

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsgut

2.1.1. Schädel-Hirntrauma: Fälle

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden 55 Schädel-Hirntrauma-Fälle verwendet, die uns freundlicherweise von Herrn Professor M. Oehmichen, Direktor des Institutes für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, zur Verfügung gestellt wurden.

Von den nach der Entnahme in 4%-igem gepufferten Formalin fixierten Gehirnen erhielten wir die jeweiligen Paraffinblöcke, die die Kontusionsanteile enthielten. Diese wurden mit einem Mikrotom (Modell HM 335E, Microm Deutschland) in 4 µm dicke Schichten geschnitten und auf beschichtete Objektträger (Super Frost Plus, Menzel-Gläser Deutschland) aufgebracht.

Die Untersuchungsgruppe umfasst 39 Männer und 16 Frauen. Das Alter der verstorbenen Patienten reicht von 7 Monaten (Mon.) bis zu 88 Jahren (J.), der Median beträgt 53 Jahre. Abbildung (Abb.) 2.1. zeigt die Altersverteilung beider Geschlechter. Die ungleiche Geschlechterrelation mit einem Überwiegen des männlichen Anteils ist besonders in den jüngeren und mittleren Jahrgängen ausgeprägt.

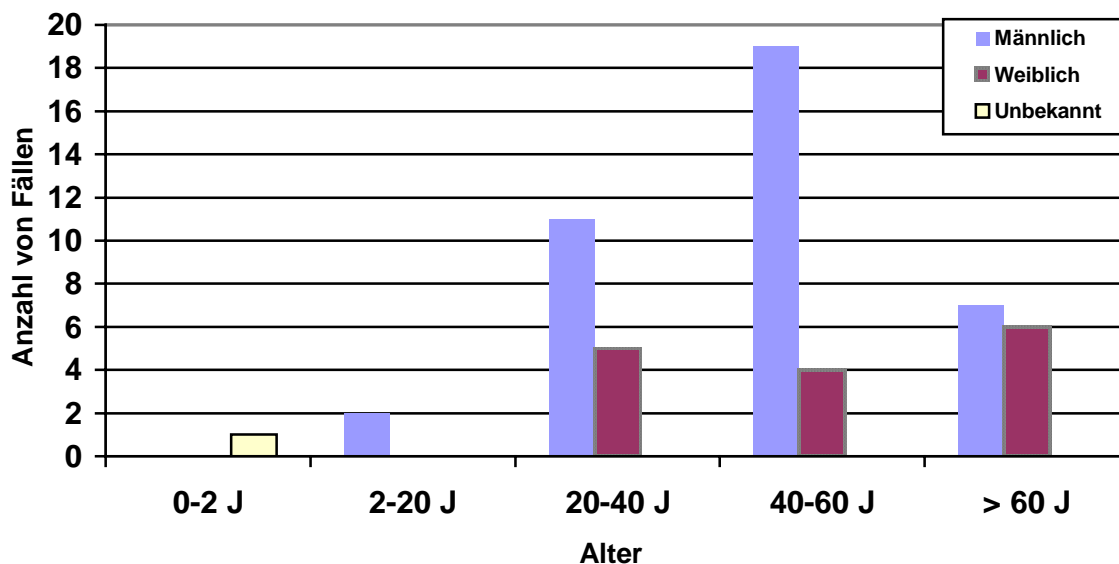


Abb. 2.1. Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten

Die Unfallursachen sind sehr unterschiedlich, weswegen sie in Abb. 2.2. unter fünf

Schlagwörtern subsumiert wurden: Die 1. Kategorie „Verkehrsunfälle“ bezeichnet alle Unfälle, die im Straßenverkehr passierten - hier sind auch Patienten aufgeführt, die als Fußgänger von anderen Verkehrsteilnehmer erfasst wurden. Die 2. Kategorie „Sturz/Sprung“ umfasst alle Patienten, die sich entweder durch einen Sturz bzw. Sprung aus größerer Höhe oder durch Sturz auf der Ebene ein Schädel-Hirntrauma zugezogen haben. Die 3. Kategorie „sonstige Unfälle“ meint alle nicht willkürlich herbeigeführten Verletzungen, die nicht schon in den ersten beiden Kategorien erfasst sind, wie zum Beispiel Betriebsunfälle. Die 4. Kategorie „Gewalt“ fasst alle Verletzungen zusammen, die willkürlich durch fremde Hand entstanden sind. Die letzte Kategorie „unklar“ beinhaltet alle Fälle, bei denen die vorliegende Fallbeschreibung nicht ausreicht, einen klaren Unfallmechanismus zuzuordnen.

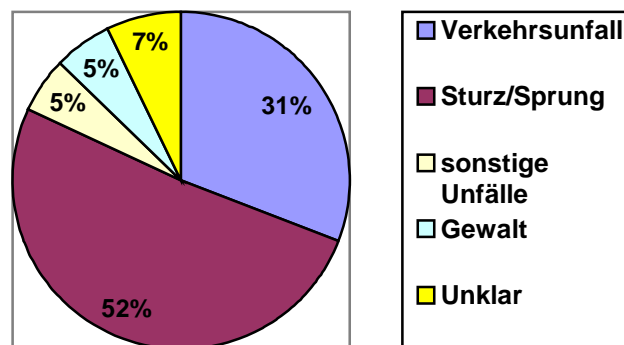


Abb. 2.2. Prozentuale Verteilung der Unfallursachen

Die angegebenen Überlebenszeiten (Ü-Zeit) post Trauma reichen von 0 Stunden (h) bis zu mehreren Jahren, der empirische Median liegt bei 45 h. Wir haben die Überlebenszeiten für die lichtmikroskopische Auswertung in vier Gruppen zusammengefasst. Die erste Gruppe reicht von 0h bis 24h, die zweite von größer 24h bis 7 Tage (d), die dritte von größer 7d bis 99d und die letzte Gruppe umfasst alle Überlebenszeiten größer 99d. Die Abb. 2.3. zeigt die Verteilung aller Patienten auf die gebildeten Überlebenszeitspannen. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung mussten, wie in Kapitel 3.3. noch erläutert wird, andere Überlebenszeitspannen gebildet werden.

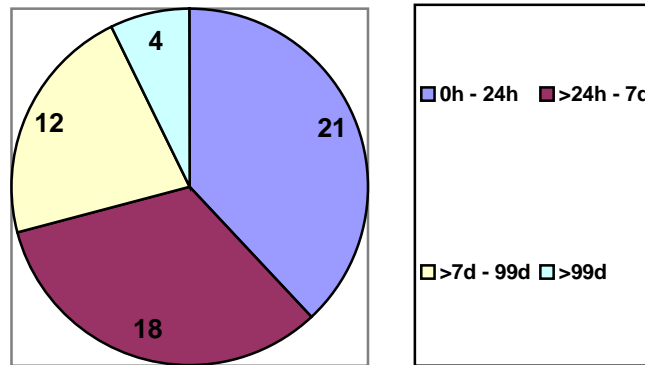


Abb. 2.3. Anzahl der Fälle zu verschiedenen Überlebenszeiträumen

Im Rahmen der makroskopischen Befundung lassen sich bestimmte Verletzungsfolgen besonders häufig finden: Hierzu zählen Schädelfrakturen, Subduralblutungen (SDB), Subarachnoidalblutungen (SAB), Epiduralblutungen (EDB) und das Gehirnödem. Die Verteilung dieser häufigen Verletzungsfolgen in unserem Patientengut lässt sich aus Abb. 2.4. entnehmen.

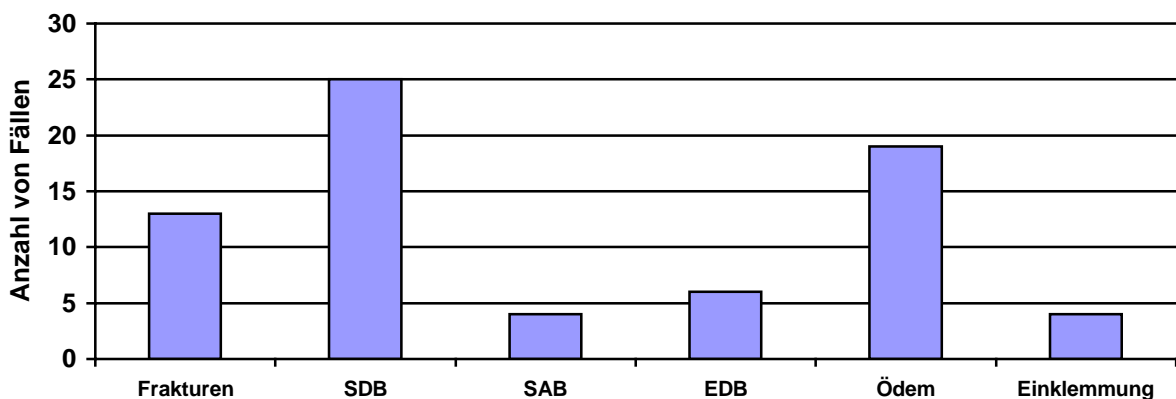


Abb. 2.4. Verteilung der Verletzungsfolgen im Patientengut

2.1.2. Gesundheitskontrollen

Als Gesundheitskontrollen dienten 10 Fälle (sex and age matched) aus dem Sektionsgut des Institutes für Neuropathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum (CVK), welche klinisch nicht neurologisch erkrankt waren und im Institut durch einen Neuropathologen als makroskopisch und histologisch unauffällige Erwachsenengehirne klassifiziert wurden.

Das Gewebe wurde in gleicher Weise wie die Schädel-Hirntraumata für die immunhistochemischen Untersuchungen aufbereitet (s. 2.1.1.).

2.2. Lichtmikroskopische Immunhistochemie

2.2.1. Prinzip

Immunhistochemische Verfahren werden zum Nachweis und zur Lokalisation von Antigenen in Gewebsschnitten eingesetzt. Dazu wird das gewünschte Antigen mit einem Primärantikörper (PAK) markiert, dessen Bindung sichtbar gemacht wird.

Für die hier durchgeführten Färbungen von EAAT1, EAAT2 sowie PACAP38 und PACAP27 wurde die sogenannte Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) gewählt, da diese eine sehr hohe Empfindlichkeit aufweist (Hsu and Raine, 1981). Diese beruht auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden.

Nachdem sich der spezifische PAK an das gesuchte Antigen gebunden hat, gibt man einen kovalent biotinylierten Sekundärantikörper (SAK) hinzu, welcher mit seiner Fab-Region an die Fc-Region des PAK bindet.

Der dritte Schritt ist die Zufügung eines Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes. Über freie Stellen am Avidinkomplex erfolgt die Bindung am biotinylierten SAK. Das Enzym Peroxidase – und damit auch das entsprechende Antigen - wird mit einem Chromogen sichtbar gemacht. Hierzu benutzen wir 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Die Peroxidase zerfällt unter Zugabe von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff, das DAB stellt dabei die Elektronen für den laufenden Enzymzerfall zur Verfügung und wird selbst oxidiert. Diese Oxidation zeigt sich in der Ausfällung eines braunen Reaktionsproduktes.

Da Peroxidase aber auch endogen im Gewebe vorkommt und die Substrat-Chromogenreaktion diese nicht von der Antikörpergebundenen Peroxidase unterscheiden kann, muss die Aktivität der endogenen Peroxidase mit Methanol und Wasserstoffperoxid blockiert werden, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden.

Der Minimierung unspezifischer Hintergrundfärbungen dient auch die Inkubation mit Normalserum (NS). Es besetzt stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente, an die der PAK binden und somit eine Anfärbung hervorrufen könnte. Das NS sollte aus der gleichen Spezies stammen wie der SAK, um eine Bindung an Komponenten der Proteinlösung zu vermeiden (Bourne, 1983).

2.2.2. Durchführung der Färbung

1. Entparaffinierung:
 - a) Schnitte für 20 Minuten (min) bei 50° - 60° Celsius (C) erwärmen
 - b) 2 x 15 min in Xylol; anschließend absteigende Alkoholreihe (Ethanol): je 2 min mit: 100%, 100%, 96%, 80%, 70% und Aqua destillatum (A. dest.)
 - c) Mikrowellenbehandlung: 3 x 2 min bei 600 Watt (W) in Citratpuffer
2. Spülen in puffer based saline (PBS): 3 x 5 min
3. Blockierung der endogenen Phosphatase: 15 min Inkubation in 200 Milliliter (ml) 100%-igem Methanol und 3 ml 30%-igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂)
4. Auftragen des NS: Verdünnung in 3%-igem bovinen Serumalbumin (BSA), Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (RT)
5. Auftragen des PAK: Verdünnung in 3%-igem BSA, Inkubation für 80 min bei RT
6. Spülen in PBS: 3 x 5 min
7. Auftragen des SAK: Inkubation für 30 min
8. Spülen in PBS: 3 x 5 min
9. Auftragen Streptavidin/Peroxidase (HRP), Inkubation für 35 min bei RT
10. Spülen in PBS: 3 x 5 min
11. DAB-Reagenz: in 15ml PBS + 12µl H₂O₂ gelöst; 3-4 Tropfen auftragen und bis zur gewünschten Farbentwicklung inkubieren lassen
12. Spülen in PBS: 3 x 5 min
13. Kernfärbung mit Hämatoxylin
14. Eindeckeln der Schnitte

2.2.3. Verwendete Primärantikörper

2.2.3.1. EAAT1

NCL-EAAT1 (Novocastra Laboratories Ltd., UK) ist ein monoklonaler Antikörper (Klon: 10D4) aus der Maus, der gegen die C-terminale Region des EAAT1-Proteins gerichtet ist (Novocastra Data Sheet NCL-EAAT1).

Die Verdünnung betrug hier 1 : 80 in 3%-igem BSA.

2.2.3.2. EAAT2

NCL-EAAT2 (Novocastra Laboratories Ltd., UK) ist ebenfalls ein monoklonaler Antikör-

per (Klon: 1H8) aus der Maus gegen die C-terminale zytoplasmatische Domäne des EAAT2-Proteins (Novocastra Data Sheet NCL-EAAT2).

Die Verdünnung betrug ebenfalls 1 : 80 in 3%-igem BSA.

2.2.3.3. PACAP38

Rabbit Anti-PACAP(1-38) (Peninsula Laboratories Inc., USA) wurde 1:100 in 3%-igem BSA verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten.

2.2.3.4. PACAP27

Rabbit Anti-PACAP(1-27) (Peninsula Laboratories Inc., USA) wurde 1:250 in 3%-igem BSA verdünnt. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls 90 Minuten.

2.2.4. Verwendete Normalsera und Sekundärantikörper

<u>PAK</u>	<u>SAK (biotinyliert)</u>	<u>NS</u>
mouse anti-EAAT1	goat anti-mouse-IgG	goat
mouse anti-EAAT2	goat anti-mouse-IgG	goat
rabbit anti-PACAP38	swine anti-rabbit IgG	swine
rabbit anti-PACAP27	swine anti-rabbit IgG	swine

Tabelle (Tab.) 2.1. Kombination PAK, SAK und NS bei der Immunhistochemie

Alle Sera und Sekundärantikörper sind von der Firma DAKO, Hamburg.

2.2.5. Negativkontrollen

Um eventuelle unspezifische Anfärbungen ausschließen zu können, wurde für jeden Antikörper eine Negativkontrolle angefertigt. Dazu wird der Schnitt nach dem obigen Protokoll (s. 2.2.2.) behandelt, man verzichtet jedoch auf den PAK.

Alle durchgeführten Negativkontrollen wiesen keine Anfärbung im Kortex, sondern nur eine leichte, nicht zellgebundene Hintergrundfärbung im Marklager auf.

2.3. Fluoreszenzmikroskopische Immunhistochemie

2.3.1. Prinzip

Das Prinzip unterscheidet sich nicht wesentlich von dem der lichtmikroskopischen Immunhistochemie - lediglich das Detektionssystem ist ein anderes.

Ein spezifischer Primärantikörper, an dem der Sekundärantikörper bindet, erkennt das gewünschte Antigen. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem fluoreszierenden Chromogen gekoppelt, welches eine charakteristische Fluoreszenz erzeugt.

Für unsere Färbungen wurden Sekundärantikörper benutzt, die mit Indocarbocyanin (Cy3) bzw. Carbocyanin (Cy2) konjugiert waren. Cy3 hat sein Absorptionsmaximum bei 553 nm und erzeugt eine rote Fluoreszenz, während das Absorptionsmaximum des grün fluoreszierenden Cy2 bei 490 nm liegt.

Doppelmarkierungen ermöglichen es unter anderem, Coexpressionen zu detektieren und somit die Expression eines bestimmten Proteins in verschiedenen Zellpopulationen zu beurteilen. Hierzu werden zwei verschiedene Primärantikörper an einem Schnitt eingesetzt und durch unterschiedliche Farbsignale visualisiert.

2.3.2. Durchführung der Färbung (Doppelmarkierung)

- 1.) Entparaffinierung: siehe 2.2.2)
- 2.) Spülen in PBS: 3 x 5 min
- 3.) Erste Blockierung: mindestens (mind.) 30 min mit entsprechendem NS (RT)
- 4.) Ersten PAK für mind. 4 h auftragen (RT)
- 5.) Spülen in PBS: 3 x 5 min
- 6.) Ersten SAK für mind. 1h auftragen (RT)
- 7.) Spülen in PBS: 4 x 5 min
- 8.) Zweite Blockierung: mind. 30 min mit entsprechendem NS (RT)
- 9.) Zweiten PAK über Nacht bei 4°C auftragen
- 10.) Spülen in PBS: 5 x 5 min
- 11.) Zweiten SAK für mind. 1h auftragen (RT)
- 12.) Spülen in PBS: 5 x 5 min
- 13.) Eindeckeln mit 0,1%-igem Phenylenediamin in 80%-igem Glycerin

2.3.3. Verwendete Primärantikörper

2.3.3.1. EAAT1

s. 2.2.3.1.

Verdünnung: 1:20 in PBS

2.3.3.2. EAAT2

s. 2.2.3.2.

Verdünnung: 1:20 in PBS

2.3.3.3. PACAP38

s. 2.2.3.3.

Verdünnung: 1:40 in PBS

2.3.3.4. PACAP27

s. 2.2.3.4.

Verdünnung: 1:40 in PBS

2.3.3.5. GFAP

Das saure Gliafaserprotein („glial fibrillary acidic protein“=GFAP) konnte erstmals aus Multiple-Sklerose-Plaques isoliert werden (Eng et al., 1970). GFAP ist eine Proteinuntereinheit der Typ III-Intermediärfilamente, die die Zellkörper und -fortsätze reifer Astrozyten in Bündelform durchziehen. Die Aminosäuresequenz des GFAP ist spezieabhängig; so liegt sein Molekulargewicht bei der Ratte bei 51000 Dalton (Da), bei der Maus beträgt es 48000 Da. Im ZNS lassen sich Astrozyten durch GFAP-Antikörper spezifisch anfärben (Bignami et al., 1972).

Wir benutzten den monoklonalen mouse anti-GFAP-Antikörper (Clone 6F2) von Dako (Hamburg, Deutschland). Dieser reagiert mit dem humanen 52000 Da Intermediärfilament in Gehirn und Rückenmark, andere Intermediärfilamente werden nicht erkannt (Royds et al., 1986). Verdünnung: 1:40 in PBS.

2.3.3.6. CNPase

2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (=CNPase) differenziert Oligodendrozyten von Neuronen, Astrozyten und anderen Zellpopulationen des ZNS. Die biologische

Funktion ist noch nicht bekannt, es wird aber eine Beteiligung beim Aufbau der Myelinscheiden angenommen (Barradas et al., 2000; Kozlov et al., 2003).

Verwendet wurde der monoklonale mouse anti-CNPase (Clone 11-5B), Antikörper von Chemicon International INC., USA. Verdünnung: 1:50 in PBS.

2.3.4. Verwendete Normalsera und Sekundärantikörper

Wie schon bei der lichtmikroskopischen Immunhistochemie erläutert, müssen auch bei der Immunfluoreszenz Primärantikörper, Sekundärantikörper und Normalserum aufeinander abgestimmt sein.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die benutzten Kombinationen:

PAK	SAK	NS
mouse anti-EAAT1	goat anti-mouse-IgG Cy 2	goat
mouse anti-EAAT2	goat anti-mouse-IgG Cy 2	goat
rabbit anti-PACAP38	swine anti-rabbit-IgG Cy2	swine
rabbit anti-PACAP27	swine anti-rabbit-IgG Cy2	swine
mouse anti-GFAP	goat anti-mouse-IgG Cy3	goat
mouse anti-CNPase	goat anti-mouse-IgG Cy3	goat

Tab. 2.2. Kombination von PAK, SAK und NS in der Immunfluoreszenz

Die Sekundärantikörper stammen von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (USA). Das Normalserum stammt von DAKO (Hamburg, Deutschland).

2.3.5. Durchgeführte Doppelmarkierungen

Als exemplarische Fälle für die Doppelmarkierungen wurden je zwei Fälle aus den Überlebenszeiten 0h bis 24h, >24h-7d und >7d plus zwei Gesundkontrollen gewählt.

Alle ausgesuchten Fälle weisen eine Kontusionsblutung auf und enthalten wenig Formalinpigment.

EAAT1, EAAT2, PACAP38 und PACAP27 wurden jeweils mit GFAP und CNP kombiniert.

2.4. Ergänzende Übersichtsfärbung

Von allen 65 Präparaten wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung angefertigt. Diese dient der Orientierung innerhalb der Schnitte und der Festlegung der kontusionellen und perikontusionellen Gebiete. Das Kontusionsgebiet definiert sich durch das Vorhandensein einer Blutung und untergegangenen Neuronen. In den Fällen mit sehr langen Überlebenszeiten, bei denen keine Blutung mehr nachweisbar war, wurde das Kontusionsgebiet durch die gliale Narbe definiert. Das Perikontusionsgebiet wurde durch das Vorhandensein eines Ödems, fehlender Blutung und nur einzelnen untergegangenen Neuronen festgelegt. Bei den langen Überlebenszeiten wurde in unmittelbarer Nähe zur Narbe ausgewertet. Die Festlegung der Kontusions- und Perikontusionsgebiete in der HE-Färbung erfolgte zusammen mit Herrn Dr. med. van Landeghem.

Durchführung der HE-Färbung:

1. Entparaffinieren (s. immunhistochemische Protokolle: 2.2.2. und 2.3.2.)
2. Kernfärbung mit Hämalaun für 6 – 8 Min.
3. Spülen in A. dest.
4. Bläuen in Leitungswasser für 10 Min.
5. Färben in Eosin (0,1% in A. dest.) für 10 Min.
6. Auswaschen in Leitungswasser für 5 Min.
7. Differenzieren in 80%-igem Ethanol
8. Ethanol 100% 2 x 2 Min.
9. Xylol für 3 – 5 Min.
10. Eindeckeln

2.5. Auswertung

2.5.1. Morphometrie

Alle Präparate wurden an einem Mikroskop (Modell: DMRB) der Firma Leica (Bad Bensheim, Deutschland) ausgewertet. Die Auszählung der positivmarkierten Zellen geschah mit Hilfe eines Zähllokulars der Firma Leica. Lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch wurde mit 40x-Objektiv und 10x-Okular gezählt. Die

Zählkammer des Okulars hat in der 400er-Vergrößerung eine Seitenlänge von 0,25mm x 0,25mm (=0,0625mm²). Nur markierte Zellen, deren Zellkern eindeutig identifiziert werden konnte, wurden als positiv gewertet. Zellen, deren Kern genau auf der oberen oder rechten Begrenzung der Zählkammer lag, wurden im Gegensatz zu Zellen, deren Kern auf der linken oder unteren Begrenzung lag, nicht gewertet. Sowohl in den kontusionellen als auch perikontusionellen Gebieten wurden jeweils zehn benachbarte Gesichtsfelder ausgezählt. Anschließend wurden die Ergebnisse zur besseren Vergleichbarkeit auf Zellen pro mm² umgerechnet. Hierzu ist die Multiplikation der Zellen pro Gesichtsfeld mit dem Faktor 16 nötig.

Zur Überprüfung der korrekten Zählung wurden stichprobenartig aus allen durchgeführten Färbungen einzelne Präparate ebenfalls von Herrn Dr. med. van Landeghem ausgewertet und mit meinen Ergebnissen verglichen. Dabei traten keine signifikanten Differenzen auf.

2.5.2. Statistik

Aufgrund des begrenzten Stichprobenumfangs kann nicht automatisch von einer symmetrischen Verteilung (Normalverteilung) des Untersuchungsgutes ausgegangen werden. Für die deskriptive Statistik führten wir daher die Berechnung des Medians sowie der unteren Quartile $x_{0,25}$ und der oberen Quartile $x_{0,75}$ durch, da diese nichtparametrischen Maßzahlen insbesondere für kleinere Stichproben mit schiefer Verteilung besonders geeignet sind (Lozán and Kausch, 1998). Zur grafischen Darstellung wählten wir den Boxplot.

Um die gefundenen Ergebnisse nun auf statistische Signifikanz zu überprüfen, führten wir den Kruskal-Wallis-Test und den Mann-Whitney-U-Test durch. Beide gelten als nichtparametrische Tests für nicht normalverteilte Populationen als zuverlässig. Der Kruskal-Wallis-Test dient hierbei dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen, in unserem Fall wurden hiermit die vier Überlebenszeitgruppen auf signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) untersucht. Wurden solche Differenzen gefunden, wurden die Gruppen einzeln mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes untereinander verglichen. Der Vergleich der einzelnen Gruppen mit den Kontrollfällen wurde ebenfalls mit dem Mann-Whitney-U-Testes geführt. Um die kontusionellen Gebiete mit den perikontusionellen Gebieten zu vergleichen, führten wir den Wilcoxon-Test durch. Dieser ist das verteilungsunabhängige Gegenstück zum parametrischen t-Test und vergleicht Paar-

differenzen. Der Wilcoxon-Test hat auch für kleine Stichprobenumfänge eine 95%-ige Wirksamkeit des t-Tests (Lozán and Kausch, 1998).

Als höchste zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit legten wir dabei bei allen Tests fünf Prozent fest. Damit sind alle Ergebnisse mit einem $p < 0,05$ als signifikant zu bezeichnen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Microsoft Word, Microsoft Excel (beide Microsoft, USA) und SPSS10.0 (SPSS, Kalifornien, USA).

2.5.3. Lichtmikroskopische Fotografie

Ausgewählte Präparate wurden zur Dokumentation an einem Olympus-Mikroskop (Modell: BX 50) mit einer Olympus-Kamera (Modell: C-35 AD-4) fotografiert. Die Filme stammen von Kodak (Ektachrome 64 T).

2.5.4. Fluoreszenzmikroskopische Fotografie

Die Präparate wurden an einem konfokalen Lasermikroskop der Firma Zeiss (Modell: Axiovert 100 M) gescannt.

2.6. Benutzte Materialien

2.6.1. Primärantikörper

ANTIKÖRPER	FIRMA	KONZENTRATION (Licht; Fluoreszenz)
mouse anti-EAAT1 (clone 10D4)	Novocastra Lab.; Newcastle upon Tyne; Großbritannien	1:80; 1:20
mouse anti-EAAT2 (clone 1H8)	Novocastra Lab.; UK	1:80; 1:20
rabbit anti-PACAP (1-38)	Peninsula Lab. Inc.; USA	1:100; 1:40
rabbit anti-PACAP (1-27)	Peninsula Lab. Inc.; USA	1:250; 1:40
mouse anti-GFAP (clone 6F2)	Dako; Hamburg; Deutschland	---; 1:40
mouse anti-CNPase (clone 11-5B)	Chemicon International; Temecula; USA	---; 1:50

Tab. 2.3. Primärantikörper

2.6.2. Sekundärantikörper

ANTIKÖRPER	FIRMA	KONZENTRATION (Licht; Fluoreszenz)
goat anti-mouse-IgG	Dako; Hamburg; Deutschland	1:100; ---
swine anti-rabbit-IgG	Dako; Hamburg; Deutschland	1:100; ---
goat anti-mouse-IgG Cy2	Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.; USA	---; 1:200
swine anti-rabbit-IgG Cy2	Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.; USA	---; 1:200
goat anti-mouse-IgG Cy3	Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.; USA	---; 1:250

Tab. 2.4. Sekundärantikörper

2.6.3. Normalsera

Normalserum	FIRMA	KONZENTRATION (Licht; Fluoreszenz)
goat	Dako; Hamburg; Deutschland	1:10; 1:10
swine	Dako; Hamburg; Deutschland	1:10; 1:10

Tab. 2.5. Normalsera

2.6.4. Chemikalien und Reagenzien

REAGENZ	FIRMA	KONZENTRATION
Ethanol	Herbeta Arzneimittel; Deutschland	100%, 96%, 80%, 70%
PBS	Biochrom KG; Deutschland	9,55 g/l
Citronensäure-Monohydrat	Merck; Deutschland	2,1 g/l ; pH 6,0
Wasserstoffperoxid	SigmaAldrich; Deutschland	30%
DAB	SigmaAldrich; Deutschland	10 mg/Tablette
Methanol	Herbeta Arzneimittel; Deutschland	100%
Bovines Serum Albumin (BSA)	SigmaAldrich; Deutschland	3%(3g/100ml PBS)
Xylol	Merck; Deutschland	
Eosin	Chroma-Gesellschaft; Deutschland	
Hämalaun	selbst angesetzt	

Tab. 2.6. Chemikalien und Reagenzien

2.6.5. Technische Geräte und Zubehör zur Durchführung der Färbungen

GERÄT/ZUBEHÖR	FIRMA	MODELL
Ofen	Memmert; Deutschland	
Mikrowelle	Bosch; Deutschland	
Mikrotom	Microm; Deutschland	HM 335E
Objekträger	Menzel-Gläser; Deutschland	Super Frost Plus
Deckgläschen	Menzel-Gläser; Deutschland	
0,1% Phenylenediamin in 80%-igem Glycerin	SigmaAldrich; Deutschland	

Tab. 2.7. Technische Geräte und Zubehör zur Durchführung der Färbungen

2.6.6. Technische Geräte und Zubehör zur Auswertung der Färbungen

GERÄT	FIRMA	MODELL
Auswertungs-Mikroskop	Leica; Deutschland	DMRB
Fotografie-Mikroskop	Olympus; Deutschland	BX-50
Kamera	Olympus; Deutschland	C-35 AD-4
Fotofilm	Kodak; Deutschland	Ektachrom 64 T
Konfokales Lasermikroskop	Zeiss, Deutschland	Axiovert 100 M
Zählokular	Leica, Deutschland	Gitternetz

Tab. 2.8. Technische Geräte und Zubehör zur Auswertung der Färbungen