

II. Methoden

2.1. Versuchsablauf

Um die hämodynamischen Veränderungen und die Veränderungen im Zytokinmuster nach Herzinfarktinduktion beurteilen zu können, wurden 90 männliche Sprague-Dawley-Ratten randomisiert wie folgt in 12 Gruppen eingeteilt. Zu vier verschiedenen Auswertungszeitpunkten gibt es jeweils 3 Haupttiergruppen:

1. Schein-Operation (in den Grafiken „Sham“ genannt)
2. Infarkt-Operation mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung behandelt (in den Abbildungen „Co“, für „Kontrollinfarkt“, genannt)
3. Infarkt-Operation mit IL-2-FP behandelt (in den Abbildungen „IL-2“ genannt)

Die Tiere wurden 6 Stunden vor der Operation (OP) gewogen und es wurde in der IL-2-FP-Gruppe IL-2IgG2b in einer Dosis von 330 µg/kg intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Die Kontrollinfarkttiere erhielten zeitgleich dasselbe Volumen als 0,9 %-ige Kochsalzlösung ebenfalls i.p.

6 Stunden nach Herzinfarktinduktion erhielten alle Infarkttiere ihre zweite Dosis und von da an wieder alle 24 Stunden bis zu ihrer hämodynamischen Charakterisierung nach 6 Stunden, 24 Stunden, 6 Tagen bzw. 3 Wochen.

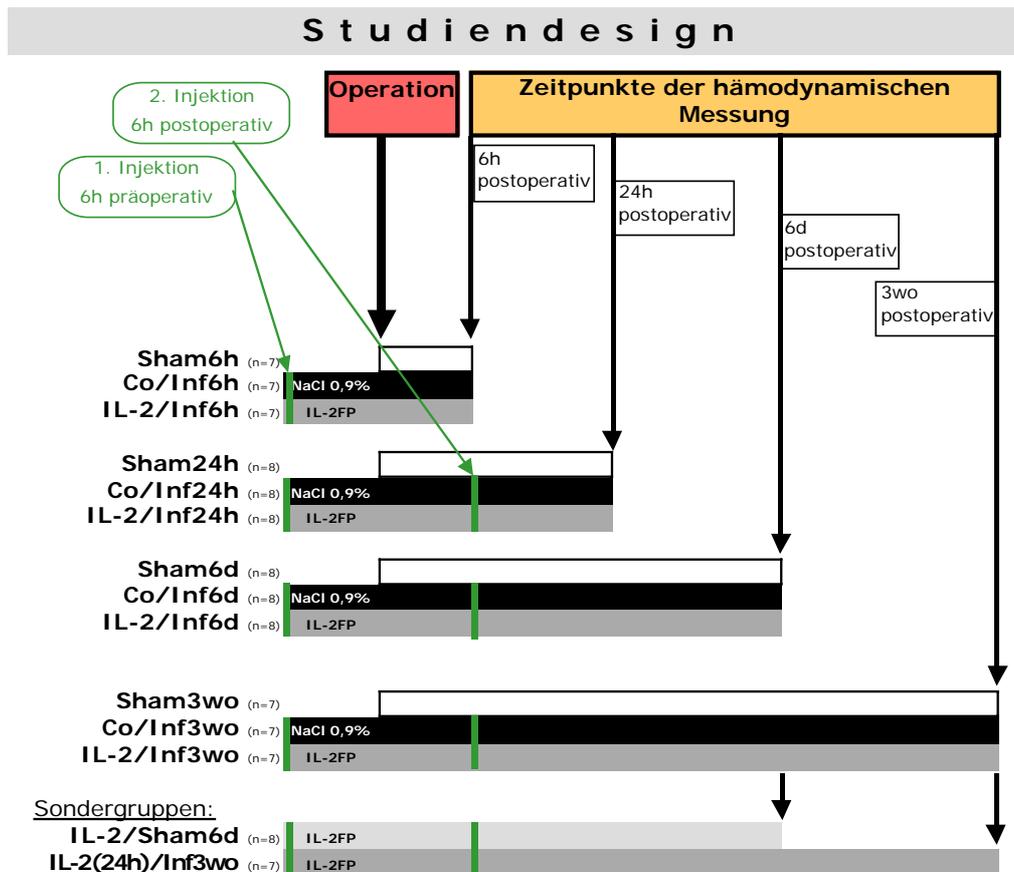
Die Tierbezeichnungen im Ergebnisteil erklären sich wie folgt:

Der erste Teil des Gruppennamens bezeichnet die Tiergruppe, der das entsprechende Tier angehört (scheinoperiert [=Sham], mit 0,9 %-NaCl behandelter Infarkt [=CO] oder mit IL-2-FP behandelter Infarkt [=IL-2]). Davon getrennt durch eine Schrägstrich bezeichnet der zweite Teil des Namens den Untersuchungszeitpunkt nach der Operation (z.B. bei Infarkten „Inf6h“ und bei einem scheinoperierten Tier nur „24h“).²

Im Rahmen einer Operation erhielten alle Tiere der Infarktgruppen einen Vorderwandinfarkt durch Abbinden des Ramus interventricularis anterior (RIVA).

Tiere der Schein-OP-Gruppen erhielten eine Fadenligatur ins Myokard allerdings neben den RIVA. Die Tiere

² Demnach trägt ein Kontrollinfarkttier, das 24 Stunden nach OP ausgewertet wurde die Bezeichnung „Co/Inf 24h“.

**Abb. 2.1**

Das Gesamtstudiendesign im Überblick. Aufbau im Sinne eines Zeitstrahls. Zur besseren Übersicht wurden von allen Applikationszeitpunkten nur die ersten beiden dargestellt (grüne Balken). Die Sham-Gruppen erhielten keine Applikationen. (Sham = scheinoperiertes Tier, Inf = Infarkttier, h = Stunden, d = Tage, wo = Woche, n= Anzahl)

wurden dann zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (6 Stunden, 24 Stunden, 6 Tage, 3 Wochen) hämodynamisch untersucht, um so die Auswirkungen der Behandlung auf das Rattenherz in den vier Phasen nach dem Myokardinfarkt zu beobachten. Sie spiegeln die typischen Zeitpunkte der Wundheilungsphasen wider: exsudative Phase (6 Stunden nach MI), inflammatorische Phase (24 Stunden nach MI), proliferative Phase (6 Tage nach MI) und reparative Phase (3 Wochen nach MI).

Zusätzlich wurde noch eine Gruppe (n=7) gebildet, die nur für 24 Stunden nach Myokardinfarkt (MI) Induktion mit IL-2-FP behandelt worden ist und 3 Wochen nach Infarktinduktion analysiert wurde. Eine weitere Gruppe (n=8) wurde außerdem über 6 Tage mit dem Fusionsprotein behandelt, aber nur scheinoperiert.

Zur Untersuchung zählt die hämodynamische Charakterisierung sowie die anschließende Entnahme des Herzens zu weiteren histologischen und immunhistologischen Untersuchungen.

2.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (SD) verwendet (Tierversuchsantrag-Nr.: G0324). Die Tiere wurden in Standardkäfigen in klimatisierten Stallräumen (Temperatur 20 °C, Luftfeuchte: ~30 %) gehalten und hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Über eine Zeitschaltuhr wurden sie Licht, einer circadianen Rhythmik entsprechend, ausgesetzt. Das OP-Gewicht lag zwischen 300-350 g, was einem Alter von ungefähr 9-10 Wochen entspricht.

2.3. Operationen

2.3.1 Anästhesie

Die Narkose der Tiere wurde mit Ketamin (Ketanest®, 50 mg/kg, i.p.) und Xylanzin (Rompun® 2%, 5 mg/kg, i.p.) durchgeführt. Durch Überprüfen der Reaktion auf Schmerzreize wurde die Narkosetiefe kontrolliert. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert, um Wärmeverluste während der Operation auszugleichen, und mittels einer 18 G Venenverweilkanüle intubiert. Durch Anschließen an ein Beatmungssystem wurde eine suffiziente Belüftung der Lungen während der OP gewährleistet. Die Narkosedauer (ca. 40 Minuten) reichte für die gesamte Operationsdauer (ca. 25 Minuten) aus, sodass zu keiner Zeit nachdosiert werden musste.

Die Operationen erfolgte gemäß TSCHOPE et al. [107] und SPILLMANN et al. [108].

2.3.2. Infarkt-OP

Nach Rasur des äußeren, vorderen Thorax und anschließend eingehender Hautdesinfektion mit einer Polyvidon-Iod-Propanol-Lösung für mindestens 3 Minuten, wurden etwa 3 mm links lateral des Sternums nacheinander erst das Fell und dann der M. pectoralis major durchtrennt. Der thorakale Teil des M. rectus abdominis wurde vorsichtig nach lateral mobilisiert, um so den Zugang zu den Rippen zu ermöglichen. Die 2. und 3. Rippe wurden durchtrennt und die beiden Thoraxhälften durch einen Wundspreizer auseinander gedrängt. Das Perikard wurde eröffnet und herzbasiswärts abgezogen. Nach vorsichtigem Anheben des linken Herzohres und Mobilisierung des Herzens nach rechts, wurde der RIVA sichtbar, dann proximal umstochen und durch eine Fadenligatur (Faden: 6/0 nicht resorbierbar) abgebunden. Eine erfolgreiche Okklusion des RIVA ist sofort durch eine Verblässen des distal der Ligatur gelegenen Myokards erkennbar. So ist bereits intraoperativ der Erfolg oder Misserfolg einer Ligatur beurteilbar und gegebenenfalls korrigierbar. Anschließend wurde der Thorax mit 3 Knopfnähten (Faden: 2/0, nicht resorbierbar) unter Überdruckbeatmung verschlossen.

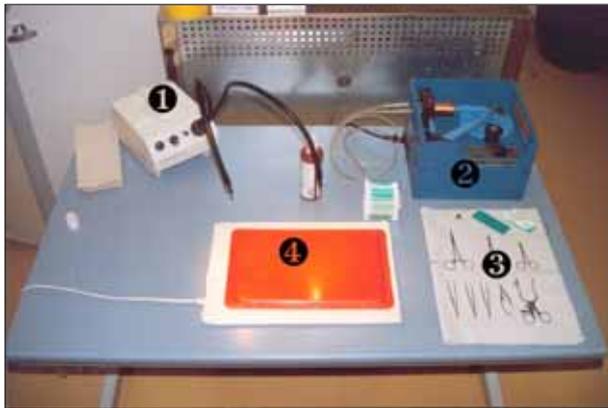


Abb. 2.2
Operationsarbeitsplatz (① OP-Leuchte, ② Beatmungsgerät, ③ Instrumente, ④ Wärmeplatz)

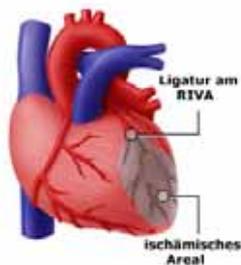


Abb. 2.3
Abbinden des RIVA nach dem Abgang aus der A. coronaria sinistra. Ansicht von ventral.

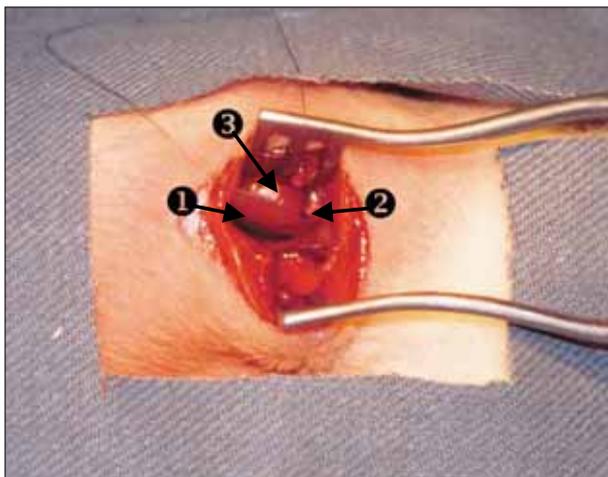


Abb. 2.4
Operationssitus mit ventrolateraler Aufsicht auf das Herz kurz nach Abbinden des RIVA (rechts ist kranial, links ist kaudal; ① Infarktgebiet, ② Ligatur, ③ Nichtinfarktgebiet)

Die Überdruckbeatmung ist notwendig, um bei geschlossener Thoraxhöhle den durch Thorakotomie entstandenen Pneumothorax zu beseitigen. Der M. pectoralis major der linken Seite wurde das Sternum überlappend mit einer fortlaufenden Naht auf den M. pectoralis major der rechten Seite genäht (Faden: 2/0, nicht resorbierbar). Auf diese Weise kann der Thorax best möglich luftdicht nach außen verschlossen werden. In einer letzten Schicht folgte die fortlaufende Hautnaht (Faden: 2/0, nicht resorbierbar). Postoperativ wurde das Tier bei suffizienter Atmung und Vorhandensein der Schutzreflexe extubiert und bis zum Erwachen aus der Narkose gewärmt und beobachtet.

2.3.3. Schein-OP

Bei den scheinoperierten Tieren wurden in absolut identischer Weise zu den Infarktgruppen die präoperativen Maßnahmen durchgeführt, die Narkose geführt und der Thorax eröffnet. Jedoch wurde die Fadenligatur neben den RIVA gesetzt, ohne dabei einen Infarkt zu auszulösen. Operativer Verschluss des Thorax erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben.

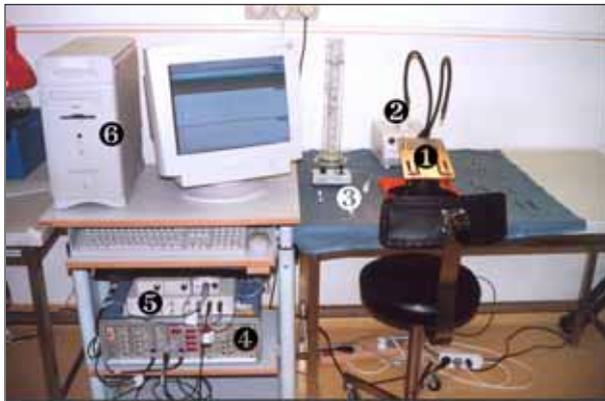


Abb. 2.5
Arbeitsplatz zur Messung der Kardiodynamik (①OP-Tischchen, ②OP-Leuchte, ③Tip-Katheter mit Transducereinheit, ④Verstärkereinheit, ⑤Meßwandler, ⑥Computer mit Monitor)



Abb. 2.6
Spitze des 2 F-Mikro-Tip-Katheters mit einer 1-Eurocent-Münze zum Größenvergleich.

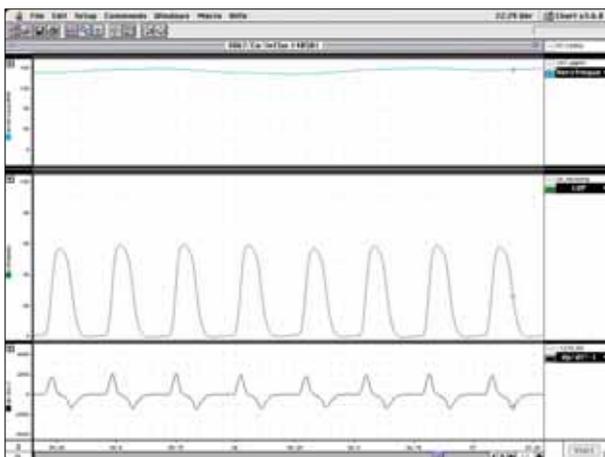


Abb. 2.7
Arbeitsoberfläche des Programms *Chart* zur Erfassung von Herzfrequenz (blaue Kurve, oben), linksventrikulärem Druck (grüne Kurve, mitte) und Kontraktilität bzw. Relaxation (schwarze Kurve, unten).

2.4. Dokumentation der kardiodynamischen Parameter

2.4.1. Messgeräte

Die kardiodynamische Charakterisierung der Tiere am Ende der jeweiligen Beobachtungszeiträume erfolgte mittels eines 2F-Mikro-Tip-Katheters, der in den linken Ventrikel des lebenden, narkotisierten Tieres eingebracht wurde und dort Druckschwankungen registrierte. Dieser Katheter ist an eine Transducer-Einheit angeschlossen, über die man die Eichung des Katheters vornehmen kann. Das Messsignal wird an eine Verstärkereinheit (*Plugsys Bench Unit*[®]) weitergeleitet, gelangt dann in einen Messwandler (*Power Lab 8/5*[®] - Hardware des *MacLab-Systems*[®]) und zuletzt in den Computer. Die Software des *MacLab-Systems*[®] (*Chart*[®] v3.6.0), mit der die Dokumentation und Auswertung der Daten erfolgte, errechnet aus den oben genannten Druckschwankung in Abhängigkeit von der Zeit folgende Parameter: Herzfrequenz (HF), linksventrikulärer Druck (LVP) und die Druckerhöhungsgeschwindigkeit und -abfallgeschwindigkeit (dp/dt max und min) als Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität bzw. Relaxation. Alle Parameter wurden für jedes Tier einzeln für einen Zeitraum von einigen Minuten parallel und in Echtzeit aufgezeichnet.

Zu Beginn einer jeden Messung wurde das *MacLab*[®]-System nach Vorgabe des Herstellers durch eine 2-Punkt-Eichung geeicht. Dazu waren zwei Durchgänge nötig. Einmal wurde das

Messsignal überprüft, das von der Transducer-Einheit an den Computer gesendet wird. Dazu stellte man an einem Drehschalter an der Transducer-Einheit die Werte „0 mmHg“ und dann „100 mmHg“ ein und verglich diese mit den im Programm *Chart®* angezeigten Messwerten. Dann wurde das Messsignal des Tip-Katheters kalibriert. Hierfür wurde die Spitze des Katheters dem atmosphärischen Druck ausgesetzt, was einem Wert von 0 mmHg entspricht. Anschließend wurde die Spitze in einem Messzylinder gefüllt mit Wasser in eine Tiefe gehalten, die einem Druck von 25 mmHg entspricht. Bei beiden Vorgängen wurde der entsprechende Druckwert auf dem Bildschirm abgelesen und gegebenenfalls an der Transducer-Einheit bzw. am *MacLab-System®* korrigiert.

2.4.2. Kardiodynamik

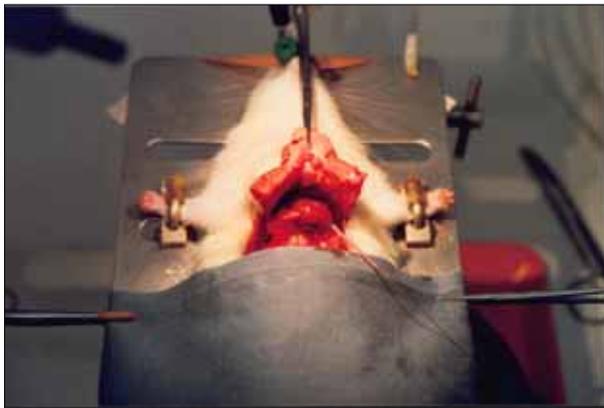


Abb. 2.8

Hämodynamische Messung in der *Open-Chest-Methode*. Hier ein scheinoperiertes Tier bei der Messung

Die Tiere wurden abermals narkotisiert und kontrolliert beatmet wie oben beschrieben. Auf einem Präpariertischchen in etwa 30° Schräglage wurde nach der „Open Chest-Methode“ mittels einer 20G Stahlkanüle der linke Ventrikel über die Herzspitze punktiert und durch sie ein 2F-Mikro-Tip-Katheter in den linken Ventrikel eingeführt. Mit Hilfe eines digitalen Erfassungssystems wurden HR, LVP, und dP/dt max. und dP/dt min. aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. Die ersten Sekunden

kurz nach Einführen der Kanüle in den Ventrikel wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt, da in dieser Zeit durch die mechanische Irritation des Herzens vermehrt Rhythmusstörungen verschiedener Art auftraten. Die Auswertung der Daten erfolgte ausschließlich im Gleichgewichtszustand.

2.5. Organentnahme und Histologie

Unmittelbar im Anschluss an die Erhebung der kardiodynamischen Daten wurde das Herz-Lungen-Paket exzidiert. Herz und Lungen wurden sorgsam und zügig von Fett- und Mediastinalgewebe befreit und gewogen. Die Vorhöfe wurden auf Ventrikelebene abpräpariert und das Herz mit einem Gewebeschnneider in vier gleichmäßige 3 mm dicke horizontale Scheiben geschnitten. Vom Apex zur Herzbasis wurden nur die mittleren beiden Schnitte genutzt. Der distale Schnitt wurde in 10 %-Formalin-Lösung fixiert und der proximale in *Tissue-*

Tek[®] eingebettet, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C in einem Tiefkühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.1. Immunhistologie

2.5.1.1. Anfertigen der immunhistologischen Schnitte

Von den in *TissueTek*[®] eingebetteten Herzpräparaten werden mittels eines Kryostaten bei -20 °C jeweils 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin-(10 %)-beschichtete Objektträger übertragen.

2.5.1.2. Färben der Schnitte (die Avidin-Biotin-Komplex-Methode)

Zur Färbung der Kryoschnitte wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode als indirekte immunhistochemische Nachweisreaktion in Anlehnung an NOUTSIAS et al. [109] gewählt. Bei dieser Methode wird als zweiter Antikörper (Ak) ein biotinylierter Ak genutzt, bei dem das Vitamin Biotin kovalent an das Immunglobulin gebunden ist. Dieser bindet nichtkovalent an Streptavidin, einem aus *S. avidinii* gewonnenen Glykoprotein. Da sich ein biotinylierter Ak über ein Avidin-Molekül mit 3 Biotin-Peroxidase-Komplexen verbinden kann, ist die Farbsensitivität und somit die Sensitivität gegenüber der direkten Methode eindeutig erhöht. Da das Chromogen Carbazol durch Peroxidasen umgesetzt wird, ist eine vorherige Blockung der endogenen Peroxidase mit 5 % H₂O₂/PBS-Lösung notwendig. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde das Gewebe mit fetalem Kälberserum (FCS) inkubiert.

Um späteres Austrocknen zu vermeiden, wurden die Schnitte auf dem Objektträger jeweils mit dem *PapPen*[®] umrahmt. Einer Fixierung des Gewebes in kaltem Azeton und anschließendes Trocknen an der Luft für 10 Minuten folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,3 % H₂O₂ in Phosphatpuffer (PBS) für 20 Minuten. Anschließend wurde der Schnitt dreimal mit PBS gewaschen. Zur Blockierung endogener Avidin- bzw. Biotinaktivität erfolgt eine Inkubation der Schnitte für 20 Minuten mit einem Avidin-Blocking-Kit (8 Trpf. Avidin-Block auf 1 ml 1% FCS in PBS). Im folgenden Arbeitsgang wurde auf das Gewebe ein Gemisch aus dem Biotin-Block (4 Trpf. Biotin-Block auf 1 ml 1% FCS in PBS) und dem primären Ak aufgetragen und dann für 45 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper, der biotinylierte und gegen den ersten Ak gerichtet ist, für weitere 45 Minuten inkubiert. Es folgte eine Inkubation der Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex für 30 Minuten. Um das zu detektierende Antigen sichtbar zu machen, wurden die Schnitte für 12 Minuten im Carbazol-Bad inkubiert. 3-Amino-9-Ethylcarbazol als chromogenes Substrat wird durch die Peroxidase des Avidin-Biotin-Komplex zu einem rotfarbenen Präzipitat umgesetzt. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit frisch gefiltertem Hämalaun. Zwischen jedem einzelnen Arbeitsschritt wurde das Gewebe jeweils zweimal mit PBS gewaschen. Sämtliche Inkubationen erfolgten – um evtl. Austrocknen zu verhindern –

in einer feuchten Kammer. Zum Schluss wurden die Schnitte mit *Kaiser's Gelatine*[®] eingedeckelt.

2.5.2. Histochemie

2.5.2.1. Anfertigen der histologischen Schnitte

Die in Formalin gelagerten Herzschnitte wurden in Paraffin eingebettet, dann mit einem Mikrotom ebenfalls in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf die Oberfläche eines 50°C warmen Wasserbades gebracht. Von dort wurden sie dann mit dem Objektträger aufgenommen.

2.5.2.2. Färben der Schnitte (*Sirius Red*-Färbung)

Als Färbemethode wurde die *Sirius Red*-Färbung gemäß PAUSCHINGER et al. [110] angewandt. Sie dient der Beurteilung des Gesamtkollagenanteils im Myokardgewebe. Vor der Färbung wurde das Paraffin aus den Schnitten vollständig entfernt, da sonst störende Artefakte unter dem polarisierenden Licht auftreten. Dazu wurde das Präparat für 20 Minuten auf 67 °C erwärmt. Nach einem 44 °C warmen Xylolbad für 3 Minuten und einer aufsteigenden alkoholischen Reihe (70 %, 90 %, 100 %) wurde in 1,2 %-wässriger Pikrinsäurelösung mit dem Farbstoff *Sirius Red* für 60 Minuten die Färbung durchgeführt. Es folgten die Überführung in 0,01 nM HCl, um den Farbstoff zu lösen, und danach eine kurze, absteigende alkoholische Reihe (100 %, 90 %, 70 %) und über einen wiederholten Xylolschritt das Eindeckeln des Präparats in Corbid-Balsam.

2.5.3. Auswertung der immunhistochemischen und histochemischen Präparate

Die Auswertung erfolgte entsprechend NOUTSIAS et al. [109, 111] mittels digitaler Bildanalyse. Die Präparate wurden mit einem *Leica*[®] *DMRD*-Mikroskop dargestellt, mit einer *Sony*[®] *3CCD*-Videokamera aufgezeichnet und mit dem Programm *LUCIA G*[®] interpretiert. Zur Auswertung wurde ein eigens entwickeltes Makro genutzt. Ausgewertet wurde immer ein ganzer Schnitt, wobei die IL-2, IL-1β und TNF-α Spots gezählt und auf die Gesamtfläche des Präparats bezogen wurden (Spots/mm²).

Die Messung des Gesamtkollagengehalts in den histologischen Präparaten erfolgte dagegen unter zirkulär polarisiertem Licht bei 200-facher Vergrößerung. Der Farbstoff *Sirius Red* bewirkt ein grelles Aufleuchten der kollagenen Fasern unter polarisiertem Licht. Durch Drehen der Ebene des polarisierten Lichts ändert sich der Aspekt der Fasern. So wurde versucht, einen bestmöglichen Kontrast zwischen kollagenen Fasern und restlichem Gewebe zu erreichen. Zur Quantifizierung wurde die Größe der gefärbten Flächen gemessen und in Relation zur Gesamtfläche des Gewebeschnittes gesetzt (Kollagenanteil/Gesamtfläche).

2.6. Statistik

Nach Durchführung einer multifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) wurden alle Daten mittels *Tukey-Kramer-HSD*-Test analysiert. Dabei wurden P-Werte <0.05 als signifikant akzeptiert.

Die statistischen Berechnungen und Darstellungen erfolgten für die hämodynamischen und histologischen Daten mit *JMP*® 4.0.2. Davon ausgenommen sind die Säulendiagramme, deren Darstellung mit *MS Excel*® 11.0 (for Macintosh) erfolgte. Bei den Box-Plot-Diagrammen sind die 10 %, 25 %, 50 %, 75 % und 90 % Perzentilen als horizontale Linien dargestellt. Die rechtsseitig angeschlossenen Kreisdarstellungen vergleichen die Mittelwerte aller Gruppen. Im Falle einer Signifikanz schneiden sich die Kreise nicht oder unter einem Winkel $<90^\circ$. Ist der Überschneidungswinkel $>90^\circ$ so liegen keine Signifikanzen vor. Als Fehlerabweichung bei den Säulendiagrammen ist der Standardfehler des arithmetischen Mittels („standard error of mean“) SEM angegeben.

2.7. Materialien

operativer Bereich

7025 Rodent Ventilator, Firma FMI GMBH, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland

α -Methylbutan, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland

Altromin® 1324- Haltungsfutter für Ratten/Mäuse, Firma ALTROMIN GmbH, Lage, Deutschland

Braunoderm®, Firma B.BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen, Deutschland

Fäden (Firma ETHICON, Norderstedt, Deutschland):

6/0 *Mersilene®* (nicht resorbierbar) Nadel: P-1,

2/0 *Mersilene®* (nicht resorbierbar) Nadel: FS-1,

Ketanest® (Ketamin), Firma PARKE-DAVIS, Berlin, Deutschland

MacLab® (Firma ADINSTRUMENTS PTY LTD., Castloe Hill, NSW, Australien):

Software: *Chart®*v3.6.8

Hardware: *PowerLab®*/8s

Mikro-Tip Catheter Transducer, Modell SPR-407 (2 F), Firma MILLAR INSTRUMENTS INC., Houston, Texas, USA

OP-Instrumentarium:

chirurgische Pinzetten

Scheren, spitz / stumpf

kleine anatomische Pinzetten

Klemmen

Nadelhalter, groß / klein

Wundspreizer

alle Instrumente: Bezug: Firma DOSCH GMBH, Heidelberg

Plugsys Bench Unit® Type 600, Firma HUGO SACHS ELEKTRONIK KG, March, Deutschland

Rompun® 2% (Xylanzin), Firma MEDISTAR, Holzwickede, Deutschland

Sprague-Dawley-Ratten, Firma CHARLES RIVERS LABORATORIES, Sulzfeld, Deutschland

Transducer Control Unit Model TC-510, Firma MILLAR INSTRUMENTS, INC., Houston, Texas, USA

histologischer / immunhistologischer Bereich

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Firma SIGMA DIAGNOSTICS, St.Louis, MO, USA
Aceton, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit[®], Firma VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, USA
Corbid-Balsam, Firma SIGMA DIAGNOSTICS, St. Louis, MO, USA
Einbettungskassette mit Scharnierdeckel, Model 138 74841, Firma LABONORD, Templemars, Frankreich
Essigsäure (96 %), Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol reinst., Firma BAKER, USA
Formalin Lösung (10 % neutral buffered), Firma SIGMA DIAGNOSTICS, St.Louis, MO, USA
H₂O₂, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun n. Meyer, Firma SIGMA DIAGNOSTICS, St. Louis, MO, USA
Kaiser's Gelantine[®], Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
KCL, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
KH₂PO₄, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Leica[®] DMRD Mikroskop, Firma LEICA, Bensheim, Deutschland
LUCIA G[®] (Version 3.52ab), Firma NIKON, Düsseldorf, Deutschland
Na-Acetat, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Na-Acetat-Trihydrat, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Na₂HPO₄, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
NaCl, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
NN-Dimethylformamid, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
PapPen[®], Firma DIANOVA, Hamburg, Deutschland
Paraffin, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Pikrinsäurelösung, Firma MERCK KGAA, Darmstadt, Deutschland
Poly-L-Lysin Lösung, 0.1% w/v, in water, Firma SIGMA DIAGNOSTICS, St.Louis, MO, USA
Sirius Red, Firma POLYSCIENCE INC., London, Großbritannien
Tissue-Tek[®], Firma SAKURA FINETEK EUROPE B.V., aa Zoeterwoude, Niederlande
Vectastain[®], Firma VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, USA
Xylol, Firma BAKER, USA

verwendete Lösungen

PBS:

NaCl	200 g
KCl	5 g
KH ₂ PO ₄	6,25 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	33,75 g
Aqua dest.	ad 1,0 l

0,2 M Na-Acetat:

Na-Acetat-Trihydrat	27,2 g ad 1,0 l Aqua dest.
---------------------	----------------------------

0,2 M Essigsäure:

Essigsäure (96 %)	11 ml ad 1,0 l Aqua dest.
-------------------	---------------------------

Carbazol-Färbelösung:

3-Amino-9-Ethylcarbazol	50 mg
NN-Dimethylformamid	10 ml
0,2 M Na-Acetat	35 ml
0,2 M Essigsäure	15 ml
H ₂ O ₂	100 µl

verwendete Antikörper und Verdünnungenprimäre AK (Firma R&D SYSTEMS, Deutschland)

anti-rat rTNF- α specific goat IgG	1:25
anti-rat rIL-1 β specific goat IgG	1:25
anti-rat rIL-2 specific goat IgG	1:100

sekundäre AK (Firma JACKSON IMMUNO RESEARCH LABORATORIES, INC., USA)

Biotin-SP-conjugated Rabbit anti-Goat IgG	1:333
Biotin-SP-conjugated Goat anti-Rabbit IgG	1:333
