

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Versuchstiere

Alle in Verbindung mit dieser Studie geplanten *in vivo* Experimente sind gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung unter dem Titel „Pathobiologie und pharmakologische Modulation der ZIA“ (**Projekt-Nummer G 0378/94 / TVV 31/91/** ) an der Charité Berlin, Campus Virchow Klinikum, angemeldet und genehmigt worden. Für die Versuche sind ausschließlich syngene, 6 bis 8 Wochen alte, weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6 aus der Charles River-Zuchtanstalt (Sulzfeld, Deutschland) mit einem Durchschnittsgewicht von 20 bis 23 Gramm verwendet worden. Die Tiere wurden in Gemeinschaftskäfigen in den Räumen des Tierversuchshauses untergebracht. Gruppen von maximal bis zu 10 Tieren wurden pro Käfig gehalten. Naturähnliche Lebensbedingungen wurden durch Lichtperioden von 12 Stunden und klimatisierte Haltung gewährleistet. Die Tiere sind mit Wasser und Alleindiät für Mäuse *ad libitum* versorgt worden.

## **3.2 Haarzyklusmanipulation *in vivo***

### **3.2.1 Anageninduktion durch Depilation**

Das C57BL/6 Mausmodell ermöglicht die Synchronisation des Haarwuchses durch Depilation der Rückenhaut während der ersten postnatalen Telogenphase 6 bis 8 Wochen nach der Geburt (Paus *et al.* 1989). Aus diesem Grund wurden nur Tiere mit einwandfreier Telogenhaut ausgesucht. Durch Narkose mittels Injektion von 0.2 ml einer Injektionslösung aus 1 Teil (50 mg/ml) „Ketanest“ (Park-Davis, Berlin, Deutschland), 1 Teil „Rompun“ 2% und 8 Teilen Wasser *Aqua dest.* für Injektionszwecke wurden die Tiere ruhig gestellt.

Für die Entfernung der Haarschäfte (Depilation) wurden Bienenwachs (Aldrich, Chemical Comp Inc., Milwaukee, USA) und Harz (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) nach Einwiegen in gleichen Gewichtsanteilen gemischt und durch Erhitzen auf 40 – 45° C geschmolzen. In der Substanz wurde mittels Thermostat eine konstante Temperatur von ca. 35° C gehalten. Die Mischung wurde mit einem Metallspatel (Carl Roth, GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) als gleichmäßige Schicht auf die Rückenhaut der Tiere aufgetragen. Die Harzmasse verhärtete ca. 3 bis 5 Minuten nach dem Auftragen und wurde manuell mitsamt den Haarschäften von kaudal nach kranial entfernt. Angestrebt wurde eine breitflächige, verletzungsfreie Enthaarung des gesamten Rückens und der Flanken, nach welcher die Rückenpartien homogen samtrosig erscheinen (Paus *et al.* 1989). Der Tag der Depilation wurde als Tag 0 des neu gestarteten Experiments dokumentiert. Tiere mit leichten Hautverbrennungen, oberflächlichen Verletzungen oder unzureichender Depilation wurden aus dem Experiment als nicht tauglich ausgeschlossen.

### **3.2.2 Induktion von Katagen und ZIA durch Cyclophosphamid: Behandlungsschema**

Für die Versuchsreihe wurde an ruhig gestellten Mäusen (Äther, Inhalationsnarkose) am Tag 9 nach der Depilation 150 mg/kg Körpergewicht CYP (Endoxan, Asta Medica, Deutschland), gelöst in 0.2 ml (200 µl) Injektionslösung als einmalige intraperitoneale Injektion verabreicht. Diese experimentelle Dosis wurde anhand von Pilotstudien mit unterschiedlichen CYP-Konzentrationen aufgrund des ausgeprägten Haarausfalls gewählt. Sie liegt deutlich unter der letalen Dosis LD<sub>50</sub> für Mäuse von 275 mg/kg (Wheeler *et al.* 1962). Unmittelbar vor der Applikation wurde CYP als Trockenpulver frisch in *Aqua dest.* für Injektionszwecke aufgelöst, und als 0.2 ml (200 µl) Injektionslösung i.p. injiziert. Für das Studium der Histopathologie der

ZIA wurden Tiere an den Tagen 11, 12, 13, 14 und 15 p.d. getötet. In Langzeitstudien wurde die Wiederherstellung des Fells zusätzlich bis zum Tag 30 nach der Depilation kontrolliert (**Abb. 10**).

### **3.2.3 Katageninhibition und Haarausfallprävention durch CsA: Behandlungsschema**

Für die Untersuchung der Auswirkung des IPL CsA (Sandimmun, Sandoz Pharma, Basel, Schweiz) auf Haarzyklus und ZIA wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in Kapitel 3.2.2 verwendet. Zusätzlich zu der CYP-Gabe am Tag 9 p.d. wurde den ruhig gestellten Mäusen (Äther, Inhalationsnarkose) an den Tagen 7, 9 und 11 nach der Depilation der IPL CsA als einmalige Tagesdosis von 250 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 0.5 ml (500 µl) Keimöl, als intraperitoneale Injektion verabreicht (**Abb. 10**).



### **3.3 Histologische Techniken**

#### **3.3.1 Technik der Hautentnahme, Präparation und Fixation**

Die Versuchstiere wurden mittels zervikaler Dislokation manuell getötet. Die Haarschäfte der gesamten Rückenhaut wurden vorsichtig mit dem Kleintierscherapparat (*Eickenmeyer*, Tuttlingen, Deutschland) abrasiert. Dieser Schritt erleichtert die Fertigung von Hautschnitten. Während der Rasur wurde darauf geachtet, die Hautoberfläche nicht zu verletzen. Mittels Anatomieschere (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde die glatt rasierte Haut nahe des Schwanzansatzes perforiert. Mit anatomischer Pinzette (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Schere wurde die gesamte Rückenhaut proximal des *Panniculus carnosus* in der Subkutis stumpf freipräpariert. Die sorgfältig abgetrennte Rückenhaut wurde faltenfrei auf Karton aufgespannt, um unerwünschte Schrumpfung zu vermeiden. Das freipräparierte Gewebe wurde mit 5 % PBS-gepuffertem Formalin (pH 7,4) (Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland) für weitere Paraffineinbettung konserviert.

#### **3.3.2 Herstellung von Paraffinschnitten**

Mit dem Skalpell (Nr. 21, Feather pfm GmbH, Köln, Deutschland) wurde die Haut vom Nacken bis zum Schwanzansatz entlang der Paravertebrallinie geschnitten. Gefertigt wurden mehrere 1 cm lange und 0.2 bis 0.4 cm breite, aufeinander folgende Hautstückchen. Das Hautgewebe wurde sofort für mindestens 24 Stunden in 5 % PBS-gepuffertem Formalin (pH 7.4) (Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur gelagert. Fixierte Hautpräparate wurden nach der Passage in einer standardisierten Alkoholreihe im Färbeautomat (Citadell 2000, Shandon Southern Products, Astmore, Großbritannien) in Paraffin (Jung-Histiowax, Cambridge Instruments GmbH, Nusloch, Großbritannien) eingebettet. Der Vorgang des Einbettens erfolgte manuell an einem Einbettautomaten (Histostat, Reichert Scientific Instruments, Deutschland). An einem Schlittenmikrotom (Reichert Jung, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden mehrere 4 bis 6  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte von jedem Block geschnitten, auf vorbereitete Objektträger aufgezogen und bei 34° C Lufttemperatur getrocknet.

### 3.3.3 Giemsa-Färbung

Die Objektträger mit aufgezogenen Hautschnitten wurden bei 37° C getrocknet und mit einer Färbung nach Giemsa in mehreren Schritten gefärbt (Romeis, 1989). Die Schnitte wurden in Giemsalösung (Merck, Darmstadt, Deutschland), 1:10 verdünnter Natrium-Borat-Lösung (Sigma Chemie, Deutschland), 30 bis 60 min inkubiert. Danach erfolgte eine Spülung mit *Aqua dest.* Nach mikroskopischer Kontrolle und Differenzierung mit 0.2 % Essigsäure wurde wiederholt mit *Aqua dest.* gewaschen. Eine nachfolgende aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung beendete die Färbung. Fertige Objektträger wurden mit Vitracemid (Vitroclud) zur Mikroskopie eingedeckelt.

### **3.4 Immunhistochemische Techniken**

#### **3.4.1 Technik der Hautentnahme, Präparation und Fixation**

Hautstreifen aus dem paravertebralen Rückenbereich (ca. 1 x 0.4 cm) wurden mittels Skalpell entlang des makroskopisch sichtbaren Verlaufs der HF-Linien geschnitten. In weiteren Schritten wurde die Haut mit Einbettmedium (GSV, SLEE Technik GmbH, Mainz, Deutschland) sorgfältig nach der Hoffmans-Technik (Müller-Rover et al. 2001) bedeckt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach wiederholter Deckung mit Einbettmedium wurde die Haut im letzten Schritt eingefroren. Die Blöcke mit der eingebetteten Haut wurden im Spezialkühlschrank bei -80° C gelagert.

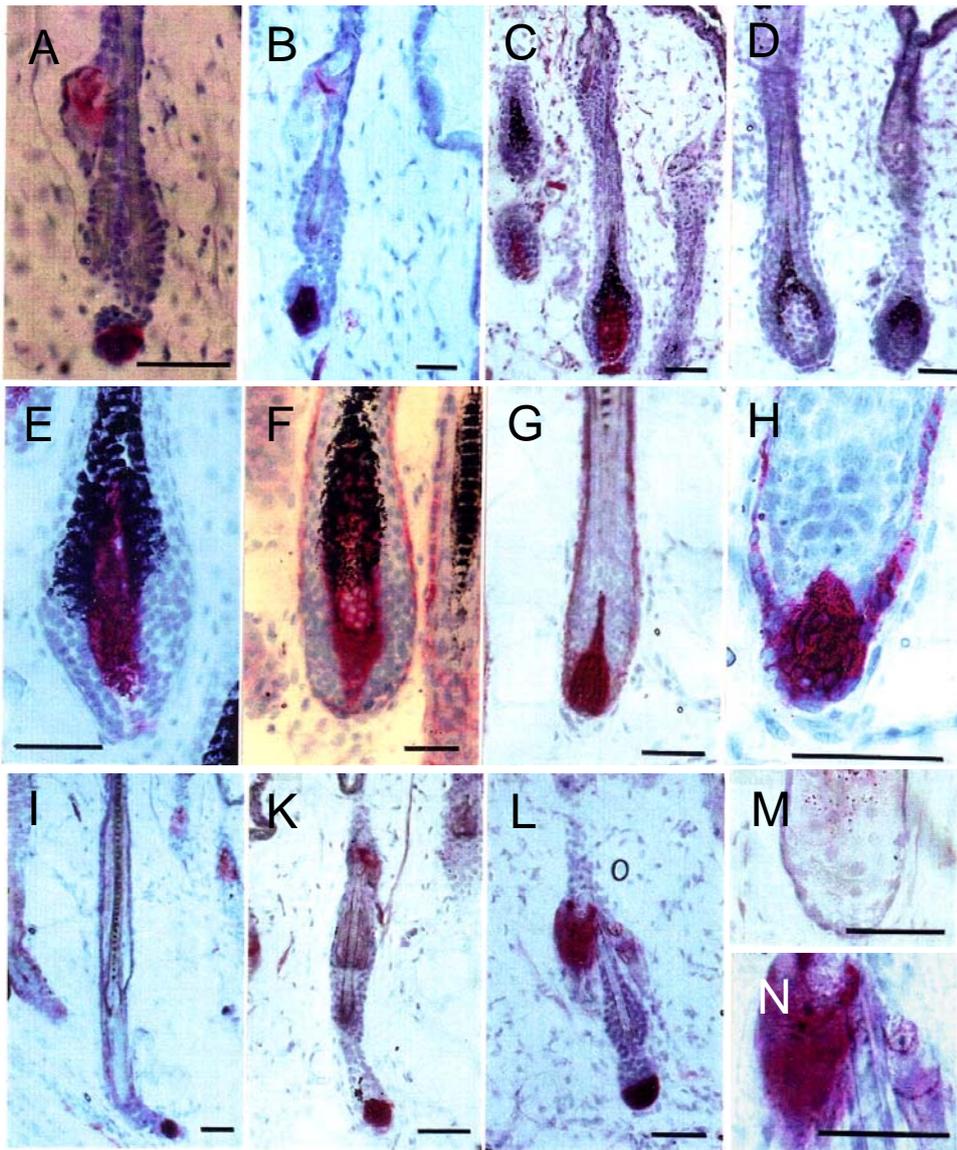
#### **3.4.2 Herstellung von Kryoschnitten**

Für die immunhistologische Färbung wurden 8 bis 9 µm dünne Hautschnitte mittels Mikrotom-Kryostat HM 500-OM (MICROM Laborgeräte, GmbH, Waldorf, Deutschland) gefertigt und auf mit Poly-Lysine (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) beschichtete Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden luftgetrocknet im Tiefkühlschrank bei -20° C gelagert (Romeis, 1989).

#### **3.4.3 Modifizierte APAAP-Technik zur Darstellung der Alkalische-Phosphatase-Aktivität**

Die Technik für den Nachweis des Enzyms Alkalische Phosphatase (AP) stellt eine Modifikation der konventionellen immunhistochemischen APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) dar (Romeis, 1989). Die Färbung wiederholt die Grundschritte der standardisierten APAAP-Färbung wie folgt: Kryostat-gefertigte Schnitte werden 10 min. lang in Aceton (Merck Chemie, Darmstadt) fixiert und danach 15 min lang in Entwicklungslösung (Standardlösung, Sigma Chemie) inkubiert. Neue Färbelösung wird extra mit TRIS-HCl Pufferlösung und 2-Amino-2-Methyl-1.3-Propanediol (Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Danach werden 300 µl einer New Fuchsin Stammlösung (0.1 mM g/l) (Chroma, Stuttgart, Deutschland) in einer Lösung (0.03 g konzentrierte Natrium-Nitrite in 750 ml *Aqua dest.*) langsam aufgelöst. Die frische Lösung wird mit TRIS-Puffer, zusammen mit 0.075 g Naphtol-AS-Bi-Phosphatic Acid gelöst und zu 900 µl N-Dimethylformamide hinzugefügt (pH 8.8). Nach Filtration wird die Färbelösung unmittelbar verwendet. Nach der APAAP-Technik blockiert die protokollgetreue

Zugabe von „Levamisol“ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) das Enzym AP. Erst das Weglassen von „Levamisol“ ermöglicht eine Begutachtung des Enzyms innerhalb der Haut (Handjiski *et al.* 1994). Die gefärbten Hautschnitte wurden in weiteren Schritten mit Maiers Haemalaun Lösung und mit Kaisers Glyceringelatine bedeckt. Unter dem Lichtmikroskop wurde das Enzym AP als kräftige rote Markierung in der Haut und innerhalb der HF nachgewiesen (**Abb. 11**).



**Abb. 11** Darstellung der AP in der DP während des Haarzyklus. Die starke endogene Aktivität des Enzyms in der DP ermöglicht die kontrastreiche Darstellung ihrer Konturen und erleichtert die Analyse der HF während der einzelnen Phasen der HF-Transformation. A) Telogen, B) Anagen II, C) Anagen III, D) negative Kontrolle, E) Anagen V, F) Anagen VI, G) Katagen 3, H) Katagen 4, I/K) Katagen 6, L) Anagen I, M) Talgdrüse, Negativkontrolle, N) AP+ Talgdrüse. Die intensive Färbung der DP bleibt während der Anagen-, Katagen- und Telogenphasen des Haarzyklus unverändert und kann erfolgreich zur HF-Differenzierung verwendet werden (nach Handjiski *et al.* 1994).

### 3.5 Makroskopische Untersuchung und Photodokumentation

Für alle Tiere der ZIA-Versuchsreihen wurde ab Tag 9 p.d. täglich die gesamte Rückenhaut unter ausreichenden Lichtbedingungen makroskopisch untersucht. Nach der Ruhigstellung der Tiere mit Ketanest (Ketanest, Park Davis, Berlin, Deutschland) wurde sowohl auf eine Veränderung des Hautkolorits als auch auf Zeichen des Haarausfalls geachtet. Ein plötzliches Ergrauen der Haut oder eine Änderung der Hautfarbe von schwarz/grau (zyanidblau) zu rosa gelten als Zeichen für die Reduktion des Pigmentgehalts während der Katagentransformation, für Pigmentstörungen (Pigmentinkontinenz) sowie als ein Indiz für fortschreitende HF-Dystrophie. Die Inspektion wurde sorgfältig durchgeführt, weil ein vorzeitiger Übergang ins Katagen sowie ein diskreter Haarausfall bereits wenige Tage nach der CYP-Gabe (Tag 12 p.d.) auftreten kann.

Eine kartographische Darstellung der Progression der Farbumstellung und der Alopezie wurde täglich gezeichnet. Die Tierversuche wurden erst dann abgebrochen, wenn bei der Mehrzahl der Mäuse eine breitflächige ZIA und/oder Änderung der Rückenhautfarbe in Richtung zyanidblau oder rosa festgestellt wurde (in der Regel um Tag 14/15 p.d.). Einige Tiere wurden im Rahmen einer Langzeitstudie bis zu 30 Tage p.d. weiter beobachtet. Damit wurden die Schritte bis zur kompletten Wiederherstellung des Haarfalls und dessen Qualität kontrolliert. Sowohl die dafür erforderliche Zeit als auch die Farbe der nachgewachsenen Haarschäfte wurden schriftlich und photographisch dokumentiert.

Alle makroskopischen Aufnahmen wurden mit einer Spiegelreflexkamera „Minolta“ (Minolta, Osaka, Japan) auf einem entsprechendem Stativ für diese Kamera angefertigt. Für Dokumentation wurden Filme der Marke Kodak (Kodak, Stuttgart, Deutschland) von 100 und 160 Asa verwendet.

### 3.6 Histomorphometrie

Die Grunduntersuchungen wurden anhand routinehistologischer, Giemsa-gefärbter Hautschnitte durchgeführt. Die Anagen-, Katagen- und Telogeneinheiten sowie die HF mit HF-Dystrophie wurden qualitativ nach etablierten Kriterien eingeordnet (Müller-Röver *et al.* 2001, Hendrix *et al.* 2005), welche die Basiskriterien für normale und dystroph veränderte HF einschließen (Braun-Falco, 1961a, Straile *et al.* 1961). Mindestens 50 HF pro Area (L1-L5) und insgesamt mehr als 250 gut geschnittene HF der gesamten Rücken- und Flankenhaut je Maus wurden entlang der Paravertebrallinie und der Flanken untersucht und differenziert.

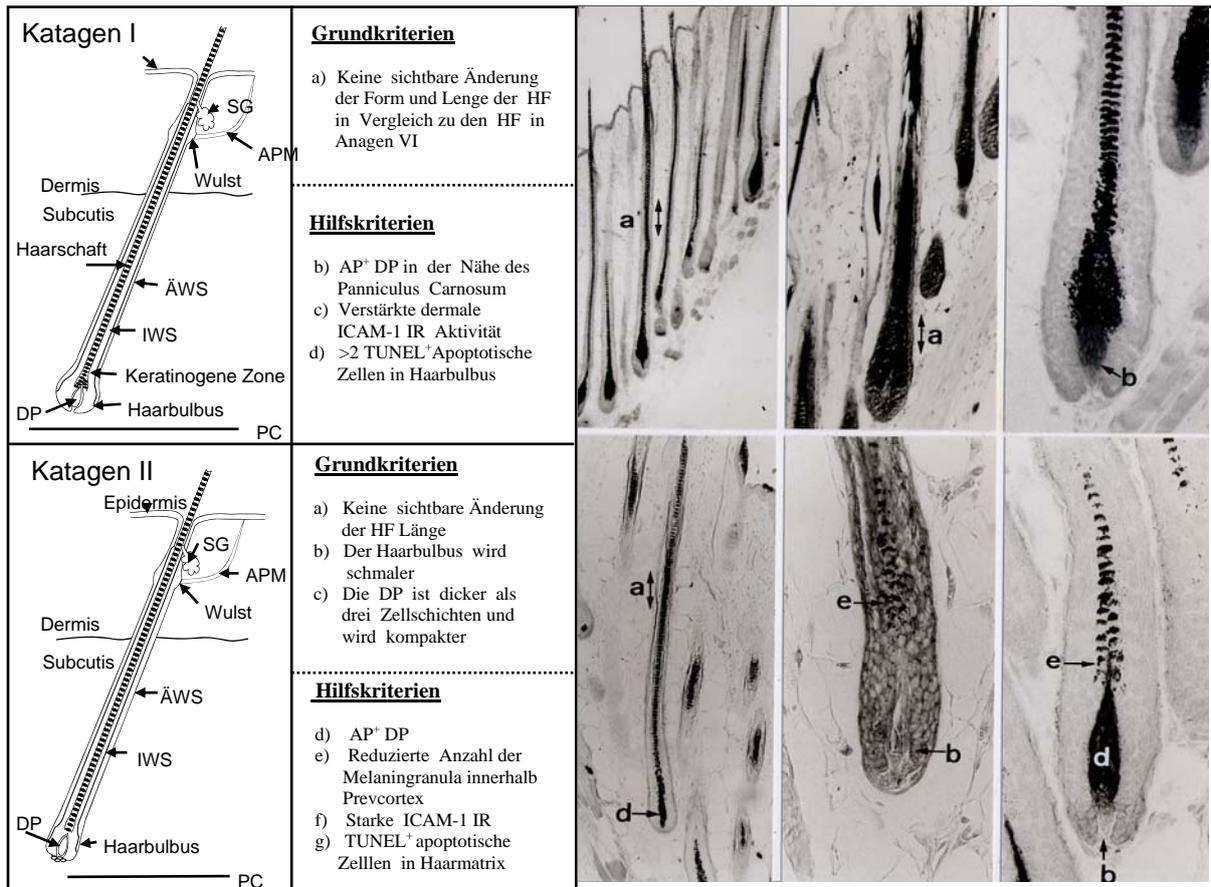
Da die AP-Färbung für die HF-Differenzierung erst nach dem Abschluss der ZIA-Histomorphometrie etabliert wurde, wurde diese Färbung ausschließlich für die Erstellung der Aushilfskriterien der ZIA-Score (**Kapitel 6.5**) verwendet. Sie erleichtert die Klassifikation der dystrophen HF-Stadien, wenn die Erkennung der DP durch Melanininkontinenz und Clumping maskiert ist (Müller-Röver *et al.* 2001, Hendrix *et al.* 2005).

#### 3.6.1 Technik der Lichtmikroskopie. Technische Ausrüstung

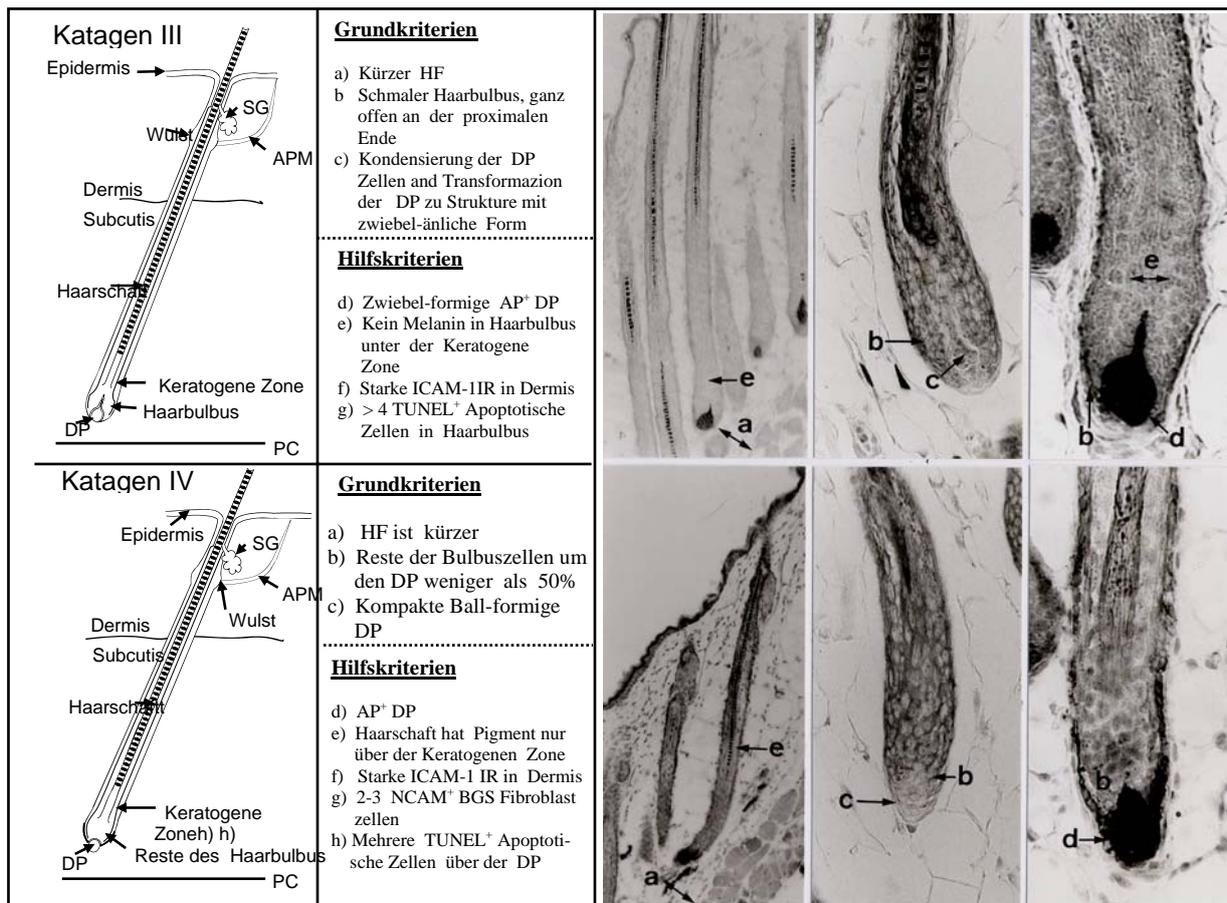
Für histomorphometrische Analysen wurde das Lichtmikroskop „Zeiss Axiophot“ (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Hautschnitte wurden systematisch untersucht und die HF nach bereits etablierten Kriterien differenziert (**Abb. 12**). Die Fotoaufsatzkameras „Minolta“ (Minolta, Osaka, Japan) und „AxioCam HRc“ (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) sind zur photographischen Dokumentation benutzt worden. Sie gehören zur Standardausrüstung des Mikroskops. Für die Schwarzweiß- und Farbbilder wurden Filme der Marke Kodak (Kodak, Stuttgart, Deutschland) 100/160 Asa benutzt. Sämtliche HF-Untersuchungen und Hautaufnahmen wurden unter 10 x 20- und 10 x 40facher Vergrößerung durchgeführt. Die Übersichtsvergrößerung mit 10 x 100-facher Magnifikation wurde selten zur Analyse gebraucht, um Fehler bei der Differenzierung einzelner Zyklusphasen zu vermeiden.

#### 3.6.2 Kriterien für die Haarfollikelanalyse

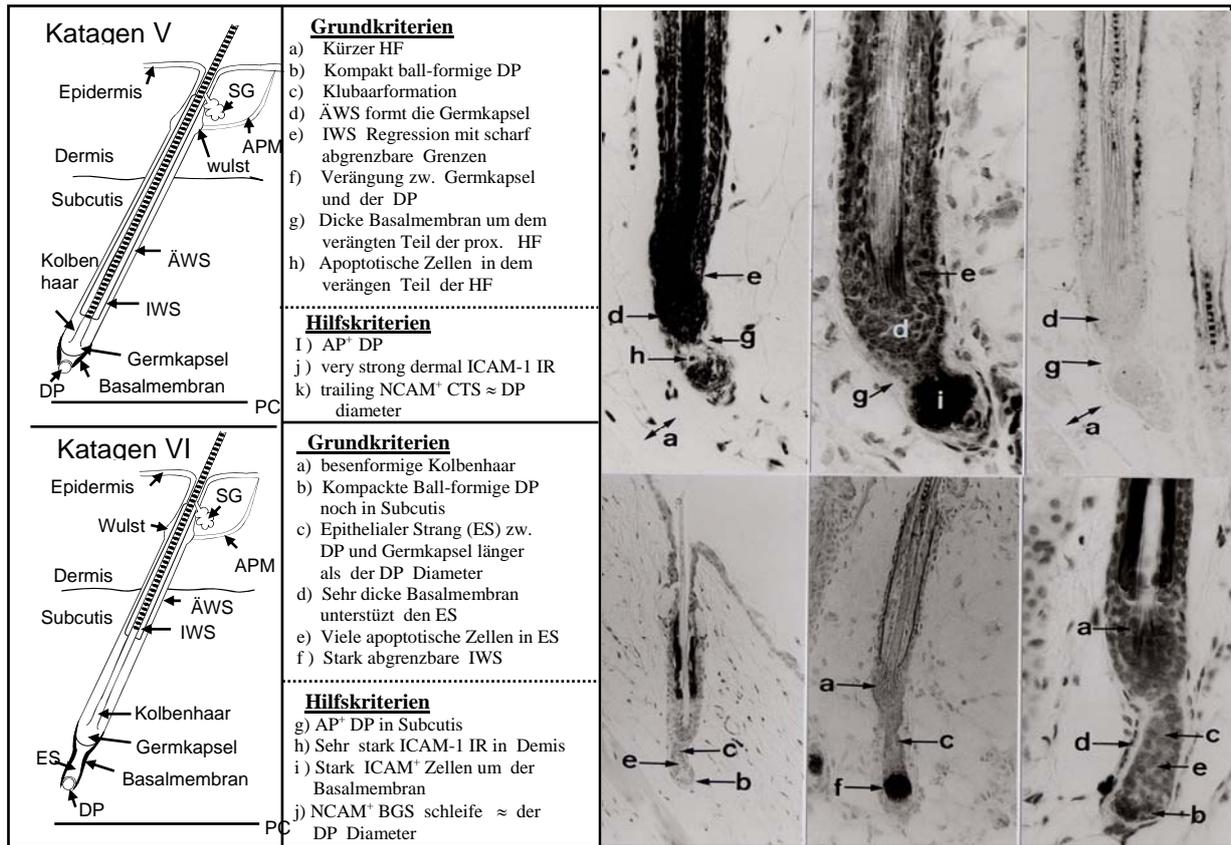
Für die Einordnung der HF zu den Anagen-, Katagen- und Telogen-Stadien des Haarzyklus wurden bereits etablierte Kriterien nach Straile *et al.* verwendet (Straile *et al.* 1961, Müller-Röver *et al.* 2001) (**Abb. 12**).



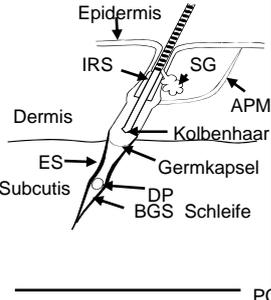
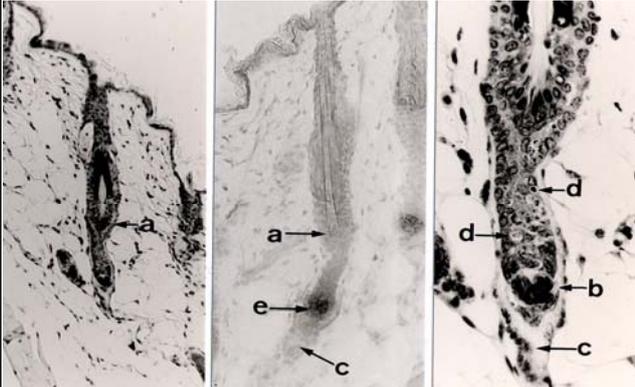
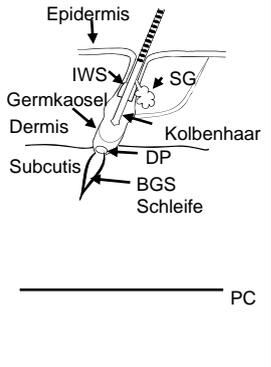
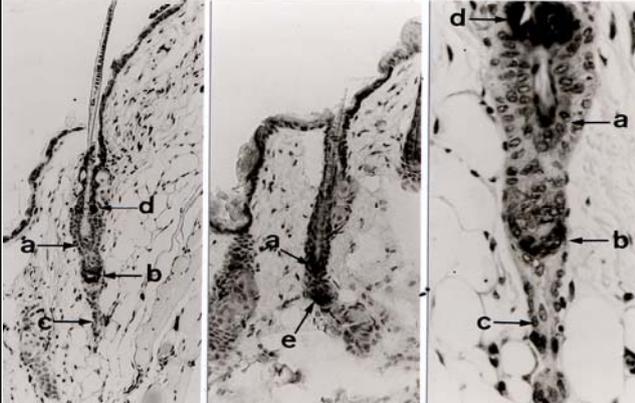
**Abb. 12 A - E** Kriterien zur HF-Differenzierung während der Anagen VI-Katagen-Transformation (nach Müller-Rover *et al.* 2001). **A)** Kriterien für HF in der Katagenphase 1, obere Reihe, und Katagenphase 2, untere Reihe.



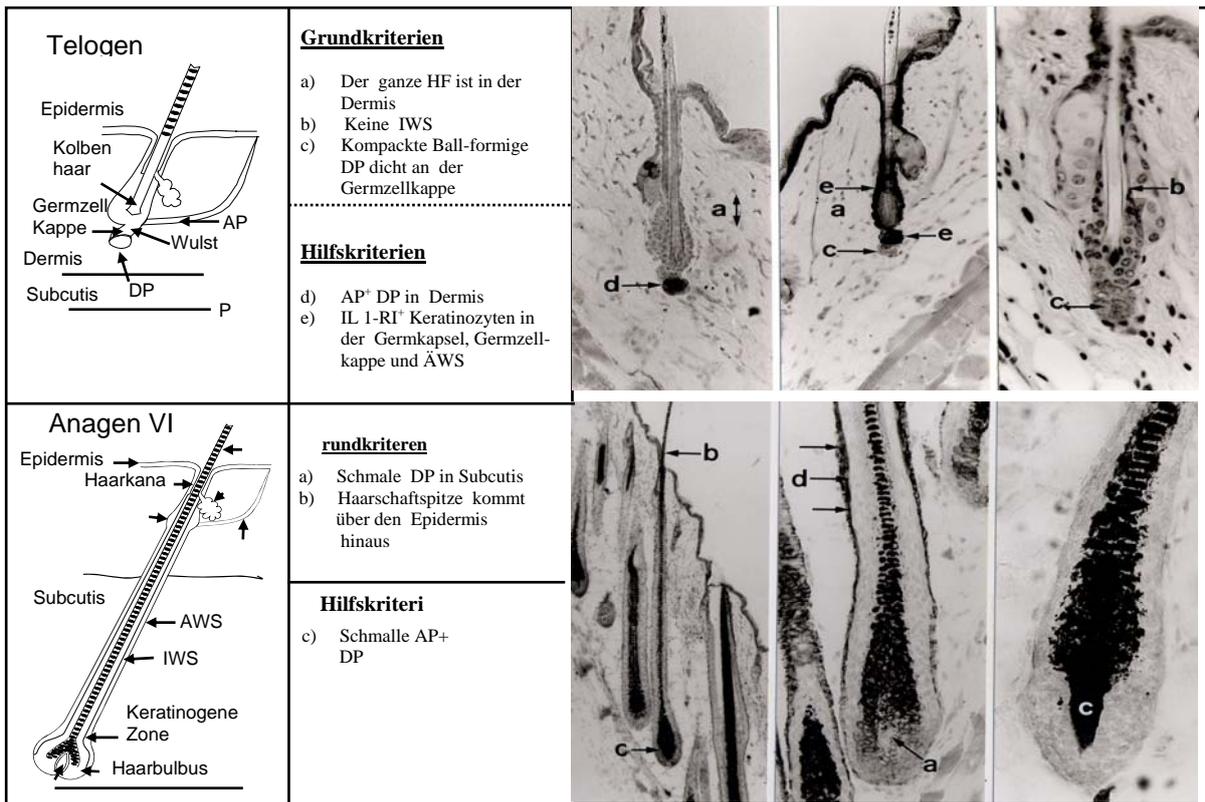
**B) Kriterien für HF in Katagenphase 3, obere Reihe, und in Katagenphase 4, untere Reihe.**



C) Kriterien für HF in der Katagenphase 5, obere Reihe, und Katagenphase 6, untere Reihe.

<p><b>Katagen VII</b></p> 	<p><b>Grundkriterien</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Der komplett keratinisierte Kolbenhaar und die Germkapsel sind schon in Dermis</li> <li>Epitheliale Strang (ES) ist länger als DP Diameter</li> <li>Prominente BGS Schleife hinter der DP in Subcutis</li> <li>Viele apoptotische Zellen in in der ES</li> </ol> <hr/> <p><b>Hilfskriterien</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>AP<sup>+</sup> DP mit BGS Schleife in Subcutis</li> <li>NCAM<sup>+</sup> CTS Schleife &gt;2 länger als DP Diameter</li> </ol>	
<p><b>Katagen VIII</b></p> 	<p><b>Grundkriterien</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Germkapsel und Kolbenhaar in Dermis</li> <li>DP an der Grenzé Dermis/Subcutis</li> <li>BGS Schleife mit Basalmembran in Subcutis</li> <li>Reste der IWS dicht an der Level der SG</li> </ol> <hr/> <p><b>Hilfskriterien</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>AP<sup>+</sup> DP an der Grenzé Dermis/Subcutis</li> <li>NCAM<sup>+</sup> BGS Schleife &gt;3 mal länger als DP Diameter</li> </ol>	

**D) Kriterien für HF in Katagen 7, obere Reihe und in Katagen 8, untere Reihe**



E) Kriterien für HF im Telogen, obere Reihe, und im Anagen VI, untere Reihe.

Für die histomorphometrische Analyse der ZIA wurden Kriterien zur Differenzierung herangezogen, die die Grundkriterien für die Erkennung der normalen Anagen-, Katagen und Telogen-HF (Straile *et al.* 1961) und die bis zum Jahr 1995 gebräuchlichen Grundcharakteristika für HF-Dystrophie (Braun-Falco, 1961a,) zusammenfassen (Kapitel 6.5). Nach diesen Kriterien wurden die dystrophen HF allgemein zwei Grundgruppen zugeordnet: dystrophe Anagen VI-HF und dystrophe Katagen-HF.

## 3.7 Elektronenmikroskopie

### 3.7.1 Technik der Hautentnahme: Präparation, Fixation und Herstellung der Ultradünnschnitte

Die Rückenhaut von repräsentativen Tieren mit ausgeprägter ZIA wurde im Labor der Charité, Campus Virchow Klinikum, nach bereits beschriebenem Muster freipräpariert (Kapitel 4.3.1.1). Das Gewebe wurde mit 2.5% Glutaraldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer bei pH 7.4 und 4°C vorfixiert. Danach wurden die Proben mehrmals in Cacodylatpuffer mit 5% Saccharose bei 4°C gewaschen. Die Nachfixation wurde mit 1-2% OsO<sub>4</sub> (Osmium Tetraoxid, S.E.R.V.A GmbH, Heidelberg, Deutschland) in 0.15 M Cacodylatpuffer (400-450 mOsm) bei pH 7.4 und 4°C für etwa 2 Stunden durchgeführt. Die Haut wurde in Araldit (S.E.R.V.A GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingebettet und gelagert. Weiterhin wurden die Kunststoffblöcke zu Pyramiden mit trapezförmiger Grundfläche getrimmt. Die Anschnittfläche (ebenfalls trapezförmig) sollte ca. 0.3 - 0.8 mm<sup>2</sup> betragen. Ultradünnschnitte von 70 nm Dicke wurden mittels Ultramikrotom (Reichert Jung, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) gefertigt und mit Uranylacetat (0.5 bis 6%) (S.E.R.V.A GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Bleinitrat (Leica, Microsysteme, Deutschland), bekannt als Kontrastieren nach Reynolds, für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Die Untersuchung wurde mittels Elektronenmikroskop (Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt. Weitere Semidünnschnitte (> 100 nm) von 0.5 µm Dicke wurden geschnitten und mit Methyleneblau zur Lichtmikroskopie gefärbt.

#### 4 STATISTISCHE ANALYSEN

Für die statistischen Datenanalysen, einschließlich der Bestimmung der Signifikanz der histomorphometrischen Daten, sind die folgenden statistischen Methoden und Tests (Sachs, 1992) verwendet worden:

1. Datenverarbeitung für relative Ergebnisse ( $p = \arcsin(\text{square-root} / p)$ )
2. Friedman two-way-Analyse für normale Veränderungen für die Testung der Unterschiede zwischen unterschiedlichen Regionen.
3. Levene-Test für die Untersuchung der Homogenität der Veränderungen.
4. Kruskal-Wallis-Test zur Analyse der Signifikanz zwischen den verschiedenen Testgruppen.
5. Mann-Whitney, Wilcoxon ranksum Test für die Kalkulation der P-values.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit / *probability value*  $p < 0.05$  wurde als signifikant,  $p < 0.01 / 0.001$  als hoch signifikant angesehen. Alle durchgeführten statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für statistische Analysen angefertigt.

## 5 MATERIALIEN, REAGENZIEN UND GERÄTE

### 5.1 Pharmaka

Cyclophosphamid	(Endoxan, Asta Medica, Frankfurt, Deutschland)
Cyclosporin A	(Sandimmun, Sandoz Pharma, Basel, Schweiz)
Ketanest	(Park-Davis, Berlin, Deutschland)
Rompun	(Bayer, Leverkusen, Deutschland)

## 5.2 Reagenzien

Äther zur Inhalationsnarkose	(Hoechst AG, Frankfurt, Deutschland)
Ketaminhydrochlorid 10 %	(Ketanest, Parke-Davis, Berlin, Deutschland)
Bienenwachs	(Aldrich Chemical Comp. Inc., Milwaukee, USA)
Harz	(Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
Keimöl	(Mazola, Maizena, Deutschland)
Aqua. dest.	(Apotheke der Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, Deutschland)
Giemsa	(Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland)
NaCl 0.9 %	(Braun Melsungen AG, Nürnberg, Deutschland)
Einbettmedium	(GSV, SLEE , Technik GmbH, Mainz, Deutschland)
Flüssiger Stickstoff	(Apotheke der Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, Deutschland)
PBS	(Gibco, Eggstein, Deutschland)
Poly-Lysine-Aceton	(Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
Acetone	(Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland)
Standardlösung für Inkubation	(Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
TRIS-HCL Pufferlösung	(Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
2-Amino-2-Methyl-1.3-Propandiol	(Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland)
New Fuxin Stammlösung	(Chroma, Stuttgart, Deutschland)
Sodium Nitrite	(Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
Naphtol-AS-Bi-Phosphatic Acid	(Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
N-Dimethylformamide	(Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland)
Mayers Hemalaun	(Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
Osmium Tetroxid	(S.E.R.V.A GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Araldit	(S.E.R.V.A GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Methylenblau	(Merck Chemie, Darmstadt, Deutschland)
Uranylazetat	(S.E.R.V.A GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Bleinitrat	(Leica, Microsysteme, Deutschland)

### 5.3 Laborgeräte

Kleintierscherapparat	(Eickemeyer, Tüttlingen, Deutschland)
Entwässerungsautomat	(Citadell 2000, Shandon Southern Products, Astmore, Großbritannien)
Färbeautomat	(Citadell 2000, Shandon Southern Products, Astmore, Großbritannien)
Einbettautomat	(Jung-Histowax, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
Schlittenmicrotom	(Reichert Jung, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
Mikrotom-Kryostat-HM 500 OM	(MICROM Laborgeräte GmbH, Waldorf, Deutschland)
LKB Ultratom	(Reichert Jung, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
Elektronenmikroskop	(Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande)
Lichtmikroskop <i>Axiophot</i> mit	(Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Kamera „Minolta“	(Minolta, Osaka, Japan)
Kamera „AxioCam HRC“	(Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

## 5.4 Instrumentarium

Anatomische Schere und Pinzetten

(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Metallspatel für Depilation

(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Spritzen zur Injektion

(Braun Melsungen AG, Deutschland)

Kanülen Nr.3

(Becton Dickinson GmbH, Deutschland)

Pinsel für topische Applikation

Skalpell Nr. 21

(Feather GmbH, Köln, Deutschland)