Stunden waren Anfärbbarkeit und Kontrast jeweils mittelgut. Bei allen Inkubationszeiten lag eine hochgradige Konsolidierung der Nervenfasern vor, wobei alle Fasern mit der Fixierzeit zunehmend zu Quetschartefakten neigten. In den Kontrollschnitten stellten sich die SLK`s feinlamellär dar.

Bei *2,5%iger Glutaraldehydfixierung* wurden Anfärbbarkeit und Kontrast mit steigender Fixierdauer schlechter, bei 24 Stunden waren die Fasern schließlich hochgradig überfärbt.

Nach 2-stündiger Fixierung war mitunter eine Umverteilung des Myelins in paranodalen Bereichen zu beobachten, so dass das Axon hier dunkel dargestellt war. Dasselbe Phänomen konnte bei VV3 (Pfd., 6 J.) mit 2,5%igem Glutaraldehyd nach 4 Stunden, und bei VV10 (Rind, 3 J.) mit 1%igem Glutaraldehyd nach 1 Stunde erreicht werden. Einzelfasern von VV17 waren mit der Zeit zunehmend konsolidierter und ab 4 Stunden kam es zu Quetschartefakten. Die Myelinscheiden zeigten eine geringgradige Leopardentüpfelung. In histologischen Längsschnitten stellten sich die SLK's bei 2,5%iger Fixierung ab 2 Stunden Inkubation schollig, bei 24 Stunden sogar mit Protrusion nach innen dar. Im Querschnitt zeigten die Myelinscheiden einen geringgradigen Zirkularitätsverlust.

Teasingpräparate mit *6,25%iger Glutaraldehydfixierung* wurden bei stets deutlicher Leopardentüpfelung in Anfärbung und Kontrast zunehmend schlechter und waren ab 4 Stunden deutlich überfärbt. Ab 2 Stunden wirkten die Fasern bereits konsolidiert. Im 24-Stundenwert waren zusätzlich viele Frakturen zu verzeichnen. Ab 2 Stunden Inkubation waren die SLK's in den Längsschnitten derart schollig aufgedunsen, dass sie kaum noch als solche zu erkennen blieben. Im Querschnitt zeigte sich hier mitunter ein Zirkularitätsverlust. Nach 24 Stunden schien das Interstitium etwas brüchig zu sein.

Von dem 6-jährigem Wallach **VV3** war bei Fixierung in *1%igem Glutaraldehyd* der 1- und 2-Stundenwert auf Grund höchster Fragilität nicht teasbar. Anfärbung und Kontrast waren bei 4 Stunden trotz Leopardentüpfelung gut, und bei 24 Stunden von uneinheitlicher Qualität. In Kontrollschnitten zeigte die Myelinscheide häufig Doppelringbildungen. Elektronenmikroskopisch war der Bereich zwischen den Ringen als Schwannzellzytoplasma zu identifizieren. In den Längsschnitten waren bei 4-stündiger Fixierung die SLK's fein aufgeblättert und das Schwannzellzytoplasma durchwegs leicht vakuolisiert.

Anfärbung und Kontrast der Teasingpräparate war bei allen Inkubationszeiten in *2,5%igem Glutaraldehyd* sehr gut, wobei ab 2 Stunden eine Leopardentüpfelung hinzukam. Die Anzahl an Querfrakturen war bei 2-stündiger Fixierung am höchsten. In histologischen Kontrollschnitten war die Anfärbung bei zunehmender Myelinscheidenaufblätterung stets gut. Bei 4 Stunden zeigte sich das Schwannzellzytoplasma wie das der Proben der 1%igen Fixierung vakuolisiert.

Gesteaste Fasern *6,25%iger Glutaraldehydfixierung* hatten die beste Anfärbung bei 24 Stunden, wobei der Kontrast hier am schwächsten war. Die Myelinscheidenkontur stellte sich etwas unregelmäßig dar, und Leopardentüpfelungen waren ein konstantes Merkmal. Die meisten Querfrakturen traten bei 1 Stunde auf. Bei histologischen Kontrollschnitten zeigten sich neben

einem deutlichen Zirkularitätsverlust myelinisierter Fasern auch eine Aufblätterung der Myelinscheide nach 1 sowie 24 Stunden und eine Verquellung nach 4 Stunden.

#### 3.1.2.4 Fixationsbedingte Artefakte bei Schweinenerven

Bei dem 12 Wochen alten Tier **VV11** war bei Fixierung in *1%igem Glutaraldehyd* Anfärbung und Kontrast nur nach 2-stündiger Fixierung als gut zu bewerten. Bei einer Stunde traten viele, bei 2 Stunden vereinzelt Querfrakturen auf. Beim 4-Stundenwert waren viele Quetschartefakte zu verzeichnen. In den Kontrollschnitten waren Anfärbung und Kontrast stets gut. Bis zu 4 Stunden Inkubation traten Hufeisenbildungen und eine Aufblätterung der Myelinscheide auf, die bereits ab dem 4-Stundenwert von Verquellung und Faltung der Myelinscheide begleitet wurden.

In *2,5%igem Glutaraldehyd* waren Kontrast und Anfärbung in den 1- und 2-Stunden Präparaten am besten. Zu Quer- und Längsfrakturen kam es bei 1 Stunde und zu wenigen Querfrakturen bei 2 und 24 Stunden. Nach 24 Stunden schien die Myelinscheide geringgradig aufgequollen. In den Schnitten war die Anfärbung und der Kontrast bis zu 4 Stunden gut, wobei ab 2 Stunden bereits eine deutlicher werdende Leopardentüpfelung einsetzte und das Axon zunehmende Schrumpfungstendenz aufwies. Nach 24-stündiger Inkubation war diese am deutlichsten, wobei zusätzlich eine Myelinscheidenverquellung hinzukam.

Bei *6,25%igem Glutaraldehyd* wurden Anfärbung und Kontrast der Teasingpräparate mit steigender Inkubationszeit schlechter. Nach 2 Stunden begann sich eine Myelinscheidenverquellung mit Leopardentüpfelung abzuzeichnen. Das bestätigte sich auch in den Kontrollschnitten. Die Verbackenheit der Nervenfasern stieg mit der Fixierdauer.

Bei der Altsau **VV15** zeigten die Teasingpräparate bei *1%iger Glutaraldehydfixierung* stets eine gute Anfärbbarkeit bei zunehmend schlechter werdendem Kontrast. Querfrakturen waren multipel nach 1 Stunde und seltener nach 2 Stunden. Eine Verquellung und Faltung der Myelinscheide setzte ab der 2. Stunde ein. Eine Leopardentüpfelung trat nur nach 4-stündiger Inkubation auf. In den Schnitten war bei 1 und 2 Stunden eine feine Aufsplitterung der Myelinscheide erkennbar. Sie wurde ab 2 Stunden Fixierung zunehmend von Verquellungen und Leopardentüpfelungen abgelöst. Bei 24 Stunden faltete sich die Myelinscheide ein und das Schwannzellzytoplasma schien vakuolisiert.

Bei *2,5%iger Glutaraldehydfixierung* waren Anfärbung und Kontrast der Teasingpräparate bis zu 2 Stunden gut, ab 4 Stunden jedoch durch eine zunehmende Leopardentüpfelung und Myelinscheidenverquellung gekennzeichnet. Bei den histologischen Kontrollschnitten war diese Tendenz bereits ab 2-stündiger Fixierung vorhanden.

*6,25%ige Glutaraldehydfixierung* bewirkte eine mit der Inkubationszeit ansteigende Konsolidierung der Fasern, Leopardentüpfelung, Verquellung und Einfaltung der Myelinscheide, was sich auch in den histologischen Schnitten widerspiegelte.

Bei dem Schwein **VV2** wurden auf Grund von Materialmangel nur 1-, 2- und 24-Stundenwerte der verschiedenen Fixierstufen untersucht. Bei *1%igem Glutaraldehyd* stellten sich Färbung und Kontrast der Teasingpräparate ungleichmäßig mit paranodalen Aufhellungen, die bei 24 Stunden allerdings unilateral waren, dar. Leopardentüpfelung und Querfrakturen waren bei 24 Stunden am ausgeprägtesten. Beim 1-Stundenwert waren Hernien mit Austritt von Axoplasma zu sehen. Im Schnittbild war nach 24-stündiger Inkubation Leopardentüpfelung und Fältelung der Myelinscheide sowie Einschlüssen innerhalb der Myelinscheide, die sich in den axonalen Tubus vorwölbten, zu erkennen. Letztere waren elektronenmikroskopisch als lamellenartige Ausstülpungen der Myelinscheide zu identifizieren. Bei bis zu 2 Stunden Fixierung war die Myelinscheide aufgeblättert.

Die *2,5%ige Glutaraldehydfixierung* zeigte nach 2 Stunden die beste Anfärbung und den besten Kontrast, wobei die Paranodien stets heller waren als die internodalen Bereiche. Bei 24 Stunden war die Aufhellung nur noch unilateral. Die Fasern wirkten hier stets konsolidiert. Bis zu 1 Stunde waren wenige axonale Hernien zu beobachten. Ab 2 Stunden schien die Myelinscheidenkontur rauer und eine beginnende Leopardentüpfelung zeichnete sich ab. Im Schnittbild traten ab 2 Stunden Leopardentüpfelungen und eine Fältelung der Myelinscheide auf. Bei 2 und 24 Stunden zeigten sich Myelinscheideneinschlüsse. Das Myelin der Paranodien schien (außer bei 1 Stunde) in der Peripherie schaumig-feinvakuolär aufgeheilt, und zentral eher lamellär aufgesplittert. Eine detailliertere Darstellung war elektronenmikroskopisch nicht möglich.

Anfärbung und Kontrast bei in *6,25%iger Glutaraldehydlösung* fixierten Teasingpräparaten waren durchwegs gut. Nach 24 Stunden trat eine leichte Leopardentüpfelung auf. Ab 2 Stunden wirkten die Fasern konsolidiert. Nur bei 1-stündiger Fixierung kam es zu axonalen Hernien. Die histologischen Schnitte waren zunehmend durch Leopardentüpfelung und Fältelung der Myelinscheide gekennzeichnet und die Paranodien des 2-Stundenwertes stellten sich wie unter 2,5% beschrieben dar. Zusätzlich waren hier Einschlüsse in der Myelinscheide zu verzeichnen.

### 3.1.2.5 Fixationsbedingte Artefakte bei Rindernerven

Die Teasingpräparate des Kalbes **VV9** waren bei *1%iger Glutaraldehydfixierung* trotz gutem Kontrast schlecht und ungleichmäßig angefärbt. Bei 1-stündiger Fixierung waren die Paranodien aufgehellte. In den Kontrollschnitten zeigte sich eine mit der Inkubationszeit zunehmende Aufblätterung der Myelinscheide und ab 4 Stunden war das Schwanzzellzytoplasma vakuolisiert. Eine geringgradige Leopardentüpfelung konnte bei einer Stunde vereinzelt beobachtet werden. Ab 4 Stunden setzte sie jedoch mit Regelmäßigkeit ein.

Anfärbung und Kontrast der Teasingpräparate bei *2,5%iger Glutaraldehydfixierung* waren nach 1 Stunde gut, nach 2 Stunden ungleichmäßig schlecht und bei 4 Stunden wieder sehr gut. Bei 24 Stunden war die Anfärbung bei vorhandenem Kontrast ungleichmäßig und schlecht. Beim 2-Stundenwert schienen einige Einzelfasern geringgradig verbacken zu sein und wiesen wenige Querfrakturen auf. In den histologischen Kontrollschnitten war die Myelinscheide etwas aufgeblättert. Ab 2 Stunden kam es zur Leopardentüpfelung. Bei 1 Stunde war ein geringgradiger Zirkularitätsverlust myelinisierter Fasern zu verzeichnen. Ab 24 Stunden war das Schwanzzellzytoplasma extrem vakuolisiert.

Bei *6,25%iger Glutaraldehydfixierung* waren Anfärbung und Kontrast bei 2 und 4 Stunden gut, ansonsten eher schlecht. Die Fasern wirkten zunehmend aufgequollen und ab 2 Stunden zudem verbacken. Bei 2-stündiger Inkubation schien sich das Myelin in den SLK's proglottidenartig zusammenschieben. Ab 4 Stunden traten eine Leopardentüpfelung und vereinzelte Querfrakturen auf. Die histologischen Schnitte zeigten zunehmend Leopardentüpfelung und Verquellung der Myelinscheide. Das Schwanzzellzytoplasma war bis auf den 24-Stundenwert vakuolisiert, wobei die SLK's hier schollig aufgedunsen und eingestülpt wirkten. Nach 2 Stunden konnte eine Schrumpfung des Axons festgestellt werden.

Bei Tier **VV10** (3J.) waren Anfärbbarkeit und Kontrast der Teasingpräparate bei *1%iger Fixierung* im Allgemeinen mittelgut. Ab 4 Stunden wurde die Anfärbung ungleichmäßiger. Bei 1-stündiger Fixierung waren die Paranodien mit einer scheinbaren Umverteilung der Osmiophilie von der Myelinscheide auf das Axon aufgehellte. Die Myelinscheide war hier zudem angeraut. Fasern aller Inkubationszeiten wirkten aufgedunsen und ab 4 Stunden miteinander verbacken. Quetschartefakte zeigten sich bei 1- und 2-stündiger Fixierung, nach 24 Stunden traten einige Frakturen der Nervenfasern auf. Die histologischen Schnitte waren durch eine Myelinscheidenaufblätterung gekennzeichnet, die sich häufig in einer regelrechten Doppelringbildung äußerte. Elektronenmikroskopisch entsprachen die Bereiche sowohl einer

Separation der *intraperiod lines* als auch der *major dense lines*. Nach 2 Stunden wirkten Myelinscheide und Interstitium in dieser Fixierstufe lichtmikroskopisch verquollen. Nach 24-stündiger Fixierung traten gelegentlich Hufeisenbildungen auf.

Bei Fixierung in 2,5%igem Glutaraldehyd waren Anfärbung und Kontrast in den Teasingpräparaten nach 2 und 24 Stunden schlecht, nach 1 und 4 Stunden hingegen gut. Die Myelinscheide wirkte nach 2 Stunden etwas verquollen. Quetschartefakte waren bei 1-stündiger Fixierung zu verzeichnen. Hier traten zudem Quer- und vereinzelte Längsfrakturen auf, die sich nach 4-stündiger Inkubation auf Querfrakturen reduzierten. Nach 24 Stunden wirkten die Fasern konsolidiert. In den Schnitten schien die Myelinscheide schollig aufgetrieben. Bei 1 Stunde waren ein geringgradiger Zirkularitätsverlust, und bei 4 Stunden Axonschrumpfungen festzustellen. Bei 2-stündiger Fixierung kam es zu einer Hufeisenbildungen.

Sowohl Anfärbung als auch Kontrast der Teasingpräparate stellten sich bei 6,25%iger Glutaraldehydfixierung sehr heterogen dar, wobei das beste Ergebnis nach 1-stündiger Fixierung erreicht wurde. Die Außenkontur der Myelinscheide war bei 1 und 4 Stunden rau. Bei 1 Stunde kam es zu Längsfrakturen. Quetschartefakte traten nach 2-stündiger Fixierung auf. Die Fasern wirkten mit steigender Inkubationszeit zunehmend verbacken. In den histologischen Kontrollschnitten wirkte die Myelinscheide verquollen und bei 2 Stunden kam es zur Leopardentüpfelung. Nach 4 Stunden traten vereinzelt Hufeisenbildungen auf. Nach 24 Stunden waren einige Axone geschrumpft.

Bei dem Kalb VV4 waren Anfärbung und Kontrast der Teasingpräparate bei Fixierung in 1%igem Glutaraldehyd nach 1 Stunde am besten. Bei längerer Fixierung trat dagegen eine Leopardentüpfelung in den Vordergrund. Ab 24 Stunden wirkten die Fasern zudem aufgedunsen. Bei 1-stündiger Fixierung traten axonale Hernien und Querfrakturen auf. In histologischen Kontrollschnitten konnte bis zu 4 Stunden eine fein radiäre Myelinscheidenaufblätterung festgestellt werden, die sich durch eine zentrale Verquellung von den bisher bei anderen Proben beobachteten Aufblätterungen unterschied. Elektronenmikroskopisch war sie einer Trennung der *intraperiod lines* zuzuordnen. Die zentrale Verquellung stellte sich in diesen Vergrößerungsstufen als Axon mit hyalin verquollenem Plasma heraus.

Bei 2,5%iger Glutaraldehydfixierung waren Anfärbung und Kontrast prinzipiell gut, wobei es bei 1 Stunde zu einer sehr deutlichen Leopardentüpfelung kam, die bei 2 Stunden fehlte, und ab 4 Stunden im schwächeren Maße auftrat. Nach 24 Stunden schienen große Fasern verquollen



und kleine eher verbacken zu sein. Die histologischen Kontrollschnitte waren hier aber unauffällig.

Bei der 6,25%igen *Glutaraldehydfixierung* war die Anfärbung gut, wobei bei steigender Konzentration aufgrund von extremer Leopardentüpfelung, zunehmender Vakuolisierung der Myelinscheide und Überfärbung die Kontraste immer schlechter wurden. Die Nervenfasern waren derartig verbacken, dass sie ab 4 Stunden zerrupft und bei 24 Stunden regelrecht zerfetzt wirkten. Die Kontrollschnitte zeichneten sich durch eine Leopardentüpfelung und Myelinscheidenverquellung aus.

Die fixationsbedingten Veränderungen des Tieres **VV5** entsprachen denen, des Kalbes **VV4**.

### 3.1.2.6 Speziesübergreifende Zusammenfassung frequent auftretender fixierungsbedingter Artefakte

#### 3.1.2.6.1 Verquellung der Myelinscheide

Verquellungen der Myelinscheide traten bei Teasingpräparaten am häufigsten und massivsten bei Fixierung in 6,25%igem Glutaraldehyd auf, wobei sie in der Regel mit der Inkubationszeit zunahm. Bei dem Schwein **VV15** setzte sie bereits ab 2 Stunden, und bei dem Hund **VV12**, sowie der Katze **VV8** ab 4 Stunden in 1%igem Glutaraldehyd ein. Das Rind **VV10** zeigte als Ausnahme nur bei 1%igem Glutaraldehyd eine Aufgedunsenheit der Teasingpräparate. Die Verquellung korrelierte selten exakt mit den Kontrollschnitten, wobei sie auch hier am stärksten bei steigender Fixierung in 6,25%igem Glutaraldehyd auftrat. Die Myelinscheidenverquellung war spezies- und altersunabhängig.

#### 3.1.2.6.2 Leopardenartige Tüpfelung der Myelinscheide

Die „Leopardentüpfelung“ war unter den Teasingpräparaten am deutlichsten bei Fixierung in 6,25%igem Glutaraldehyd ausgeprägt. Sie nahm tendenziell bei allen Fixationskonzentrationen mit der Inkubationszeit zu. Sie korrelierte selten exakt mit den Kontrollschnitten, wobei sie auch hier am eindeutigsten bei steigender Fixierung in 6,25%igem Glutaraldehyd vertreten war. Es bestand kein Zusammenhang zu Spezies oder Alter. Vereinzelt gesellten sich zur Leopardentüpfelung auch Vakuolisierungen der Myelinscheide (**VV4**, **VV 8**, **VV13**).

### 3.1.2.6.3 Konsolidierung der Nervenfasern in Teasingpräparaten

Bei Fixierung in 6,25%igem Glutaraldehyd zeigten alle Proben außer denen des Pferdes VV3 und der Katze VV6 eine Verbackung der Nervenfasern. In der Regel stieg sie mit der Dauer der Inkubationszeit. Bei dem Pferd VV17 trat sie bei allen Inkubationszeiten, und bei dem Fohlen VV16 sowie dem Rind VV10 ab 4 Stunden in 1%igem Glutaraldehyd auf. Diese wurden mit zunehmender Inkubation immer deutlicher. Ein histologisches Korrelat war nicht festzustellen. Die Konsolidierung war spezies- und altersunabhängig.

### 3.1.2.6.4 Paranodale Aufhellungen

Zu paranodalen Aufhellungen in Teasingpräparaten kam es in erster Linie bei 1- und 2-stündiger Fixierung in 1%igem Glutaraldehyd (VV1, VV2, VV6, VV9, VV10, VV13). Sie waren bei längerer Inkubation nicht mehr nachvollziehbar.

Bei 2,5%igem Glutaraldehyd waren bei 1- (VV13) bzw. 2-stündiger (VV1), und bei 6,25%igem Glutaraldehyd einmalig (VV13) bei 1-stündiger Einwirkzeit die Paranodien aufgehellt. Häufig korrelierten in der Histologie eine paranodale Myelinscheidenaufblätterung (VV1, VV2, VV6, VV13). 4 von 6 Tieren waren Jungtiere, wobei je ein alter (10J.) und ein junger (8 Wo) Hund, sowie ein älteres (3 J.) und ein junges (13 Tg.) Rind betroffen war.

### 3.1.2.6.5 Subhernien und Hernien bei Teasingpräparaten

Als Subhernien wurden sich aus der Myelinscheide stülpende Axone ohne Axoplasmaaustritt, und als Hernien solche mit Axoplasmaaustritt bezeichnet. Sie traten in erster Linie bei 1- und 2-stündiger Fixierung in 1%igem Glutaraldehyd auf (VV2, VV4, VV6, VV8, VV12). Vereinzelt waren sie noch bei 1-stündiger Fixierung in 2,5%igem (VV2, VV8) und 6,25%igem (VV2, VV6) Glutaraldehyd zu beobachten. Drei der betroffenen Tiere waren jung und zwei alt, wobei je eine Katze vertreten war.

### 3.1.2.6.6 Frakturen bei Teasingpräparaten

Frakturen traten bei allen Inkubationszeiten in jeder Konzentration auf, wobei sie bei 1%iger und 6,25%iger Glutaraldehydfixierung etwas gehäuft festzustellen waren als bei 2,5%iger Fixierung. Querfrakturen traten bei allen Fixierstufen, Längsfrakturen hingegen nur bei

2,5%igem und 6,25%igem Glutaraldehyd auf. Die Frakturen waren spezies- und altersunabhängig.

#### 3.1.2.6.7 Quetschartefakte bei Teasingpräparaten

Quetschartefakte traten bei allen Fixierungsstufen, jedoch am häufigsten bei den sehr weichen Proben mit 1%iger Glutaraldehydfixierung auf. Sie waren spezies- und altersunabhängig.

#### 3.1.2.6.8 Fixierungsbedingte Veränderung der Myelinscheiden in histologischen Schnitten

Bei Fixierung in 1%igem Glutaraldehyd schienen die Myelinscheiden in Querschnitten häufig fein aufgeblättert (VV2, VV4, VV6, VV8-11, VV15, VV16). Die Tendenz war dahingehend, dass diese Aufblätterung bei 2,5%igem Glutaraldehyd seltener und weniger filigran zu beobachten war.

Bei Fixierung in 6,25%igem Glutaraldehyd trat die Verquellung der Myelinscheide derart in den Vordergrund, dass die Aufblätterung im Sinne der 1%igen Glutaraldehydfixierung kaum noch nachvollziehbar war. In Längsschnitten war dieses fixierungsbedingte Verhalten der Myelinscheide besonders gut in Bereichen des nicht-kompaktierten Myelins nachzuweisen. So zeigte sich bei 1%iger Glutaraldehydfixierung eine feinlamelläre Aufblätterung der SLK's (VV17, VV3). Bei Inkubation in 2,5%igem Glutaraldehyd schienen die SLK's eher schollig, mitunter mit Protrusionen nach innen (VV17, VV10), und bei 6,25%iger Fixierung regelrecht schollig aufgedunsen (VV17, VV16, VV9).

Ebenso waren paranodale Myelinscheidenaufblätterungen nur in niedrigen Fixierstufen zu verzeichnen (vgl. 6.2.6.4). Einfaltungen der Myelinscheide bis hin zum Zirkularitätsverlust kamen bei allen Fixierstufen, am häufigsten jedoch bei 6,25%iger Glutaraldehydfixierung vor.

#### 3.1.3 Einstufung der Auswertbarkeit von Teasingpräparaten und histologischen Kontrollschnitten

Die Auswertbarkeit der einzelnen Proben ist den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

### 3.1.4 Nicht-artifizielle Veränderungen

Beim Hund **VV12** waren in Teasingpräparaten mehrfach Demyelinisierungen zu verzeichnen. Sie traten mitunter segmental und im Zusammenhang mit Remyelinisierungen auf. Vereinzelt zeigte sich Myelindebris im Sinne verschiedener Stadien einer Wallerschen Degeneration. Die axonale Pathologie war in den histologischen Präparaten durch Myelinscheidenzerfall und Axonsprossung zu untermauern.

Bei den Teasingpräparaten des jungen Hundes **VV13** waren perlen- bzw. wurstkettenartig erscheinende Fasern die einzige Auffälligkeit. Dementsprechend waren in den histologischen Schnitten hypomyelinisierte Fasern mit zum Teil unregelmäßig erscheinender Myelinscheide und hypertrophen Schwannzellen zu sehen.

Der Hund **VV1** zeigte in Teasingpräparaten einige Fasern mit deutlichem Markscheidenzerfall und viele de- und remyelinisierende Fasern. Mitunter waren Digestionskammern zu verzeichnen. In histologischen Schnitten wirkten die Myelinscheiden dünn.

Die Teasingpräparate der alten Katze **VV8** wiesen gehäuft paranodale Demyelinisierungen, vereinzelt auch Remyelinisierungen auf. Wenige Fasern unterlagen dem Myelinscheidenzerfall. Mitunter war eine Anisometrie innerhalb des Paranodiums zu beobachten. Auf Schnittbildern waren in Bereichen, in welchen eine starke Myelinscheidenaufblätterung stattfand, Phagozyten zu finden. Lichtmikroskopisch darstellbare Punkte im Axon zeigten sich elektronenmikroskopisch als kondensierte zytoskelettale Anteile.

Bei der jungen Katze **VV6** fielen in Teasingpräparaten wiederum die perlschnur- bzw. wurstkettenartig geformten Einzelfasern auf. Dünnkalibrige Fasern waren hiervon besonders betroffen. In histologischen Schnitten waren die Myelinscheiden dünn und die Schnürringe erschienen vereinzelt weit.

Alle Pferde (**VV16**, **VV17**, **VV3**) wiesen in den Teasingpräparaten kolbenartig aufgetriebene Paranodien auf. Ebenso zeigten alle in den Schnitten eine subperineurale Hofbildung, sowie eine Clusterung nicht-myelinisierter Fasern.

Bei dem Fohlen **VV16** waren die Fasern in Teasingpräparaten wie auch bei den bisher aufgeführten Jungtieren perlschnur- bzw. wurstkettentartig angeordnet. Die Schnürringe erschienen insgesamt weit. In den histologischen Schnitten wirkten die Myelinscheiden hypomyelinisiert.

Das Pferd **VV17** wies in den Teasingpräparaten gehäuft interkalierende Internodien auf und an einer Faser war eine Wallersche Degeneration zu beobachten.

Auch bei dem Pferd **VV3** kam es in den Teasingpräparaten gehäuft zu De- und Remyelinisierungen, die in erster Linie segmental waren.

Teasingpräparate und histologische Schnitte des Schweins **VV11** wiesen keinerlei Auffälligkeiten auf.

Die Altsau **VV15** zeigte in histologischen Schnitten axonale Sprossungen, die Teasingpräparate waren dagegen unauffällig.

Bei den Teasingpräparaten des jungen Schweines **VV2** waren die Schwannzellkerne besonders deutlich. Das Axon zeichnete sich durch Auftreibungen und korkenzieherartiges Aussehen in manchen PNP-Regionen besonders deutlich ab. Die Schnürringe wirkten weit. In den Schnitten fielen dünne Myelinscheiden und große Schwannzellen auf.

Das Kalb **VV9** zeigte bei den Teasingpräparaten häufig osmiophile Körper ( $\mu$ -Körperchen?) in den Schwannzellen. Histologische Äquivalente wurden nicht beobachtet. Dafür waren große Schwannzellen und mitunter endo- und perineurale Mastzellen zu verzeichnen.

Bei dem Rind **VV10** waren in den Teasingpräparaten ebenfalls häufig osmiophile Körper ( $\mu$ -Körperchen?) in den Schwannzellen anzutreffen. Es traten gehäuft beginnende, seltener fortgeschrittene Stadien einer Wallerschen Degeneration auf. Die histologischen Schnitte waren unauffällig.

Das Kalb **VV4** war in den Teasingpräparaten unauffällig. In den histologischen Schnitten waren Anzeichen einer endoneuralen Fibrose und Zwiebelchalenformierungen. Frühe Stadien

einer Myelindegeneration und einige Mastzellen waren zu beobachten. Die Axone stellten sich mitunter hyalin dar und waren atrophisch.

Auch die pathologischen Befunde zwischen **VV5** und **VV4** waren weitestgehend übereinstimmend.

### 3.2 Autolyseversuch

Von einem Hund, einer Katze und einem Pferd wurden insgesamt 37 Einzelnervenproben bzw. rund 9300 Einzelfasern auf ihre autolytischen Eigenschaften hin untersucht.

#### 3.2.1 Autolysebedingte Veränderungen

Die *Teasbarkeit* verschlechterte sich im Zuge der Autolyse. Dabei waren Fasern vor allem ab 72 Stunden post mortem zunehmend fragil und schwieriger zu teasen.

In den *Teasingpräparaten* war bei allen Tieren nach relativ kurzer Zeit post mortem eine Verquellung der Nervenfasern zu beobachten. Diese Aufgedunsenheit zeigte sich bei der Katze **VA1** bereits nach 1, bei dem Pferd **VA3** nach 2, und bei dem Hund **VA2** erst nach 4 Stunden. Dazu gesellte sich bei der Katze ab 2 Stunden eine Leopardentüpfelung, die sich bei dem Hund schon 1 Stunde post mortem geringgradig abzeichnete. Zudem stellte sich die Myelinscheidenkontur bei der Katze ab 2 Stunden post mortem gefältelt, und ab 8 Stunden sehr unruhig dar. Bei dem Pferd war diese Fältelung hingegen erst ab 8 Stunden zu beobachten. Die Myelinscheide entwickelte sowohl beim Pferd als auch bei der Katze die Tendenz, sich an den SLK's deutlich einzufalten, und wirkte mitunter regelrecht gewunden. Die Katze zeigte daneben an einigen Fasern nach etwa 24 Stunden eine Aufsplitterung der Myelinscheide, die sich in Form einer Teilung der Myelinscheide in 2 Blätter darstellte.

Beim Pferd entwickelten die Myelinscheideneinfaltungen bereits nach 12 Stunden rundliche Myelinprotrusionen in den axonalen Tubus, was bei der Katze erst zwischen 48 und 72 Stunden post mortem deutlich wurde. Die Protrusionen waren mitunter blasig, so dass sie den Anschein von Myelinvakuolen weckten. Beim Hund stand dagegen die zunehmende Verquellung der Myelinscheide derart im Vordergrund, dass keine Detailerkennbarkeit mehr gegeben war. Zudem lag bereits am frischen Nerv eine Fältelung der Myelinscheide vor, so

dass sich hier derartige Tendenzen im Sinne einer Autolyse von vorneherein schlechter abzeichnen konnten. Lediglich Myelinscheidenwindungen traten vereinzelt an großkalibrigen Fasern auf. Bei dem Pferd führten die Myelinscheideneinfaltungen bereits nach 48 Stunden post mortem zu einer leichten Fragmentierung der Faser, die nach 72 Stunden sehr deutlich war, und sich mitunter auch wurstkettentartig darstellte. Diese Fragmentierung und Wurstkettentbildung war bei der Katze und bei dem Hund ab 96 Stunden post mortem ebenfalls sehr deutlich. Bei allen Tieren waren großkalibrige Fasern eher fragmentiert, und kleinere eher wurstkettentartig geformt. Dabei blieben diese Wurstketten bei der Katze und bei dem Pferd teilweise von einer äußeren Myelinmembran umgeben. Mitunter standen die einzelnen Segmente aber auch nicht mehr miteinander in Verbindung. Bei einigen, in erster Linie großkalibrigen Fasern, wirkte die Myelinscheide staubig zerfallen.

In den *histologischen Schnitten* zeigte sich bei allen Tieren bereits ab 1 Stunde post mortem eine Auflockerung oder Verquellung der Perineurallagen, die mit der Autolyse stetig zunahm. Die Myelinscheide wies bei Hund und Katze den Teasingpräparaten entsprechend eine Leopardentüpfelung auf. Ab 4 Stunden post mortem wirkte die Myelinscheide bei dem Hund und bei dem Pferd verquollen, was bei der Katze erst nach etwa 96 Stunden deutlich wurde, wobei vor allem großkalibrige Fasern betroffen waren. Überdies begann sich die Myelinscheide bei dem Hund und bei der Katze bereits ab 1 bis 2 Stunden aufzublättern, was sich anfangs etwas deutlicher in den Bereichen des nicht-kompaktierten Myelins bemerkbar machte. Bei dem Pferd wurde diese Aufblätterung erst nach 12 Stunden deutlich. Bei allen Tieren gipfelte sie jedoch nach 48 Stunden in einer beginnenden, und spätestens ab 72 Stunden in einer deutlichen Wollknäuelbildung. Ab 24 Stunden kam es bei allen drei Tieren zur bakteriellen Kontamination. Bei der Katze und bei dem Pferd zeigte sich das Schwannzellzytoplasma ab 48 Stunden wabig-vakuolig. Autolytische Schwannzellkerne traten ab 72 Stunden bei dem Hund und bei der Katze auf. Die Myelinscheide des Pferdes schien sich 96 Stunden post mortem aufzulösen. Bei der Katze begann zu diesem Zeitpunkt das Interstitium zu zerfallen, und das Axon wies blasig-scholligen Inhalt auf.

### 3.2.2 Nicht-autolysebedingte Veränderungen

Der frisch entnommene Nerv der Katze **VA1** zeigte in Teasingpräparaten multiple Demyelinisierungen, häufig in Kombination mit Remyelinisierungen. Dementsprechend waren

viele hypomyelinisierte Fasern und interkalierende Internodien zu verzeichnen. In diesem Sinne stellten sich in histologischen Schnitten hypomyelinisierte Fasern mit großen Schwannzellkernen dar.

Trotz fehlender Symptomatik zeigte der Hund **VA2** bereits beim frisch entnommenen Nerv in Teasingpräparaten einige Wallersche Degenerationen, De- und Remyelinisierungen und interkalierende Internodien. Vereinzelt waren Digestionskammern und paranodale Auftreibungen zu verzeichnen. Zudem traten viele Querfrakturen auf und die Myelinscheidenkontur war insgesamt gewellt, mitunter auch etwas gekerbt.

Einige Fasern wirkten blass (sog. *fading fibers*). In den histologischen Schnitten waren epineural viele Mastzellen und Gefäßanschnitte zu verzeichnen. Das Endoneurium enthielt zudem viele Gefäße und ceroidbeladene Phagozyten. Die meisten Nervenfasern waren klein und erschienen wenig myelinisiert mit relativ großen anliegenden Schwannzellkernen.

Das Pferd **VA3** zeigte beim frisch entnommenen Nerv in Teasingpräparaten vereinzelt Wallersche Degenerationen und Myelindebris in Schwannzellen. Zudem konnten einzelne interkalierende Internodien festgestellt werden. Die Paranodien waren, wie auch bei den Pferden aus der Reihe der Fixierversuche, kolbenartig aufgetrieben. In histologischen Schnitten wirkte das Perineurium etwas aufgelockert und subperineurale Bereiche waren ödematisiert. Nicht-myelinisierte Fasern bildeten die pferdetypischen Cluster. Endoneurium und Myelinscheiden wirkten geringgradig aufgequollen.

### 3.3 Kollagenolyseversuche

#### 3.3.1 Einsatz des Glycinpuffers

Der kollagenolytische Einfluss des Glycinpuffers auf den **unfixierte** Nerven wurde an insgesamt 37 Einzelproben bzw. etwa 6750 Einzelfasern, die von einer Katze (**GP1**), einem Hund (**GP2**) und einem Pferd (**GP3**) stammten, überprüft.



### 3.3.1.1 Artifizielle Veränderungen

Die *Teasbarkeit* der Einzelfasern war durch die Einwirkung von Glycinpuffer auf unfixierte Proben nicht zu verbessern.

Nach dem Scoringsystem (vgl. 2.2.2) waren die Kontrollpräparate ohne Glycinbehandlung und Inkubationsstufen bis 1 Stunde bei der Katze **GP1** und bei dem Hund **GP2** als ++, und ab 2 Stunden bei + einzustufen. Ab dann waren die Fasern derart weich, dass die Fragilität stark zunahm. Bei dem Pferd **GP3** waren alle Proben, inklusive Kontrolle, bis zu 2 Stunden Inkubation mit + – zu bewerten. Danach waren die Nervenfasern auch hier so weich, dass aufgrund der hohen Fragilität ein – für die Teasbarkeit zu vergeben war. Makroskopisch fiel auf, dass sich die Nerven ab 20 Minuten in Glycinpuffer zunehmend gelblich verfärbten.

In *Teasingpräparaten* war bereits nach 5-minütiger Inkubation in Glycinpuffer die Anfälligkeit für mechanische Artefakte erhöht. So zeigte hier insbesondere der Hund im Vergleich zur Kontrollprobe mannigfache Quer- und Längsfrakturen, sowie Quetschungen. Obwohl die Myelinscheide mitunter etwas staubig wirkte, waren die Kontraste kleinkalibriger Fasern hier in der Regel deutlicher. Dies war auch noch nach 10 Minuten Einwirkzeit der Fall, wobei ab diesem Zeitpunkt die Anzahl der mechanischen Artefakte deutlich zunahm. Zu diesen gesellten sich spätestens nach 15 Minuten bei allen Tieren auch eine Leopardentüpfelung und beim Hund und bei der Katze eine Verquellung der Myelinscheide. Beim Pferd hingegen wirkte die Myelinscheide eher staubig als verquollen, was hier ab 60 Minuten Glycinpufferinkubation das prägende Bild verursachte. Bei der Katze war die Myelinscheidenkontur nach 10 Minuten zudem aufgerauter, und ab 15 Minuten schien das Myelin in den SLK's proglottidenartig zusammengerutscht. Nach 20 Minuten zeigten sich hier zusätzlich zystische Erweiterungen und blasige Auftreibungen des Myelins. Beim Hund wurde die Myelindesintegration ab einer Glycinpufferinkubation von 60 Minuten deutlich, wobei hier das nicht-kompaktierte Myelin herausgelöst wirkte. Nach 120 Minuten schien bei ihm die Außenkontur ebenfalls sehr rau.

In den *Kontrollschnitten* manifestierte sich bei der Katze und bei dem Hund die Glycinpufferwirkung zuerst an bindegewebigen Strukturen. So war hier bereits nach 5-minütiger Inkubation das Endoneurium deutlich aufgelockert. Beim Hund ging der interstitielle Zusammenhalt bereits ab 20 Minuten, bei der Katze hingegen erst ab 60 Minuten gänzlich verloren. Beim Pferd manifestierte sich die kollagenolytische Wirkung erstaunlicherweise nach 10 Minuten zuerst an der Myelinscheide. Sie schien insgesamt aufgeblättert, und bei einigen

Fasern regelrecht aufgelöst, wobei ab 15 Minuten sogar Wollknäuelbildungen auftraten. Interstitielle Anteile waren bei ihm ab 15-minütiger Inkubation geringgradig aufgelockert, und ab 30 Minuten zerklüftet. Perineurale Lagen waren hier ab 2 Stunden verquollen. Beim Hund waren diese hingegen ab 15 Minuten zunehmend aufgelockert. Das Perineurium der Katze fehlte auf den Schnitten, und konnte daher nicht beurteilt werden. Bei der Katze und bei dem Hund war das Myelin ab 15 Minuten Einwirkzeit ebenfalls aufgeblättert und mit steigender Inkubation auch zerklüftet. Hierbei waren nicht-kompaktierte Myelinanteile schneller betroffen als die kompaktierten. Den Teasingpräparaten entsprechend stellten sich bei der Katze nach 20 und 30 Minuten zystische Ablösungen der inneren Myelinlamelle vom Axon dar. Ab 15 Minuten zeigten sich bei allen Tieren an Myelinscheidenbereichen, die noch erhalten waren, eine den Teasingpräparaten entsprechende Leopardentüpfelung und Verquellung der Myelinscheide. Dies zeichnete sich durch zunehmende Inkubation immer stärker ab. Nach 30 Minuten kam es bei der Katze und bei dem Pferd zusätzlich zu Hufeisenbildungen. Bei dem Hund war ab einer 15-minütigen Inkubationszeit eine Karyolyse der Endothelzellen, nach 20 Minuten auch der Schwanzzellen und nach 25 Minuten aller kernhaltigen Zellen zu beobachten. Nach 2 Stunden waren keine Schwanzzellkerne mehr zu erkennen, wobei das Zytoplasma hier zudem vakuolisiert erschien. Selbst die Axone waren hier etwas vakuolig.

### 3.3.1.2 Nicht-artifizielle Veränderungen

Die Katze **GP1** zeigte im Teasing gehäuft fokale Demyelinisierungen und interkalierende Internodien. Es traten zudem Wallersche Degenerationen auf. In histologischen Schnitten waren desweiteren einige dystrophische Axone, mitunter mit Zirkularitätsverlust einhergehend, zu beobachten.

Bei dem Hund **GP2** waren in Teasingpräparaten gehäuft Wallersche Degenerationen aller Stadien zu beobachten. Es war Myelindebris in Makrophagen und Schwanzzellen vorhanden. Axonale Atrophie zeigte sich hier aufgrund von Längsfurchen in internodalen Myelinscheidenbereichen. Mitunter wirkte das Axon geschwollen. Darüberhinaus traten gehäuft demyelinisierte Fasern, interkalierende Internodien und fokale Myelinscheidenverdickungen auf. In histologischen Schnitten war perineurales Lipofuszin und Ceroid im Endoneurium zu verzeichnen. Die Hypomyelinisierung vieler Axone ging mit einer Schwanzzellhypertrophie und -hyperplasie einher. Einige myelinisierte Fasern zeigten

deutlichen Zirkularitätsverlust. Die Myelinscheiden waren bei geringgradiger Leopardentüpfelung leicht verquollen.

Bei dem Pferd **GP3** wirkten die unbehandelten Proben etwas aufgequollen und verbacken. Eine geringgradige Leopardentüpfelung und pferdetypische, kolbenartig aufgetriebene Paranodien fielen auf. Wie auch bei anderen Pferden beobachtet trat in histologischen Schnitten ein aufgelockertes subperineurales Gewebe und eine Clusterung nicht-myelinisierter Fasern auf. Ein Renault-Körper befand sich in Ausbildung.

### 3.3.2. Vergleichender Einsatz von Glycinpuffer und Kollagenase

Wurde der frisch entnommene Nerv samt dem umgebenden Gewebe in Glycinpuffer geschwenkt, war die Feinpräparation zur Entfernung bindegewebiger Anteile bei allen Proben deutlich leichter. Dies war auch noch nach anschließender Fixierung der Fall. Das Schwenken in Kollagenase brachte einen ähnlichen, jedoch weniger ausgeprägten Effekt.

Wurden die Nerven hingegen nach Entnahme ohne vorangegangene Feinpräparation fixiert, konnte durch anschließende 1-stündige Inkubation in Kollagenase das verbliebene Bindegewebe im Vergleich zur unbehandelten Probe ohne Substanzverlust abgezogen werden und eine Trennung in möglichst dünne Faszikel war möglich. Nach Glycinpufferinkubation war lediglich das Bindegewebe leichter zu lösen, eine Trennung in möglichst dünne Faszikel konnte nicht ohne Substanzverlust erfolgen.

#### 3.3.2.1 Artifizielle Veränderungen

Zu dieser experimentellen Studie wurden 45 Einzelproben bzw. etwa 9000 Einzelfasern herangezogen, die von 3 Hunden (V1,V7,V9), 3 Katzen (V2,V6,V8) und 3 Pferden (V3,V5,V10) stammten.

Die *Teasbarkeit* war prinzipiell durch einen 5-minütigen Einsatz der Kollagenase vor Fixierung geringgradig, und durch eine 1-stündige Einwirkzeit nach Fixierung deutlich zu verbessern. Das Scoring für die einzelnen Protokolle erfolgte nach 2.2.2 und die Ergebnisse der

Einzelproben, sowie Details, sind den Tabellen des Anhangs zu entnehmen. Dabei beziehen sich Vergleiche immer auf die unbehandelte Probe.

In allen *Teasingpräparaten* erschien mit einer **60-minütigen Inkubation in Glycinpuffer nach der Fixierung** (Vx/G60p) die Myelinscheide etwas staubiger, wodurch die Detailerkennbarkeit herabgesetzt wurde. Bei V1 zeichneten sich mitunter rundliche Protrusionen der Myelinscheide in den axonalen Tubus ab. In *histologischen Kontrollschnitten* war das Myelin bei 8 Tieren (V1,V2,V5,V6,V7,V9,V10,V12) stellenweise komplett herausgelöst. Tendenziell war die Myelinscheide tierartenübergreifend etwas aufgeblättert und es zeigte sich außer bei VV3 und VV10 eine leichte bis mittelstarke Leopardentüpfelung. Bei 3 Tieren (V2,V7,V3) traten vereinzelt Hufeisenbildungen auf.

Bei **60-minütiger Inkubation in Kollagenase nach der Fixierung** (Vx/K60p) zeigten die *Teasingpräparate* tierartenübergreifend ebenfalls die Tendenz zu einer staubigen Myelinscheide. Bei dem Pferd V3 war sie eher verquollen. Bei kleinen Fasern konnte häufig ein im Vergleich zur unbehandelten Probe besserer Kontrast induziert werden. Die *histologischen Kontrollschnitte* glichen denen der Glycinpufferbehandlung, wobei sie in ihrer Ausprägung insgesamt milder waren.

Bei **5-minütiger Inkubation in Glycinpuffer vor der Fixierung** (Vx/G5a) waren an den *Teasingpräparaten* tierartenübergreifend vereinzelt mechanische Artefakte zu verzeichnen, die häufig von einer leicht staubigen, mitunter geringgradig leopardenartig getüpfelten Myelinscheide begleitet wurden. Trotz allem war der Kontrast kleinkalibriger Fasern auch hier mit Hilfe des Glycinpuffers meist deutlicher. Die Myelinscheiden in den *histologischen Schnitten* wirkten bei allen Tieren geringgradig aufgeblättert und vereinzelt auch leicht leopardengetüpfelt. Eine komplette Herauslösung des Myelins zeigte sich aber nur stellenweise bei den Tieren V1, V2 und V5. Überdies wirkten Peri- und Endoneurium geringgradig aufgelockert.

Die *Teasingpräparate* bei **5-minütiger Inkubation in Kollagenase vor der Fixierung** (Vx/K5a) waren mit denen der 60-minütigen Kollagenaseexposition nach der Fixierung vergleichbar, wobei bei einigen Tieren (V1,V6,V5) die Myelinscheide weniger staubig war. Auch hier war bei kleinen Fasern ein besserer Kontrast zu erzielen. Die *histologischen Schnitte* zeigten mit diesem Protokoll insgesamt die mildesten Veränderungen. Dabei war das Myelin bei keinem Tier herausgelöst, und es erschien nur vereinzelt geringgradig leopardengetüpfelt.

### 3.3.2.2 Nicht-artifizielle Veränderungen

Bei der Katze V1 waren in den Teasingpräparaten die Paranodien vielfach aufgeheilt. Darüberhinaus zeigte sich an multiplen Fasern eine Myelinscheidendesintegration, wobei das Myelin zum Teil gewunden wirkte. Bei dünnen Fasern waren gehäuft Wurstkettbildungen zu verzeichnen, aber auch dicke Fasern waren mitunter segmentiert. In den histologischen Schnitten waren die Perineurallagen zerissen. An der Myelinscheide waren Aufblätterungen und Tendenzen zur Wollknäuelbildung zu verzeichnen. In Randbereichen zeigte sich Leopardentüpfelung, und einige Axone schienen geschrumpft. Die Myelinscheiden in Teasingpräparaten des Hundes V2 waren nur mittelmäßig angefärbt und schlecht kontrastiert. Die Einzelfasern wirkten verbacken und aufgedunsen. Eine Detailerkennbarkeit war nicht vorhanden. Zum Teil waren nur noch Nervenfragmente zu erkennen. In histologischen Schnitten waren vereinzelt Myelinscheidenaufblätterungen und einige herausgelöste Myelinscheiden zu verzeichnen. Markhaltige Fasern zeigten einen geringgradigen Zirkularitätsverlust. In den Teasingpräparaten aller Pferdenerven (V3,V5,V10) waren kolbenartig aufgetriebene Paranodien zu beobachten. Histologische Schnitte zeigten die für diese Spezies typische subperineurale Hofbildung und Clusterung der nicht-myelinisierten Fasern. Bei dem Pferd V3 lag eine geringgradige Hypomyelinisierung aller mittel- und großkalibrigen Fasern vor. Bei dem Pferd V5 traten in den Teasingpräparaten vereinzelt Wallersche Degenerationen im Stadium II und III auf.

Bei dem Hund V7 waren neben multiplen paranodalen und segmentalen Demyelinisierungen vereinzelt interkalierende Internodien in den Teasingpräparaten zu beobachten. Die Querschnitte zeigten dementsprechend eine Hypomyelinisierung aller Faserkaliber und eine hochgradige Schwanzzellhyperplasie.

Teasing- und Schnittpräparate der Tiere V6, V8 und V9 waren unauffällig.

## 3.4 Fluorochromatische Untersuchungen

### 3.4.1 Einsatz von DPED vor Fixierung

Um mit Hilfe eines Vorversuchs den Einfluss der Inkubationsdauer von DPED auf das Neuroparenchym unfixierter Nerven abschätzen zu können, wurden 8 Einzelproben bzw. etwa 2400 Einzelfasern von 2 Tieren untersucht.

Nach 20-minütiger Inkubation in DPED stellten sich sowohl die Teasingpräparate des Hundes **VFA1** als auch jene des Ferkels **VFA2** eher blass und mit einem Stich ins Orange dar. Bei dem Hund waren mitunter Einkerbungen entlang der Nervenfasern zu beobachten. Nach 90-minütiger Einwirkzeit war die Emission des Hundenervens hingegen hellgrün, und die des Ferkels eher grün-gelblich. Bei beiden schien jedoch das Myelin wolkig herausgelöst, und der axonale Innenkörper war deutlich dargestellt. An den Fasern des Hundenervens stellten sich mitunter die Einkerbungen der SLK's deutlich dar. Nach 24 Stunden in DPED war die Myelinscheide beider Proben hochgradig vakuolig herausgelöst, wobei sie bei dem Schwein mitunter ganz fehlte. Im Gegensatz zu hier, wo sich der axonale Innenkörper innerhalb des Myelinscheidenskeletts noch deutlich abzeichnete, war dieser beim Hund kaum noch zu sehen. Dabei war die Emission des DPED beim Hund extrem gelblich, beim Schwein hingegen eher gelblich-grün. Bei ihm färbten sich auch die Schwannzellkerne mit an.

Die osmiumpostfixierten Kontrollfasern beider Tiere zeigten sehr gute Kontraste. Dabei war der axonale Innenkörper bei dem Hund verhältnismäßig dunkel. Bei dem Ferkel färbten sich äußere Myelinscheidenanteile etwas weniger an als innere. Viele Fasern zeigten hierbei die jungtiertypischen Wurstkettenbildungen, die auch in den Fluorochrompräparaten zu sehen waren.

In Anlehnung an die Ergebnisse dieses Vorversuchs sind 6 Einzelproben bzw. etwa 1800 Einzelfasern eines Tieres (VFB1) nach der DPED-Färbung in unterschiedlicher Reihenfolge mit Lösungsmitteln behandelt worden.

Nach Protokoll A war bei den Teasingpräparaten nur die äußere Membran der Myelinscheide angefärbt. Der axonale Innenkörper stellte sich dagegen sehr deutlich dar. Darüberhinaus färbten sich Schwannzell- und Fibroblastenkerne ebenfalls an. Unterblieb das Schwenken in Aqua bidest. nach F6-Inkubation wie in Protokoll C, war das Ergebnis zwar qualitativ ähnlich, aber weniger kontrastreich. Der axonale Innenkörper war auch hier gut zu sehen. Kehrt man die Reihenfolge der Alkoholstufen nach Protokoll B um, erhielt man ähnliche Ergebnisse wie unter A, mit der Ausnahme dass das Myelin fleckiger und nicht so stark herausgelöst wirkte. Darüberhinaus war die äußere Myelinscheidenbegrenzung nicht so deutlich. Auch die Zeichnung der Endoneuralzellkerne war seltener.

Unterblieb hier das initiale Schwenken in Aqua bidest. nach DPED-Inkubation (Protokoll D), so wies die Myelinscheide rötlich-orange Areale auf. Wurde bei der präfixativen Anwendung von DPED auf sämtliche Alkoholstufen verzichtet (Protokoll E), so waren die Kontraste schlecht, obwohl das Myelin weitgehend herausgelöst, und der axonale Innenkörper

darzustellen war. Unterblieb sogar wie bei Protokoll F ein Waschen in Aqua bidest., so zeigte die Myelinscheide rötlich-orange Areale bei ansonsten sehr unregelmäßiger Anfärbung.

### 3.4.2 Einsatz von DPED nach Fixierung

Für diese Untersuchungsreihe wurden 48 Einzelproben bzw. etwa 9600 Einzelfasern von 4 Tieren präpariert, um den Einfluss verschiedener Kombinationen von Alkoholkonzentrationen zu ermitteln. Dabei waren die Proben des Tieres **VFB4** aufgrund insuffizienter Anfärbung nicht in die Ergebnisse miteinzubeziehen.

Nach Protokoll a (30/100) war die Detailerkennbarkeit in den Teasingpräparaten bei allen Tieren gut. So stellten sich die SLK's trotz einer Vakuolisierung der Myelinscheide mitunter sehr deutlich dar. Bei dem Elch **VFB1** war überdies die axonale Innenstruktur sehr gut angefärbt. Die Emission war bei allen Präparaten sehr stark und gelb-grün.

Bei Protokoll b (50/100) wurde der Kontrast der vakuolisierten Myelinscheide deutlich schwächer, und die SLK's waren nur vereinzelt zu sehen. Dabei waren bei dem Elch mitunter noch axonale Innenkörper undeutlich angefärbt. Hier wirkten die Fasern, wie auch bei Protokoll c, zudem konsolidiert. Trotz des schlechten Kontrasts war die Emission bei dem jungen Hund **VFB2** sehr stark.

Bei dem Elch und bei dem Hund **VFB3** zeigten sich nach Protokoll c (70/100) die SLK's aller Faserkaliber wieder deutlich, wobei die Detailerkennbarkeit bei dem Elch derart gut war, dass sich auch die einzelnen Lamellen der Myelinscheide gut darstellen ließen. Bei dem Hund **VFB3** war hier die Emission besonders stark. Bei dem jungen Hund hingegen war die Detailerkennbarkeit nur an dünnkalibrigen Fasern gegeben. Das gleiche Ergebnis erhielt man hier, wenn man die Proben zuerst mit 96%igem und anschließend in 100%igem Alkohol (Protokoll e) behandelte.

In den folgenden Protokollen, bei denen immer eine Behandlung mit zwei hochprozentigen Alkoholen erfolgte, waren die Ergebnisse bei den Tieren sehr heterogen.

Wurden die Proben erst in 80%igem, und dann in 100%igem Alkohol geschwenkt (Protokoll d) so war bei dem Elch die Myelinscheide, ebenso wie nach Protokoll e (96/100), höchstgradig vakuolisiert. Der Hund **VFB3** zeigte nach Protokoll d ebenfalls eine schlecht erhaltene Myelinscheide, wobei sich hier in erster Linie die äußeren Anteile herauslösten. Bei ihm zeigte sich nach primärer Behandlung in 96%igem und anschließender Behandlung in 100%igem

Alkohol (Protokoll e), genauso wie nach zweifachem Schwenken in 100%igem Alkohol (Protokoll f) ebenfalls eine deutliche Herauslösung der Myelinscheide, wobei jedoch paranodale Anteile besonders stark betroffen waren. In beiden Fällen war hier ein axonaler Innenkörper zu erkennen. Bei dem jungen Hund VFB2 hingegen war bei Protokoll d die Detailerkennbarkeit selbst in großkalibrigen Fasern wieder gut.

Beim Elch zeigten sich nach zweimaligem Schwenken in 100%igem Alkohol (Protokoll f) neben einer Verquellung der Fasern in erster Linie eine vakuolisierte Myelinscheide mit deutlichem axonalem Innenkörper. Bei dem jungen Hund VFB2 war nach diesem Protokoll die Myelinscheide sehr unregelmäßig angefärbt und überdies deutlich vakuolisiert. Eine primäre Behandlung mit 100%igem Alkohol gefolgt von 96%igem (Protokoll g) bewirkte ein gleiches Ergebnis.

Die Proben des Elches, die zuerst in 100%igem und anschließend in 96%igem, 80%igem, 70%igem oder 50 %igem Alkohol geschwenkt wurden (Protokoll g bis j) waren aufgrund der starken Vakuolisierung der Myelinscheide nicht mehr beurteilbar. Es blieb hier lediglich ein Myelinskelett stehen. Das gleiche war bei dem Hund VFB3 nach Protokoll g bis i der Fall. Die Myelinscheide wirkte hier regelrecht angefressen.

Bei dem jungen Hund VFB2 hingegen war die Detailerkennbarkeit nach Behandlung mit 100%igem und anschließend mit 80%igem Alkohol (Protokoll h) wieder deutlich. Protokoll i (100/70) hingegen ermöglichte nur eine streckenweise Beurteilung der Strukturen.

Im Gegensatz zum Elch ließen sich bei beiden Hunden nach Behandlung mit zuerst 100%igem und anschließend 50%igem Alkohol (Protokoll j) selbst filigrane Strukturen wieder sehr detailliert darstellen. Bei dem jungen Hund zeigte sich dabei eine orange-gelbe Emission.

Erst bei Protokoll k (100/30) lag auch bei dem Elch wieder eine derartige Detailerkennbarkeit vor. Protokoll k konnte hierbei jedoch nur annähernd die gleiche Qualität wie Protokoll a liefern.

Bei dem Elch zeigten die osmiumgefärbten Kontrollpräparate durchwegs sehr guten Kontrast. Die Detailerkennbarkeit war insgesamt sehr gut, und die SLK`s stellten sich deutlich dar. Die Paranodien waren vereinzelt blass. Kleine Nervenfasern schienen hypomyelinisiert. Mitunter war Myelindebris in Schwannzellen zu verzeichnen (vermutlich  $\pi$ - oder  $\mu$ - Körperchen).

Im dem osmiumgefärbten Kontrollpräparat des jungen Hundes VFB2 war der Kontrast zwischen Axon und Myelinscheide erheblich besser als bei den DPED-Färbungen. Dafür konnte hier nur eine begrenzte Detailerkennbarkeit im Bereich der SLK`s erreicht werden. Dünne Fasern stellten sich dabei noch etwas differenzierter als dicke Fasern dar. Eine



jungtiertypische Wurstkettenbildung war hier deutlicher als in der Fluorochromfärbung. Darüberhinaus stellten sich die Nervenfasern hier häufig mit einem variierenden Durchmesser dar.

Bei dem Hund VFB3 war der Kontrast und die Detailerkennbarkeit der osmiumgefärbten Kontrollfasern im Vergleich zu den Fluorochrompräparaten als insgesamt besser zu bewerten.

### 3.5 Versuche zur Darstellung des Axons an Teasingpräparaten mittels *whole-mount*-Immunhistochemie

Diesem Versuchsansatz dienten 36 Einzelproben bzw. 3600 Fasern von drei Tieren.

Bei allen Proben, die in 4%igem **Paraformaldehyd** fixiert wurden, waren die Axone mitsamt den Veränderungen des Axonkalibers tierartenübergreifend gut darstellbar. Stellenweise schien die Anfärbung auf das Myelin überzugreifen. Durch Schwenken in Glycinpuffer vor Fixierung wurden keine Veränderungen erzielt. Proben, die in über Nacht in Glycerin waren, wirkten heller.

Bei Fixierung in 10%igem **Formaldehyd** färbten sich die Axone bei allen Tieren etwas schlechter und ungleichmäßiger an als mit Paraformaldehyd. Bei den Proben des Hundes wirkten sie mitunter sogar fleckig. Durch Schwenken in Glycinpuffer vor Fixierung wurde diese Fleckung noch deutlicher. Proben, die über Nacht in Glycerin waren, wirkten heller.

Bei Fixierung in 2,5%igem **Glutaraldehyd** färbten sich die Axone bei keinem Tier an. Durch Schwenken in Glycinpuffer vor Fixierung zeigten mitunter einzelne Axone (maximal 2 von 100 Fasern) eine schwache Reaktion.

Sämtliche Negativkontrollen zeigten keine Reaktion mit dem Axon. Vereinzelt schien die Myelinscheide sich fokal unspezifisch anzufärben.

### 3.6 Versuche zur *post-teasing*-Licht- und Elektronenmikroskopie

Nach Buchführung der medizinisch technischen Assistentin waren 80% der Teasingpräparate ohne Plastik gut semidünn, und 85% gut ultradünn zu schneiden. Von Teasingpräparaten mit Plastik waren nur 50% gut semidünn, und 20% gut ultradünn zu schneiden.

Das Ausgangsmaterial für **Präparat 9** und **10** war ein Bündel von mindestens 7 geteasten Fasern. Präparat 9 war pur, Präparat 10 auf Plastik eingebettet worden. Die Anzahl der Fasern war bei beiden Präparaten mindestens 8 Fasern pro Schnitt. Der Erhaltungszustand und die Detailerkennbarkeit neuroparenchymatöser Strukturen waren bei lichtmikroskopischer Betrachtung gleich gut. Vereinzelt wurden auch Schwannzellkerne mit angeschnitten.

In der Elektronenmikroskopie war Präparat 9 von besserer Qualität als Präparat 10. Der Grenzbereich zum Plastik war hier sehr deutlich. Bei Präparat 9 waren ödematisiert wirkende Schwannzellen und Interstitium gut erhalten, und Details der Myelinscheide wie SLK's deutlich. Die Periodizität der Myelinscheide ging mitunter verloren.

**Präparate 12** und **13** stammten ebenfalls von einem Bündel von mindestens 7 geteasten Fasern. Präparat 12 war pur, Präparat 13 auf Plastik eingebettet worden. Die Anzahl der Fasern war bei Präparat 12 fünf bis sechs, und bei Präparat 13 mindestens sieben Fasern pro Schnitt. Die licht- und elektronenmikroskopische Qualität der beiden war gleich gut. Die Myelinscheide war in Ultradünnschnitten recht gut erhalten, die Periodizität ging wegen stellenweiser Verquellung etwas verloren. Axone einiger Fasern waren kondensiert. Vesikuläre Veränderungen von Axonen und Axon-Schwannzell-Netzwerke traten auf. Remakzellen stellten sich sehr deutlich dar. Bei Präparat 13 war eine demyelinisierende Faser zu sehen .

Auch bei weiteren **Präparaten** zeigte sich lichtmikroskopisch keine Divergenz in Schnitten mit (**17**) und ohne Plastik (**18, 20**). Bei Präparat 17 war die Qualität der Ultradünnschnitte schlecht. Vor allem Myelinscheiden großer Fasern, waren zum Teil herausgebrochen. Besonders deutlich war die Herauslösung an pathologisch veränderten Stellen. Myelinscheiden kleiner Fasern schienen besser erhalten. Die Axone wirkten atrophisch und kondensiert, interstitielle Bestandteile waren gut zu erkennen. Myelinscheiden von Präparat 20 verhielten sich wie bei Präparat 18, wobei sie mitunter ödematisiert und wabig aufgesplittert erschienen. Interstitium und Remakzellen waren deutlich dargestellt. Schwannzelleiber waren ödematisiert. Bei Präparat 18 war die Qualität schlechter, und Myelinscheiden großer Axone herausgebrochen.

Das Ausgangsmaterial für **Präparat 14** und **15** waren 2 geteaste Einzelfasern. Sowohl die Semidünnschnitte mit (14), als auch ohne Plastik (15) waren lichtmikroskopisch genauso gut dargestellt wie bei Präparaten mit mehreren Fasern im Ausgangspräparat. In Ultradünnschnitten zeigten zwei Fasern von Präparat 14 ödematisierte, teilweise

herausgebrochene Myelinscheiden, nur an einer Faser konnte man die Periodizität der Myelinscheide abschnittsweise erkennen. Axone waren ödemartig verquollen. Die Qualität ist als schlecht zu beurteilen. Ultradünnschnitte von Präparat 15 waren qualitativ besser. Sowohl Axone als auch Schwannzellen hatten große Mitochondrien zu verzeichnen.

Bei den folgenden Präparaten sind Semidünnschnitte aus sechs Ebenen angefertigt worden. Das Teasingausgangspräparat für die Schnitte 1, 2 und 3 stellte eine Faser mit Wallerscher Degeneration dar. Präparat 1 und 2 wurden mit, Präparat 3 ohne Plastik eingebettet. Die Qualität war bei allen gut.

In **Präparat 1** (mit Plastik) stellte sich die Wallersche Degeneration lichtmikroskopisch in Schnittebene 5, und andeutungsweise in Schnittebene 3 dar. In Ultradünnschnitten der Ebene 5 war die Wallersche Degeneration auch zu sehen. Das Präparat wies eine starke Faltung auf. Die Myelinscheide großer Fasern schien besonders an pathologisch veränderten Stellen herausgebrochen oder verquollen. In gut erhaltenen Bereichen war ihre Periodizität erkennbar. Interstitielle Komponenten, Remakfasern und Schwannzellen mit Kern und Zytoplasma waren gut erhalten. Einige Schwannzelleiber waren ödematös aufgetrieben. Die Neurofilamentdichte in Axonen schien reduziert.

Bei **Präparat 2** (mit Plastik) war in keiner Schnittebene eine Wallersche Degeneration auffindbar. Die Detailerkennbarkeit in Ultradünnschnitten glich der von Präparat 1.

**Präparat 3** (ohne Plastik) hatte im Lichtmikroskop auf den Ebenen 3, 4, und 5 Teasingäquivalente zu verzeichnen. Elektronenmikroskopisch stellte sich der Myelinscheidenzerfall wabenartig dar. Interstitium und viele nicht-myelinisierende Fasern waren zu sehen. Axone enthielten relativ wenig Neurofilamente. Eine Falte verlief quer durchs Präparat.

Ein weiteres Ausgangspräparat mit Wallerscher Degeneration wurde für die Schnitte von 4 und 5 herangezogen. Präparate 4 wurde pur, 5 mit Plastik eingebettet. Auch hier war die Qualität gleichgut. In Ebene 3 und 4 der Semidünnschnitte von **Präparat 4** waren Teasingäquivalente gut zu sehen, in Ebene 0 und 5 angedeutet. Ultradünnschnitte waren gut erhalten. Im Interstitium waren ein Fibrozyt und zahlreiche Remakzellen und Kollagen darstellbar. Axone enthielten viele Mitochondrien, die Schwannzellen wirkten groß. Die Myelinscheide einer

Faser war insgesamt etwas frakturiert und verquollen, an einer anderen war der Myelinscheidenzerfall und ein kondensiertes Axon nachzuvollziehen. Die übrigen Axone enthielten relativ wenig Neurofilamente.

Bei **Präparat 5** war die Wallersche Degeneration in Semidünnschnitten in den Ebenen 0, 2, 3 und 5 nachvollziehbar. Ultradünnschnitte stellten sich wie bei Präparat 4 dar. Die pathologisch veränderte Myelinscheide war hier noch deutlicher herausgelöst.

Vom Teasingausgangspräparat für die Schnitte 6 und 7 sollten die hellen Paranodien dargestellt werden. Präparat 6 wurde mit, Präparat 7 ohne Plastik eingebettet. Die Qualität der beiden war gleich gut. In Semidünnschnitten der Ebene 1 und 5 von **Präparat 6** war die Myelinscheide aufgeblättert. Elektronenmikroskopisch war die Aufblätterung dem Bereich der SLK's zuzuordnen. Eine weitere Faser zeigte schlechten Myelinscheidenkontrast mit atrophischem Axon.

Bei **Präparat 7** konnte nur Ebene 0 und 1 semidünn geschnitten werden. In Ebene 1 war die Myelinscheide vakuolig herausgelöst. Im Ultradünnschnitt wirkte paranodales Myelin aufgeblättert.

Teasingausgangspräparat für Schnitt 8 zeigte Myelinscheideneinfaltungen mit rundlichen Protrusionen ins Axon. **Präparat 8** wurde mit Plastik eingebettet. Die Qualität war gut. In Semidünnschnitten der Ebene 0 waren Teasingäquivalente exakt getroffen, in Ebene 1 und 4 andeutungsweise, was im Ultradünnschnitt nicht mehr nachvollzogen werden konnte. Hier war die Myelinscheide stellenweise wabig herausgelöst.

Die Wurstkettenbildung eines Teasingpräparats konnte im **Präparat 11** auf Ebene 1, 2 und 3 der Semidünnschnitte nachvollzogen werden. Es zeigten sich Myelineinstülpungen und deren Anschnitte. Die entsprechende Stelle war in Ultradünnschnitten nicht zu erkennen. Die Myelinscheide zeigte hier wabige Veränderungen.

Der **histologische Kontrollschnitt** des gesamten Faszikels zeigte lichtmikroskopisch subperineurale Hofbildung mit Ödem, einige Fasern mit Myelinscheidenzerfall und atrophische Axone. Im Elektronenmikroskop war das Myelin großer Fasern stellenweise herausgelöst. Besonders waren bereits pathologisch veränderte Abschnitte betroffen. Die Myelinscheide

stellte sich teilweise verquollen dar, so dass keine Periodizität der Myelinlamellen mehr erkennbar war. Mitunter zeigte sie wabige Struktur. Schwannzelleiber wirkten ödematisiert.

### 3.7 Kasuistik

Im Rahmen der Kasuistik wurden 57 Einzelproben bzw. etwa 17000 Einzelfasern beurteilt. Von den insgesamt 45 Fällen zeigten 5 keine pathologischen Veränderungen. Bei 14 Fällen handelte es sich in erster Linie um eine primäre Myelinscheidenpathologie, bei 11 Tieren standen primäre Axonveränderungen im Vordergrund, und weitere 11 waren gemischte Neuropathien. 3 Fälle manifestierten sich in erster Linie interstitiell, gingen aber auch mit Veränderungen der Myelinscheide einher. In einem Fall war nur das Interstitium betroffen. Die einzelnen Protokolle sind dem Anhang zu entnehmen.



Abb. 14: gesundes Internodium mit deutlichen SLK's (1137fache Vergr.)



Abb. 15: gesundes Nodium und Paranodium (728fache Vergr.)

## IV DISKUSSION

### 1. GEGENÜBERSTELLUNG VON FIXATIONSBEDINGTEN ARTEFAKTEN UND AUTOLYSE ZU ALTERSBEDINGTEN UND PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN

Fixationsbedingte Veränderungen peripherer Nerven können anhand der hier gewonnenen Ergebnisse in Unter- und Überfixierungsphänomene eingeteilt werden.

Bereits bei der Untersuchung zur Teasbarkeit von Einzelfasern konnte diese Zuordnung erfolgen. Bei kurzen Fixierzeiten in 1%igem Glutaraldehyd waren die Nerven sehr weich und dadurch fragil. Zu einer durch Rigidität und Konsolidierung bedingten Fragilität kommt es bei längeren Einwirkzeiten und höheren Konzentrationen im Sinne einer Überfixierung. Das war am deutlichsten bei 24-stündiger Fixation in 6,25%igem Glutaraldehyd.

Darüberhinaus nimmt der Autolysegrad Einfluss auf die Teasbarkeit. Nervenproben frisch toter Tiere waren stets am einfachsten in Einzelfasern zu trennen. Im Rahmen der Untersuchungen wurde auch deutlich, dass die Nerven in der Regel umso schlechter zu teasen waren, je mehr pathologische Veränderungen sie aufwiesen. Daher erhält man häufig bereits hier einen Anhaltspunkt für den Grad der Erkrankung, der bei der nachfolgenden Beurteilung zu erwarten ist.

Unter der Stereolupe war mit zunehmender Fixierung eine Tendenz zur Wellung der Faserbündel zu verzeichnen. Diese kann am unfixierten Nerv in situ oder auch nach Exzision festgestellt werden, sofern die Eigenelastizität der Nervenfasern nicht unter pathologischen Bedingungen verloren gegangen ist. Ihr wird in vivo eine Adaptationmöglichkeit des Nerven an Streckungen zugeschrieben (63) und es ist anzunehmen, dass sie durch die stärkere Fixierung der mechanischen Zugbelastung bei der Feinpräparation besser standhält. Vermutlich bildet sie die Grundlage der an unfixierten und ungefärbten Nerven beobachteten FONTANA-Spiralen (43).

Ein eindeutiger Einfluss der Fixierung auf Anfärbbarkeit und Kontrast der Teasingpräparate hat sich nicht herauskristallisiert. Die sehr heterogenen Ergebnisse innerhalb einer Fixierreihe an einem Tier, wie auch divergierende Ergebnisse gleicher Protokolle an verschiedenen Tieren,

ist darauf zurückzuführen, dass die geteasten Einzelfasern an verschiedenen Stellen in den Faszikeln lokalisiert waren und somit das Osmium nicht alle gleichermaßen erreichen konnte. Artefakte in Nervenproben können entweder chemisch oder mechanisch induziert werden. Eine typische chemisch bedingte Veränderung ist die leopardenfällähnliche Tüpfelung der Myelinscheide bei Überfixierung (Leopardentüpfelung; Abb. 16 bis 19). Sie tritt sowohl in Teasingpräparaten als auch in histologischen Kontrollschnitten auf. Sie war am deutlichsten bei Fixierung mit 6,25%igem Glutaraldehyd und stieg stets mit der Inkubationszeit an. Elektronenmikroskopisch ist sie als Separierung der *intraproduct lines* mit strangartiger Verquellung der bestehenbleibenden, dazwischenliegenden Lamellen zu identifizieren (Abb.19). Vermutlich entsteht sie auf Grund der übermäßigen Vernetzung integraler Membranproteine mit den Aldehydgruppen des Glutaraldehyds und einem regionalem Verlust ihrer Adhäsionsfähigkeit (7).



Abb. 16: Leopardentüpfelung (656fache Vergr.)

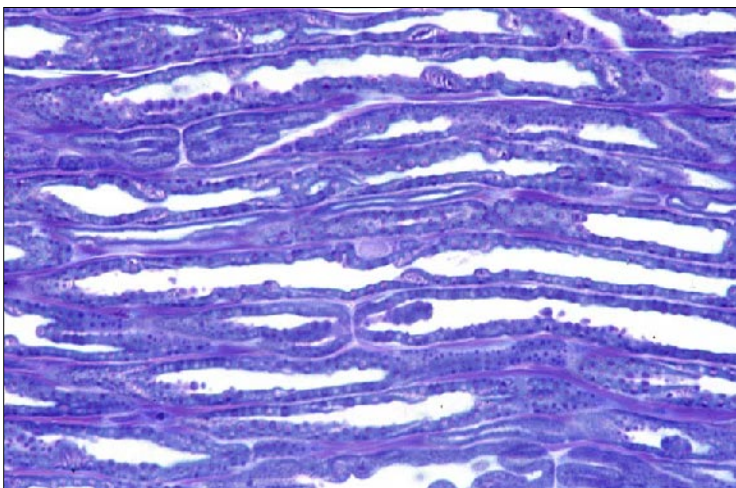


Abb. 17: Leopardentüpfelung (656fache Vergr.)

Die Leopardentüpfelung kann aber auch in der Frühphase der Autolyse beobachtet werden, was durch den Zerfall und die Dispersion der Membranproteine erklärt werden kann. Im Vergleich zu anderen Tierarten scheint die Myelinscheide von Pferden relativ unanfällig zu sein. Das ist dem Ergebnis des Autolyseversuchs wie auch dem laufenden Sektionsgut und diagnostischen Einsendungen (151) zu entnehmen. Die Problematik der Leopardentüpfelung besteht in erster Linie darin, dass die Detailerkennbarkeit der Nervenproben deutlich reduziert wird. Obwohl sie wohl eher weniger mit



Myelinscheidenpathologien verwechselt werden kann, sollte man sie einzuordnen wissen.

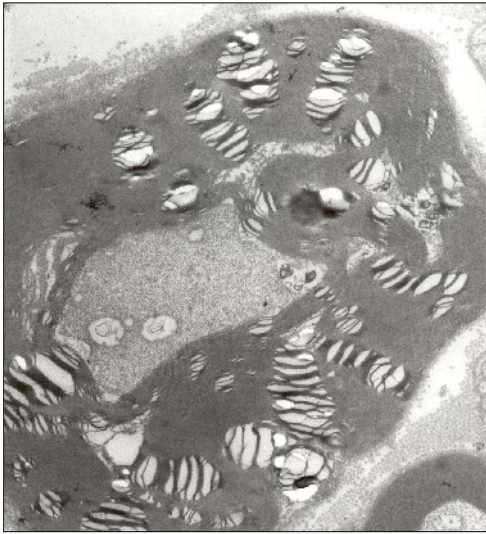


Abb. 18: Leopardentüpfelung (12525fache Vergr.)



Abb. 19: Leopardentüpfelung (68135fache Vergr.)

Die Leopardentüpfelung ist von Vakuolisierungen der Myelinscheide abzugrenzen. In Teasingpräparaten stellen diese sich nicht dunkel sondern hell dar. Sie waren im Zuge autolytischer Veränderungen (Abb. 20) und vereinzelt bei Überfixierungen in Glutaraldehyd zu beobachten (Abb. 21). In Semidünnschnitten konnte hierzu interessanterweise kein Äquivalent gefunden werden. Bekanntlich treten sie relativ konstant bei Formalinfixierungen auf. Früher wurde dieses Phänomen fälschlicherweise als Neurokeratinartefakt (42) bezeichnet. Man ging davon aus, dass sich das Myelin bei Formalinfixierung herauslöst und nur ein Keratingerüst bestehen bleibt. Eine derartige Vakuolenbildung zeigt sich sowohl in histologischen Schnitten als auch in Teasingpräparaten. KAZUI und FUJISAWA beschreiben auch eine Vakuolisierung der Markscheide als Alterungsphänomen (130). Diese Beobachtung konnte im eigenen Sektionsgut allerdings nicht bestätigt werden.



Abb. 20: Vakuolisierung bei Autolyse (560fache Vergr.)



Abb. 21: Vakuolisierung bei Überfixierung (560fache Vergr.)



Die Myelinscheidenverquellung ist eine weitere Veränderung, die als chemischer Artefakt im Zuge von Überfixierungen auftritt. Sie war dementsprechend am häufigsten und deutlichsten bei langer Fixierung in 6,25%igem Glutaraldehyd nachzuweisen. Hierdurch ist die Detailerkennbarkeit in Teasingpräparaten (Abb. 22) stärker reduziert als in Semidünnschnitten (Abb. 23). Elektronenmikroskopisch geht sie mit Verlust der lamellären Periodizität der Myelinscheide einher (Abb. 24). Erstaunlicherweise zeigten auch einige Proben bei niedrigen Fixierstufen aufgedunsene Myelinscheiden. Unter suboptimalen Aufbewahrungsbedingungen wirken die Myelinscheiden im Zuge der Autolyse ebenfalls nach wenigen Stunden aufgequollen. Daher korreliert die Myelinscheidenverquellung der niedrigen Fixierstufen möglicherweise mit der einsetzenden Autolyse.



Abb. 22: Myelinscheidenverquellung  
(656fache Vergr.)

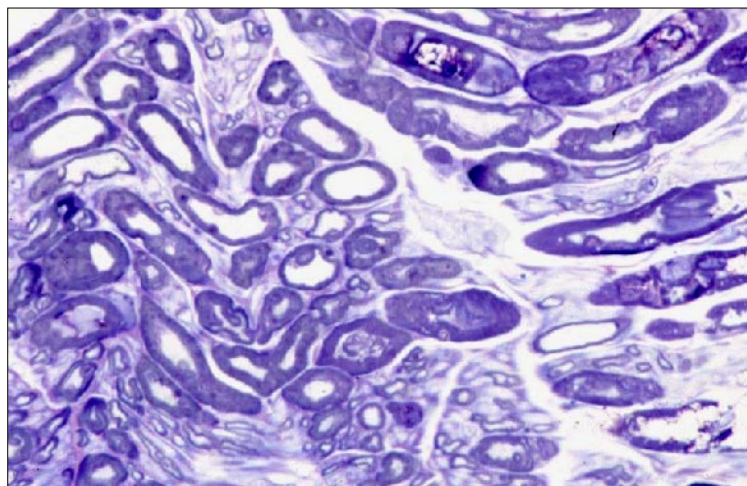


Abb. 23: Myelinscheidenverquellung  
(656fache Vergr.)

In Semidünnschnitten kann die Abgrenzung zu beginnenden interlamellären Myelinscheidenödemen unter Umständen erschwert sein. Bei Teasingpräparaten stellt sich die

artifizielle Verquellung meist über die Gesamtlänge einer Faser dar, und ist daher von lokalisierten Myelinscheidenödemen zu differenzieren.



Abb. 24: Myelinscheidenverquellung mit Periodizitätsverlust (6700fache Vergr.)

Bei Überfixierung von Teasingpräparaten trat desweiteren häufig eine Konsolidierung von Einzelfasern und Fasergruppen auf (Abb. 25). Sie war im Fixierversuch bei fast allen Tieren mit Hilfe von 6,25%igem Glutaraldehyd zu induzieren und stieg mit der Inkubationszeit an. Diese Verbackenheit beruht auf der mit steigenden Fixierungsstufen zunehmenden Dehydratation (7). Da das gesunde Endoneurium zu mindestens 20-30% aus Wasser besteht (201), kann man sich erklären, weshalb die Konsolidierung unter Schonung der lipidreichen Myelinscheide zustande kommt. Die erschwerte Trennung der Einzelfasern stellt sich ganz ähnlich dar, wie bei Erkrankungen des Endoneuriums die mit Fibrose einhergehen. Die Verbackenheit erschwert zudem die Beurteilung der gezupften Fasern.



Abb. 25:  
Konsolidierung  
(560fache Vergr.)

Als Formveränderung kommen bei der Überfixierung weiterhin Myelinscheideneinfaltungen in histologischen Schnitten vor. Im Extremfall stellen sich diese als Zirkularitätsverlust markhaltiger Fasern dar. Das gleiche Bild zeigt sich allerdings auch bei axonalen Atrophien im Zuge pathologischer (153) oder altersbedingter (130, 100, 38) Zustände. Im Gegensatz zu den überfixierten Präparaten deuten hier im Teasing parallele Linien internodaler Bereiche die Längsfaltung an (Abb. 54). Erstaunlicherweise war in Schnittpräparaten die mit starker Fixierung manchmal einhergehende axonale Schrumpfung nie im Zusammenhang mit Zirkularitätsverlust der Internodien zu beobachten.

Im Zuge der Autolyse muss bei Einzelfaserpräparaten bereits ab wenigen Stunden neben der Verquellung und der Leopardentüpfelung mit einer Fältelung der Myelinscheidenaußenkontur gerechnet werden. Aus ihr können sich bereits ab 8 Stunden post mortem Einkerbungen entwickeln, die sich zuerst an den SLK's manifestierten (Abb. 28, links unten). Von dort aus greifen sie zunehmend auf die gesamte Faser über und bilden unter Umständen bereits ab 12 bis 24 Stunden regelrechte Myelinscheidenprotrusionen in den axonalen Tubus. Diese stellen sich rund bis zapfenartig dar und können vakuolisiert sein (Abb. 20). An anderen Stellen wirkt das Myelin eher gewunden (Abb. 28, rechts oben, obere Faser). Mitunter kann aber auch die Verquellung der Nervenfasern zu diesen Zeitpunkten so stark sein, dass Myelinstrukturen nicht mehr eindeutig zuzuordnen sind. Allerdings gipfelt die Myelinscheidendesintegration nach etwa vier Tagen immer in einer Fragmentation der gesamten Faser (Abb. 28, rechts oben, untere Faser). Die Fragmente können hierbei wurstkettentartig aneinandergereiht sein (Abb. 27 und 28, rechts unten). Dabei ist Fragmentierung häufiger an großkalibrigen, und die Wurstkettentbildung eher an kleinen Fasern zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit kristallisiert sich eine „Wurstkettentbildung“ auch als speziesübergreifendes Jungtierphänomen (Abb. 26) heraus, das von der autolytischen Variante (Abb. 27) abgegrenzt werden muss. In Abwesenheit anderer autolytischer Veränderungen besteht mitunter eine Verwechslungsmöglichkeit mit der Myelinscheidensegmentierung kleiner Fasern im Zuge einer Wallerschen Degeneration (90). Bei großen Fasern zerfällt das autolytische Myelin manchmal staubig, wodurch ebenfalls Ähnlichkeit mit Myelinovoiden bei einer Wallerschen Degeneration entsteht. Sind die Fasern eher rechteckig segmentiert (Abb. 28, rechts oben), können sie auch mechanisch bedingten Querfrakturen (Abb.38) gleichen. Die Chronizität autolytischer Veränderungen in Teasingpräparaten und ihr Erscheinungsbild, das zu den entsprechenden Zeitpunkten zu erwarten ist, sind in Abb. 28 dargestellt.

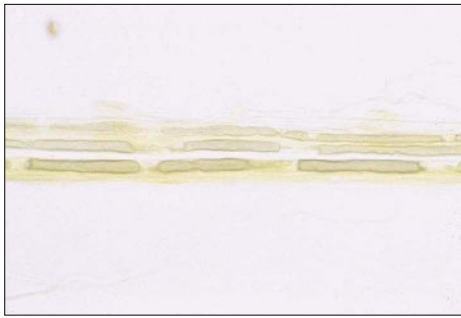


Abb. 26: Jungtier-, „Wurstkette“  
(437fache Vergr.)



Abb. 27: Autolyse-, „Wurstkette“  
(280fache Vergr.)

Zu der hier im Anfangsstadium der Autolyse beschriebenen Faltung der Myelinscheide stellen KALICHMAN et al. kontroverse Überlegungen an (128). Zwar erwähnen sie dieses *myelin wrinkling* nicht im Zusammenhang mit autolytischen Veränderungen, aber diskutieren es als mechanischen Artefakt und als sekundäres Phänomen einer axonalen Atrophie. Sie führen aber auch an, dass *myelin wrinkling* ebenso ohne Veränderung des Axonkalibers beobachtet wird. Im Rahmen dieser Arbeit stellten sich ebenfalls beide Variationen dar. Daher sind derartige Veränderungen der Myelinscheidenkontur stets zu erfassen, aber nicht überzubewerten, sondern mit dem übrigen Erscheinungsbild in Teasing- und Schnittpräparaten zu korrelieren.

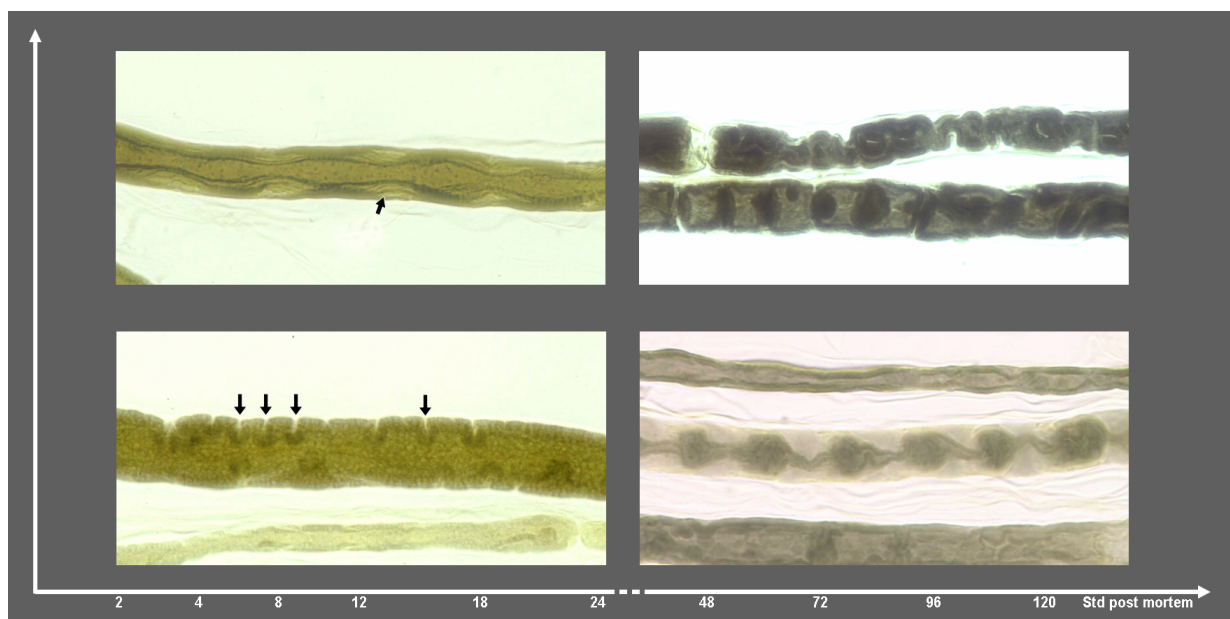


Abb. 28: Dynamik autolytischer Veränderungen (875fache Vergr.)

Wie bereits in Versuchen zur Gefrierätzmethode beschrieben (206), war in Semidünnschnitten bei Unterfixierungen und Autolyse (Abb. 28, links oben) eine feinlamelläre Aufblätterung der Myelinscheide zu beobachten. Sie beruht auf einer Herauslösung integraler Membranproteine (206) und manifestiert sich insbesondere in Bereichen des nicht-kompaktierten Myelins. So sind,



wie in Abb. 29 bis 32 dargestellt, die SLK's in Längsschnitten bei Unterfixierung in 1%igem Glutaraldehyd filigran aufgeblättert, bei 2,5%igem Glutaraldehyd etwas scholliger, und bei Überfixierung in 6,25%igem Glutaraldehyd regelrecht schollig aufgedunsen. Eine ähnliche Beobachtung konnte außerhalb der Versuchsreihe an Semidünnschnitten extrem überfixierter Mäusenerven gemacht werden, wobei sich hier das Schwannzellzytoplasma zusätzlich in den axonalen Tubus wölbte (Abb. 32).

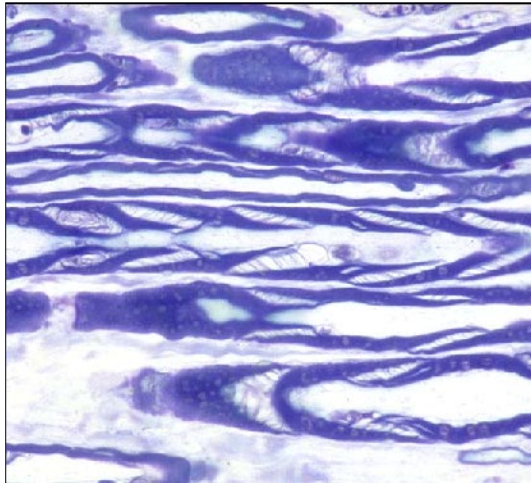


Abb. 29: SLK's bei 1 %igem Glutaraldehyd  
(1400fache Vergr.)

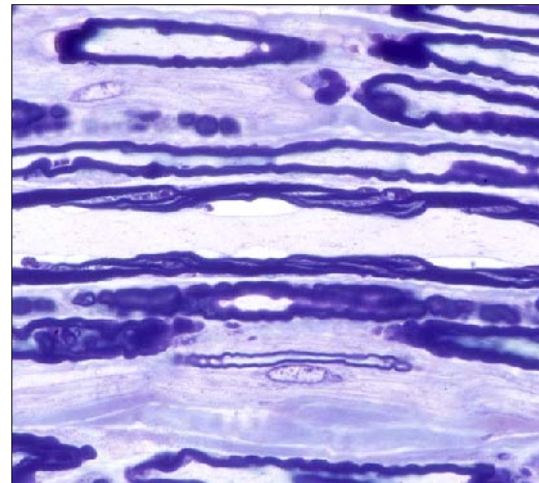


Abb. 30: SLK's bei 2,5 %igem Glutaraldehyd  
(1400fache Vergr.)

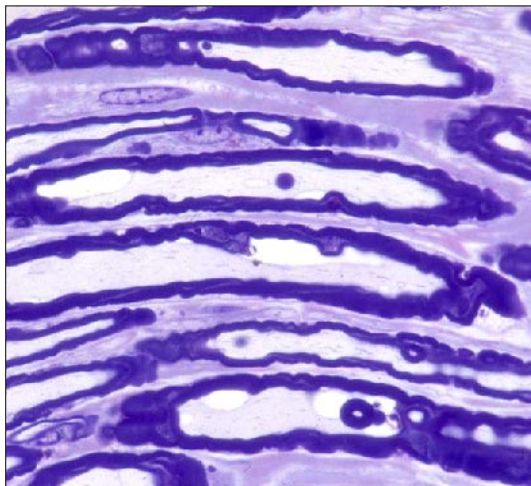


Abb. 31: SLK's bei 6,25 %igem Glutaraldehyd  
(1400fache Vergr.)

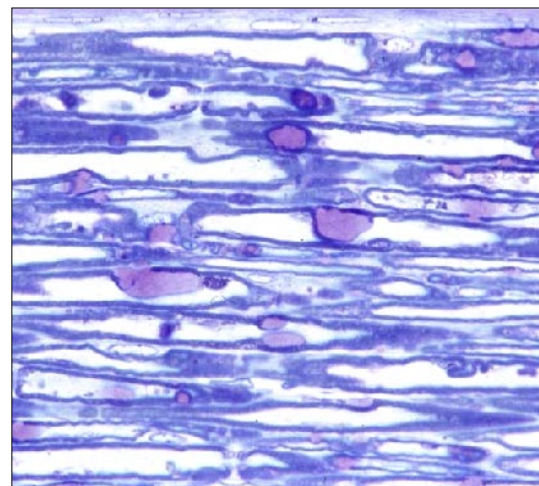


Abb. 32: SLK's bei 2,5 %igem Glutaraldehyd  
über 6 Tage (875fache Vergr.)

Ebenso wirkten paranodale Bereiche in Semidünnschnitten (Abb. 34) wie Teasingpräparaten bei Unterfixierung aufgeblättert und hell. Um sie von paranodalen Demyelinisierungen (Abb. 35) abgrenzen zu können (155), ist eine elektronenmikroskopische Untersuchung anzuraten. Obwohl KRINKE et al. auch im Zuge autolytischer Veränderungen eine paranodale

Aufhellung feststellen konnten (138), blieb dieses Phänomen in der vorliegenden Studie auf die Unterfixierung beschränkt.

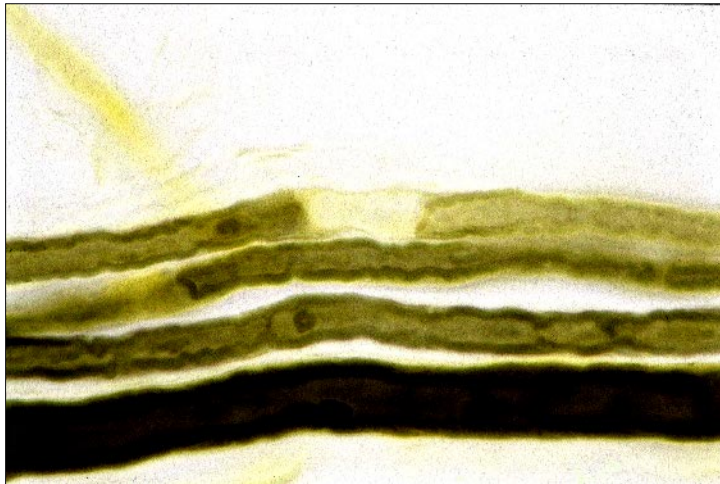


Abb. 33:  
paranodale Aufhellung bei  
Unterfixierung (1040fache Vergr.)

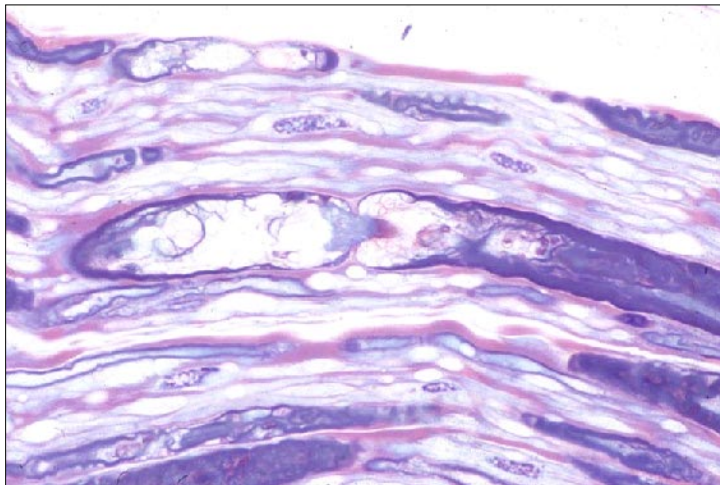


Abb. 34:  
paranodale Aufhellung bei  
Unterfixierung (1040fache Vergr.)



Abb. 35:  
paranodale Aufblätterung bei  
Diabetes mellitus, Hd  
(875fache Vergr.)

HONOVAR et al. (114) beschreiben eine Myelinscheidenaufblätterung als autolytische Veränderung. Sie waren in den eigenen Versuchsreihen reproduzierbar. Nach einigen Tagen



post mortem erreichen sie ein solches Ausmaß, dass man von „Wollknäuelbildung“ spricht (228). In Teasingpräparaten findet man in paranodalen und juxtapanodalen Bereichen Strukturen, die den Wollknäuelen der Schnittpräparate entsprechen.

Um artifizielle Myelinscheidenaufblätterungen von pathologischen Prozessen abzugrenzen, kann die Elektronenmikroskopie hilfreich sein. Artefakte scheinen eher extrazelluläre Anteile der Myelinscheide zu betreffen und gehen deshalb mit einer Separierung der Myelinlamellen im Bereich der *intraperiod lines* (Abb. 37) einher (161). In den vorliegenden Untersuchungen stellte sich hierbei die Aufblätterung unterfixierter Proben mitunter genauso wabenartig dar (Abb. 36), wie die von HONOVAR et al. beschriebene autolysebedingte (114). Pathologische Myelinscheidenveränderungen manifestieren sich dagegen vor allem in den ehemals intrazellulären Anteilen der *major dense lines* (161).

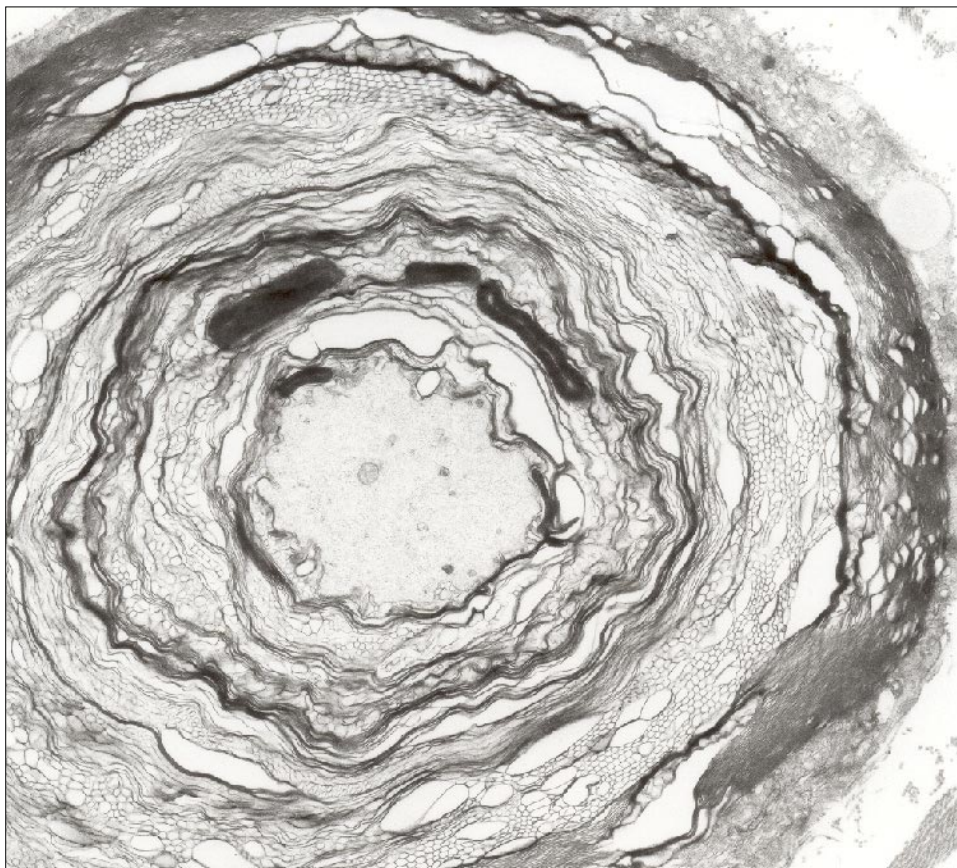


Abb. 36:  
wabenartige Aufblätterung  
bei Unterfixierung  
(10500fache Vergr.)

Diese ultrastrukturelle Differenzierungsmöglichkeit kann man sich auch bei dem Phänomen der Myelinscheidendoppelringbildung in Semidünnschnitten zu Nutze machen. In bis zu 50% der dick myelinisierten Fasern stellen sich die SLK's in Querschnitten derart dar (161). Im Elektronenmikroskop sind hier eindeutig zytoplasmatische Anteile zu identifizieren. Diese

fehlen bei einer artifiziellen Doppelringbildung unterfixierter oder autolytischer Präparate. Durch Fixierung in hypertonen Medien oder einer vermehrten Zugbelastung bei Präparation oder Teasing werden die SLK's noch deutlicher hervorgehoben (138).

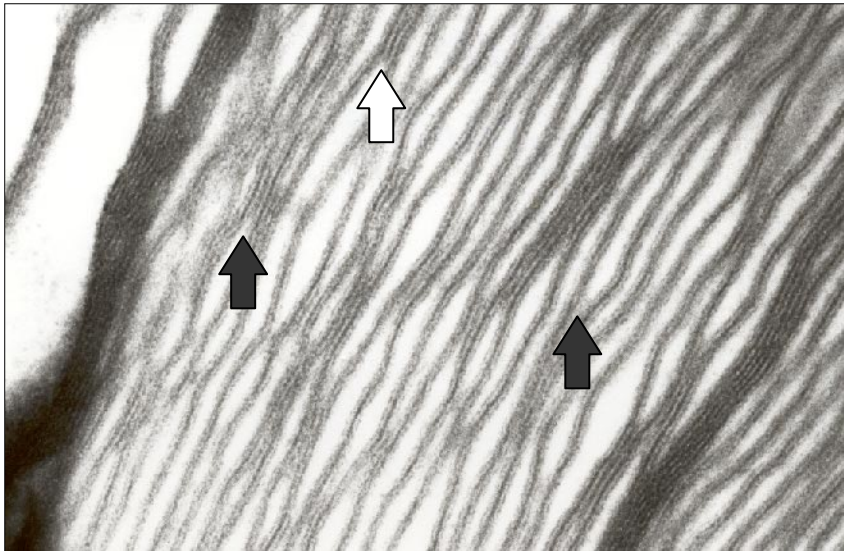


Abb. 37:  
Aufblätterung der Myelin-  
scheide

major dense line  
(weißer Pfeil)

intra-period line  
(schwarzer Pfeil)

(184000fache Vergr.)

An mechanisch bedingten Artefakten treten in Teasingpräparaten neben den bereits erwähnten Querfrakturen (Abb. 38) auch Längsfrakturen und Quetschungen auf. Die Frakturen waren bei allen Fixierstufen zu beobachten, wobei sie bei Fixierung mit 2,5%igem Glutaraldehyd eher selten waren. Die Quetschartefakte betrafen ebenfalls alle Fixierstufen, wobei eine Präferenz bei der Fixierung mit 1%igem Glutaraldehyd festzustellen war. Der hierbei entstehende Myelinstaub kann mitunter mit pathologischer Debris oder den mit zunehmendem Alter vermehrt auftretenden  $\pi$ - (45, 236) und  $\mu$ -Granula (6) verwechselt werden. Bei Unterfixierungen kann es überdies durch mechanische Einwirkung zur Bildung axonaler Hernien (Abb. 41 und 42) und Subhernien (Abb. 40) kommen. Hernien gehen mit und Subhernien ohne Axoplasmaustritt einher. Im Querschnitt entstand hier ein hufeisenähnliches Bild. Elektronenmikroskopisch war zu belegen, dass die Myelinscheide in diesen Bereichen gebrochen ist und das Axon sich hernienartig vorwölbt.



Abb. 38:  
multiple Querfrakturen  
(560fache Vergr.)



Abb. 39:  
Wallerische Degeneration  
Stadium II  
(560fache Vergr.)



Das unter anderem von KRINKE et al. (138) beschriebene *beading*-Phänomen, das man als *stretch*-Artefakt unfixierter Nerven (138, 170, 171) oder proximal von Nervenquetschungen (257) beobachtet hat, trat im eigenen Untersuchungsmaterial nur ein einziges Mal auf, ohne dass dabei eine exakte pathognomonische Zuordnung getroffen werden konnte. Insgesamt konnten innerhalb der Studie trotz einer Gesamtzahl von etwa 112400 geteaseten Fasern *stretch*-Artefakte völlig vermieden werden.



Abb. 40:  
„axonale Subhernien“  
(560fache Vergr.)

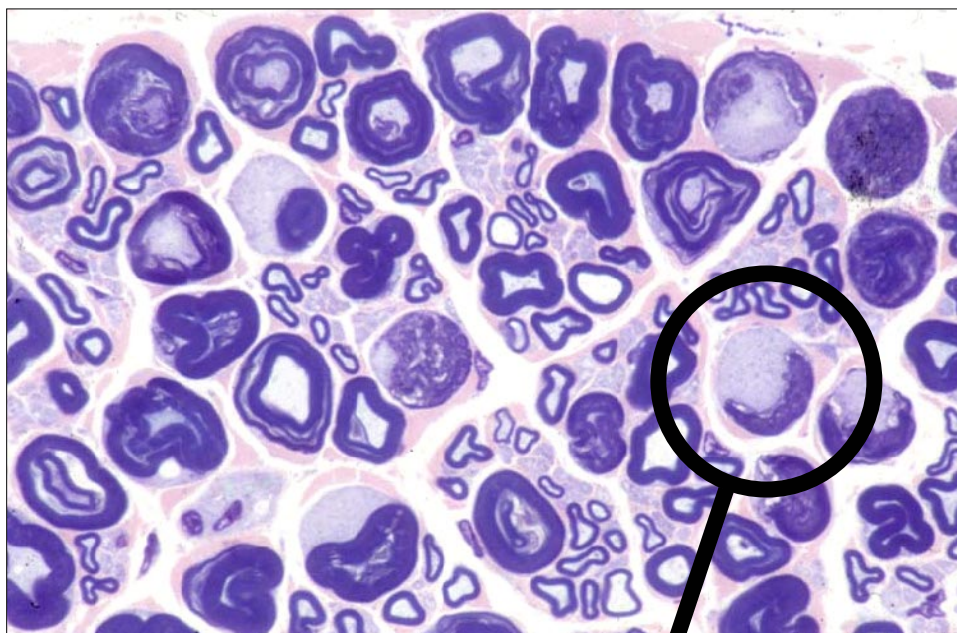


Abb. 41:  
„axonale Hernien“  
(1400fache Vergr.)

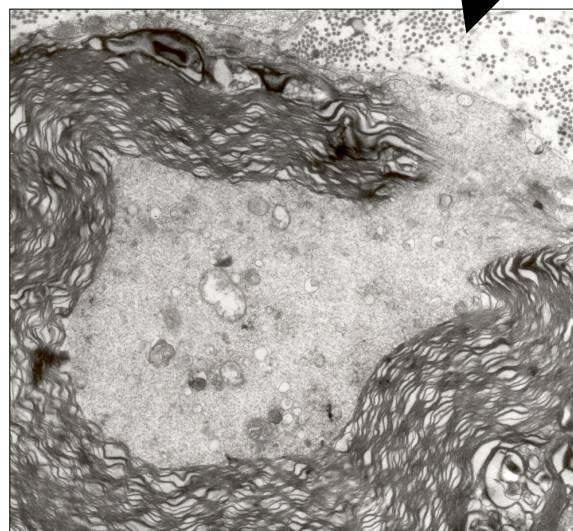


Abb. 42:  
„axonale Hernien“  
(8300fache Vergr.)

## 2 VORSCHLÄGE ZUR DIAGNOSTISCHEN AUFBEREITUNG DES PERIPHEREN NERVENS

Die beste Voraussetzung zur pathologischen Diagnostik peripherer Neuropathien ist der „frische“ Nerv. Das bedeutet im Falle von Biopsien eine sofortige Fixierung nach der Exzision, und im Falle von Autopsien zusätzlich eine möglichst rasche Entnahme nach dem Tod. Aus den eigenen Untersuchungen wurde deutlich, dass autolysebedingte Veränderungen bereits nach 1 bis 2 Stunden einsetzen. Die Auswertbarkeit wird mit zunehmender Autolysedauer schlechter, wobei ab 3 bis 4 Tagen häufig keine sicheren Aussagen über pathologische Veränderungen mehr gemacht werden können.

Großen Einfluss auf die Autolysegeschwindigkeit haben mit Sicherheit auch die Temperatur und die Art der Aufbewahrung der Probe bis zur Fixierung. So wiesen unfixierte oder ungekühlte Proben aus diagnostischen Einsendungen viel schneller autolytische Veränderungen auf als Proben, die vor Fixierung etwa gleich lang in mit Custodiol® befeuchteter Gaze oder im Kühlschrank aufbewahrt worden waren.

Die für verschiedene Fixierstufen mit Glutaraldehyd vergebenen Scores für die Auswertbarkeit der Teasingpräparate und histologischen Kontrollschnitte ergaben zusammen mit den Scores für die Teasbarkeit einen Gesamtüberblick, mit welchem Fixierprotokoll eine optimale Auswertbarkeit mit minimalen Artefakten erreicht werden kann. Summa summarum kann eine Fixierung in 2,5%igem Glutaraldehyd bei Jungtieren für etwa 2, bei alten Tieren für etwa 1 Stunde vorgeschlagen werden, und widerspricht damit längeren Angaben aus der Literatur (60). Übereinstimmend mit früheren Beobachtungen (27), wurde in vorangegangenen hauseigenen Untersuchungen bestätigt, dass die Beurteilbarkeit von Feinstrukturen formalinfixierter Nerven erheblich eingeschränkt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit fiel immer wieder auf, dass pathologisch verändertes Untersuchungsmaterial eher zu Fixations- und Autolyseartefakten neigt als gesunde Nerven. Um bei Einsendungen diese vermeidbaren autolytischen und chemischen Artefakte zu verhindern, wurde an Kliniken und Praxen, welche Nervenbiopsien durchführen, bereits von Institutsseite 2,5%iges Glutaraldehyd und Sörensen-Waschpuffer mit den entsprechenden Instruktionen verschickt.

Um zu testen inwieweit die manuelle Bearbeitung erleichtert werden kann, wurden Kollagenolyseversuche mit Glycinpuffer (1) und Kollagenase (231, 145) durchgeführt. Per primam wurde erprobt ob ihr Einsatz vor der Fixation sinnvoll ist. Die erste Überlegung dabei

war, ob das Einzelfaserteasing zu erleichtern ist, ohne dass dabei artifizielle Veränderungen die Diagnostik beeinträchtigen. Die Nervenproben wurden bewusst von älteren Tieren gewählt, da der Gehalt an endoneuralem Bindegewebe im Nerven mit dem Alter zunimmt (100, 38). Die Teasbarkeit der Einzelfasern war durch eine fünfminütige Einwirkung von Kollagenase zu verbessern, durch Glycinpuffer hingegen selbst durch längere Inkubationsdauer nicht. In beiden Fällen muss bereits nach 5 Minuten mit einer geringgradig reduzierten Detailerkennbarkeit gerechnet werden, da die Myelinscheide mitunter etwas staubig wirken kann. Trotzdem erwies sich die Kontrastierung dünner Fasern gegenüber unbehandelten Proben tendenziell besser, was mit dem Eindringungsvermögen des Osmiums zusammenhängen dürfte. Glycininkubierte Proben können jedoch bereits nach 5 Minuten anfälliger für mechanische Artefakte werden.

In den histologischen Kontrollschnitten traten geringe Überfixierungsphänomene der Myelinscheide auf. Beim Einsatz von Glycinpuffer wirkten Endo- und Perineurium zusätzlich aufgelockert. Proben, die vor der Fixierung länger als 5 Minuten in Glycin inkubiert wurden, neigten zunehmend zu mechanischen und Überfixierungsartefakten. Erstere beruhen auf dem „Weichmachereffekt“ des Glycins, so dass bei langen Einwirkzeiten die Proben sogar schlechter zu teasen waren. Zudem traten Überfixierungsphänomene wie Leopardentüpfelung und Myelinscheidenverquellung auch bei Teasingpräparaten auf. Ob sie auf dem Glycinpuffer selbst oder auf ein durch ihn bewirktes erhöhtes Penetrationsvermögen für das Fixativum beruhen, bleibt fraglich. Bei längeren Einwirkzeiten induziert Glycinpuffer sogar eine Myelindesintegration, so dass das Myelin sich an den SLK's mitunter proglottidenartig zusammenschiebt (Abb. 43).



Abb. 43:  
(560fache Vergr.)

ADAMS et al. (1) zeigten in ihrem Versuch zur Homogenisierung von peripherem Myelin eine elektronenmikroskopische Aufnahme nach 2-stündiger Inkubation einer unfixierten Probe in Glycinpuffer. Das Myelin war über die gesamte Myelinscheide verteilt löchrig herausgelöst. An intakten Stellen war die Periodizität der Lamellen allerdings noch zu sehen.

Wurde der frisch entnommene Nerv samt dem umgebenden Gewebe in Glycinpuffer geschwenkt, war die Feinpräparation zur Entfernung bindegewebiger Anteile bei allen Proben deutlich leichter. Dies war auch noch nach anschließender Fixierung der Fall. Das Schwenken in Kollagenase brachte einen ähnlichen, jedoch weniger ausgeprägten Effekt. LEVY et al. (145) berichten, dass die komplette Entfernung epi- und perineuraler Anteile durch eine 1- bis 2-stündige Inkubation in einem Kollagenase-Trypsin-Gemisch möglich ist. Trypsin zersetzt, ebenso wie Glycinpuffer, Proteine unspezifischer als Kollagenase. Aus diesem Grund und wegen seiner unter Umständen auftretenden Tendenz Zellmembranen zu schädigen (145), wurden die eigenen Untersuchungen jedoch auf Glycinpuffer und Kollagenase beschränkt.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist als präfixative Behandlung ein kurzes Schwenken der Gesamtprobe in Glycinpuffer zu empfehlen. So kann der Nerv für die Fixierung mit wenig mechanischem Aufwand in möglichst kleine Faszikel unterteilt werden. Nach jedem Kontakt mit dem Glycinpuffer sollte der Nerv sofort in Waschpuffer geschwenkt werden, da ansonsten die Nervenstrukturen vom Glycinpuffer sehr schnell angegriffen werden. Zur Erleichterung der Teasingarbeit kann man darüberhinaus eine 5-minütige Inkubation in Kollagenase erwägen. Da sie anderen Autoren zu Folge vor allem auf die im Endoneurium vorkommenden Kollagentypen I-III wirkt und die Endoneuralscheide aus Kollagen IV besteht (230), wäre zu erwarten gewesen, dass sie das Myelin weniger angreift als der Glycinpuffer. Dass trotz allem Myelinstrukturen durch die Kollagenase geringgradig nachteilhaft beeinflusst wurden, kann auf die Kontamination mit nicht-spezifischen Proteasen zurückzuführen sein (145). Nachteile der Kollagenase gegenüber dem Glycinpuffer liegen darin, dass sie nicht vorrätig gehalten werden kann und stets frisch angesetzt werden muss. Darüberhinaus ist sie viel teurer.

Der zweite Gedankenansatz zum vergleichenden Einsatz von Glycinpuffer und Kollagenase war dahingehend, wie ihr Einfluss auf bereits fixierte Nervenproben ist. Die Teasbarkeit konnte hier trotz einer 60-minütigen Einwirkzeit von Glycinpuffer nicht verbessert werden, obwohl die Myelinscheide bereits angegriffen war. Hingegen konnte, wie auch in den Versuchen von TATKE und DOYLE (230) beschrieben, durch 60-minütige postfixative Inkubation in Kollagenase die Teasbarkeit eindeutig verbessert werden. Allerdings muss auch hier in Teasingpräparaten mit einer geringgradig staubig wirkenden Myelinscheide gerechnet werden, die die Detailerkennbarkeit unter Umständen herabsetzt. In histologischen Schnitten kann zudem die Myelinscheide etwas angegriffen sein.

Wurden Nerven nach Entnahme ohne vorangegangene Feinpräparation fixiert, konnte durch anschließende 1-stündige Inkubation in Kollagenase das verbliebene Bindegewebe im Vergleich zur unbehandelten Probe ohne Substanzverlust abgezogen werden und eine Trennung in möglichst dünne Faszikel war möglich. Nach Glycinpufferinkubation war lediglich das Bindegewebe leichter zu lösen, eine Trennung in möglichst dünne Faszikel konnte nicht ohne Substanzverlust erfolgen. Daher bietet der Einsatz von Kollagenase an bereits fixierten Proben eine gute Möglichkeit sowohl die Feinpräparation als auch die Teasbarkeit zu verbessern. Dafür muss eventuell eine geringgradig reduzierte Detailerkennbarkeit in Kauf genommen werden. Proben für histologische Schnitte sind dabei vor Inkubation in Kollagenase abzutrennen. Die Möglichkeit, die Bearbeitung durch Kollagenase nach Fixierung zu erleichtern, ist besonders im Hinblick auf Einsendungen hilfreich, da diese oft mitsamt dem umgebenden Bindegewebe überfixiert sind.

Die bisher vorgeschlagenen Bearbeitungsmethoden sind neben der Anfertigung histologischer Quer- und Längsschnitte als „Standardprotokoll“ zur Bearbeitung von Nervenbiopsien zu betrachten. Sind in Schnittpräparaten unklare, nicht einzuordnende Strukturen zu verzeichnen, ist, wie auch zur Untersuchung nicht-myelinisierter Fasern, eine elektronenmikroskopische Feindarstellung anzuraten.

#### **Protokoll zur Bearbeitung unfixierter Nervenproben**

- a) falls die Fixierung nicht sofort nach Entnahme erfolgt, ist der Nerv in einer mit Custodiol® befeuchteten Gaze in den Kühlschrank zu verbringen
- b1) Kurzes Schwenken in Glycinpuffer
- b2) Kurzes Schwenken in Waschlösung
- c) Fixierung in 2,5%igem Glutaraldehyd bei Raumtemperatur:
  - Proben adulter Tiere für eine Stunde
  - Proben juveniler Tiere für zwei Stunden
- d) Waschen in Waschlösung  
(24 Stunden im Kühlschrank oder 4 Stunden auf dem Rüttler)
- e) Abtrennung und Einbettung des Anteils für die licht- und eventuell elektronenmikroskopische Untersuchungen
- f) Postfixierung für eine Stunde in 2%igem Osmiumtetroxid
- g) Waschen in Waschlösung  
(24 Stunden im Kühlschrank oder 4 Stunden auf dem Rüttler)
- h) Inkubation in Glycerin (reinst) über Nacht

**Protokoll zur Bearbeitung vorfixierter Nervenproben**

- a) Abtrennung und Einbettung des Anteils für die licht- und eventuell elektronenmikroskopische Untersuchung
- b) 60-minütige Inkubation in Kollagenase
- c) Waschen in Waschpuffer (24 Stunden im Kühlschrank oder 4 Stunden auf dem Rüttler)
- d) vgl. Protokoll zur Bearbeitung unfixierter Nervenproben: f-h)

Kommt es bei der Diagnosefindung an Teasingpräparaten zu entsprechenden Fragestellungen, besteht anhand fluorochromatischer oder immunhistochemischer Methoden die Möglichkeit einer selektiven Axondarstellung.

Die mit dem Fluorochrom 5,5'-Diphenyl-9-ethyl-oxacarbocyanin (DPED) hergestellte Lösung besitzt neben ihrer Fähigkeit Myelinscheiden anzufärben (204) auch myelinolytische Eigenschaften zu besitzen. Diese Wirkung ist auf den hohen Methanolgehalt der Lösung zurückzuführen (204). Besonders deutlich wird das, wenn unfixierte Proben mit DPED-Lösung gefärbt werden. In den eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sich das Myelin unfixierter Nerven ab Inkubationszeiten von etwa 90 Minuten herauslöst und DPED sich dabei an axonale Strukturen bindet. Hierbei stellt sich das Axon dünner als in osmiumgefärbten Kontrollpräparaten dar. Da DPED eine Bindungsspezifität für  $\beta$ -Faltblattstrukturen besitzt, handelt es sich höchstwahrscheinlich um kondensierte Elemente des axonalen Zytoskeletts (154). In den eigenen Versuchsreihen erwies sich das unten aufgeführte Protokoll zur Axondarstellung als empfehlenswert. Die Myelinscheide löst sich dabei bis auf eine äußere dünne Membran, die bestehenbleibt, heraus. Werden die Proben zwischen den einzelnen Schritten nicht gründlich genug in Aqua bidest. geschwenkt, wird die Emission von DPED orangefarben. Dieser Solvatochromieeffekt beruht auf der Polymerbildung in unterschiedlich polaren Lösungsmittel (154).

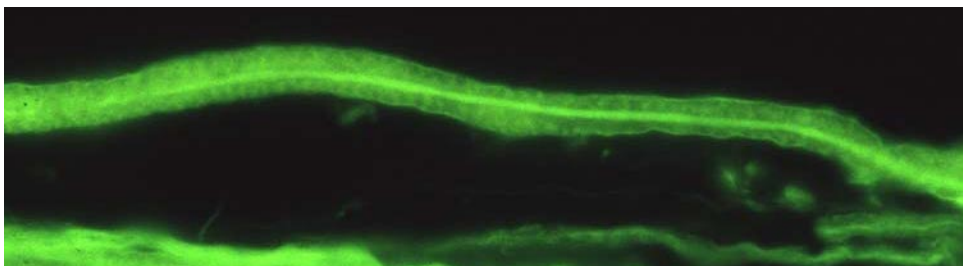


Abb. 44:  
axonale DPED-Färbung  
(560fache Vergr.)



**Protokoll zur Axondarstellung mit DPED**

- a) Inkubation der unfixierten Probe in DPED für 2 Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss
- b) 10-sekündiges Schwenken in Aqua bidest.
- c) 10-sekündiges Schwenken in Alkohol 30%
- d) 10-sekündiges Schwenken in Alkohol 100%
- e) 10-sekündiges Schwenken in Aqua bidest.
- f) Fixierung in 2,5%igem Glutaraldehyd für 1 bis 2 Stunden
- g) über Nacht in Glycerin (reinst)

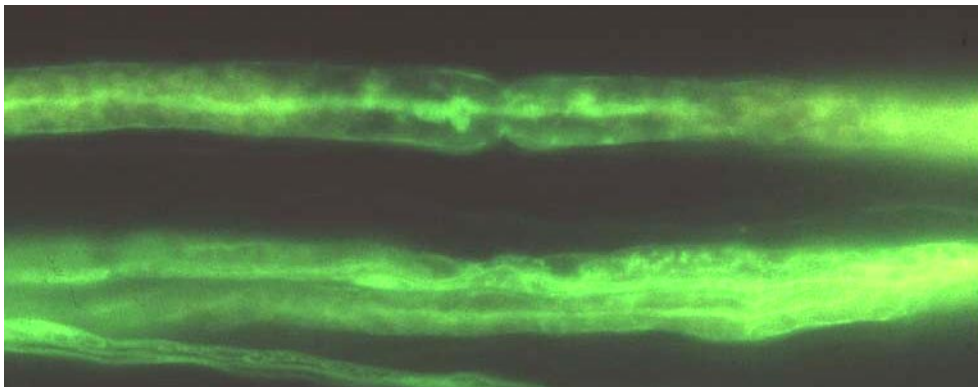


Abb. 45:  
axonale DPED-Färbung  
(875fache Vergr.)

Darüberhinaus besteht bei fixierten Nervenproben die Möglichkeit mittels DPED eine selektive Färbung der Myelinscheide zu erwirken. Die Fixierung dämmt die myelinolytische Wirkung der DPED-Lösung. Bei Proben, die nach der Färbung zweifach in höheren Alkoholen geschwenkt wurden, löste sich die Myelinscheide tendenziell trotzdem vakuolig heraus. Divergierend zu vorangegangenen Untersuchungen am eigenen Institut (154), konnte in der vorliegenden Studie die beste Detailerkennbarkeit der Myelinscheide erreicht werden, wenn die fixierten Proben nach 2-stündiger DPED-Inkubation zuerst in 30%igem und dann in 100%igem Alkohol geschwenkt wurden. Auch bei umgekehrter Reihenfolge (100%/30%) zeichneten sich die SLK's besonders deutlich ab.

Im Vergleich zur Osmiumfärbung leistet die DPED-Darstellung der Myelinscheide jedoch eine geringere Detailerkennbarkeit. Bereits nach wenigen Tagen geht die DPED-Emission der Teasingpräparate verloren, so dass eine Beurteilung immer sofort erfolgen sollte. Es ist ferner stets darauf zu achten, dass die Lösung möglichst frisch angesetzt wird, da sich ansonsten weder Myelinscheide noch Axon deutlich anfärben. Der Vorteil von DPED gegenüber dem

schleimhautreizenden Osmium liegt darin, dass es wesentlich weniger gesundheitsschädigend ist.

Eine weitere im Rahmen dieser Doktorarbeit evaluierte Methode zur selektiven Darstellung des Axons an Teasingpräparaten ist die *whole-mount*-Immunhistochemie. Die Schwierigkeit in der Darstellung der Neurofilamente liegt erstens darin, sie als Antigen zu erhalten und zweitens für die Antikörper zugänglich zu machen (80, 82).

Glutaraldehyd modifiziert die Antigenstruktur der Neurofilamente infolge der Aldehydvernetzung (7) derart, dass keine immunhistologische Markierung mehr möglich ist. Bei Formalinfixierung färbten sich die Axone an, allerdings etwas unregelmäßig und fleckig. In vergleichbaren Untersuchungen (82) wurde mit Paraformaldehyd fixiert.

Dieses Protokoll gewährleistet den besten Antigenerhalt. In Anlehnung an Vorschläge von FERRI et al. (82) und ERNFORS et al. (80) wurde die „Weichmacherwirkung“ von Triton-X-100 genutzt, um die Myelinscheide für die Antikörper durchgängig zu machen. Die Nerven müssen vor Fixierung dennoch unter der Stereolupe einem „Vorteasing“ unterzogen werden, da sich sonst nur die äußerste Lage der Faszikel anfärbt.

Durch zusätzliches Schwenken in Glycinpuffer vor der Fixierung konnte die Durchdringungskraft der Antikörper nicht erhöht werden. Sobald die Proben bei der Beschickung mit Chromogen die geringste Anfärbung zeigen, sind sie mit Aqua dest. zu spülen. 2-3 Minuten sind ausreichend, da bei längerer Einwirkzeit die Tendenz besteht, dass die Färbung des Axons auf die Myelinscheide übergreift.

Im Vergleich zur DPED-Färbung und auch im Vergleich zu osmiumgefärbten Präparaten stellt sich das Axon hier deutlich breiter dar, was eventuell auf den Tritoneffekt zurückgeführt werden kann.

Alles in Allem ist zur selektiven Darstellung der Axone in Nervenbiopsien das Fluorochrom DPED aus mehreren Gründen zu bevorzugen: Zunächst beträgt der Zeitaufwand der Immunhistochemie etwa 10 Tage, die DPED-Färbung kann dagegen am gleichen Tag beurteilt werden. Dabei birgt die Immunhistochemie zusätzlich mehr potentielle Fehlerquellen, die zum Scheitern führen können. Darüberhinaus stellt der Umgang mit DPED im Gegensatz zu einigen Utensilien der Immunhistochemie wie Triton-X-100 und DAB keine vergleichbare gesundheitliche Gefahr dar.





Abb. 46:  
immunohistochemische  
Neurofilamentfärbung

Axon: weißer Pfeil

äußere Myelinscheiden-  
begrenzung: schwarzer  
Pfeil

(1400fache Vergr.)

Die sogenannte *post-teasing* Licht- und Elektronenmikroskopie erschließt einem die Möglichkeit, die Fasern von außen und von innen zu betrachten. Techniken zur Untersuchung von Querschnitten isolierter Einzelfasern wurden bereits vor über 30 Jahren beschrieben (69, 225). Obwohl es auch damals gelang bestimmte, morphologisch verdächtige Abschnitte aus Teasingpräparaten im Schnitt wiederzufinden, hat sich die Technik wohl wegen des hohen präparatorischen Aufwands nicht für die Routinediagnostik durchgesetzt. ZHAO et al. (268) schlugen kürzlich ein Protokoll vor, das mit Sicherheit eine hohe „Trefferquote“ erzielt. Es beansprucht allerdings 11 Tage und ist sehr aufwändig und diffizil. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode ist deshalb dahingehend modifiziert, dass sie innerhalb von 4 Tagen durchgeführt werden kann.

Die Qualität der Einzelfaserschnitte bei Proben mit und ohne Plastikunterlage war gleich gut. Unter dem Lichtmikroskop blieb bei beiden Methoden das Neuroparenchym sehr gut erhalten und die Detailerkennbarkeit war optimal (Abb. 47).

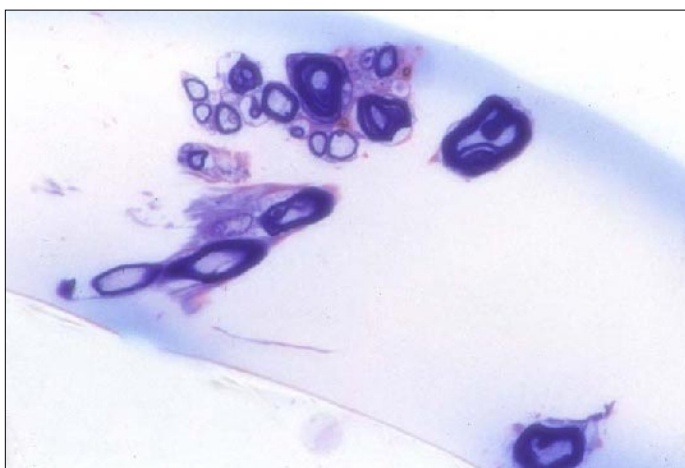


Abb. 47:  
post-teasing-Semidünnschnitt

(1040ache Vergr.)

Im Elektronenmikroskop war die Plastikunterlage auf Grund ihrer höheren Dichte vom Einbettmedium zu unterscheiden, hatte aber ebenfalls keinen Einfluss auf die Qualität der Schnitte. Die Detailerkennbarkeit am Neuroparenchym war sehr ausgeprägt. Die Darstellung von Myelinaufblätterungen und -vakuolisierungen, Axon-Schwannzellnetzwerken sowie Organellen von Axon und Schwannzellen ist mit den Ultradünnschnitten vorher nicht geteaster Fasern vergleichbar. Sogar interstitielle Anteile wie Kollagen und Fibroblasten blieben erhalten und es waren erstaunlich viele Remakfasern in den *post-teasing* Schnitten zu sehen (Abb. 48). Es waren insgesamt nicht mehr Artefakte zu verzeichnen als in Ultradünnschnitten vorher nicht geteaster Präparate.



Abb. 48:  
post-teasing-  
Elektronenmikroskopie

(16700fache Vergr.)

Obwohl die Qualität der Schnitte mit und ohne Plastikunterlage gleich war, ist die Einbettung ohne Plastik vorzuziehen, da diese Präparate aufgrund der besseren Verbindung zwischen den Kunststoffen viel leichter zu schneiden sind. Nach Eingrenzung eines pathologischen Merkmals auf einer Strecke von 1 bis 2 mm liegt die Wahrscheinlichkeit diese Stelle im Schnitt zu treffen sehr hoch, sofern man etwa 6 Ebenen des Blockes schneidet. Um unnötiges Trimmen und Schneiden zu vermeiden, sollte in jeder Ebene sofort nach Teasingäquivalenten gesucht werden. Auf diese Weise kann dem sehr sensitiven Verfahren des *nerve fiber teasings* eine spezifische Zusatzuntersuchung zur Seite gestellt werden, die selbst bei geringen Materialmengen möglich ist. An dieser Stelle sollte allerdings erwähnt werden, dass die

Zupfpräparation in nicht auspolymerisierten Einbettmedien strikt unter dem Abzug zu erfolgen hat.

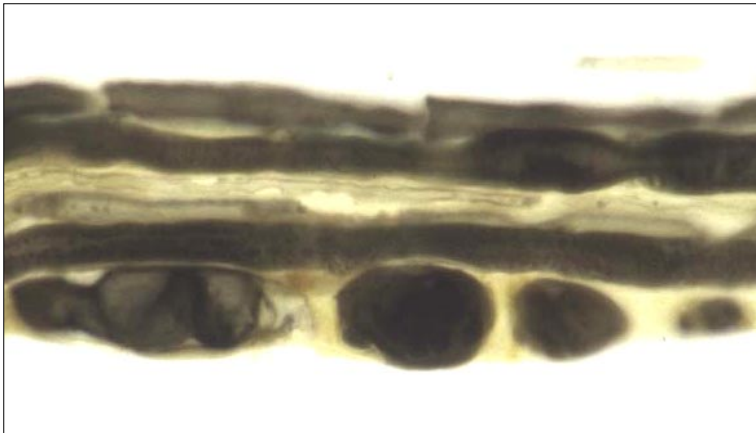


Abb. 49 a:  
Teasingfaser in Epon®  
(875fache Vergr.)

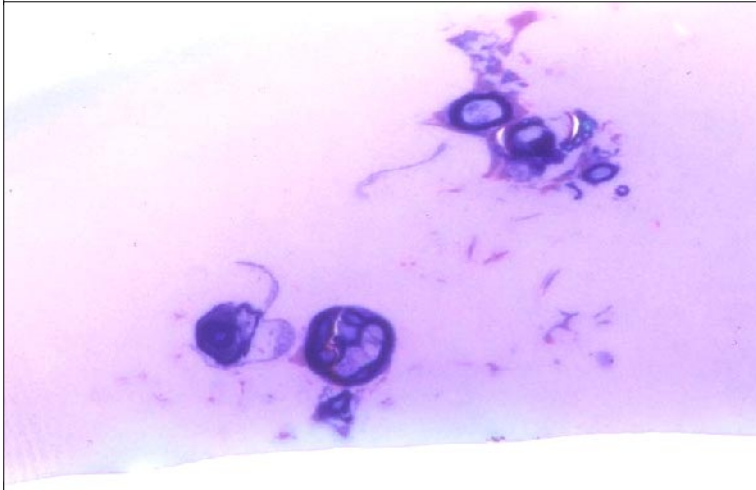


Abb. 49 b:  
Semidünnschnitt durch  
das obige Faserbündel  
(1040fache Vergr.)

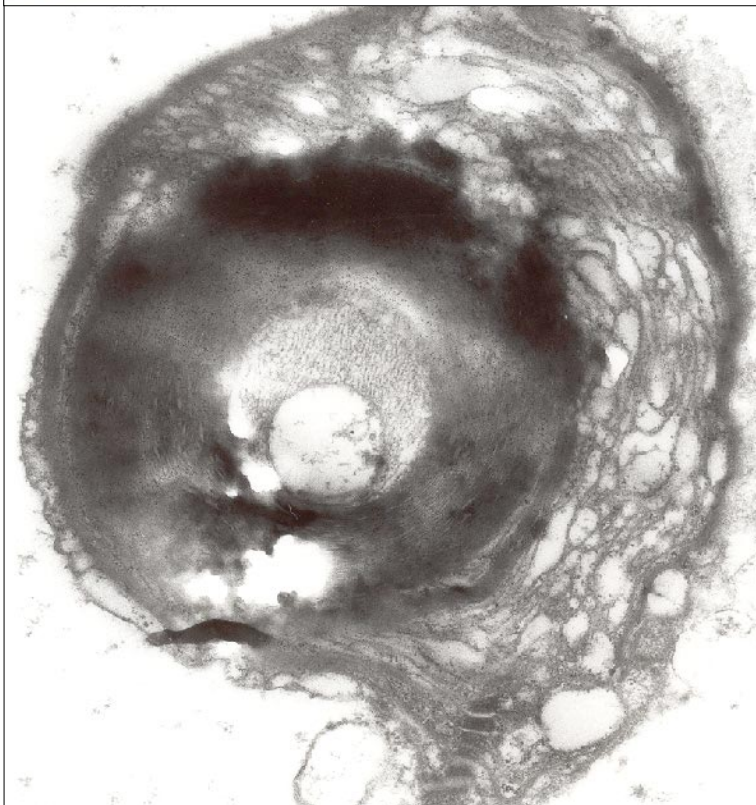


Abb. 49 c:  
Ultradünnschnitt durch  
das obige Faserbündel  
(26900fache Vergr.)

### 3 DIE BEDEUTUNG VON TEASINGPRÄPARATEN BEI DER DIAGNOSTIK PERIPHERER NEUROPATHIEN

Die Herstellung von Teasingpräparaten lässt sich über hundert Jahre zurückverfolgen. Im 19. Jahrhundert und Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Pionierarbeiten von Neuropathologen und Anatomen wie REMAK, KOLLIKER, GOMBAULT und CAJAL geleistet (138). In den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde diese Methode von DYCK et al. (68) wieder aufgegriffen und überarbeitet. Er erstellte erstmals ein deskriptives Klassifizierungsschema zur Beschreibung von Veränderung geteaster Nerven bei peripheren Neuropathien des Menschen. Dabei ordnete er Kombinationen von Veränderungen den alphabetischen Buchstaben A bis I zu (siehe II., 4.2.1.1). KALICHMANN et al. (128) üben an diesen Summationskategorien dahingehend Kritik, als dass hier durch die große Variabilität innerhalb der einzelnen Kategorien Information verloren gehen kann. Daher schlagen sie eine konkretere Beschreibung der Einzelveränderungen innerhalb der Fasern vor (siehe II., 4.2.1.2).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Beurteilung geteaster Nerven vorerst in Anlehnung an diese beiden Klassifizierungsschemata. Sämtliche in der Humanmedizin beobachteten Veränderungen waren auf die verschiedenen Tierspezies übertragbar. Mit den Versuchsreihen und bei der Aufarbeitung diagnostischer Fälle kristallisierten sich jedoch etliche Phänomene heraus, die weder DYCK noch KALICHMANN berücksichtigen. Daher wird hier aufgrund der eigenen Beobachtungen ein Erfassungsschema vorgeschlagen, das nicht nur mögliche pathologische Zustände, sondern auch mechanisch, chemisch und autolytisch bedingte Artefakte miteinbezieht (Tabelle 25). Jede Nervenfasern ist auf die einzelnen Punkte hin zu überprüfen. Treten Veränderungen auf, soll darüberhinaus ihr Verteilungsmuster und ihr Grad bestimmt werden. Mit dem Schema (Abb. 50) wird ein Vorschlag gemacht, wie die Beschreibung einzelner Veränderungen systematisch vorgenommen werden kann. Somit bietet sich auch Personen, die sich nicht tagtäglich mit der Beurteilung von Teasingpräparaten beschäftigen, eine Möglichkeit Veränderungen zuzuordnen und einzustufen. Führt man eine „Strichliste“ für die erhobenen Befunde, so kann nach der Beurteilung eine Objektivierung im Sinne einer „Auszählung“ erfolgen. Auf diese Weise wird deutlich, welche Veränderungen davon wirklich pathognomonisch relevant sind. Nur diese fließen letztendlich in die Bewertung bzw. Diagnose ein, wobei auch momentan nicht zuzuordnende Phänomene nicht verlorengelassen werden. Zu Beginn muss die Repräsentativität der Probe abgeschätzt werden. Als adäquate Ausgangssituation bezeichnen wir 200-300 beurteilbare Fasern bei einer Länge von etwa 5 Internodien. Können etwa 100 Fasern geteast werden, schätzen wir im Gegensatz zu

anderen Autoren (27) die Repräsentativität nur als marginal ein. Eine inadäquate Menge liegt bei weniger als 50 Fasern vor.

Tabelle 25: Erfassungsschema zu Veränderungen an Teasingpräparaten

<b>Repräsentativität</b>	adäquat	marginal	inadäquat	
<b>Technische Daten</b>	gut	mittel	schlecht	
Anfärbbarkeit				
Kontrast				
<b>Befunde</b>				
allgemeiner Myelinisierungsstatus	adäquat	hypomyelinisiert	hypermyelinisiert	
	Schwanzzellen		Hyperplasie	
	Hypertrophie			
Querfrakturen				
Längsfrakturen				
Quetschungen				
(Sub-)Hernien				
Beading				
Axonschwellung				
Leopardentüpfelung				
Vakuolisierung				
Verquellung				
Konsolidierung				
Paranodienaufhellung				
paranodale Demyelinisierung				
interkalierende Internodien				
segmentale Demyelinisierung				
segmentale Hypomyelinisierung				
Myelinscheidenwellung				
Myeloneinfaltungen				
Myelinovoide				
Fragmentierung der Myelinscheide				
eindeutige Wallersche Degeneration	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Digestionskammern				
zystische Myelinscheidenödeme				
Schwanzzeleinschlüsse				
Globoide				
Tomakula				
Fading Fibers				
Gewebsreste				
Zellinfiltrate	intratubär		extratubär	

Je dunkler die Färbung des Feldes ist, desto höher liegt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um einen Artefakt handelt. Bei diesen Merkmalen sind zur Absicherung andere Indikatoren für künstliche Nervenveränderungen zu überprüfen.

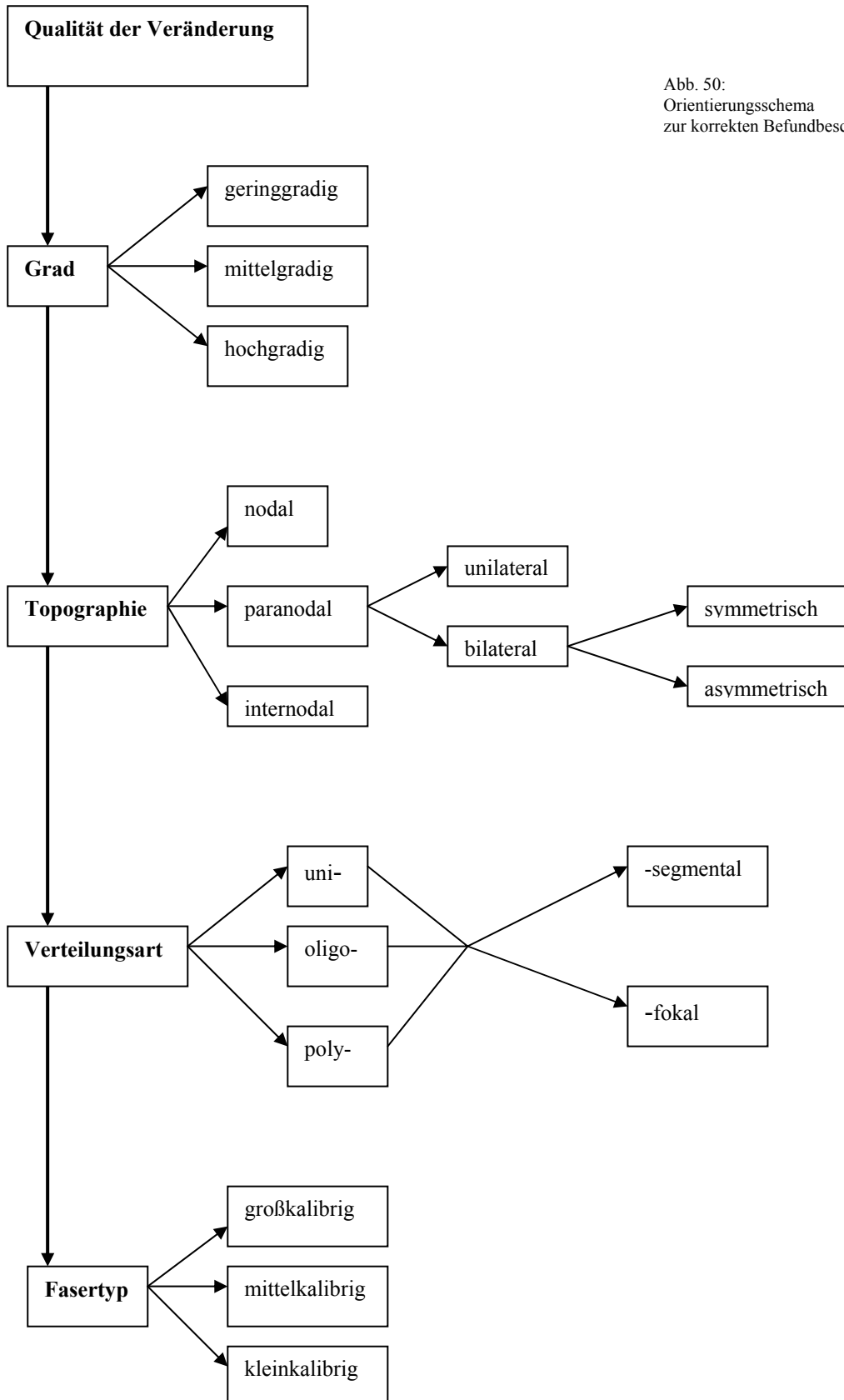


Abb. 50:  
Orientierungsschema  
zur korrekten Befundbeschreibung



Die Einzelfaserdiagnostik am geteasten Nerven kann jedoch die übliche Schnittdiagnostik keinesfalls ersetzen, da mesenchymale Anteile des Nervens nur begrenzt und nicht-myelinisierte Fasern gar nicht beurteilt werden können. So kann diagnostisch wichtige Information über Epi-, Peri- und Endoneurium verlorengehen. Zwar stellen sich mitunter Mastzellen und intra- bzw. extratubäre Makrophagen an Teasingpräparaten dar, aber eine quanti- und qualitative Aussage über interstitielle Infiltrate (27) und eine Beurteilung von Veränderungen endoneuraler Zellen (98) und extrazellulärer Matrix ist nicht möglich. Daher können insbesondere entzündliche Veränderungen, vor allem im Stadium vor der Infiltration, nur mit Schnittpräparaten erfasst werden. So geht die Befundung endo- und perineuraler Ödeme und vaskulärer Alterationen (161, 60) bei alleiniger Beurteilung geteaster Fasern ohne histologische Kontrollschnitte verloren. Obwohl vereinzelt Blutgefäße in Teasingpräparaten vorkommen, können vaskuläre Veränderungen hier ebenfalls nicht erkannt werden.

Abgesehen davon, dass die Klassifizierung von Tumoren des peripheren Nervens nur mit speziellen Methoden an Schnittpräparaten erfolgen kann (202, 177), können auch Tumormetastasen im Teasingpräparat nicht erfasst werden. Darüberhinaus sind Ultradünnschnitte zur Beurteilung sensorischer und vegetativer Remakfasern Voraussetzung (129). In der Humanmedizin kann bereits der klinische Vorbericht, wie beispielweise ein Sensibilitätsverlust, Hinweise auf mildere Veränderungen an nicht-myelinisierten Fasern geben und eine Indikation für eine Nervenbiopsie darstellen (213). Bei Tieren werden derartige krankhafte Prozesse in der Regel erst in fortgeschritteneren Stadien durch Automutilation (229) für den Besitzer deutlich. Daher stammen Nervenbiopsien in der Tiermedizin fast ausschließlich von Tieren mit motorischen und propriozeptiven Defiziten.

Dennoch sind geteaste Nervenfasern in der Diagnostik peripherer Neuropathien unverzichtbar. Nur sie ermöglichen myelinisierte Fasern in ihrem Verlauf zu beurteilen und pathologische Veränderungen in ihrem Ausmaß entlang der Nervenfasern darzustellen (87). Deswegen kann insbesondere die Wallersche Degeneration in Einzelfaserpräparaten optimal erfasst werden (138). Histologische Schnitte spiegeln dagegen nur eine Momentaufnahme des geschnittenen Bereichs wider, ohne dass eine Aussage über die Kontinuität der Veränderung an der Faser gemacht werden kann. Selbst bei der Anfertigung von Folgeschnitten ist eine Einzelfaser nicht über die im Teasing erreichte Distanz zu verfolgen. Dazu kommt, dass die Fasern im Verlauf ihre Position sowohl innerhalb des Bündels als auch zwischen den Bündeln wechseln können (27) und sie daher in weiteren Schnittebenen unter Umständen nicht mehr eindeutig zuzuordnen sind.

Auch segmentale Veränderungen, wie beispielsweise segmentale Demyelinisierungen (213), können genauso wie interkalierende Internodien als solche nur mit Hilfe von Teasingpräparaten angesprochen werden (161, 27). Das Auftreten von interkalierenden Internodien im Zusammenhang mit Demyelinisierungen spricht eindeutig für einen regenerativen Prozess (27). In Schnitten sind dabei häufig nur hypomyelinisierte Fasern zu verzeichnen (215). Wenn hier zusätzlich eine Hyperplasie von Schwannzellen auftritt, kann das als ein Bestreben zur Remyelinisierung interpretiert werden. Allerdings ist es kaum möglich, einen eindeutigen Remyelinisierungserfolg nach einer Demyelinisierung im Schnitt zu belegen. So geht wertvolle Information in Bezug auf die Prognose verloren. Genauso leicht können umschriebene Veränderungen wie beispielsweise Tomakula untergehen, wenn nicht genau der entsprechende Bereich geschnitten wird (161). Ohne weitere Korrelate kann auch eine lokal begrenzte Veränderung an der Faser, wenn sie in Schnittpräparaten getroffen wurde, für generalisiert gehalten, oder eine generalisierte Veränderungen als lokale missinterpretiert werden.

Darüberhinaus können Veränderungen an geteasten Fasern eindeutig nodalen, paranodalen oder internodalen Bereichen zugeordnet werden. Wird in einem Schnitt beispielsweise häufig der Knotenbereich angeschnitten, kann das den Eindruck von vielen „nackten“ Axonen (12) vermitteln. Werden vermehrt paranodale Bereiche getroffen, besteht Verwechslungsgefahr dieser kleeblattähnlichen Abschnitte (12) mit einem pathologischen Zirkularitätsverlust. In Teasingpräparaten müsste sich in diesem Fall eine Längsfaltung des Myelins in internodalen Bereichen abzeichnen (153). Wenn dagegen vermehrt Bereiche der SLK's angeschnitten werden, so ist eine Elektronenmikroskopie zur Abgrenzung pathologischer Myelinscheidenaufblätterungen (212) oder auch von *stretch*-Artefakten (161) von Nöten. Das kann aus unserer Erfahrung heraus unterbleiben, wenn Teasingpräparate in diesen Bereichen unverändert sind.

#### 4 KORRELATIVE NEUROPATHOLOGIE DES PERIPHEREN NERVENS ANHAND EINIGER FALL- BEISPIELE

Dysfunktionen des peripheren Nervens beruhen entweder auf homöostatischen Verschiebungen im Endoneurium, die sich sekundär auf die Nervenfunktion auswirken, oder auf Erkrankungen des Neuroparenchyms per se (254, 20). Hierbei kann zwischen demyelinisierenden und axonalen Prozessen sowie gemischten Neuropathien unterschieden werden (254).



In Teasingpräparaten stellt sich auf Grund ihrer Osmiophilie vor allem die Myelinscheide dar. Da axonale Veränderungen die Myelinscheide stets sekundär beeinflussen (251), lassen sie sich hierüber indirekt erfassen. In den gezupften Einzelfasern können **axonale Primärschädigungen** in zwei Formen auftreten. Einerseits ist die Wallersche Degeneration (251) anhand ihrer typischen Myelinscheidenfragmentierung zu beobachten. Sie beruht auf einer strukturellen (17) oder funktionellen (19) Kontinuitätsunterbrechung des Axons. Andererseits treten primär axonale Veränderungen auch als reine Atrophie ohne unmittelbare Kontinuitätsunterbrechung auf. Sie gehen vom Axon oder vom Zellkörper selbst aus, und sind dann als somatogen zu bezeichnen (214), oder sie treten als Folge einer Erkrankung des Endorgans Muskel auf.

Je nach Stadium zeigt sich die klassische Wallersche Degeneration distal der Läsion zuerst in einer Aufblätterung, dann in einer Segmentierung der Myelinscheide im Bereich der SLK's (Stadium I und II). Interessanterweise konnten GHABRIEL und ALLT (90) in ultrastrukturellen Untersuchungen darlegen, dass diese Myelinsegmentierung von den *intraproduct lines* neben den Zytoplasmataschen der SLK's ausgeht. Anschließend entsteht eine lineare Reihe an Myelinovoiden, die degeneriertes Myelin und Axonsegmente enthalten (Stadium III) (90). CAJAL (Hinweis bei 229) bezeichnet solche Strukturen als Digestionskammern. Wir hingegen umfassen mit diesem Begriff auch kammerartige Verdauungsvakuolen, die bei primären Demyelinisierungen auftreten können und keine Axonsegmente enthalten müssen. Im Rahmen der Wallerschen Degeneration zerfallen diese Ovoide letztlich, wobei auch das Axon dann nicht mehr zu erkennen ist (Stadium IV) (128). All diese Prozesse distal der Läsion treten synchron auf (58). Dagegen verhalten sich Veränderungen im Bereich proximal der Läsion asynchron und aufsteigend (37). Dabei sind häufig axonale Schwellungen zu beobachten (41). Im Zuge dieses *dying-back* (36) spricht man von einer *Wallerian like degeneration* (68).

Bei der Gruppe von degenerativen Nervenerkrankungen, die unter dem Begriff distale *dying-back* Neuropathien zusammengefasst sind, und hereditären wie toxischen Ursprungs sein können (223), ist gerade diese *Wallerian like degeneration* in den Spätstadien ein typisches Erkennungsmerkmal. Die Mehrzahl dieser Erkrankungen weist eine Faserselektivität auf und betrifft in diesem Sinne bevorzugt großkalibrige Fasertypen (211). Im Teasing kann die distale Hauptmanifestation sehr gut angesprochen werden. Im Vergleich zu Krankheiten, die mit einem deutlichen Myelinscheidenzerfall einhergehen (siehe oben), ist die reine Axonatrophie

nicht so leicht zu erkennen. Die Myelinscheidenaußenkontur stellt sich hier oftmals gefältelt dar (72), was mitunter bis zum *myelin wrinkling* hin ausgeprägt sein kann (128). Deutlich wurde dies bei einem jungen Leonberger mit hereditärer Axonopathie aus der Reihe der Kasuistikfälle (VK1). Er wies eine derartige gefältelte Außenkontur über die gesamten Segmente aller großkalibrigen Fasern auf, wobei hier insbesondere an den Paranodien eine hochgradige Myelinscheideneinfaltung zu beobachten war (Abb. 51 und 52). Licht- und Elektronenmikroskopie bestätigten einen atrophischen, hochgradig kondensierten axonalen Innenkörper. Diese axonale Atrophie führte zu einer Denervation der Muskulatur, die in der Elektromyographie anhand der pathologischen Einstichaktivität nachgewiesen werden konnte. Da diese in proximalen Gliedmaßenabschnitten weniger deutlich ausgeprägt war, lässt sich ein Hinweis auf eine distale Hauptmanifestation ableiten. Die Verminderung der Nervenleitgeschwindigkeit, die in der Regel eher für eine primäre Veränderung der Myelinscheide spricht, ist hier auf die Betroffenheit der großkalibrigen Fasern, die sich pathomorphologisch abzeichnet, zurückzuführen. Da es sich bei diesem Fasertyp in erster Linie um Motoneurone und propriozeptive Fasern handelt, lassen sich auch die im Rahmen der neurologischen Untersuchung festgestellten propriozeptiven Defizite und stark reduzierten spinale Reflexe erklären.

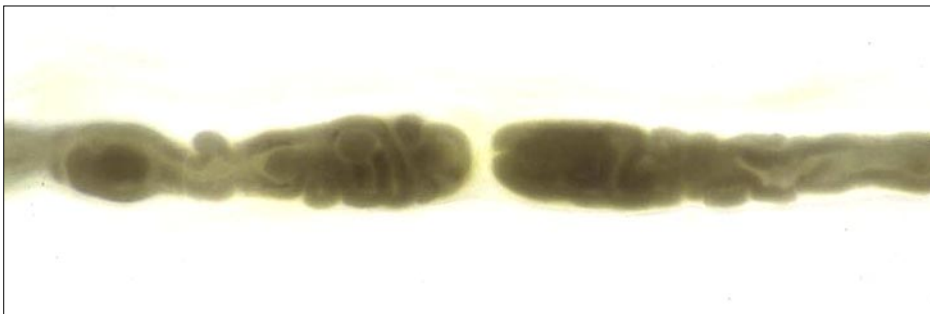


Abb. 51:  
paranodale Auffaltung  
(875fache Vergr.)

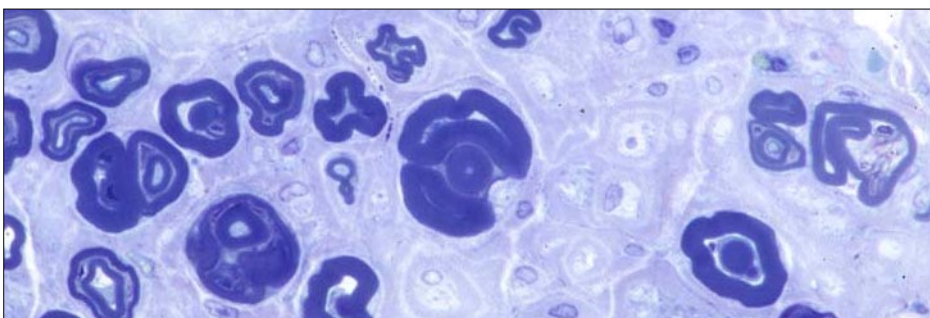


Abb. 52:  
axonale Atrophie und  
paranodale Auffaltung  
im Querschnitt  
(1400fache Vergr.)

Wie sich in den eigenen Beobachtungen an Teasingpräparaten herauskristallisierte, können neben diesen Myelinscheidenauffaltungen auch Längsfalten der Myelinscheide in internodalen Bereichen als Indiz für eine axonale Atrophie gewertet werden (Abb. 54).

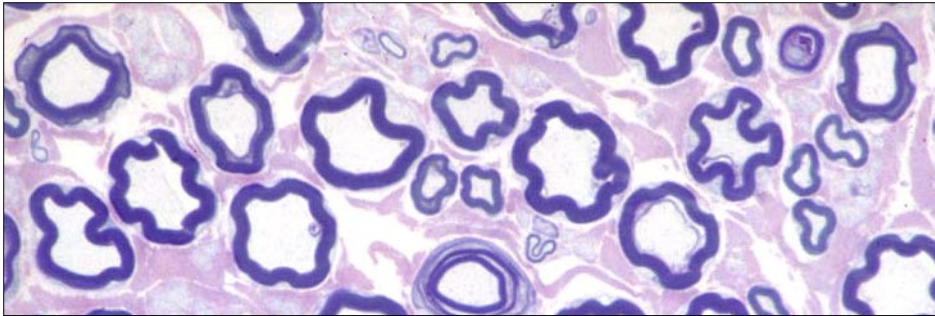


Abb. 53:  
gekerbte Faserquer-  
schnitte  
(1400fache Vergr.)

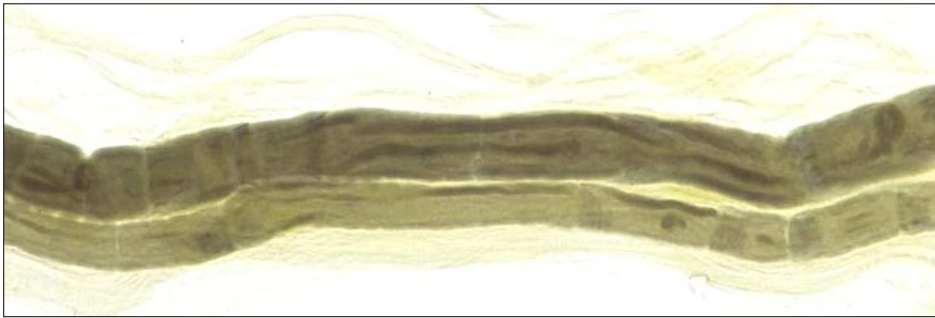


Abb. 54:  
internodale Längsfaltung  
der Myelinscheide  
(875fache Vergr.)

Erkrankungen der Myelinscheide selbst werden als **demyelinisierende Neuropathien** bezeichnet (20). Aus pathomorphologischer Sicht scheint es treffender, von einer funktionell demyelinisierenden Neuropathie zu sprechen, da die Veränderungen der Myelinscheide nicht unbedingt mit einem Verlust an Myelinsubstanz eingehen müssen.

Bei vielen Erkrankungen nehmen die pathologischen Veränderungen im Paranodium ihren Ursprung (209). Einerseits kann das Myelin hier dann dünner oder herausgelöst wirken, oder andererseits der Schnürringbereich länger erscheinen (128). Kommt es zur Remyelinisierung in diesem Abschnitt, so entsteht ein interkalierendes Internodium (vgl. II.,4.2.3.2). Anfangs ist es nicht nur kürzer, sondern auch dünner als die restlichen Internodien (225). Daran kann man eindeutig einen remyelinisierenden Prozess erkennen (27). Nach WELLER und NESTER (260) treten interkalierende Internodien nur bei Fasern auf, deren Durchmesser mehr als 5 µm beträgt. Daher ist bei dünnkalibrigen Fasern nie ein primärer Markscheidenzerfall, der von den Paranodien ausgeht, zu erwarten. Aus diesem Grund ist selbst bei Teasingpräparaten der primäre Myelinscheidenzerfall kleiner Fasern von einer Ovoidbildung im Sinne einer Wallerschen Degeneration schwer zu unterscheiden.

Ist ein ganzes Internodium von der Demyelinisierung betroffen, bezeichnet man sie als segmental. Nach KALICHMAN et al. (128) ist sie am eindeutigsten in ihren Anfangsstadien erkennbar, wenn von Makrophagen phagozytierte Myelindebris um ein intaktes Axon herum akkumuliert. Die Makrophagen penetrieren vorher die Basalmembran der Schwannzellen, meist im Bereich der Ranvierschen Schnürringe, und separieren das Schwannzellzytoplasma von seinem Myelin. Dieser Vorgang wird als *myelin stripping* bezeichnet (161). Nach eigenen

Einschätzungen kann man auch von einer segmentalen Demyelinisierung sprechen, wenn ein Axon entlang eines ganzen Segments frei von Myelin ist. Remyelinisierungen in diesen Bereichen zeichnen sich durch eine dünne Myelinscheide aus und sind ohne Kenntnis der Kinetik korrekterweise nur als Hypomyelinisierungen zu beschreiben (128).

Bei einem Pyrenäenschäferhund mit demyelinisierender Neuropathie aus unserer Kasuistikreihe (VK2) war neben paranodalen Demyelinisierungen das Phänomen besonders des *myelin strippings* besonders deutlich ausgeprägt. Bereits die Elektrodiagnostik wies mit der stark verlangsamten Nervenleitgeschwindigkeit und der zeitlichen Dispersion des Muskelsummenaktionspotentials eindeutig auf eine demyelinisierende Erkrankung hin. Da pathomorphologisch keinerlei Anzeichen von Remyelinisierung zu verzeichnen waren und es sich vorberichtlich um einen chronisch progredienten Verlauf handelte, ist der Fall prognostisch eher als vorsichtig einzustufen.



Abb. 55:  
Makrophage verschafft  
sich Zutritt am Schnürring

(1400 fache Vergr.)

Auch bei primärem Markscheidenzerfall können darüberhinaus Myelinovoide entstehen, deren Abgrenzung zu den Fragmenten der Wallerschen Degeneration schwierig sein kann. Das trifft aus den oben genannten Gründen besonders auf die dünnkalibrigen Fasern zu. Da Wallersche Degenerationen nach distal immer die ganze Faser gleichzeitig betreffen, ist bei uni- oder oligosegmental auftretenden Ovoiden von einem primären Markscheidenzerfall auszugehen. Im Zuge von primär demyelinisierenden Prozessen können auch die bereits angesprochenen Digestionskammern entstehen. Nach unseren Beobachtungen enthalten sie stets Debris. Daher sind wir dazu übergegangen, sie von anderen kammerartigen Auftreibungen der Myelinscheide zu differenzieren. Als solche konnten wir fokale Myelinscheidenödeme oder -liquifizierungen feststellen. SPENCER und THOMAS (225) bezeichneten vergleichbare zystische Erweiterungen als *myelin bubbles*, obwohl sie mitunter auch osmiophile Strukturen darin beobachten konnten. Besonders eindrücklich zeigten sich diese primär myelinopathischen

Bilder mit multiplen Digestionskammern und zystischen Myelinscheidenliquifizierungen bei einem Belgischen Schäferhund (VK3) aus unserer Kasuistikreihe (Abb. 56). Die Elektrodiagnostik wies aufgrund einer geringgradigen Denervation in den distalen Abschnitten aller Gliedmaßen, sowie aufgrund einer fehlenden Stimulierbarkeit der Nerven an den Hintergliedmaßen und eines verbreiterten und amplitudenreduzierten Muskelsummenaktionspotentials an den Vordergliedmaßen, auf eine gemischte Polyneuropathie hin. Zwar traten auch pathomorphologisch vereinzelt Anzeichen für eine axonale Schädigung auf, aber aufgrund der bereits genannten, massiven Primärveränderungen an der Myelinscheide, war histopathologisch eindeutig eine demyelinisierende Neuropathie festzustellen. Die axonalen Veränderungen lassen sich hier auf die erkrankte Markscheide zurückführen, da die myelinbildenden Zellen bekannterweise einige für das Axon wichtige, trophische Faktoren exprimieren (19) (vgl. II., 4.1).



Abb. 56:  
Digestionskammer mit  
Makrophage

(875fache Vergr.)

Neben all den bisher genannten Veränderungen der Myelinscheide, die sich in Teasingpräparaten durch eine Reduktion der Myelinsubstanz hervortun, kommen bei demyelinisierenden Neuropathien auch umschriebene Hypermyelinisierungen in Form von Globoiden (11) und Tomakula vor (200). Sie entstehen durch verschiedene genetische und erworbene Defekte definierter Myelinscheidenproteine (10, 194, 200), auf die im Literaturteil bereits genauer eingegangen wurde (vgl. II.,4.2.3.3). Per definitionem dürfen nur Myelinverdickungen die über 150% des Gesamtfaserdurchmessers betragen als tomakulär bezeichnet werden (245). BEHSE et al. (11) geben an, dass die eher wurstförmigen, nicht



abgesetzten Tomakula Durchmesser von bis zu 40  $\mu\text{m}$ , die abgesetzten Globoide hingegen nur zwischen 8 und 12  $\mu\text{m}$  aufweisen. In Anlehnung an DYCK et al. (68) unterscheiden wir diese beiden Strukturen nur auf Grund ihrer Form, da mitunter auch sehr große Globoide zu beobachten sind.

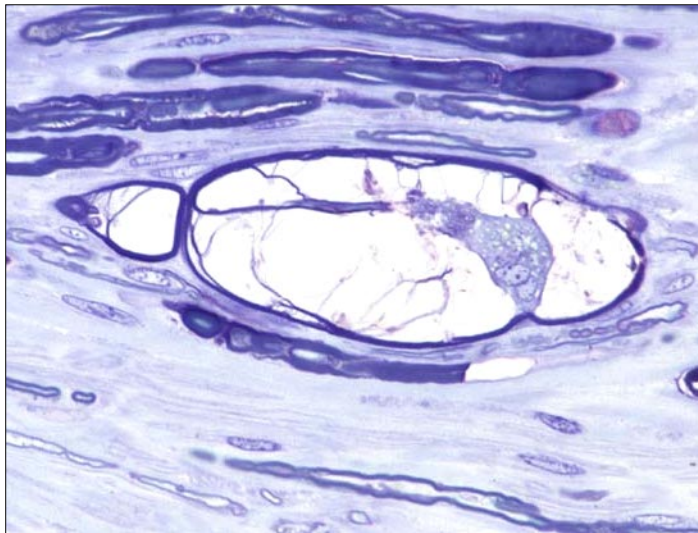


Abb. 57: zystisches Myelinscheidenödem mit intratubärer Makrophage (875fache Vergr.)

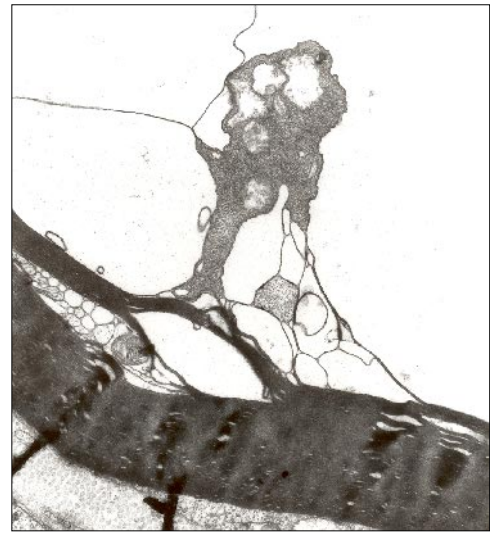


Abb. 58: mit atrophischem Axon (13450fache Vergr.)

Häufig aber zeigen sich bei Neuropathien demyelinisierende und axonale Prozesse in ihrer pathomorphologischen Ausprägung von Beginn an gleich stark. In diesem Fall spricht man von einer **primär gemischten Neuropathie**. Ein gutes Beispiel aus der Kasuistikreihe ist ein Bobtail mit gemischter Polyneuropathie (VK4). Digestionskammern, zystische Myelinscheidenerweiterungen, Myelinovoide, Tomakula und komplett demyelinisierte Abschnitte zeigten sich ebenso wie fortgeschrittene Stadien der Wallerschen Degeneration und Myelinscheideneinfaltungen großkalibriger Fasern. Bereits die Spontanaktivität, die deutlich reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit und Veränderungen der Muskelsummenaktionspotentiale in der elektrodiagnostischen Untersuchung ließen massive Veränderungen beider neuroparenchymatöser Komponenten vermuten. Die Hochgradigkeit der Schädigung sowohl an den Myelinscheiden als auch an den Axonen konnten durch die nachfolgende pathomorphologische Untersuchung belegt werden.



Abb. 59: primärer Myelinscheidenzerfall neben Wallerscher Degeneration Stadium III (560fache Vergr.)

Das Auftreten von Dysfunktionen des peripheren Nervens wird in der Tiermedizin nach wie vor in Häufigkeit und Relevanz unterschätzt. Mit Hilfe der klinisch-neurologischen Untersuchung kann beispielsweise die Aussage getroffen werden, ob eine Erkrankung des unteren motorischen Neurons vorliegt. Anhand elektrodiagnostischer Untersuchungen kann dies verifiziert, und eine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit sie sich auf die Innervation des Endorgans Muskel auswirkt. Mitunter ist auch eine Zuordnung in axonale und demyelinisierende Erkrankungen möglich. Allerdings ist hier der Graubereich relativ groß und eine große Erfahrung des Untersuchers ist Voraussetzung für die konkrete Diagnose. Eine eindeutige Zuordnung ist oft erst auf Grund pathomorphologischer Befunde möglich. Diese ist von prognostischer Relevanz, da primär demyelinisierende Neuropathien prinzipiell eine bessere Prognose haben als axonale. Darüberhinaus kann nur anhand von Nervenbiopsien die regenerationsfähige Kapazität bei lediglich einmaliger Untersuchung festgestellt werden (60). Dabei ist die Beurteilung von gezupften Einzelfaserpräparaten nicht nur als hilfreich, sondern als unerlässlich anzusehen. Zur ätiopathogenetischen Diagnosefindung ist die alleinige Beurteilung von gezupften Nervenfasern allerdings meist nicht ausreichend. Daher bietet die Kombination von Teasingpräparation und histologischen Schnitten eine optimale Möglichkeit zur standardmäßigen pathomorphologischen Aufarbeitung peripherer Neuropathien.

## V ZUSAMMENFASSUNG

In der Tiermedizin bietet die Nervenbiopsie bei der Diagnostik peripherer Neuropathien eine sinnvolle Ergänzung zu klinisch-elektrodiagnostischen Untersuchungen. Hierbei können neben Licht- und Elektronenmikroskopie insbesondere Nervenzupfpräparate einen wertvollen Beitrag leisten. Nur sie ermöglichen myelinisierte Fasern in ihrem Verlauf zu beurteilen und pathologische Veränderungen in ihrem Ausmaß entlang der Nervenfasern darzustellen. Darüberhinaus lässt sich hier die regenerationsfähige Kapazität myelinisierter Fasern am eindeutigsten erfassen.

Voraussetzung zur Beurteilung von Nervengewebsproben ist einerseits die Kenntnis über pathomorphologische Veränderungen. Andererseits dürfen aber auch fixierungsbedingte und autolytische Phänomene nicht unterschätzt werden, da diese nicht nur die Diagnostik erschweren, sondern auch zu Fehlinterpretationen führen können. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es daher, artifizielle und autolytische Veränderungen in ihrer Reinform darzustellen. Anhand von etwa 51300 Einzelfasern aus 171 Proben konnten durch unterschiedliche Fixierprotokolle Über- und Unterfixierungsphänomene aufgezeigt werden. Übereinstimmend mit der Literatur kann für eine möglichst artefaktfreie Darstellung ein Fixiermodus von 1 bis 2 Stunden in 2,5%igem Glutaraldehyd empfohlen werden. Darüberhinaus wurde deutlich, dass autolytische Veränderungen bereits nach 1 bis 2 Stunden post mortem in geringem Maße auftreten können, und die Beurteilung von Nervenbiopsien nach 3 bis 4 Tagen aufgrund hochgradiger Myelinscheidendesintegrationen kaum mehr möglich ist.

Anhand der Erkenntnisse, die innerhalb dieser Versuchsreihen gewonnen wurden, gekoppelt mit pathologischen Phänomenen, die im Rahmen einer Fallstudie an etwa 17000 Einzelfasern von 57 Proben beobachtet wurden, konnte ein Erfassungsschema erstellt werden, das eine objektive Beurteilung gezupfter Nervenfasern ermöglicht. Zudem wurden beispielhaft klinische Erscheinungsbilder einiger dieser Kasuistikfälle mit ihren neuropathologischen Befunden korreliert.

Um die Trennbarkeit von Fasern bei der Herstellung von Teasingpräparaten zu verbessern, wurde der Einsatz von kollagenolytisch wirkenden Substanzen an etwa 15700 Einzelfasern von 72 Proben nach verschiedenen Protokollen untersucht. Dabei erwies sich eine 1-stündige Inkubation bereits fixierter Nerven in Kollagenase als sehr empfehlenswert. Dieses Erkenntnis ist besonders hilfreich im Hinblick auf eingesandte Nervenbiopsien, die häufig überfixiert sind.



Der ebenfalls kollagenolytisch wirkende Glycinpuffer kann hierzu nicht empfohlen werden. Allerdings kristallisierte sich in den Versuchsreihen heraus, dass bei unfixierten Nervenproben ein kurzes Schwenken in Glycinpuffer die Feinpräparation zur Entfernung bindegewebiger Anteile erleichtert.

Mitunter kann auch die geringe Probenmenge bei Einsendungen der limitierende Faktor für die Diagnostik sein. Mit Hilfe von *post-teasing*-licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen kann diesem Problem jedoch erfolgreich entgegengetreten werden. Neben neuroparenchymatösen Komponenten konnten auch interstitielle Anteile dargestellt werden und eine gezielte licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung auffälliger Strukturen innerhalb der gezupften Fasern war möglich.

Um die diagnostische Aussagekraft zu erweitern, wurden Verfahren zur selektiven Darstellung neuroparenchymatöser Komponenten an gezupften Einzelfasern etabliert. Mit Hilfe des Fluorochroms 5,5'-Diphenyl-9-ethyl-oxacarbo cyanin war in Abhängigkeit von der Vorbehandlung sowohl eine Myelinscheiden- als auch als auch eine Axondarstellung möglich. Immunhistochemisch fand im Sinne einer *whole-mount*-Methode ein Antikörper gegen Neurofilamente Anwendung, wobei nur mit einer initialen Fixierung in Paraformaldehyd eine adäquate und regelmäßige Axonmarkierung entlang der Fasern zu erreichen war, so dass die fluorochromatische Axondarstellung vergleichsweise effizienter ist.

## VI SUMMARY

### NERVE FIBER TEASING AS A DIAGNOSTIC AID IN DETECTION OF PERIPHERAL NEUROPATHIES – METHODOLOGY AND INTERPRETATION

Nerve biopsies are widely used for the investigation of peripheral neuropathies in man and animals in addition to clinical and electrodiagnostic evaluation . Besides light- and electron microscopy, single nerve fiber teasing provides a convincing method in the approach of a correct diagnosis. It is the only practicable method for inspection of myelinated fibers along their path. Moreover, teasing preparates are most indicative for the regenerative capabilities of myelinated fibers.

Besides knowledge of pathomorphological alterations, the investigator needs some experience in identifying artefacts and autolytic changes since they can look very alike and, thus, may lead to misdiagnosis. Therefore, it was the aim of this study to provoke pure artificial and autolytic changes in peripheral nerves. For evaluating divergent fixation-protocols, 171 samples were taken to prepare about 51300 single teased fibers. Like this, phenomena of delayed fixation as well as of hyperfixation could be described. To avoid artefacts, we recommend a fixation in 2,5% glutaraldehyde for 1 to 2 hours. Minor autolytic changes could already be observed 1 to 2 hours post mortem. Interpretation became nearly impossible due to desintegration of the myelin sheath after 3 to 4 days .

Those results, together with the samples of 57 selected cases (17000 single teased fibers) enabled to establish a list of phenomena seen with pathology, artefacts or autolysis. This categorization substantially increases objective diagnosis when evaluating teased fibers.

Additionally, clinical signs were correlated with their neuropathological findings.

In order to improve the separation of nerve fibers, the value of collagenolytic agents was investigated. About 15700 single fibers from 72 samples were slided. Teasing of samples that had already been fixed could be improved by incubation in collagenase for 1 hour. These findings proved very helpful for investigating referred biopsies which often arrive in a hyperfixed state. Collagenolytic glycin buffering is not advisable in this case, although it did facilitate the removal of the connective tissue of unfixed nerves, when samples were bathed in it.

Moreover the often sparse amount of biopsied material can be the limiting factor of diagnosis. Therefore, post-teasing-light and electron microscopy is a useful approach. Even interstitial

components can be visualized, and treatment allows for a correlation of suspicious regions within teased fibers with cross-section investigations.

To widen the diagnostic range different methods to stain single components of teased fibers were evaluated. The thus established labelling of myelin sheathing or of the axon, respectively, by different staining protocols for the fluorochrome 5,5'-diphenyl-9-ethyl-oxacarbo-cyanine is helpful. This procedure for axonal investigation proved superior to whole-mount-immunohistochemical approaches as only established the paraformaldehyde fixation allowed for a selective staining of neurofilaments along the entire axon.

## VII Anhang

### 1 UNTERSUCHUNGSPROTOKOLLE DER KASUISTIK

#### VK1

Teasing: hochgradige Einfaltung der Myelinscheide im Bereich der Paranodien, sowie hochgradig gefältelte Außenkontur über die gesamten Segmente in allen großkalibrigen, stark myelinisierten Fasern; einzelne Wallersche Degenerationen der Stadien I-III.

DPED-Teasing: hochgradige multifokale Aufblätterung der SLK's, hochgradige allgemeine Myelinscheidenauf- und einfaltung, unter besonderer Bevorzugung der Paranodien.

Semidünnschnitt: multifokale Einfaltungen der Myelinscheide, bevorzugt paranodal, mit intussuszeptionsartigen Einstülpungen und atrophischem, hochgradig kondensiertem axonalen Innenkörper.

#### VK2

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig, hohe Rigidität.

Teasing: Anzeichen für Fibrose; zahlreiche Makrophagen in Knotenbereichen; eine knopfartige MS-Erweiterung mit intratubär liegender Makrophage; segmentaler Myelinscheidenzerfall, abschnittsweise mit Weitung der Myelinscheide und hochgradiger Akkumulation von Myelindebris mit zahlreichen extra- und intratubär sichtbaren Makrophagen; multiple anisometrische Paranodien; multifokale paranodale, meist unilateral beginnende Demyelinisierung mit Myelinscheidenaufblätterung; zapfenartige Einfaltung der MS Richtung Axon; MS wirkt mitunter kollabiert - oftmals nur schmaler Spalt für Axonverlauf; einige Fasern mit Myelin-Outpouchings; einige demyelinisierte Segmente in einer von Outpouchings betroffenen Faser; zahlreiche Tomacula in einer großkalibrigen Faser.

Schnellschnitt: mittelgradiger Einbettungsartefakt; mittelgradige allgemeine Doppelringbildung; einzelne Myelinscheidenprotrusionen nach adaxonal; in einzelnen Faszikeln zahlreiche hypomyelinisierte großkalibrige Fasern und vakuolisierte Paranodien; zahlreiche intratubäre Makrophagen.

#### VK3

a)N. fibularis:

Teasing: Anzahl strukturloser Fasern sehr hoch; Myelinscheide para- und internodal vielfach blasig-ödematös aufgetrieben; multiple Digestionskammern; erhaltene Fasern hypomyelinisiert; viele intra-

und extratubäre Makrophagen mit Myelindebris, sowie Myelindebris in Schwannzellen; vereinzelt Wallersche Degenerationen Stadium II-IV.

Semidünnschnitt: allgemeine deutliche Hypomyelinisierung von Nervenfasern mit deutlichem Zirkularitätsverlust; vereinzelt Phagozyten.

b) N. tibialis:

Teasing: Myelinscheiden vielfach ödematös aufgetrieben, zum Teil mit kammerartiger Liquifizierung des Myelins; multiple Digestionskammern; vielfach interkalierende Internodien; einige Wallersche Degenerationen Stadium I-III.

Semidünnschnitt: geringgradige endoneurale Fibrose; deutliche Myelinscheidenaufblätterung mit Auseinanderdrängung der Lamellen bei zum Teil atrophischen Axonen; ansonsten wie N. fibularis.

c) N. ulnaris:

Teasing: multisegmentale Myelinscheideneinfaltungen; mitunter interkalierende Internodien;

Semidünnschnitt: wie N. fibularis

#### **VK4**

a) N. ischiadicus proximal:

Teasing: Vielfach zystische Myelinscheidenaufreibungen und Digestionskammern; mitunter Myelinovoide; gehäuft Wallersche Degenerationen Stadium II-III; vereinzelt interkalierende Internodien; vermehrt Philips-Typ-I Schnürringe.

Semidünnschnitt: hochgradiges subperineurales und geringgradiges endoneurales Ödem; vereinzelt endoneurales Ceroid; allgemeiner hochgradiger Verlust myelinisierter Nervenfasern; vereinzelt zystische Myelinscheidenerweiterungen mit atrophischem Axon; großkalibrige Fasern häufig mit Aufblätterung der Myelinscheide; vermehrt Myelindebris und Myelinkörperchen in Schwannzellen; vielfach Makrophagen mit Myelindebris; vereinzelt hypertrophe Mastzellen

b) N. ischiadicus distal:

Teasing und Semidünnschnitt: wie proximal, aber noch geringgradig stärker ausgeprägte Pathologie; vereinzelt *fading fibers* im Teasing

c) N. fibularis:

Teasing: Gering- bis mittelgradiger primärer Myelinscheidenzerfall mit Ovoiden; mitunter deutliche Digestionskammern; Vereinzelt Tomakula mit angrenzenden stark demyelinisierten Bereichen; gehäuft Wallersche Degenerationen Stadium III; vereinzelt *fading fibers*; vorwiegend Philips-Typ-I Schnürringe.

Semidünnschnitt: ähnlich dem N. ischiadicus, insgesamt etwas weniger pathologische Veränderungen.

## d) N. tibialis:

Teasing: allgemeine Hypomyelinisierung vor allem dünnkalibriger Fasern; vielfach demyelinisierte Abschnitte mit angrenzender zum Teil zystisch aufgetriebener Myelinscheide, Digestionskammern oder tomakulären Veränderungen; gehäuft Wallersche Degenerationen Grad III; Myelinscheidenaußenkontur großkalibriger Fasern gefältelt; gehäuft Myelindebris in Schwannzellen und Makrophagen; vereinzelte *fading fibers*.

Semidünnschnitt: geringgradiges subperineurales und endoneurales Ödem; allgemeine Hypomyelinisierung aller Faserkaliber.

## e) N. ulnaris:

Teasing: wie N. ischiadicus prox.; vereinzelt interkalierende Internodien.

Semidünnschnitt: generalisierte Hypomyelinisierung aller Fasern, z.T. mit hyperplastischen Schwannzellen, vielfach Zirkularitätsverlust und kondensiert wirkende Axone.

**VK42**

Teasing: Myelin insgesamt aufgedunsen, Außenlinie der Myelinscheide unregelmäßig; paranodaler, meist symmetrischer Verlust an Osmiophilie; mehrfach hypomyelinisierte dünne Nervenfasern; einzelne Wallersche Degenerationen (ca. 5 von 300); einzelne demyelinisierende Fasern mit intratubären Makrophagen.

Semidünnschnitt: geringgradig vermehrte Extrazellulärmatrix (ECM) im Endoneurium; einzelne hypomyelinisierte Fasern; allgemeine Auflockerung des nicht-kompaktierten Myelins, in den Paranodien wollknäuelartig; gehäuft geschrumpfte azurophile Axone in aufgetriebenen Fasern.

**VK43**

Teasing: mittelgradig arrodierte, z.T. vakuolisiert erscheinende Myelinscheiden; 1 mittelgradige, symmetrische kolbenartige Myelinscheidenschwellung; 1 exzentrisches internodales osmiophiles Ovoid.

Semidünnschnitt: Perineurium geringgradig aufgequollen; geringgradige Wandverdickung der kleinen endoneuralen Arterien; multifokale Aufblätterung des nicht-kompaktierten Myelins mit besonderer Betonung der Paranodien; mitunter hochgradige Vakuolisierung der Myelinscheide.

**VK35**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schlecht, da Einzelfasern schwer zu trennen

Teasing: Myelinscheidendicke und Gesamtdicke der Nervenfasern innerhalb einzelner Fasern stark variierend mit Auflösungserscheinungen; Myelinscheidenaußenkontur unregelmäßig; 1 Wallersche Degeneration bei 300 Fasern; einzelne distrahierte Knoten, Paranodien mitunter knopfförmig.

Semidünnschnitt: geringgradige interlamelläre Fibrosierung des Perineuriums; subperineurale Verquellung mit polymorphkernigen Zellen und Mastzellen; gering- bis mittelgradige Fibrosierung des Endoneuriums mit Mastzellen; insgesamt wenig myelinisierte Fasern; Zirkularitätsverlust myelinisierter Nervenfasern; Myelinscheide teilweise aufgeblättert; Schwanzzell- und Endothelzellkaryolyse.

**VK36**

Teasing: starke Längsfaltung der Myelinscheiden; übermäßiges Vorkommen von Phillips Typ I Schnürringen bei gelegentlicher Nodiendistraktion; in einigen Fasern Wallersche Degeneration Stadium I; einzelne hypomyelinisierte Fasern und Fasersegmente.

Semidünnschnitt: Hochgradiger Zirkularitätsverlust markhaltiger Fasern ; kondensierte axonale Innenkörper.

Elektronenmikroskopie: Bestätigung der lichtmikroskopischen Befunde.

**VK37**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwer zu teasen.

Teasing: unruhige Myelinscheidenkontur; vereinzelt aufgehellte Paranodien; gehäuft verstärkte Zeichnung der SLKs (proglottidenartig); multifokale Demyelinisierungsprozesse, z.T. mit floridem Myelinabbau und Digestionskammern; Remyelinisierungserscheinungen mit interkalierenden Internodien; geringgradige allgemeine Hypomyelinisierung; vereinzelt *fading fibers*; gehäuftes Auftreten von Phillips Typ I Schnürringen, vor allem in den dünneren Fasern; vereinzelt Wallersche Degenerationen (5 von 300 Fasern).

Semidünnschnitt: Perineurium geringgradig aufgequollen; mittelgradiger allgemeiner Zirkularitätsverlust markhaltiger Fasern; geringgradige allgemeine Hypomyelinisierung; diffus vermehrte Doppelringbildung (im Querschnitt) mit Weitung und homogener oder scholliger Matrix; intratubäre Myelindebris in einzelnen Fasern; internodäre Myelinscheideneinfaltungen mit exzentrischen Axonverdrängungen (Längsschnitt); einzelne zystische Myelinscheidenerweiterungen.

**VK38**

Teasing: allgemein stark aufgeraute Einzelfaserkonturen; zahlreiche inter- und paranodale, knotige bis manschettenartige, in der Regel osmiumdichte Myelinscheidenverdickungen; oligofokal paranodale Demyelinisierung und interkalierende Internodien; in einzelnen Fasern blasige Myelinscheidenveränderungen mit intratubärer Myelindebris und Phagozytenakkumulation.

Semidünnschnitt: hochgradiges subperineurales Ödem; geringgradige fokale Fibroblastenvermehrung; geringgradige Zunahme der extrazellulären Matrix; geringgradige diffuse mononukleäre Infiltrate; hochgradige Hypomyelinisierung aller Faserkaliber; mittelgradiger, multifokaler Zirkularitätsverlust; multifokale intratubäre Myelindebris, zum Teil mit Neutralfetttröpfchen, unter Erhalt der äußersten Myelinlamellen; einzelne regeneratorsche (Sprouting) Cluster; im Längsschnitt multifokale Myelinauffaltungen mit Dickenzunahme und exzentrischem Axon.

**VK39**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwer zu teasen.

Teasing: Myelin häufig aufgetrieben; mitunter Digestionskammern; hochgradige paranodale, mitunter auch segmentale Demyelinisierung; in etwa 10% der Fasern Wallersche Degenerationen Stadium III-IV; allgemeine Hypomyelinisierung vor allem kleiner Fasern; einige *fading fibers*.

Semidünnschnitt: mittelgradiger allgemeiner Zirkularitätsverlust; hochgradige diffuse allgemeine Hypomyelinisierung; diffuse, verstärkte Doppelringbildung (Querschnitt); intratubäre Myelindebris in zahlreichen Fasern mit Makrophagenanhäufungen; multifokal-internodäre Myelinscheideneinfaltungen und -verdickungen mit exzentrischer Axonverdrängung; multifokale interlamelläre Spaltenbildung mit teilweise hochgradiger Abhebung; vereinzelt Wallersche Degeneration Stadien III-IV.

**VK40**

Teasing: Myelinscheidenkontur unruhig; dünne Fasern vielfach hypomyelinisiert; teils segmentale Dispersion des Myelins mit zusammengeschobenem, scholligem Myelin in angrenzenden Bereichen; zahlreiche große Myelinkugeln innerhalb des Schwannzellzytoplasmas eines gesamten Segments; zahlreiche, meist symmetrische paranodale Aufhellungen.

Semidünnschnitt: Myelinscheiden aller Fasern hochgradig zopf- (längs) bzw. wollknäuelartig (quer) interlamellär aufgelockert; multifokal schollige Einschlüsse im Schwannzellzytoplasma; vereinzelt bis gehäuft Einfaltungen bzw. Invaginationen großkalibriger Fasern ohne erkennbaren Axoninnenkörper, oder mit kleinem kondensiertem Rest.



**VK41**

Teasing: insgesamt reduzierte Osmiophilie; Faserkaliber im Verlauf oft ungleichmäßig; multifokale, multisegmentale Hypomyelinisierungen vor allem der mittleren Faserstärken; hohe Frequenz an Wurstkettenformationen; oligosegmentale grobschollige Myelinscheidenaufreibung mit einzelnen, benachbarten interkalierenden Internodien; multifokale osmionegative, gelbliche Debris innerhalb der zerfallenden Myelinscheiden; einzelne bullöse Myelinscheidenaufreibungen mit osmionegativem, gelblichen, amorphen Inhalt.

Semidünnschnitt: mittelgradige Abnahme der Dichte an myelinisierten, in erster Linie großkalibrigen Fasern; bilateral symmetrische, blasige, paranodale Myelinscheidenerweiterung; multiple, unilaterale, paranodale Kolben; multifokal geringgradige Myelinscheideneinstülpungen; mittelgradige Hypomyelinisierung aller Faserkaliber; einzelne zystisch-erweiterte Myelinscheiden.

**VK44**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwer zu teasen, Fasern mitunter rigide.

Teasing: mittelgradige Ein- und Auffaltung der Myelinscheide großkalibriger Fasern; multifokaler Verlust an Osmiophilie in den äußeren Myelinschichten, ausgehend von den Paranodien und dem mittel-internodalen Schwanzzellzytoplasma; multiple segmentierte kleinkalibrige Fasern; multifokale Demyelinisierungserscheinungen in großen Fasern; multiple osmiumdichte Ovoide in den Paranodien und, in geringem Ausmaß, in den Internodien einzelner benachbarter großkalibriger Fasern; einzelne Foci mit Myelindebris; multiple wollknäuelartige paranodale Veränderungen.

**VK46**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwer zu teasen, Fasern fragil.

a) Nervus radialis:

Teasing: : in besser erhaltenen Fasern ungleichmäßige Außenkontur und kolbenförmige Paranodien; Längsfaltung der Myelinscheide sowie multisegmentale Demyelinisierung; in den meisten Nervenfasern Wallersche Degeneration Stadien II-IV mit sekundärem Myelinscheidenzerfall und Phagozytose durch Schwanzzellen und intra- und extratubären Makrophagen.

DPED-Teasing: hochgradige Myelinfragmentierung, zum Teil mit Digestionskammern und axonalen Bruchstücken.

Semidünnschnitt: mehrere Ebenen: Ödematisierung des Perineuriums mit Auseinanderdrängen der Lamellen; geringgradiges subperineurales Ödem; hochgradige Infiltration des Endoneuriums durch aktivierte Makrophagen mit resorbierten Myelinfragmenten und Neutralfetttröpfchen. Geringgradiger,

allgemeiner, nach distal verstärkter Faserverlust bei insgesamt mittel- bis hochgradiger Abnahme an Durchmesser und Zirkularität; gehäuft Anzeichen für axonale Atrophie sowie axonale und Myelindebris mit zahlreichen resorptiv-aktiven Makrophagen und autophagischen Einschlüssen innerhalb des Schwanzzellzytoplasmas; zahlreiche, diffus verstreute hypomyelinisierte Fasern kleinen bis mittleren Axondurchmessers.

b) Nervus radialis superficialis:

Teasing und DPED-Teasing und Semidünnschnitt: Veränderungen wie Nervus radialis, ebenfalls distal verstärkt, bei wesentlich stärkerem Faserverlust und kaum noch erhaltenen Axonen, sowie einer deutlichen stärkeren Makrophageninfiltration.

#### **VK 47**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwer teasbar; Einzelfasern fragil.

Teasing: hochgradiger allgemeiner Myelinscheidenzerfall ohne auto- oder heterophagische Aktivitäten; hierbei nur noch innerste Umscheidung des axonalen Tubus osmiophil; symmetrische Paranodienaufhellung in einer Vielzahl von Fasern unterschiedlichen Kalibers.

Semidünnschnitt: hochgradige Myelinscheidendesintegration bei multifokalem Axoplasmaustritt.

#### **VK48**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig.

Teasing: Scheinbare Querfrakturierung / Wurstkettenbildung infolge Hydrops des Schwanzzellzytoplasmas in den nicht kompaktierten Bereichen der Myelinscheide; einzelne de- und remyelinisierende Segmente bei hoher SLK-Frequenz; 1x Wallersche Degeneration Stadium III bei 300 Fasern.

Semidünnschnitt: hochgradige Wollknäuelbildung und multiple Zielscheibenformationen.

#### **VK17**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig.

Teasing: hochgradige allgemeine internodale Längsfaltung.

Semidünnschnitt: hochgradiger allgemeiner Zirkularitätsverlust (Querschnitt) bzw. deutliche Längsfaltung aller Fasern (Längsschnitt), ohne die Ausbildung von Zytoplasmataschen.

Elektronenmikroskopie: Bestätigung der Befunde im Semidünnschnitt; zahlreiche Kollagentaschen und leere Schwanzzelluntereinheiten; zahlreiche intraaxonale, elektronendichte, z.T. multivesikuläre Einschlüsse in den Remakfasern; geringgradig erhöhte Neurofilamentdichte.

### **VK22**

Teasing: geringgradige Leopardentüpfelung; wenige demyelinisierte Fasern; einzelne interkalierende Internodien; extreme Einfaltung der SLK's; Wurstkettbildungen und vereinzelt hyalin wirkende Fasern; mitunter undulierende, blasige Axone; wenige WD.

Semidünnschnitt: Leopardentüpfelung; allgemein Fasern mit dünner Myelinscheide; Hofbildung innerhalb des Schwanzzellzytoplasmas; SLK's extrem deutlich dargestellt; Tendenz zur Wollknäuelbildung.

### **VK23**

Teasing: Undulierender, blasiger Axondurchmesser (vermutl. *beading*) einzelner Fasern;

Semidünnschnitte: o.b.B.

### **VV7**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig zu teasing; Einzelfasern schlecht trennbar.

Teasing: ovoider Myelinscheidenzerfall mit Vakuolisierung von Myelinresten; Schwanzzellhyperplasie

Semidünnschnitt: Allgemeine Hypomyelinisierung von Fasern mit Schwanzzellhyperplasie; hochgradiger Faseruntergang mit geringgradiger endoneuraler Fibrose; Mastzellularinfiltrate und Makrophagen, die zum Teil Einschlüsse enthalten.

### **VK13**

Teasing: N. fibularis: multifokal remyelinisierende Internodien; einzelne interkalierende Internodien; einzelne paranodale Verdickungen.

N. ulnaris: multiple interkalierende Internodien; einzelne paranodale Verdickungen.

Semidünnschnitte: o.b.B.

**VK16 a-e**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schlecht zu teasen.

Teasing: multiple großkalibrige Fasern mit Wallerscher Degeneration der Stadien II-IV mit zum Teil sehr großen Myelinovoiden.

Fluorochromteasing: unauffällig.

Schnittpräparate: siehe Teasingbefund; in den Ovoiden granuläre Myelindebris nachweisbar.

**VK50**

Teasing: zahlreiche hypomyelinisierte Fasern aller Kaliber; einzelne Fasern multisegmental demyelinisiert; Längsfaltung der Myelinscheide in zahlreichen, vor allem mittelkalibrigen Fasern; zahlreiche große osmiophile Einschlüsse im abaxonalen Schwanzzellzytoplasma mit Einstülpung der Myelinscheide (internodal und paranodal), daneben granuläre nicht-osmiophile Einschlüsse im perinukleären Schwanzzellzytoplasma.

Semidünnschnitt: in vereinzelt Faszikeln Zunahme der Perineuralzellagen; einzelne subperineurale Renaut-Körperchen; geringgradige, herdförmige, endoneurale Fibrose; große stark myelinisierte Fasern überwiegen; osmiophile Einschlüsse im abaxonalen Schwanzzellzytoplasma; geringgradige Hypertrophie des angeschnittenen Schwanzzellzytoplasmas; vereinzelt mononukleäre Zellen innerhalb des Endoneuriums; im Querschnitt oligofokale, asymmetrische Myelinscheidenauflösung.

**VK51**

Teasing: multiple, noduläre, inter- und paranodale Myelinscheidenverdickungen bis hin zu Tomakula bzw. Globoiden; multiple, osmiophile, überwiegend runde Einschlüsse im abaxonalen Schwanzzellzytoplasma; in den Tomakula zum Teil dichte, granuläre Strukturen erkennbar, vereinzelt Myelindebris mit Resorption, vereinzelt auch interlamelläre Aufblätterung der Myelinscheide; zahlreiche hypomyelinisierte Bereiche im Anschluss an Tomakula; in zahlreichen Fasern adaxonales Ödem; multiple Fasern mit ovoidartiger Myelinscheidenfragmentation.

Semidünnschnitt: multifokales endoneurales Ödem; 2 große, endoneurale Renaut-Körperchen; einige Fasern mit interlamellärem Myelinscheidenödem; multiple hypomyelinisierte Fasern; granuläres Material in SLK's und Paranodien; zahlreiche Myelinzwiebeln; dichte, azurophile, meist runde Einschlüsse im abaxonalen Schwanzzellzytoplasma; multiple Zielscheibenformationen.

**VK52**

Teasing: multifokale Myelinscheidenaufquellung; Vakuolisierung der SLK's; staubige Myelindispersion (Artefakt); multifokale Myelinscheideneinfaltungen; zahlreiche osmiophile Granula im abaxonalen Schwannzellzytoplasma; Paranodien häufig betont unilateral aufgeheilt; 2 aus 300 Fasern: Wallersche Degenerationen Grad II; einzelne interkalierende Internodien, zum Teil mit Fortsetzung in segmentale Hypomyelinisierung; zahlreiche hypomyelinisierte Fasern, vor allem mittleren und dünnen Kalibers.

Semidünnschnitt: Epineurium: fibröses Bindegewebe; Endoneurium: Vermehrung der extrazellulären Matrix im Interstitium; zahlreiche Fasern aller Kaliber seitlich abgeplattet; mittelgradige Myelinscheidenaufblätterungen; große Fasern normal myelinisiert mit geringgradiger Myelinscheidenverquellung; ca. 50% der mittel- und kleinkalibrigen Fasern hypomyelinisiert; multifokale Myelinscheideneinfaltungen; knopfförmige Einstülpung des Schwannzellzytoplasmas nach adaxonal.

**VK53**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig.

Teasing: Färbung gut, etwas kontrastarm; mehrere Fasern längsgefaltet; Hypomyelinisierung mehrerer groß-, und einiger klein- und einer mittelkalibrigen Faser; zahlreiche osmiophile Einschlüsse im abaxonalen Schwannzell-Kompartiment.

Semidünnschnitt: geringgradige fokale Zunahme der extrazellulären Matrix im Endoneurium; allgemeiner Zirkularitätsverlust und viele Auffaltungen der Myelinscheide; zahlreiche mittelkalibrige Fasern hypomyelinisiert; einzelne Nervenfaserncluster; einige demyelinisierte Fasern; eine Wallersche Degeneration Stadium III.

**VK54**

Teasing: Hypomyelinisierung sowie Segmentierung vieler klein- und mittelkalibriger Fasern; Hypomyelinisierung einiger großkalibriger Fasern; noduläre Myelinscheidenzubildung mit exzentrisch verlaufendem Axon in einer großen Nervenfasern.

Semidünnschnitt: geringgradige Zunahme der extrazellulären Matrix im Endoneurium; einige großkalibrige sowie der überwiegende Teil der mittelkalibrigen Fasern hypomyelinisiert; Anzahl der Doppelringbildungen mittelgradig erhöht; in einigen Fasern granulärer Myelinscheidenzerfall; vereinzelte Cluster mit myelinisierten Fasern; interlamelläres Myelinscheidenödem in einzelnen Fasern.

**VK57**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig.

Teasing: multifokale Nodiendistraktion; multiple interkalierende Internodien; multifokale Segmentierung der Myelinscheide in den SLK's; ungleichmäßige Myelinscheidenaufreibungen in einer Vielzahl überwiegend großkalibriger Fasern; multiple Wallersche Degenerationen Stadium III; zahlreiche leere Schwannzellschläuche mit intratubären mononukleären Zellen; multifokale endoneurale mononukleäre Zellinfiltrate.

Semidünnschnitt: einzelne großkalibrige Fasern hypomyelinisiert; einzelne Wallersche Degenerationen Stadium III.

**VK58**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig, Fasern rigide und schlecht zu fassen

Teasing: starke autolytische Veränderungen mit Herauslösen der äußeren Myelinschichten an mehreren Fasern; in einzelnen Fasern Myelindebris über mehrere Segmente; einzelne hypomyelinisierte Fasern; in einer mittelkalibrigen Faser ein einzelnes Tomakulum über etwa vier SLK's hinweg mit längsorientierter osmiophiler Masse; in einer weiteren Faser großknotige internodale Tomakula mit Abschnürung und einem nicht weiter zu differenzierenden gräulichen Innenkörper; eine Faser mit intratubären Makrophagen und lobulärem Myelinscheidenzerfall; eine Wallersche Degeneration Stadium IV in 300 Fasern.

Semidünnschnitt: geringgradige endoneurale Fibrose; einzelne Fasern mit Myelindebris und autophagischen Vakuolen, eine davon mit intratubären Makrophagen; Axonoplasmaustritt mit Erweiterung der Faser ; multiple Myelinaufblätterungen im Querschnitt.

**VK 59**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig.

Teasing: zahlreiche, runde, osmiophile Einschlüsse im abaxonalen Schwannzellzytoplasma; multisegmentale Hypomyelinisierung in zahlreichen groß- und mittelkalibrigen Fasern; noduläre, internodale Myelinscheidenverdickung mit zugrundeliegender Myelinscheideneinfaltung; multiple, meist asymmetrische Verdickung der Paranodien; zahlreiche interkalierende De- und Remyelinisierungen; tomakuläre Bereiche mit hochgradigem, adaxonalem, evtl. auch interlamellärem Myelinscheidenödem; multiple Globoide mit Myelinscheidendopplung/*redundant loops*; in den gleichen Fasern Myelinscheidenaufblätterung; einige Wallersche Degenerationen Stadium II und IV; zahlreiche Fasern mit rauer Myelinscheidenstruktur bis hin zu einer Segmentierung über die ganze Länge.

Semidünnschnitt: geringgradige bakterielle Probenkontamination; mittelgradige, hypozelluläre, endoneurale Fibrose; ein großer endoneuraler Fibroseherd, evtl. ausgereiftes Renaut-Körperchen; mittelgradige Leopardentüpfelung der Myelinscheide; Faserdichte wirkt geringgradig reduziert; ein Axon mit granulärem Zerfall; mehrere mittelgroße, hypomyelinisierte Fasern (ca. 1 von 4); geringgradig vermehrte Doppelringbildungen; granuläre Zubildungen im nicht-kompaktierten Myelin; einzelne, ceroidbeladene Phagozyten.

### **VK61**

Teasing: hochgradige noppenartige Außenkontur und Längsfältelung in allen stark myelinisierten Fasern; einige Myelineinschlüsse im abaxonalen, teilweise auch im perinukleären Schwanzzellzytoplasma; zahlreiche paranodale Verdickungen infolge von Myelinscheideneinfaltungen; einige paranodale Demyelinisierungen bis hin zu interkalierenden Internodien; in zwei Fasern multisegmentale Demyelinisierung; einzelnes Tomakulum in einer mittelkalibrigen Faser.

Semidünnschnitt: geringgradig vermehrte Rundzellinfiltration (1/Blickfeld) im Endoneurium; einzelne mittelkalibrige Fasern hypomyelinisiert; einzelne Cluster; in einer Faser intratubäre Myelindebris und Makrophagen.

### **VK62**

Teasing: zahlreiche hypomyelinisierte Segmente; demyelinisierte Segmente häufig mit umliegenden Hanken-Büngnerschen Leitbändern; multiple paranodale Demyelinisierungen; über weite Strecken Herauslösung des Myelins; zahlreiche Tomakula - auch in kleinkalibrigen Fasern - häufig mit fädiger Innenstruktur; sowohl interstitiell als auch intratubär zahlreiche Makropagen; zahlreiche Varikositäten in mittelkalibrigen Fasern.

Semidünnschnitt: geringgradiges subperineurales Ödem; endoneurales Ödem mit diffuser endoneuraler Vakuolisierung; einzelne mononukleäre Zellen, stabkernige neutrophile Granulozyten und Makrophagen mit Myelindebris; Faserdichte verdachtsweise reduziert, intakte Fasern <5%; >50% der großkalibrigen Fasern mit abaxonaler Schrumpfung und verwaschener Myelinscheidenverdickung; zahlreiche großkalibrige Fasern mit Zielscheibenformation, axonaler Atrophie und Verflüssigung der Myelinsubstanz; in einzelnen großkalibrigen Fasern filamentöse azurophile Einschlüsse in der nichtkompaktierten Myelinsubstanz oder dem Axonoplasma; zahlreiche zystisch vergrößerte, interlammelläre Myelinscheidenaufsplitterungen; wenig erkennbare kleinkalibrige Fasern, davon mind. 50% hypomyelinisiert; zahlreiche Myelinscheidenauflösungen um atrophische Axone von kleinkalibrigen Fasern; abschnittsweise histiozytäre bis makrophageale Aggregate.

**VK63**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig

a) N. ischiadicus:

Teasing: mittelgradige Bindegewebsfaservermehrung; interlamelläres Myelinscheidenödem; viele Wallersche Degenerationen Stadium I bis III; zahlreiche demyelinisierende, interkalierende Internodien und Segmente; multiple zapfenartige Vorwölbungen der Myelinscheide nach adaxonal; undulierende Myelinscheidenkaliber; zahlreiche osmiophile runde Körperchen im äußeren Schwanzzellkompartiment; zahlreiche demyelinisierte Bereiche mit intratubären und extratubären Makrophagen; in vereinzelt zerfallenden Myelinscheiden, angrenzend an de- bzw. remyelinisierende Abschnitte, hyaline, nicht-osmiophile, vereinzelt auch mit haufenweisen, gemischt-osmiophilen Granula gefüllte Masse; multifokaler Myelinscheidenzerfall; stellenweise, hochgradige, längsovale Myelinscheidenaufreibung mit labyrinthartiger Innenstruktur.

Semidünnschnitt: in einzelnen Faszikeln hochgradige Perineuralfibrose und subperineurales Ödem; mittelgradige Endoneuralfibrose.

zahlreiche, überwiegend großkalibrige hypomyelinisierte Fasern; zahlreiche Fasern mit zystischem, interlamellärem Myelinscheidenödem, z.T. mit atrophischem Innenkörper; multiple hypertrophe Schwanzzellen; Bereiche mit autophagischen Reaktionen innerhalb der Schwanzzelle bei hochgradiger Auflösung der Myelinscheidenstruktur; einzelne Rundzellinfiltrate.

b) N. fibularis:

Teasing: multiple paranodale Demyelinisierungen; multiple, osmiophile, paranodale Myelinscheidenverdickungen; zahlreiche Rundzellinfiltrate um die Fasern; multiple *fading fibers*; mittelgradige Bindegewebsfaservermehrung; generalisierte, noppenartige Einfaltung der Myelinscheide.

Semidünnschnitt: in einzelnen Faszikeln perineurale Fibrose unter Auseinanderdrängen der Zelllagen; subperineurales Ödem; multiple perineurale und subperineurale Mastzellen; geringgradige, diffuse endoneurale Fibrose; in manchen Bereichen geringgradiger Faserverlust; mittelgradiger, allgemeiner Zirkularitätsverlust; multiple Zielscheibenformationen; einzelne hypomyelinisierte Fasern, vor allem mittleren Kalibers; knotige Myelinscheidenverdickungen in zahlreichen stark myelinisierten Fasern; zystische, interlamelläre Myelinscheibenaufsplitterung in zahlreichen Fasern, teilweise mit granulärem Material; zahlreiche hypertrophe Schwanzzellen; ein endoneuraler Resorptionsfokus; einzelne, große, amorphe Einschlüsse innerhalb der Myelinscheide.

c) N. ulnaris:

Teasing: ebenfalls Bindegewebsfaservermehrung, Einfaltung der Myelinscheiden und undulierende Myelinscheidenkaliber (siehe N. ischiadicus); Hypertrophie des perinukleären Schwanzzellzytoplasmas; eine endoneurale, osmium-negative, längliche Verdickung; im Endoneurium zum Teil mit osmiophilen Granula beladene Zellen; eine paranodale Demyelinisierung; multiple, noduläre Myelinscheidenverdickung, internodal.



Semidünnschnitt: hochgradige Perineuralfibrose und Fibrose des subperineuralen Raums; hochgradige Endoneuralfibrose; geringgradiger Zirkularitätsverlust; zystische, interlamelläre Myelinscheidenaufsplitterung in einzelnen Fasern (siehe N. ischiadicus und N. fibularis); Schwanzzellhypertrophie (siehe N. ischiadicus und N. fibularis); Zielscheibenformation (siehe N. ischiadicus und N. fibularis); hochgradige Myelinscheidenfaltung.

#### **VK64**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schlecht, da sehr fragil; Einzelfasern schlecht fassbar und trennbar.

Teasing: allgemeine Hypomyelinisierung und Längsfaltung; Schwanzzellhypertrophie; zahlreiche perinukleäre Schwanzzeleinschlüsse; in einzelnen großen Fasern Aufblätterung der Myelinscheide über längere Abschnitte mit entsprechendem Verlust der Osmiophilie; in eben diesen Fasern zahlreiche große, osmiophile Einschlüsse im abaxonalen Schwanzzellzytoplasma sowie einzelne hypomyelinisierte Segmente und interkalierende Internodien; multifokale, paranodale Anisometrie; in mittelgroßen Fasern teilweise zopfartige Myelinscheidenkontur; in den großen Fasern noppenartige Myelinscheidenausstülpungen; ansatzweise kleinknotige Verdickung der Myelinscheide im Bereich zwischen den SLK's.

Semidünnschnitt: ein subperineurales Renaut-Körperchen; gering- bis mittelgradiger allgemeiner Zirkularitätsverlust; 1 *onion bulb*; Unterfixationsartefakt zahlreicher großkalibriger Fasern.

#### **VK65**

Teasbarkeit: verhältnismäßig schwierig, hohe Rigidität.

Teasing: Anzeichen für Fibrose; hochgradige Wellung der Außenkonturen der Myelinscheiden; hochgradiges *outpouching* großkalibriger Fasern; multiple noduläre paranodale Auftreibungen; vereinzelte paranodal beginnende Demyelinisierungen mit Schnürringerweiterung; mehrere Tomakula in Reihe mit hochgradig zystischem Myelinscheidenödem.

Schnellschnitt: mittel- bis hochgradige Endoneuralfibrose; mittelgradiger allgemeiner Nervenfaserverlust; mittelgradiger allgemeiner Zirkularitätsverlust; zahlreiche *onion-bulb*-Formationen geringer Ausprägung; einzelne hypomyelinisierte Axone; einzelne großkalibrige Cluster.

## 2 TABELLENANHANG

## 2.1 Technische Daten zu den Fixierversuchen

## VV12

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit + -</b>	<b>Teasbarkeit n .b.</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>
<b>1</b>	Einzelfasern aufgrund hoher Fragilität kaum abtrennbar <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie n.b.</b> Reiner Fettanschnitt	Kaum Nervengewebe, nur Bindegewebe vorhanden <b>Auswertbarkeit Teasing n.b.</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> Fasern ggrd. verbacken <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit +</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> Einzel Fasern aufgrund hoher Fragilität kaum abtrennbar <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit +++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>

## VV13

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>
<b>1</b>	Sehr weich, daher etwas fragil <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	Weich, daher ggrd. fragil <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit +</b> Durch steigende Rigidität bedingte Fragilität <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit +</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit -</b> Durch hohe Rigidität bedingte Fragilität <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit +++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +</b> <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>

VV1

GA	1%	2,5%	6,25%
Std.	Teasbarkeit -	Teasbarkeit +	Teasbarkeit ++
1	Einzelfasern schlecht faßbar und fragil (sehr weich)		
	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing ++	Auswertbarkeit Teasing +-
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie -
2	Teasbarkeit+	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit ++
	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing ++	Auswertbarkeit Teasing +-
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie -

VV8

GA	1%	2,5%	6,25%
Std.	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit ++
1			
	Auswertbarkeit Teasing ++	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing ++
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie -
2	Teasbarkeit +++	Teasbarkeit +++	Teasbarkeit +
	Auswertbarkeit Teasing ++	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing -
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +-
4	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit +
	Auswertbarkeit Teasing -	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing +
	Auswertbarkeit Histologie ++	Auswertbarkeit Histologie ++	Auswertbarkeit Histologie +
24	Teasbarkeit +++	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit ++
	Auswertbarkeit Teasing ++	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing +
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie -	Auswertbarkeit Histologie+

VV6

GA	1%	2,5%	6,25%
Std.	Teasbarkeit +	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit +
1	geringgradig fragil (weich)		
	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing -
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +
2	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit + geringgradig fragil	Teasbarkeit ++
	Auswertbarkeit Teasing -	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing -
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie -
4	Teasbarkeit +++	Teasbarkeit ++	Teasbarkeit ++
	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing +
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie -	Auswertbarkeit Histologie -
24	Teasbarkeit +++	Teasbarkeit + etwas rigide	Teasbarkeit + etwas rigide, Einzelfasern schlecht trennbar
	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing +	Auswertbarkeit Teasing -
	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +	Auswertbarkeit Histologie +

## VV16

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit -</b>	<b>Teasbarkeit +-</b>	<b>Teasbarkeit +</b>
<b>1</b>	Einzelfasern schlecht faßbar und fragil (sehr weich)  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	Einzelfasern etwas besser faßbar und weniger weich als bei 1%  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Teasbarkeit +</b> Geringgradige Tendenz zur Konsolidierung  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> Geringgradige Tendenz zur Konsolidierung  <b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Teasbarkeit +</b> Geringgradige Tendenz zur Konsolidierung  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b> Geringgradige Tendenz zur Konsolidierung  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>

## VV17

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit +-</b>	<b>Teasbarkeit -</b>	<b>Teasbarkeit +</b>
<b>1</b>	etwas fragil, da weich  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	Einzelfasern schlecht faßbar und weich  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +</b> geringgradig rigide, etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b> geringgradig rigide, etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b> geringgradig rigide, etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b> geringgradig rigide, etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>

## VV3

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit -</b>	<b>Teasbarkeit -</b>	<b>Teasbarkeit +</b>
<b>1</b>	Kaum teasbar, da sehr wenig Ausgangsmaterial und sehr weich  <b>Auswertbarkeit Teasing +++</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie n.b. fehlt</b>	Kaum teasbar, da sehr wenig Ausgangsmaterial und sehr weich  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	Geringgradig rigide und etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit -</b> Kaum teasbar, da sehr wenig Ausgangsmaterial und sehr weich  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing ++</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b> Geringgradig rigide und etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b> Geringgradig rigide und etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +</b> Geringgradig rigide und etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>

## VV11

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit -</b>	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>
<b>1</b>	sehr weich und fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit -</b> sehr weich und fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b> Tendenz zur Rigidität  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit -</b> sehr weich und fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität bedingte hohe Fragilität  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> aufgrund geringgradiger Rigidität etwas fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> durch Rigidität bedingte Fragilität  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b>  <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>

## VV15

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit +++</b>	<b>Teasbarkeit -</b>
<b>1</b>	Fasern etwas weich und fragil		Durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>
	<b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>	<b>Teasbarkeit -</b> Durch Rigidität bedingte hohe Fragilität	<b>Teasbarkeit -</b> Durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>
	<b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>	<b>Teasbarkeit -</b> Durch Rigidität bedingte hohe Fragilität	<b>Teasbarkeit -</b> Durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>
	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit -</b> Durch Rigidität bedingte hohe Fragilität	<b>Teasbarkeit -</b> Durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>
	<b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>

## VV2

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>	<b>Teasbarkeit +++</b>
<b>1</b>	etwas weich und fragil		
	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing ++</b>
	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit -</b> sehr weich und sehr fragil	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> geringgradig rigide
	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +++</b>
	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit -</b> sehr weich und sehr fragil	<b>Teasbarkeit +-</b> geringgradig rigide	<b>Teasbarkeit +++</b>
	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b>
	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Histologie +</b>

VV9

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>	<b>Teasbarkeit +</b>
<b>1</b>	Fasern etwas weich und fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>2</b>	Fasern etwas weich und fragil  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit +</b> <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> Fasern etwas weich und fragil wenig Ausgangsmaterial  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> Fasern etwas weich und fragil wenig Ausgangsmaterial  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität bedingte hohe Fragilität  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>

VV10

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>	<b>Teasbarkeit +++</b>	<b>Teasbarkeit +</b>
<b>1</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	geringgradige Rigidität <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit ++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +</b> geringgradige Rigidität <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit +++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> durch Rigidität bedingte Fragilität <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit +++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing +-</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>	<b>Teasbarkeit +++</b>  <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +-</b>	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität und Verbackenheit bedingte hohe Fragilität <b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>

## VV4

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit +</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit +</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
<b>1</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit +</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit +-</b> geringgradige Rigidität
	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit -</b> Schlechtes Ausgangsmaterial: viel Bindegewebe, Nerv mehrfach gebrochen	<b>Teasbarkeit +++</b>	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>

## VV5

GA	1%	2,5%	6,25%
<b>Std.</b>	<b>Teasbarkeit +</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit +</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
<b>1</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>2</b>	<b>Teasbarkeit +-</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit +</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit +-</b> geringgradige Rigidität
	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing ++</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>4</b>	<b>Teasbarkeit ++</b> etwas fragil	<b>Teasbarkeit +</b>	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>
<b>24</b>	<b>Teasbarkeit -</b> Schlechtes Ausgangsmaterial: viel Bindegewebe, Nerv mehrfach gebrochen	<b>Teasbarkeit +++</b>	<b>Teasbarkeit -</b> durch Rigidität bedingte hohe Fragilität
	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie +</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing +</b> <b>Auswertbarkeit Histologie ++</b>	<b>Auswertbarkeit Teasing -</b> <b>Auswertbarkeit Histologie -</b>



## 2.2 Teasbarkeit bei den Kollagenolyseversuchen

## Teasbarkeit von V1:

<b>V1</b>	+ –	Einzel Fasern relativ schlecht fassbar und trennbar; durch Rigidität bedingte Fragilität
<b>V1/G60p</b>	+ –	wie V1
<b>V1/K60p</b>	+	Einzel Fasern besser fassbar und trennbar; weder rigide noch fragil
<b>V1/G5a</b>	+ –	Einzel Fasern besser fassbar und trennbar; Fragilität sehr hoch, da Nervenfasern sehr weich
<b>V1/K5a</b>	+	Nerven tendentiell weich, aber trotzdem etwas besser teasbar

## Teasbarkeit von V2

<b>V2</b>	–	Fasern extrem verbacken und kaum fassbar und trennbar; durch Rigidität bedingte Fragilität.
<b>V2/G60p</b>	–	wie V2
<b>V2/K60p</b>	+	Einzel Fasern besser fassbar und trennbar; weder rigide noch fragil
<b>V2/G5a</b>	–	wie V2
<b>V2/K5a</b>	+ –	besser fassbar und etwas besser trennbar

## Teasbarkeit von V3

<b>V3</b>	–	Einzel Fasern schlecht fassbar und trennbar; durch Rigidität bedingte Fragilität
<b>V3/G60p</b>	–	wie V3
<b>V3/K60p</b>	++	Einzel Fasern sehr gut fassbar und trennbar
<b>V3/G5a</b>	+ –	Einzel Fasern besser fassbar und trennbar; weder rigide noch fragil
<b>V3/K5a</b>	+ –	Einzel Fasern besser fassbar und trennbar; weder rigide noch fragil

## Teasbarkeit von V4

<b>V4</b>	+ –	Einzel Fasern relativ schlecht fassbar und trennbar; durch Rigidität bedingte Fragilität
<b>V4/G60p</b>	+ –	wie V4
<b>V4/K60p</b>	+	Einzel Fasern gut fassbar und trennbar
<b>V4/G5a</b>	+ –	wie V4
<b>V4/K5a</b>	+	Einzel Fasern gut fassbar und trennbar

## Teasbarkeit von V5

<b>V5</b>	+ –	Einzel Fasern relativ schlecht fassbar und trennbar; durch Rigidität bedingte Fragilität
<b>V5/G60p</b>	+ –	wie V5
<b>V5/K60p</b>	+	Einzel Fasern gut fassbar und trennbar
<b>V5/G5a</b>	+ –	wie V5
<b>V5/K5a</b>	+ –	wie V5

## Teasbarkeit von V6:

<b>V6</b>	+	Einzel Fasern gut fassbar und trennbar; geringe Fragilität, da der Nerv etwas weich ist
<b>V6/G60p</b>	+ –	Nerv weich und fragil
<b>V6/K60p</b>	++	Einzel Fasern besser fassbar und trennbar; nicht fragil
<b>V6/G5a</b>	+ –	Fragilität sehr hoch, da Nerv sehr weich
<b>V6/K5a</b>	+	Nerven tendentiell weich, aber trotzdem gut teasbar

## Teasbarkeit von V7

<b>V7</b>	–	Einzel Fasern schlecht fassbar und trennbar; durch Rigidität bedingte Fragilität
<b>V7/G60p</b>	–	wie V7
<b>V7/K60p</b>	++	Einzel Fasern sehr gut fassbar und trennbar
<b>V7/G5a</b>	–	wie V7
<b>V7/K5a</b>	+ –	Einzel Fasern besser fassbar und trennbar; weder rigide noch fragil

## Teasbarkeit von V8

<b>V8</b>	+	Einzelfasern gut fassbar und trennbar
<b>V8/G60p</b>	+ -	Nerv weich und fragil
<b>V8/K60p</b>	++	Einzelfasern besser fassbar und trennbar;
<b>V8/G5a</b>	+ -	Nerv etwas weicher und fragiler
<b>V8/K5a</b>	+	Nerven tendentiell weich, aber trotzdem gut teasbar

## Teasbarkeit von V9

<b>V9</b>	+ -	Einzelfasern schlecht fassbar und trennbar;
<b>V9/G60p</b>	+ -	wie V9
<b>V9/K60p</b>	++	Einzelfasern sehr gut fassbar und trennbar
<b>V9/G5a</b>	+ -	wie V9
<b>V9/K5a</b>	+	Einzelfasern besser fassbar und trennbar

## Teasbarkeit von V10

<b>V10</b>	+ -	Einzelfasern relativ schlecht fassbar und trennbar; durch Rigidität bedingte Fragilität
<b>V10/G60p</b>	+ -	wie V10
<b>V10/K60p</b>	+	Einzelfasern gut fassbar und trennbar
<b>V10/G5a</b>	+ -	wie V10
<b>V10/K5a</b>	+ -	wie V10

## Teasbarkeit von V11

<b>V11</b>	+	Einzelfasern gut fassbar und trennbar
<b>V11/G60p</b>	+ -	Nerv etwas weicher und fragiler
<b>V11/K60p</b>	++	Einzelfasern besser fassbar und trennbar;
<b>V11/G5a</b>	+ -	Nerv etwas weicher und fragiler
<b>V11/K5a</b>	+	Nerven tendentiell weich, aber trotzdem gut teasbar

## Teasbarkeit von V112

<b>V12</b>	+ -	Einzelfasern relativ schlecht fassbar und trennbar; durch Rigidität bedingte Fragilität
<b>V12/G60p</b>	+ -	wie V12
<b>V12/K60p</b>	++	Einzelfasern gut fassbar und trennbar; gut teasbar
<b>V12/G5a</b>	+ -	wie V12
<b>V12/K5a</b>	+	Einzelfasern gut fassbar und trennbar

## VIII Literaturverzeichnis

1

Adams CW, Abdulla YH, Turner DR, Bayliss OB (1968): Subcellular preparation of peripheral nerve myelin. *Nature* 220: 171-173.

2

Adlard PA, King CE, Vickers JC (2000): The effects of taxol on the central nervous system response to physical injury. *Acta Neuropathol* 100: 183-188.

3

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994): *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing Inc., New York.

4

Asbury AK (2000): New concepts of Guillain-Barré syndrome. *J Child Neurol* 15(3): 183-191.

5

Asbury AK, Johnson PC (1978): *Pathology of peripheral nerve*, Vol 9. Saunders, Philadelphia.

6

Babel J, Bischoff A, Spoedlin H (1970): *Ultrastructure of the peripheral nervous system and sense organs*. Thieme, Stuttgart.

7

Bancroft JP, Gamble M (2002): *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, London.

8

Baraffio A, Dupin E, Le Douarin NM (1988): Clone forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5325-5329.

9

Beggs J, Johnson PC, Olafsen A, Watkins CJ (1992): Innervation of the vasa nervorum: changes in human diabetics. *J Neuropathol Exp Neurol* 51(6): 612-629.

11

Behse F, Buchthal F, Carlsen F, Knappeis GG (1972): Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Electrophysiological and histopathological aspects. *Brain* 95: 777-794.

12

Berthold CH (1978): Morphology of normal peripheral axons. In: Waxman SG (Hrsg.): *Physiology and pathobiology of axons*. Ravens Press, New York.

13

Berthold CH (1996): Development of nodes of Ranvier in feline nerves: an ultrastructural presentation. *Microsc Res and Tech* 34: 399-421.

14

Berthold Ch, Carlstedt T (1977): Observations of the morphology at the transition between the peripheral and central nervous system of the cat. II. General organisation of the transitional region in S1 dorsal rootlets. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 446: 23-42.

15

Berthold CH, Sklogund S (1967): Histochemical and ultrastructural demonstration of mitochondria in the paranodal region of developing feline spinal roots and nerves. *Acta Soc Med Uppsala* 73: 37-70.

16

Bichsel P, Oliver JE Jr., Tyler DE (1987): Chronic polyneuritis in a Rottweiler. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191: 991-994.

17

Bignami A, Dahl D, Nguyen BT, Crosby C (1981): The fate of axonal debris in Wallerian degeneration of rat optic and sciatic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 40: 537-550.

18

Bignami A, Eng LF (1973): Biochemical studies of myelin in Wallerian degeneration of rat optic nerve. *J Neurochem* 20: 165-173.

19

Bjartmar C, Yin X, Trapp B (1999): Axonal pathology in myelin disorders. *J Neuropathol* 28: 383-395.

20

Bohl J, Goebel HH (1989): Pathologie des peripheren Nervensystems. In: Cervos-Navarro J, Ferszt R (Hrsg.): *Klinische Neuropathologie*. Thieme, Stuttgart, New York.

21

Bradley JL, King RH, Muddle JR, Thomas PK (2000): The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy. *Acta Neuropathol* 99: 539-546.

22

Bradley RL, Withrow SJ, Snyder SP (1982): Nerve sheath tumors in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 18: 915-921.

23

Braund KG (1996): Endogenous causes of neuropathies in dogs and cats. Symposium on Neuropathies in dogs and cats. *Vet Med August 1996*: 740-754.

24

Braund KG, Dillon AR, Mikeal RL, August JR (1980): Subclinical myopathy associated with hyperadrenocorticism in the dog. *Vet Pathol* 17(2): 134-48.

25

Braund KG, McGuire JA, Amling KA, Henderson RA (1987): Peripheral neuropathy associated with malignant neoplasms in dogs. *Vet Pathol* 24: 16-21.

26

Braund KG, Mehta JR, Toivio-Kinnucan M (1989): Congenital hypomyelinating polyneuropathy in two Golden-Retriever littermates. *Vet Pathol* 26: 202-208.

27

Braund KG: Nerve and muscle biopsy techniques. *PVN Review Vol 2(1)*: 35-56.

28

Braund, KG, Vallat JM, Steiss JE (1996): Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in dogs and cats. *J Periph Nerv Syst* 1(2): 149-155.

29

Bray D (1973): Branching patterns of individual sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 56: 702.

30

Brown MC, Jansen JK, Van Esded D (1976): Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J Physiol* 261: 387-422.

31

Bullitt E (1990): Expression of c-fos protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296: 517-530.

32

Bunge MB, Wood PM, Tynan LB, Bates ML, Sanes JR (1989): Perineurium originates from fibroblasts: Demonstration in vitro with a retroviral marker. *Science* 243: 229-231.

33

Cai Z, Cash K, Swift J, Sutton-Smith P, Robinson M, Thompson PD, Blumbergs PC (2001): Focal myelin swellings and tomacula in anti-MAG IgM paraproteinaemic neuropathy: novel teased nerve fiber studies. *J Periph Nerv Syst* 6: 95-101.

34

Cajal SR (1890): *Studies on Vertebrate Neurogenesis* (Translated by L. Guth, 1960). Thomas CC, Springfield.

35

Cash K, Blumbergs PC (1955): Neuromuscular tissue. In: Woods AE, Ellis RC (Hrsg.): *Laboratory histopathology: a complete reference*, Vol 2. Churchill Livingstone, Edinburgh.

36

Cavanagh JB (1964): The significance of the dying back process in experimental and human neurological disease. *Int Rev Exp Pathol* 3: 219-267.

37

Cavanagh JB (1979): The dying back process: a common denominator in many naturally occurring and toxic neuropathies. *Arch Pathol Lab Med* 10: 659-664.

38

Ceballos D, Cuadras J, Verdu E, Navarro X (1999): Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat* 195: 563-576.

39

Celio MR (1976): The Schmidt-Lanterman incisures of the myelin sheath of Mauthner axons: places of longitudinal growth of myelin? *Brain Res* 108: 221-223.

40

Chalk CH, Dyck PJ (1992): Application of immunohistochemical techniques to sural nerve biopsies. *Neurologic Clinics* Vol 10(3): 601-612

41

Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW (1992): Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Neurol Clin* Vol 10(3): 613-627.

42

Clara M (1959): *Das Nervensystem des Menschen*, 3. Auflage. Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig.

43

Clarke E, Bearn JG (1972): The spiral nerve bands of Fontana. *Brain* 95: 1-20.

44

Conrad B, Bischoff C (1998): *Das EMG-Buch*. Thieme, Stuttgart.

45

Corneliuson O, Berthold CH, Fabricius C, Gratzinsky K, Carlstedt T (1989): Marchi-positive myelinoid bodies at the transition between central and peripheral nervous system in some vertebrates. *J Anat* 163: 17-31.

46

Cuddon PA, Higgins RJ, Duncan ID, Miller SP, Parent JM, Moser F (1989): Polyneuropathy in feline Niemann-Pick disease. *Brain* 112: 1429-43.

47

Cummings JF, deLahunta A (1974): Chronic relapsing polyradiculoneuritis in a dog. *Acta Neuropathol (Berl)* 28: 191 – 204.

48

Cummings JF, deLahunta A, Suter MM (1988): Canine protozoan polyradiculoneuritis. *Acta Neuropathol (Berl)* 76: 46-54.

49

Cummings JF, Haas DC (1967): Coonhound paralysis, an acute idiopathic polyradiculoneuritis in dogs resembling the Landry-Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Sci* 4: 51– 81.

50

Dahme E (1988): Nervensystem. In: Dahme E, Weiss E (Hrsg.): *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Enke, Stuttgart.

51

Dahme E, Hafner A, Reusch C, Schmidt P (1989): Diabetische Neuropathie bei Hund und Katze- eine bioptisch-elektronenmikroskopische Studie. *Tierärztl Prax* 17: 177-188.

52

deWaegh SM, Lee VM, Brady ST (1992): Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68: 451-463.

53

Decherchi P, Cochard P, Gauthier P (1997): Dual staining assessment of Schwann cell viability within whole peripheral nerves using calcein-AM and ethidium homodimer. *J Neurosci Meth* 71: 205-213.

54

Deprez M, Ceuterick de Groote C, Fumal A, Reznik M, Martin J (1999): A new combined Bodian-Luxol technique for staining unmyelinated axons in semithin, resin-embedded peripheral nerves: a comparison with electron microscopy. *Acta Neuropathol* 98: 323-329.

55

Dietzmann K (1990): Regenerationsvorgänge in peripheren Nerven nach Kontinuitätsunterbrechung. *Zentralbl allg Pathol pathol Anat* 136: 525-536.

56

Dines KC, Shelton GD, Schneider T, Powell HC (1999): Mast cell-associated Renaut bodies in the peroneal nerve of a dog with a history of mastocytosis. *J Periph Nerv Syst* 4: 19-26.

57

Dodd J, Jessell TM (1988): Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science* 242: 692-699.

58

Donat JR, Wisniewski HM, (1973): The spatio-temporal pattern of Wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. *Brain Res* 53: 41-53.

59

Donoso JA, Illanes JP, Samson F (1977): Dimethylsulfoxide action on fast axoplasmic transport and ultrastructure of vagal axons. *Brain Res* 120: 287-301.

60

Douglas AC, Crain BJ (1996): Peripheral nerve biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 120: 26-34.

61

Drotz B (1976): Synthetic machinery and axoplasmic transport: maintenance of neuronal connectivity. In: Tower BD (Hrsg.): *The nervous system*. Raven Press, New York.

62

Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Tropper MJ, (1988): Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 193(10): 1259-1263.

63

Duncan D (1929): A mechanism of extensibility in peripheral nerves. *Anat Rec* 44: 11-14.

64

Duncan ID, Griffiths IR (1977): Canine giant axonal neuropathy. *Vet Rec* 101: 438-441.

65

Duncan ID, Griffiths IR (1979): Peripheral nervous system in case of a canine giant axonal neuropathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 5: 25-39.

66

Dyck PJ (1969): Experimental hypertrophic neuropathy. *Arch Neurol* 21: 73-91.

67

Dyck PJ, Johnson WJ, Lambert EH (1971): Segmental demyelination secondary to axonal degeneration in uremic neuropathy. *Mayo Clinic Proc* 46: 400-431.

68

Dyck PJ, Karnes J, Lais A, Aloffgren EP (1984): Pathologic alterations of peripheral nervous system of humans. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge RP (Hrsg.). Saunders, Philadelphia.

69

Dyck PJ, Lais AC (1970): Electron microscopy of teased nerve fibers: method permitting examination of repeating structures of same fiber. *Brain Res* 23: 418-424.

70

Dyck PJ, Lais AC (1971): Evidence for segmental demyelination secondary to axonal degeneration in Friedreich's ataxia. ICS No.295: Clinical studies in myology. Part 2 of the proc. of the second intern. congr. on muscle diseases, Perth, Australia, 22-26. Nov 1971. Exzerpta Medica, Amsterdam.

71

Dyck PJ, Lais AC (1973): Evidence of segmental demyelination secondary to axonal degeneration in Friedreich's ataxia. In: Kakulas BA (Hrsg.): Clinical studies in myology. Exzerpta Medica, Amsterdam.

72

Dyck PJ, Nukada H, Lais AC, Karnes JL (1984): Permanent axotomy: a model of chronic neuronal degeneration preceded by axonal atrophy, myelin remodeling and demyelination. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge RP (Hrsg.). Saunders, Philadelphia.

74

Dyck PJ, Zimmermann BR, Vilen TH, Minnerath SR, Karnes JL, Yao JK, Poduslo JF (1988): Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 319: 542-548.

75

Ehrensperger F, Suter M (1977): Radiculitis toxoplasmatica beim Hund. *Kleintier Praxis* 22: 59-62.

76

Ellisman MH, Friedmann PL, Hamilton WH (1980): The location of sodium and calcium to Schwann cell paranodal loops at nodes of Ranvier and of calcium to compact myelin. *J Neurocytol* 9: 185-187.

77

Elvin LG (1961): The ultrastructure of the nodes of Ranvier in cat sympathetic nerve fibers. *J Ultrastruct Res* 5:388-390.

78

Erickson HP (1974): Assembly of microtubules from performed, ring-shaped proto filaments and 6-s tubulin. *J Supramol Struct* 2: 393-411.

79

Erlanson RA (1985): Peripheral nerve sheath tumors. *Ultrastruct Pathol* 9: 113-122.

80

Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R (1994): Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368: 147-150.

81

Fernandez-Moran H (1952): The submicroscopic organization of vertebrate nerve fibers. An electron microscope study of myelinated and unmyelinated nerve fibers. *Exp Cell Res* 3: 282-285.

82

Ferri GL, Chichi A, Bastone A, Gaudio RM, Frontali N, Dahl D (1994): Experimental  $\beta\beta'$ -iminodipropionitrile (IDPN) neuropathy: neurofilament profile of sensory, motor and autonomic nerves as seen by immunocytochemistry on whole-mount preparations. *Brain Res* 657: 315-319.

83

Fischer A (2001): Untersuchung zur elektrodiagnostischen Charakterisierung neuromuskulärer Krankheiten beim Hund. *Habil, Univ München*.

84

Fischer A (2002): Persönliche Mitteilung.

85

Flavell DJ, Goepel J, Wilson AP, Pooter CW (1979): Immunological cross-reactivity between acid extracts of myelin, liver and neoplastic tissues: studies in immunized guinea pigs. *Br J Cancer*. 40: 424-246.



86

Flecknell PA, Lucke VM (1978): Chronic relapsing polyradiculoneuritis in a cat. *Acta Neuropathol (Berl)* 41: 81–84.

87

Frankl SM, Denaro FJ (1998): Peripheral nerve teasing: two protocols for diagnosis and research. *J Histotechnol* 21(1): 39-43.

88

Friede RL, Samorajski T (1969): The clefts of Schmidt-Lanterman: a quantitative electron microscopic study of their structure in developing and adult sciatic nerves of the rat. *Anat Rec* 165: 89-92.

89

Friedmann B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrisey D, McClain J, Wang D, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, IP NY (1992): Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron* 9: 295-305.

90

Ghabriel MN, Allt G (1979): The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 48: 83-93.

91

Glass JD, Li CY, Labato C (1990): Macrophages in Wallerian degeneration: absence of early macrophages recruitment in associated with prolonged axon survival. *Ann Neurol* 28: 288-292.

92

Gödde T (1999): Persönliche Mitteilung.

93

Goebel HH, Bohl J, Störkel S (1990): Amyloid-related neuropathies. *Zentralbl Allg pathol Anat* 136: 517-523.

94

Goebel HH (1990): Hereditary metabolic neuropathies. *Zentralbl Allg pathol Anat* 136: 503–515.

95

Görtzen A, Schlüter S, Veh RW (1999): Schmidt-Lanterman's incisures- the principal target of autoimmune attack in demyelinating Guillain-Barré syndrome?. *J Neuroimmunol* 94: 58-65.

96

Graeber MB, Bise K, Mehraein P (1993): Synaptic stripping in the human facial nucleus. *Acta Neuropathol* 86: 179-181.

97

Greengard P, Straub RW (1958): Afterpotentials in mammalian non-myelinated nerve fibers. *J Physiol (Lond.)* 144: 442-462.

98

Grehl H., Schröder JM (1991): Significance of degenerating endoneurial cells in peripheral neuropathy. *Acta Neuropathol* 81: 680–685.

99

Griffiths IR, Duncan ID (1979): Ischaemic neuromyopathy in cats. *Vet Rec* 104: 518-522.

100

Grover-Johnson N, Spencer PS (1981): Peripheral nerve abnormalities in ageing rats. *J Neuropathol Exp Neuro* 40: 155-165.

101

Hahn AF, Ainsworth PJ, Bolton CF, Bilbao JM, Vallat JM (2001): Pathomorphological findings in x-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease: a morphological and ultrastructural analysis. *Acta Neuropathol* 101: 129-139.

102

Hall S (1989): Annotation: regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15: 513-529.

103

Hall SM (1989): Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15: 513-529.

104

Hall SM, Hughes RA, Atkinson PF, McColl I, Gale A (1992): Motor nerve biopsy in severe Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 31: 441-444.

105

Hall SM, Williams PL (1970): Studies on the incisures of Schmidt-Lanterman. *J Cell Sci* 6: 767-770.

106

Harkin JC (1964): A series of desmosomal attachments in the Schwann cell sheath of myelinated mammalian nerves. *Z Zellforsch* 64: 189-192.

107

Hartley WJ, Canfield PJ, Donnelly TM (1982): A suspected new canine storage disease. *Acta Neuropathol* 56(3): 225-232.

108

Heath JW, Kidd GJ, Trapp BD (1991): Myelin maintenance by Schwann cells in the absence of axons. *Neurosci Lett* 128: 277-280.

109

Hees H (1992): Nervensystem. In Sinowatz F, Hees H (Hrsg.): *Histologie*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

110

Henion PD, Weston JA (1997): Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124: 4351-4359.

111

Hess K, Eames RA, Darveniza P, Gilliatt RW (1979): Acute ischaemic neuropathy in the rabbit. *J Neurol Sci* 44: 19-43.

112

Hinson AW, Gu XQ, Dib-Hajj S, Black JA, Waxman SG (1997): Schwann cells modulate sodium channel expression in spinal sensory neurons in vitro. *Glia* 21: 339-349.

113

Holmes DF, Schulz RD, Cummings JF (1979): Experimental coonhound paralysis: animal model of Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 29: 1186-1187.

114

Honovar M, Tharakon JK, Hughes RA (1991): A clinicopathological study of the Guillain-Barré syndrome. *Brain* 144: 1245-1269.

115

Hughes RS, Hadden RD, Gregson NA, Smith KJ (1999): Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 100(1-2): 74-97.

116

Jäckel A (1983): Zur Klassifizierung der Tumoren im Nervenwurzelbereich beim Hund. Diss, Vet Med Fak, Univ München.

117

Jackson CA, deLahunta A, Cummings JF (1995): Spinal accessory nerve biopsy as an ante mortem diagnostic test for equine motor neuron disease. *Equine Vet J* 28: 215-219.

118

Jaspan JB, Wollman RL, Bernstein L (1982): Hypoglycemic peripheral neuropathy in association with insulinoma: implication of glucopenia rather than hyperinsulinism. Case report and literature review. *Medicine* 61: 33-44.

119

Jennings CG, Burden SJ (1976): Development of the neuromuscular synapse. *Curr Opin Neurobiol* 3: 75-81.

120

Jessen KJ, Mirsky R (1999): Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 22: 402-410.

121

Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic J (1994): The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 12: 509-527.

122

Jessen KR, Mirsky R (1992): Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Development* 106: 36-32.

123

Jessen KR, Mirsky R (1997): Embryonic Schwann cell development: the biology of Schwann cell precursors and early Schwann cells. *J Anat* 191: 501-505.

124

Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R (1990): Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c (Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109: 91-103.

125

Johnson D, Seeldrayer PA, Weiner HL (1988): The role of mast cells in demyelination. 1. Myelin proteins are degraded by mast cell proteases and myelin basic protein and P2 can stimulate mast cell degradation. *Brain Res* 444: 195-198.

126

Johnson PC, Doll SC, Cromey DW (1986): Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 19: 450-457.

127

Jones MZ, Cunningham JG, Dade AW (1983): Caprine  $\beta$ -mannosidosis: clinical and pathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 42: 268-285.

128

Kalichmann MW, Chalk CH, Mizisin AP (1999). Classification of teased nerve fibers for multicenter clinical trials. *J Periph Nerve Syst* 4(3-4): 233-244.

129

Kanda T (2000): Pathological changes of human unmyelinated nerve fibers: a review. *Histol Histopathol* 15: 313-324.

130

Kazui H, Fujisawa K (1988): Radiculoneuropathy of ageing rats: a quantitative study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14: 137-156.

131

Kelly WR, Clague AE, Barns JR, Bate MJ, MacKay BM (1983) Canine alpha-L-fucosidosis: a storage disease of Springer Spaniels. *Acta Neuropathol (Berl)* 60(1-2): 9-13.

132

Kennedy P, Cavanagh JB (1977): Sensory neuropathy produced in the cat with thallos acetate. *Acta Neuropathol (Berl)* 39: 81-88.

133

Key A, Retzius G (1876): Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes (Bd. II). P. A. Nordstedt & Söhner, Stockholm.

134

Klinke R, Silbernagl S (1997): Lehrbuch der Physiologie, 2. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York.

135

Koch T, Schultz P, Williams R (1977): Giant axonal neuropathy: a childhood disorder of neurofilaments. *Ann Neurol* 1: 138-151.

136

Korthals JK, Wisniewski HM (1975): Peripheral nerve ischemia: part 1, experimental model. *J Neurol Sci* 24: 65-76.

137

Krammer EB, Zenker W (1975): Effekt von Zinkionen auf Struktur und Verteilung der Neurotubuli. *Acta Neuropathol (Berl)* 31: 59-69.

138

Krinke GJ, Vidotto N, Weber E (2000): Teased-fiber technique for peripheral myelinated nerves: methodology and interpretation. *Tox Pathol* 28: 113-121.

139

Kudo M, Noguchi T (1985): Immunoreactive myelin basic protein in tumor cells associated with carcinomatous neuropathy. *Am J Clin Pathol* 84: 741-745.

140

Lambert S, Davis JQ, Bennett V (1997) Morphogenesis of the node of Ranvier: co clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates. *J Neurosci* 17: 7025-7036.

141

Lampert PW, Cressman MR (1966): Fine structural changes in myelin sheaths after axonal degeneration in the spinal cord of rats. *Am J Pathol* 49: 1139-1155.

142

Langley OK (1973): Local anaesthetics and nodal polyanions in peripheral nerve. *Histochem J* 5: 79-86.

143

Lanternman AJ (1877): Über den feineren Bau der markhaltigen Nervenfasern. *Arch Mikrosk Anat Entwicklunsmech* 13: 1-8.

144

LaPoint SF, Powers JM, Woodruff JM, MacCollin M, Jacoby LB, Vortmeyer AO, Zhuang Z, Fong C, Ifthikharuddin SF, Teot L, Conoglio JU, Sullivan RP (2000): Schwann cell-onion bulb tumor of the trigeminal nerve: hyperplasia, dysplasia or neoplasia? *Acta Neuropathol* 99: 67-72.

145

Levy WJ, Spagnolia T, Rumpf R, York DH (1985): A method for in vitro enzymatic dissociation of nerve roots and peripheral nerves from adult mammals. *J Neurosci Meth* 14: 281-291.

146

Liebich HG (1993): Nervengewebe. In: Funktionelle Histologie. Schattauer, Stuttgart, New York.

147

Liehr T, Grehl H, Rautenstrauss B (1977): Molecular diagnosis of PMP-22-associated neuropathies using fluorescence in situ hybridisation (FISH) on archival peripheral nerve tissue preparations. *Acta Neuropathol (Berl)* 94: 266-271.

148

Lubinska L, Lubaszewska I (1956): Shape of myelinated nerve fibers and proximo-distal flow of axoplasm. *Acta Biol Exp* 17: 155-159.

149

Mallhorta SK, Harreveld A (1965): Dorsal roots of the rabbit investigated by freeze-substitution. *Anat Rec* 152: 828-292.

150

Martini R, Schachner M (1997): Molecular bases of myelin formation as revealed by investing deficient in glial cell surface molecules. *Glia* 19(4): 298-310.

151

Matiasek K (2001): Persönliche Mitteilung.

152

Matiasek K, Köstlin R, Schmahl W, Hecht S (2001): Plexiformer Nervenwurzeltumor vom Typ eines Perineurioms bei einem Hund. *Wien Tierärztl Mschr* 88: 192-200.

153

Matiasek K, Ranner W, Deeg C, Wiczorek L, Schmahl W, Gerhards H (2001): Neuropathologische Merkmale der Ligustervergiftung bei Pferden. 44. Jahrestagung DVG-FG Pathologie, Münster. Abstract in *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 115 (1/2): 66 (2002).

154

Matiasek K, Schmahl W, Hermel H (1999): Solvatochemical maneuvers for selective staining of axon and /or myelin sheath by fluorochrome DPED: New approaches to assessment of peripheral neuropathies. Joint meeting of the German and Swiss Societies of Neuropathology and Neuroanatomy & International Symposium of the Bonn Collaborative Neuroscience Center (SFB 400), 06.-09.10., Bonn. Abstract in *Acta Neuropath* 98: 538-539.

155

Matiasek K, Wieczorek L, Schmahl W (2001): Striking features in teased peripheral nerve fibers: pathology meets artefact. 19th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, 25.-28.09., Thessaloniki.

156

Matz ME, Shell L, Braund K (1990): Peripheral hypomyelination in two Golden Retriever littermates. *J Am Vet Med Assoc* 197: 228-230.

157

McKay RD (1999): Brain stem cells change their identity. *Nat Med* 5(3): 261-265.

158

Meier C, Bischoff A (1977): Polyneuropathy in hypothyroidism. *J Neurol* 215: 103-114.

159

Meier C, Parmantier E, Brennan A, Mirsky R, Jessen KR (1999): Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci* 19: 3847-3859.

160

Menegoz M, Gaspar P, LeBert M, Galvez T, Burgaya F, Palfrey C, Ezan P, Arnos F, Girault JA (1997): Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron* 19: 319-331.

161

Midroni G, Bilbao JM (1995): Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy. Butterworth-Heinemann, Boston.

162

Mirsky R, Jessen KR (1999). The neurobiology of Schwann cells. *Brain Path* 9: 293-311.

163

Mitchison T, Kirschner M (1988): Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1: 761-722.

164

Mizisin AP, Shelton DG, Wagner S, Rusbridge C, Powell HC (1998): Myelin splitting, Schwann cell injury and demyelination in feline diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol* 95: 171-174.

165

Murray JA, Blakemore WF (1980): The relationship between internodal length and fibre diameter in the spinal cord of the cat. *J Neurol Sci* 45: 29-41.

166

Nakai J (1960): Studies on the mechanisms determining the course of nerve fibers in tissue cultures. II The mechanism of fasciculation. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 52: 427-431.

167

Nesbit JW, Lourens DC, Williams MC (1981): Spastic paresis in two litter-mate pups caused by *Toxoplasma gondii*. *J S Afr Vet Assoc* 52: 243-246.

168

Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1992): Nervensystem. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV. Parey, Berlin, Hamburg.

169

Ochoa J (1976): The unmyelinated nerve fiber. In: Landon DN (Hrsg.): The peripheral nerve. Chapman and Hall, London.

170

Ochs S, Pourmand R, Jersild RA, Friedman RN (1997): The origin and nature of beading: a reversible transformation of the shape of nerve fibers. *Prog Neurobiol* 52: 391-426.

171

Ochs S, Pourmand R, Si K, Friedman RN (2000): Stretch of mammalian nerve in vitro: effect on compound action potentials. *J Periph Nerv Syst* 5: 277-235.

172

Oka N, Takahashi M, Kawasaki T, Akiguchi I (2000): Apoptosis of perineurial cells in sensory perineuritis. *Acta Neuropathol* 99: 317-320.

173

Oliver JE, Lorenz MD, Kornegay JN (1997): Handbook of veterinary neurology. WB Saunders, Philadelphia.

174

Olsson Y (1990): Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. *Crit Rev Neurobiol* 5: 265-311.

175

Oritz-Hidalgo C, Weller RO (1992): Peripheral nervous system. In Sternberg SS (Hrsg.): Histology for pathologists. Ravens Press Ltd., New York.

176

Perentes E, Nakagawa Y, Ross G, Stanton C, Rubinstein LJ (1987): Expression of epithelial membrane antigen in perineurial cells and their derivatives: an immunocytochemical study with multiple markers. *Acta Neuropathol (Berl)* 75: 160-165.

177

Perentes E, Rubinstein LJ (1985): Immunohistochemical recognition of human nerve sheath tumors by anti-Leu 7 (HNK-1) monoclonal antibody. *Acta Neuropathol (Berl)* 68: 319-324.

178

Persson H, Corneliussen O (1989): Degradation products of myelin proteins in a light CNS subcellular fraction. *Neurochem Res* 14(12): 1177-1180.

179

Pettersson CA (1993): Drainage of molecules from subarachnoid space to spinal nerve roots and peripheral nerve of the rat. A study based on Evans blue-albumin and lanthanum as tracers. *Acta Neuropathol (Berl)* 86: 636-644.

180

Pettmann D, Henderson CE (1998): Neuronal cell death. *Neuron* 20: 633-647.

181

Phillips DD, Hibbs RG, Ellison JP, Shapiro H (1972): An electron microscope study of central and peripheral nodes of Ranvier. *J Anat* 111: 229-238.

182

Pogson DM, Doxey DL, Gilmour JS, Milne EM, Chisholm HK (1992): Autonomic neurone degeneration in equine dysautonomia (grass sickness). *J Comp Path* 107: 271-283.

183

Popovic M, Bresjanac M, Sketelj J (2000): Role of axon-deprived Schwann cells in perineural regeneration in the rat sciatic nerve. *J Neurophol Appl Neurobiol* 26: 221-231.

184

Powell HC, Myers RR, Lampert PW (1982): Changes in Schwann cells and vessels in lead neuropathy. *Am J Pathol* 109: 193-205.

185

Pschyrembel W (1994): *Klinisches Wörterbuch*. WdG, Berlin.

186

Quattrini A, Nemni R, Marchettini P (1993): Effect of hypothyroidism on rat peripheral nerve system. *Neuro Report* 4: 499-502.

187

Ranner W (1999): *Persönliche Mitteilung*.

188

Reich F (1903): Über eine neue Granulation in der Nervenzelle. *Arch Anat Physiol. Abt* 208-214.

189

Remahl S, Risling M, Hildebrand C (1977): Age-related changes in occurrence of Marchi-positive granules and Marchi-positive myelinoid bodies in postnatally developing feline white matter. *J Neurol Sci* 34(1): 71-86.

190

Renaut J (1881): Recherche sur quelque points particulier d'histology des nerfs. *Archives de Physiologie (Paris)* 8: 180-190.

191

Renaut J (1881): Systeme hyaline de soutenements des centres nerveux et de quelques organes des sens. *Archives de Physiologie (Paris)* 8: 846-859.

192

Richardson PM, Thomas PK, (1979): Percussive injury to peripheral nerve in rats. *J Neurosurg* 51: 178-187.

193

Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C (1997): Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ERBB3 receptor. *Nature* 389: 725-730.

194

Ritz MF, Erne B, Ferracin F, Vital A, Vital C, Steck A (1999): Anti-MAG IgM penetration into myelinated fibers correlates with the extent of myelin widening. *Muscle Nerve* 22: 1030-1037.



195

Robertson JD (1958): The ultrastructure of Schmidt-Lanterman clefts and related shearing defects of the myelin sheath. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 39-42.

196

Rotmistrovsky RA, Alcaraz A, Cummings JF (1991): GM2 gangliosidosis in a mixed breed dog. *Prog Vet Neurol* 2: 203-208.

197

Rüsse I, Sinowatz S (1991): *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey, Hamburg, Berlin.

198

Ryle C, Donaghy M (1995): Non-enzymatic glycation of peripheral nervous proteins in human diabetics. *J Neurol Sci* 129: 62-68.

199

Sabatelli M, Mignogna T, Lippi G, Porcu C, Tonali P (1996): Intramyelinic edema in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Clin Neuropathol* 15: 17-21.

200

Sander S, Ouvrier RA, McLeod JG, Nicholson J, Pollars D (2000): Clinical syndromes associated with tomacula or myelin swellings in sural nerve biopsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 483-488.

201

Scheithauer BW, Woodruff JM, Erlandson RA (1997): The normal peripheral nerve system. In: *Tumors of the peripheral nerve system*. Washington: AM Reg of Path, AFIP.

202

Scheithauer BW, Woodruff JM, Erlandson RA (1997): Tumors of the peripheral nervous system. In: Rosai J. (Hrsg.): *Atlas of tumor pathology*. 3rd series. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.

203

Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in PNS and CNS. *J Neurosci* 15: 8281-8294.

204

Schmahl W, Hermel H, Matiasek K, Möhwald H (1999): Selective staining by the fluorochrome 5,5'-Diphenyl-9-ethyl-oxacarbo-cyanine. II. Application to paraffin embedded nervous tissue. *Biotechnic & Histochemistry* 74(5): 229-235.

205

Schmidt HD (1874): On the construction of the dark or double bordered nerve fiber. *Mon Microsc J (Lond)* 11: 200-222.

206

Schnapp B, Mugnaini E (1978): Membrane architecture of myelinated fibers as seen by freeze-fracture. In: Waxman SG (Hrsg.): *Physiology and pathobiology of axons*. Ravens Press, New York.

207

Schnorr B (1989): *Embryologie der Haustiere*. Enke, Stuttgart.

208

Schochet SS, McCormick WF (1972): Ultrastructure of Hirano bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 21: 50-60.

209

Schröder JM (1987): Pathomorphologie des peripheren Nerven. In: Neundörfer B, Schimrigk K, Soyka K. (Hrsg.) Bd. 2 der Reihe: Praktische Neurologie. D. Edition Medizin VCH, Weinheim.

210

Schröder JM (1987): Peripheral neuropathies. Correlation between molecular genetic and fine structural diagnosis of inherited peripheral neuropathies. *Brain Pathol* 7: 1299-1302.

211

Schröder JM (1999): Pathologie des Nervensystems VIII, Pathologie peripherer Nerven. In: Doerr, Seifert, Uehlinger (Hrsg.): Spezielle pathologische Anatomie. Springer, Berlin.

212

Schröder JM, Himmelmann F (1992): Fine structural evaluation of altered Schmidt-Lanterman incisures in human sural nerve biopsies. *Acta Neuropathol* 83: 120-133.

213

Schröder JM (1998): Recommendations for the examination of peripheral nerve biopsies. *Virchows Arch* 432: 199-205.

214

Schwartz M, Yoles E, Levin LA (1999): Axogenic and somagenic neurodegenerative diseases: definition and therapeutic implications. *Mol Med Tod* 5: 470-473.

215

Seddon HJ (1943): Three types of nerve injury. *Brain* 66: 237-288.

216

Shirabe T, Tawara S, Terao A, Araki S (1975): Myxoedematous polyneuropathy: a light and electron microscopic study of the peripheral nerve and muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 38: 241-247.

217

Shores A, Braund KG, McDonald RK (1987): Chronic relapsing neuropathy in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 23: 569-573.

218

Sima AA, Prashar A, Nathaniel V, Bril V, Werb MR, Greene DA (1993): Overt diabetic neuropathy: repair of axo-glial dysjunction and axonal atrophy by aldose reductase inhibition and its correlation to improvement in nerve conduction velocity. *Diabet Med* 10: 115-121.

219

Singer M, Bryant SV (1969): Movement in the myelin Schwann sheath of vertebrate axon. *Nature (Lond)* 221: 1148-1150.

220

Singer M, Krishnan N, Fyfe DA (1972): Penetration of ruthenium red into peripheral nerve fibers. *Anat Rec* 173: 375-378.

221

Sjöstrand FS (1953): The lamellated structure of the nerve myelin sheath as revealed by high resolution electron microscopy. *Experientia* 9: 68-71.

222

Sobue G, Yasuda T, Mitsuma T, Ross AH, Pleasure D (1988): Expression of nerve growth factor receptor in human neuropathies. *Ann Neurol* 24: 64-72.

223

Spencer P, Schaumburg H (1991) : Central-peripheral distal axonopathy- the pathology of dying-back polyneuropathies. In: Zimmermann HM (Hrsg.): Progress in neuropathology. Vol III, Grune & Stratton, New York.

224

Spencer PS, Schaumburg HH (1980): Experimental and clinical neurotoxicology. Williams& Wilkins, Baltimore.

225

Spencer PS, Thomas PK (1970): The examination of isolated nerve fibers by light and electron microscopy with observations on demyelination proximal to neuromas. Acta Neuropathol (Berl) 16: 177-186.

226

Spencer PS, Thomas PK (1974): Ultrastructural studies of the dying-back process. II The sequestration and removal by Schwann cells and oligodendrocytes of organelles from normal and diseased axon. J Neurocytol 3: 763-783.

227

Sponenberg DP, deLahunta A (1981): Hereditary hypertrophic neuropathy in Tibetan Mastiff dogs. J Hered 72: 287-291.

228

Suderland S (1990): Untersuchungen zur Präparationstechnik und histomorphologische Bewertung von Nervenbiopsaten bei Hund und Katze. Diss Tierärztl Fak, München.

229

Summers BA, Cummings JF, DeLahunta A (1995): Diseases of the peripheral nervous system. In: Veterinary neuropathology. Mosby, St.Louis.

230

Tatke M, Doyle D (1994): Effect of collagenase on nerve fiber teasing. J Clin Pathol 47: 774-775.

231

Thiex R, Schröder JM (1996): Correlation between sural nerve biopsy findings and PMP22 gen duplication or deletion (abstract). Eur j Hum Genet 4 (Suppl 1):133.

232

Thomas PK (1984): Clinical features and differential diagnosis. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R. (Hrsg.): Peripheral neuropathy. WB Saunders, Philadelphia.

233

Thomas PK (1987): Vascular factors in the causation of diabetic neuropathy. Trends Neurosci 10: 6-8.

234

Thomas PK, Eliasson SG (1984): Diabetic neuropathy. In Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH: Peripheral neuropathy. WB Saunders, Philadelphia.

235

Thomas PK, Hollinrake K, Lascelles RG, Os DJ, Baillod RA, Moorhead JF, Mackenzie JC (1971): The polyneuropathy of chronic renal failure. Brain 94: 761-780.

236

Thomas PK, King RHM, Sharma AK (1980): Changes with age in peripheral nerves of the rat. Acta Neuropathol (Berl) 52: 1-6.

237

Thomas PK, Ochoa J (1984): Microscopic anatomy of peripheral nerve fibers. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge RP (Hrsg.). Saunders, Philadelphia.

238

Thomas PK, Olsson Y (1984): Microscopic anatomy and function of the connective tissue components of peripheral nerve. . In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge RP (Hrsg.). Saunders, Philadelphia.

239

Toft PB, Fugleholm K, Schmalbruch H (1988): Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. *Muscle Nerve* 11: 880-889.

240

Tomonaga M, Sluga E (1970): Zur Ultrastruktur der pi-Granula. *Acta Neuropathol (Berl)* 15: 56-69.

241

Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, LeGuern E, Brice A (1996): Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 6: 813-817.

242

Vallat JM, Vital C, LeBoutet MJ, Loubet A, Brechenmacher C (1982): Abnormal proliferation of intraergoplasmatic microfilaments in myelinated Schwann cells: ultrastructural study of two cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 41: 460-465.

243

Vandeveld M, Oetli P, Fatzer R (1981): Polyradikuloneuritis beim Hund: klinische, histologische und ultrastrukturelle Beobachtungen. *Schweiz. Arch. Tierheild.* 123: 207 – 217.

244

VanHam L, Braund KG, Roels S, Putcuyps I (1979): Treatment of a dog with insulinoma-related peripheral polyneuropathy with corticosteroids 141: 98-100.

245

Verhagen WI, Gabreels-Festen AA, vanWensen PJ (1993): Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a clinical, electroneurophysiological and morphological study. *Neurol Sci* 116: 176-184.

246

Vicini DS, Wheaton LG, Zachary JF, Parker AJ (1988): Peripheral nerve biopsy for diagnosis of globoid cell leucodystrophy in a dog. *J Am Vet Assoc* 192(8): 1087-90.

247

Vital A, Vital C (1985): Polyarteritis nodosa and peripheral neuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 67: 136-14.

248

Vital A, Vital C, Coquet M, Larribau E (1986): Chronic peripheral neuropathy; unusual nerve and muscle biopsy findings (letter). *Muscle Nerve* 9: 471-472.

249

Vital C, Vital A, Deminiere C, Julien J, Laguény A, Steck A (1997): Myelin modifications in 8 cases of peripheral neuropathy with Waldenström's Macroglobulinemia and Anti-MAG activity. *Ultrastruct Pathol* 21: 509-516.

250

Vogt T, Hopf C (1996): Elektromyographische und elektroneurographische Untersuchungstechnik. In: Hopf H, Dengler R, Röder R (Hrsg.): Elektromyographieatlas. Thieme, Stuttgart-New York.

251

Waller AV (1850): Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Transact Royal Soc London B* 140: 423-429.

252

Walters BB, Matus AI (1975): Tubulin in postsynaptic junctional lattices. *Nature (Lond)* 257: 496-498.

253

Wang M, Wu Y, Culvers DG, Glass JD (2000): Pathogenesis of axonal degeneration: parallels between Wallerian degeneration and Vincristine neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 59(7): 599-606.

254

Warzok R, Cevos-Navarro J (1990): Morphologische Diagnostik von Krankheiten des peripheren Nervensystems. *Zentralbl Allg Pathol Anat* 136: 493 - 502.

255

Webster HF (1965): The relationship between Schmidt-Lanterman incisures and myelin segmentation during Wallerian degeneration. *Ann N Y Acad Sci* 122: 29-38.

256

Weidenheim KM, Campbell WG (1986): Perineural cell tumor. Immunocytochemical and ultrastructural characterization. Relationship to other peripheral nerve tumors with a review of the literature. *Virchows Arch* 408: 375-383.

257

Weiss P, Hiscoe HB (1948): Experiments on the mechanism of nerve growth. *J Exp Zoo* 107: 315-395.

258

Weller RO (1998): Pathology of cerebrospinal fluid and interstitial fluid of the CNS: Significance for Alzheimer disease, prion disorders and multiple sclerosis. *J Neuropath Exp Neurol* 5 (10): 885-894.

259

Weller RO, Herzog I (1970): Schwann cell lysosomes in hypertrophic neuropathy and in normal human nerves. *Brain* 93: 347-152.

260

Weller RO, Nester B (1972): Early changes at the node of Ranvier in segmental demyelination. Histochemical and electronmicroscopic observations. *Brain* 95(4): 665-674.

261

Wendenheim KM, Campbell WG (1986): Perineural cell tumor immunocytochemical and ultrastructural characteristics. Relationship to other perineural tumors with a review of the literature. *Virchows Arch (A)* 408: 375-383.

262

Westrum LE, Gray EG (1976): Microtubules and membran specialisation. *Brain Res* 105: 547-550.

263

Williams PL, Wendell-Smith CP (1971): Some additional parametric variations between peripheral nerve fiber populations. *J Anat* 109: 505-526.

264

Windebank AJ, Dyck PJ (1984): Lead intoxication is a model of primary segmental demyelination. In Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, : Peripheral neuropathy. WB Saunders, Philadelphia.

265

Yao D, Komoly S, Zhang Q, Webster H (1994): Myelinated axons demonstrated in the CNS and PNS by anti-Neurofilament immunoreactivity and Luxol fast blue counterstaining. *Brain Pathol* 4: 97-100.

266

Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM, Li C, Roder J, Trapp BD (1998): Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 18: 1953-1963.

267

Zenker W, Mayr R, Gruber H (1972): Axoplasmic organelles: quantitative differences between ventral and dorsal root fibers of the rat. *Experientia* 29: 77-82.

268

Zhao C, Cash K, Swift J, Sutton-Smith P, Thompson PD, Blumbergs PC (2001): A novel method for correlating internal and external structure of individual myelinated nerve fibers. *Journal of Neuroscience Methods* 105: 39-43.

269

Zhu J, Mix E, Link H (1998): Cytokine production and the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* 83(1): 40-52.

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. Schmahl für sein Vertrauen und die Möglichkeit bedanken, an seinem Lehrstuhl diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer persönlicher Dank gilt Herrn Dr. K. Matiasek für seine großartige Betreuung und seine ständige Unterstützung in der Realisierung dieser Doktorarbeit.

Mit großer Verbundenheit möchte ich alle MTAs des Instituts nennen. Insbesondere danke ich Frau Siebert für ihre Unterstützung in allen technischen Fragen, und Frau Mayer für ihre besonderen Leistungen in der Anfertigung der histologischen Schnitte.

Für die Einführung in die klinische Neurologie möchte ich mich aufrichtig bei Frau Dr. A. Fischer und ihrem Stationsteam in der I. Medizinischen Tierklinik bedanken.

Der LMU München danke ich für das Promotionsstipendium.

Meinen lieben Eltern danke ich insbesondere, da ohne ihre immerwährende und ganzheitliche Unterstützung eine Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre. Mein ganz spezieller Dank geht ebenso an meine Großmutter.





**Persönliche Angaben:**

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geboren: 20.06.1974
- Geburtsort: Ludwigshafen
- Vater: Dr. Helmut Wieczorek, Universitätsprofessor
- Mutter: Gudrun Wieczorek, geb. Abrahamczik, Lehrerin

**Ausbildung**

1980 – 1/1984	Grundschule Obertraubling
1/1984 – 8/1984	Elementary School Warminster, Pennsylvania
9/1984 – 1986	Gymnasium Neutraubling
1986 – 1993 1993 Abitur	Gymnasium Olching
1993 – 1999	LMU München Studium der Veterinärmedizin abgeschlossen am 06. September 1999
11/1999 – 4/2002	LMU München Promotionsstudium am Institut für Tierpathologie, Lehrstuhl für allgemeine Pathologie und Neuropathologie, Veterinärmedizinische Fakultät