

Godfrey Adodo
Dr. med.

Isolierung und Kultivierung von Meerschweinchenoligodendrozyten

Geboren am 27.12.1943 in Arimogija / Nigeria
Reifeprüfung am 1964 in Hussey College Warri / Nigeria
Studiengang der Fachrichtung Medizin von WS 1969 bis WS 1974/75
Physikum am 23.03.1972 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Bretten und
Werra Klinik Bad Sooden-Allendorf nach Staatsexamen
Staatsexamen am 29.01.1976 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Klaus Unsicker

Eine optimale Methode zur Oligodendrozytengewinnung vom Meerschweinchen wird dokumentiert, die ca. 90 bis 95% hochgradige Oligodendrozytensuspension liefert, bei durchschnittlicher Ausbeutung von $13,1 \times 10^6$ Zellen aus zerkleinerter Großhirnsubstanz von zwei Tieren.

Diese Methode beruht auf folgenden Bedingungen:

1. Männliche Versuchstiere mit ca. 200 g Körpergewicht, aus der Linie – Bor: DHPW. nicht mehr als 14 Tage alt.
2. Optimale Tiernarkotisierung: 0,5 ml pro kg Körpergewicht einer Mischung von Katanest und rompun 2%ig, im Verhältnis 0,8 ml : 0,2 ml, das zuerst intramuskulär und wovon 2 Min. nach Perfusionsbeginn 1 ml subcutan injiziert wurde. Kurz vor Perfusionsende Tötung des Versuchstieres mit 1,0 ml Nembutal intraperitoneal.
3. Geeignetste Perfusionslösung: eine Mischung aus 100 ml Hexose-Hepeslösung (25m.mol) und 1g Serum Albumin vom Rind mit 25 mg Calciumchlorid, eingestellt auf pH 7,35 und die Osmolarität von 644m.Osmol.
4. Perfusionsdauer: 10 Minuten.
5. Grobzerkleinerung des nach Eröffnung der Schädelkalotte entnommenen Groß- und Stammhirns in gekühlter Glaspetrischale mit Gebrauchs-Hexose-Hepeslösung mittels Rasierklinge.
Weitere Zerkleinerung durch ein Nylonnetz mit Porengröße 300 mU im Sterilfilter-Fortsatz (Sartorius).
6. Das Hirnhomogenat, in einen Glasrundkolben gefüllt, wurde im Wasserbad, bei einer Temperatur von 38°C, begast mit steril filtriertem (0,2 mU Filter) Sauerstoff, 20 Min. lang inkubiert.
7. Weitere Zerkleinerung durch Nylonnetz mit abnehmender Porengröße von 150 mU und 70 mU in sterilen Filterfortsätzen auf steriler Arbeitsbank unter einem Laminar-flow.

8. Herstellung eines 4-Stufengradientes wie in Abb. 13 oder 15.
9. Die Zellseparation erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge Omega 70.000 mit Festwinkelrotor (8x35mm) bei 10.000g.
Nachfolgende Schritte im Kältelabor.
10. Nach Zentrifugation Herausnahme der Zentrifugentuben aus dem Schwenkbecher am sterilen Arbeitsplatz. Entnahme von nicht mehr als 4 ml Zellgemisch (wegen der Gefahr der Verunreinigung) vom Boden der Zentrifugentuben.
11. Verbringen von 4ml Rundzellgemisch für die Oligodendrozytenkultur in eine sterile Reagenz-Glastube. Auffüllen mit Kulturmedium ohne Ara^C bis zum Rand und waschen in einer Sigma-2 KD-Zentrifuge bei 2.000g für 10 Min., wobei die Rundzellen sedimentiert und der Überstand verworfen wurde.
12. Oligodendrozytenzellzählung aus gut durchgemischter Zellsuspension in einem Coulter Counter ZM-Gerät, wofür das Rundzellsediment mit ca. 5 ml Kulturmedium und 5%-igem foetal Kalbsserum aufgefüllt wurde.
13. Kurz vor Zellaussatz wurden die zu 2/3 mit Beschichtungsmedium, bestehend aus Collagen und sterilisiertem Kulturmedium MEM und foetal Kalbsserum-Mischung mit Ara^C, gefüllten Plastik-Petrischalen, die über Nacht auf dem sterilen Arbeitsplatz unter UV-Bestrahlung lagen, abgesaugt.
Aus einer sterilen 10ml-Einmalspritze wurden bis zu 2mm mit sterilisiertem Kulturmedium MEM und foetal Kalbsserummischung, ohne Ara^C, in einem Verhältnis von 9,5ml:0,5ml, aufgefüllt und die Petrischale mit dem Gemisch ausgespült. Diese Ausspülung wurde nochmals wiederholt.
14. Die isolierten Rundzellen wurden mit Kulturmedium MEM und 5%-iger foetal Kalbsserum-Mischung ohne Ara^C in eine sterile 10ml-Einmalspritze aufgezogen, durchgeschüttelt und ca 1ml von diesem Gemisch in jede Petrischale zur Oligodendrozytenkultur gebracht. In einer Petrischale durften sich nicht weniger als 500.000 und nicht mehr als 1 Mio. Zellen befinden und sollten auf der collagenbeschichteten Petrischalenfläche gut verteilt sein.
15. Die Kultivierung der ausgesetzten Rundzellen (Oligodendrozyten) erfolgte in Petrischalen zu je 35mm Durchmesser mit Collagenbeschichtung. Die Plastik-Petrischalen mit den ausgesetzten Oligodendrozyten wurden ausschließlich im Inkubator (Cytoperm Heraeus) bei einer Temperatur von ca. 38°C und Luftfeuchtigkeit von ca. 80% in 5% CO₂ angereicherter Luft inkubiert.
16. Jeweils nach 3-4 Tagen wurde die Nährlösung in den Petrischalen gewechselt, indem das bisherige Medium abgesaugt und durch 2ml frisches Kulturmedium gleicher Zusammensetzung pro Petrischale ersetzt wurde. Vom ersten Mediumwechsel bis zum Ende des Zellwachstums muß das Serum-Kulturmediumgemisch 5% Serum enthalten, ohne Ara^C und mit 0,2 mU Filter steril filtriert sein.
17. Die einzelnen Arbeitsgänge von der Tiernarkotisierung bis zur Aussetzung und Kultivierung der Oligodendrozytenzellen sollten so zügig wie möglich durchgeführt werden.