

4. Material und Methoden

4.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten vom Albinostamm aus der Versuchstieranstalt "Tierzucht Schönwalde GmbH" (Deutschland) verwendet. Die Tiere wogen zu Versuchsbeginn 150 bis 180 g bzw. 550 bis 650 g. Die Haltung erfolgte in Standardkäfigen (Makrolon, Typ 5) in Gruppen zu jeweils fünf Tieren. Ein Lichtprogramm in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Regime regelte den Tag- (6.00 bis 18.00) Nacht-Rhythmus. Die Tiere erhielten Altromin-1324-Standardfutter und Wasser *ad libitum* und wurden mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn zur Akklimatisierung und Eingewöhnung im Tierstall des Institutes gehalten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland unter der Versuchsnummer G 284/ 96 von der Senatsverwaltung für Gesundheit in Berlin genehmigt.

4.2. Geräte und Materialien

Geräte

Stereotaktischer Rahmen

Dentaltechnikbohrer

Mikroliterspritze CR 400-20

Stimulator (E 13-65)

Potentiostat (AMU 130)

Oszilloskop (54601A)

Perfusionsgerät (PP1B-05)

Kryostat

Lichtmikroskop

Hersteller

David Knopf, USA

Maxikraft, Deutschland

Hamilton, USA

Coulbourn Instruments, USA

Radiometer, Dänemark

Hewlett Packard, USA

Zalimp, Polen

Reichert-Jung, Deutschland

Leitz, Deutschland

4.3. Substanzen und Lösungen

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
• Chloralhydrat	Merck, Deutschland
• Desipramin-Hydrochlorid	RBI, U.S.A.
• 3-(2-Aminoethyl)-1H-indol-5,7-diol-Kreatinsulfat (5,7-Dihydroxytryptamin-Kreatinsulfat, 5,7-DHT)	RBI, U.S.A.
• Fluoxetin	Lilly, Deutschland
• 1-[2-[bis(4-Fluorophenyl)methoxy]ethyl]-4-(3-phenylpropyl) piperazin dihydrochlorid (GBR 12909-dihydrochlorid, GBR 12909)	RBI, U.S.A.
• Longasteril 40 (kochsalzfrei G)	Fresenius AG, Deutschland
• Pentobarbital-Natrium	Sigma-Chemie, Deutschland
• Wasserstoffperoxyd	Merck, Deutschland

Die Substanzen Chloralhydrat, Desipramin, 5,7-DHT, Fluoxetin und Pentobarbital wurden in physiologischer Kochsalzlösung, GBR 12909 nach manuellem Feinmörsern in destilliertem Wasser gelöst und intraperitoneal appliziert.

Lösungen

PBS (phosphate buffered saline):

- 29,1 g Dinatriumhydrogenphosphat-12 H₂O
- 2,97 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
- 9 g NaCl

in 1 l Aqua bidest lösen

- pH 7,4 (eingestellt mit 1 N NaOH; Merck, Deutschland)
- Molarität: 0,1 M

Perfusionsfixierungslösung:

- 80 g Paraformaldehyd (Sigma-Chemie, Deutschland) in 1,5 l Aqua bidest auf 60° C erhitzen und durch Zugabe von etwa 300 µl 10 N NaOH klar lösen; Abkühlen lassen auf Raumtemperatur; danach Zugabe von:
 - 27,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Deutschland)
 - 2 ml 50 %-iges Glutaraldehyd (Sigma-Chemie, Deutschland)
 - 6 g Picrinsäure (Merck, Deutschland)
- Lösung auf 2 l auffüllen und pH-Wert auf 7,4 einstellen

Perfusionsnachspüllösung:

- 100 g Saccharose (VK Labor und Feinchemie, ehem. DDR) und 27,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Deutschland) in 1,5 l Aqua bidest lösen
- pH-Wert auf 7,4 einstellen; Lösung auf 2 l auffüllen und pH-Wert mit 10 N NaOH nachstellen

Lösungen für die 5-HT-Immunhistochemie

1. PBS (phosphate buffered saline): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und ca. 0,2 g NaOH in 1 l Aqua bidest lösen; mit 10 N NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 einstellen (phosphatgepufferte Kochsalzlösung 0,01 M)
2. Reduktionslösung (1 % NaBH_4): 1 g NaBH_4 (Sigma) in 100 ml PBS lösen (pH-Wert: 9,5)
3. PBS-A: 400 mg bovines Serumalbumin (BSA, Sigma) auf 20 ml PBS; davon 2 ml mit 18 ml PBS verdünnen (0,2 %-ige bovine Serumalbuminlösung)
4. 10 % NGS: 1 ml normal goat serum (NGS; Camon, Deutschland) mit 9 ml PBS versetzen und mischen
5. 10 % NGS-PhT: 9,7 ml 10 % NGS (Lsg. 4) mit 0,3 ml Triton-Stocklösung (Ferak, Berlin) versetzen; 5 μl Phenylhydrazin zufügen und mischen, bis das Phenylhydrazin vollständig gelöst ist
6. NaN_3 -Stammlösung: 10 % Natriumazid in H_2O
7. 10 % NGS-TAT: 9,7 ml 10 % NGS (Lsg. 4) mit 0,3 ml Triton-Stocklösung versetzen; 100 μl NaN_3 -Stocklösung zufügen und mischen
8. 1. AK-Lösung: der Erstantikörper (Serotonin 2, NT102; Eugene Tech) wird in NGS-TAT (Lsg 7) in einer Konzentration von 1:5000 verdünnt
9. 2. AK-Lösung: 5 μl B-GaR (biotinyliertes Ziegen-anti-Kaninchen IgG; Camon, Deutschland) und 100 μl NaN_3 -Stocklösung (Lsg. 6) zu 10 ml PBS-A (Lsg. 3) zusetzen und mischen
10. ABC-Komplex: 10 μl Lsg. Elite-A (Avidin H, ABC-Elite-Kit; Camon, Deutschland) mit 10 ml PBS-A mischen; 10 μl Lsg. Elite-B (Biotinyl-Peroxydase) zugeben, erneut mischen (bis zum Inkubationsbeginn möglichst 30 min warten)
11. Tris-Stammlösung (1 M): 12,2 Tris (Sigma) in 100 ml H_2O lösen; pH-Wert mit 10 N HCl auf 7,6 einstellen
12. Imidazol-Stammlösung (1 M): 681 mg Imidazol in 10 ml H_2O lösen (pH-Wert ca. 10,4) und pH-Wert mit ca. 300 μl HCl auf 7,6 einstellen
13. DAB-Stammlösung: 50 mg DAB (3,3'-Diaminobenzodin Tetrahydrochlorid; Sigma D5637) in 1 ml H_2O lösen; bei -20°C aufbewahren ; möglichst nur kurz dem Licht aussetzen
14. Vorinkubationslösung: 500 μl Tris-Stocklösung (Lsg. 11), 100 μl Imidazol-Stocklösung (Lsg. 12) und 100 μl DAB-Stocklösung (Lsg. 13) zu 9,5 ml H_2O zusetzen und mischen
15. 3 % Ammoniumnickelsulphat: 3 g Ammoniumnickelsulphatexahydrat unter Bewegen in 100 ml H_2O lösen
16. Inkubationslösung: 0,5 ml Vorinkubationslösung (Lsg. 14) unmittelbar vor Reaktionsbeginn mit 50 μl 3-% Ammoniumnickelsulphat versetzen und die Reaktion durch Zugabe von 25 μl 0,3 % H_2O_2 starten; Reaktion nach 6 min mit PBS stoppen

4.4. Organisation der Experimente

Die Versuche wurden an zwei verschiedenen Altersgruppen von Sprague Dawley Ratten vorgenommen:

- 7 Wochen (150-180 g)
- 10 Monate (550- 650 g)

Innerhalb dieser Altersgruppen wurden a) drei Behandlungsgruppen, b) je nach Läsionsort zwei Läsionsgruppen und c) je nach zeitlichem Abstand der Läsion/ Scheinläsion zu dem Folgeexperiment (CA) drei Zeitgruppen unterschieden:

- a) - lädierte Tiere (Behandlung mit dem Neurotoxin 5,7-DHT)
 - scheinlädierte Tiere (Behandlung mit sterilem NaCl)
 - unbehandelte Kontrollen

- b) - Tiere mit Läsion/ Scheinläsion des MRN
 - Tiere mit Läsion/ Scheinläsion des DRN

- c) - Messung eine Woche nach Läsion/ Scheinläsion
 - Messung drei Wochen nach Läsion/ Scheinläsion
 - Messung neun Wochen nach Läsion/ Scheinläsion

Zu Beginn des experimentellen Ablaufes standen die serotonerge Läsion bzw. Scheinläsion, daraufhin folgte nach oben genannten Zeitabständen die CA, wobei die beschriebenen Zeitgruppen unabhängig voneinander waren, d.h. ein Tier wurde jeweils nur nach einem der Zeitabstände gemessen. In Folge der amperometrischen Messung wurde von allen lädierten und einigen scheinlädierten Tieren eine immunhistochemische Untersuchung der durch Perfusion fixierten Gehirne durchgeführt.

Der beschriebene Versuchsablauf war für beide Altersgruppen identisch.

4.5. Serotonerge Läsion/ Scheinläsion

Die Tiere wurden eine halbe Stunde vor Läsion bzw. Scheinläsion mit Desipramin (25 mg/kg, i.p.) vorbehandelt. Die Operation erfolgte unter Pentobarbitalnarkose (50 mg/kg, i.p.), falls nötig, wurde mit Chloralhydrat (400 mg/kg) nachdosiert.

Nach Fixation der Tiere auf einem stereotaktischen Tisch mittels zweier Ohrstifte und eines Schneidezahnstiftes wurde die Kopfhaut geschoren, desinfiziert und anschließend im Lambdabereich ein etwa 1 cm langer Hautschnitt gesetzt. Daraufhin wurde ausschließlich im Gebiet der zu setzenden Trepanationslöcher der Schädelknochen freipräpariert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden entsprechend der zwei Altersgruppen unterschiedlich vorgenommen:

Jungtiere (150-180 g; Alter: 7 Wochen)

Für die Läsion/ Scheinläsion (L/ SL) der Raphekerne wurden für Sprague Dawley Ratten der Gewichtsklasse 150 bis 180 g speziell entwickelte Schablonen aus durchsichtigem Piacryl verwendet, in welchen standardisierte Führungen für den Bohrdraht eingelassen sind. Die Ausrichtung der Bohrführungen erfolgte nach einer auf der Schablone gekennzeichneten Vertikal- und Horizontallinie, welche zum einen der Mittellinie des Schädels, zum anderen der Interaurallinie des Tieres entsprechen. Nach Fixation der Schablone auf dem stereotaktischen Tisch, wurde das Tier so unter dieser ausgerichtet, dass sich die Mittellinie der Schablone und Schädelmittellinie des Tieres genau decken (die Schablone liegt dabei direkt der Schädeloberfläche auf). Mit Hilfe eines feinen Bohrers (angeschliffener Edelstahlrat, Durchmesser: 0,25 mm) wurde nun in Führung der Schablonenbohrung der Schädel trepaniert, die Injektionskanüle (Durchmesser: 0,22 mm), ebenfalls unter Führung der Schablone, in das Hirngewebe eingeführt und das Neurotoxin 5,7-DHT bzw. sterile physiologische NaCl-Lösung appliziert. Dabei wurde je nach zu lädierender Struktur unterschiedlich vorgegangen. Der MRN wurde einseitig lädiert/ scheinlädiert, indem die Kanüle durch die linke Hirnseite in den Kern vorgeschoben wurde, bei L/ SL des DRN dagegen erfolgte aufgrund der besonderen anatomischen Verhältnisse ein beidseitiges Einführen der Kanüle, von links und rechts. Die verwendeten Koordinaten und Toxinkonzentrationen sind im Folgenden dargestellt.

	<u>MRN</u>	<u>DRN</u>
Läsion:	10 µg 5,7-DHT in 0,5 µl NaCl	10 µg 5,7-DHT in 0,5 µl NaCl (2 x 0,25 µl)
Scheinläsion:	0,5 µl NaCl	2 x 0,25 µl NaCl
Koordinaten:	A: 0,4 L: 4,5 V: 8,1 mm Winkel: 31° (in Bezug auf die interaurale Linie)	A: 0,7 L: 4,65 V: 6,05 mm Winkel: 35°

Die Applikation des Toxins bzw. der Kochsalzlösung erfolgte über die Injektionskanüle, welche über einen Polyethylenschlauch mit einer Mikroliterspritze verbunden war. Die Applikationsdauer betrug 4 min (0,5 µl) für die L/ SL des MRN bzw. 2 x 2 min (2 x 0,25 µl) für L/ SL des DRN. Um einen Rückfluss in den Stichkanal zu vermeiden, wurde die Kanüle nach Applikation weitere 4 min (MRN) bzw. 2 min (DRN) unverändert in ihrer Position belassen.

b) Tiere mit Alter von 10 Monaten (550-650 g)

Für diese Altersgruppe wurde eine stereotaktische Vorrichtung mit winkelveränderlichen stereotaktischen Armen verwendet. Es hatte sich in Vorversuchen bei den adulten Tieren herausgestellt, dass eine optimale Läsionsebene 0,8 mm rostral der Lambdanähte erreicht wird. So wurde ausgehend von Bregma die Medianebene des Schädels bestimmt, diese in Höhe der Lambdanähte markiert und in Bezug auf diese Punkte die folgenden Koordinaten bemessen bzw. mit folgenden Konzentrationen gearbeitet:

	<u>MRN</u>	<u>DRN</u>
Läsion:	10 µg 5,7- DHT in 0,6 µl NaCl	10 µg 5,7- DHT in 2 x 0,3 µl NaCl
Scheinläsion:	0,6 µl NaCl	2 x 0,3 µl NaCl
Koordinaten:	A: 0,8 L: 3,2 V: 8,6 mm Winkel: 20°	A: 0,8 L: 3,9 V: 6,6 mm Winkel: 30°

Die Applikation erfolgte über einen Zeitraum von 4 min (0,6 µl; MRN) bzw. 2x 2 min (2x 0,3 µl; DRN). Die Injektionskanüle wurde 4 min (MRN) bzw. 2 min (DRN) nach Applikation nicht in ihrer Position verändert.

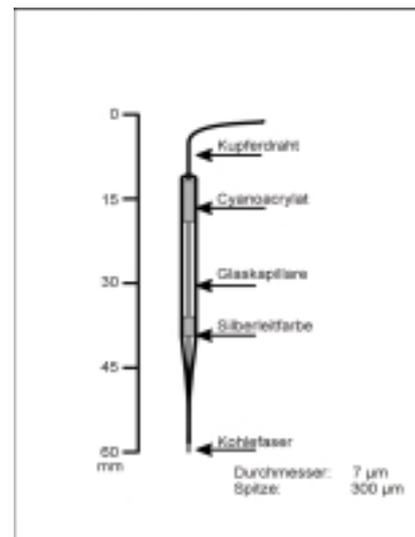
Nach Entfernen der Kanüle wurde die Inzision der Kopfhaut mit chirurgischem Nahtmaterial verschlossen und die Tiere bis zum Erwachen auf einer Wärmeplatte belassen.

4.6. Kontinuierliche Amperometrie

Herstellung der Arbeitselektrode

In eine ethanolgefüllte Borosilikat-Glaskapillare (Außendurchmesser 2 mm) wurde ein Kohlefaden mit einem Durchmesser von 7 μm eingeführt. Anschließend wurde die aufrecht in einem Elektrodenziehgerät (Eigenbau) eingespannte Glaskapillare mit Hilfe einer glühenden Wendel ausgezogen, wobei sie in der Mitte geschmolzen und der Kohlefaden in einer der beiden entstehenden spitz auslaufenden Kapillaren eingeschlossen wurde. Der nun überstehende Faden wurde unter einem Lichtmikroskop auf eine Länge von 300 μm gekürzt. Über Silberleitlack wurde Kontakt zwischen dem Kohlefaden und einem vom stumpfen Ende her eingeführten Kupferdrat hergestellt. Der Drat wurde mit Cyanoacrylat-Klebstoff an der Kapillare fixiert. In einem vorherigen Arbeitsschritt wurde der Kupferdrat mit einem Goldstecker verlötet (Abbildung 10).

Abbildung 10



In vitro Kalibrierung

Im Vorfeld des *in vivo* Experiments wurde die Arbeitselektrode *in vitro* auf ihre Funktion getestet. Da die Empfindlichkeit der Arbeitselektrode und die Reaktionsgeschwindigkeit auf DA-Konzentrationsänderungen von besonderem Interesse war, wurden der in 2 ml PBS eingetauchten Elektrode aufsteigende Mengen einer 500 mikromolaren DA-Lösung zugesetzt (10, 11, 85, 117, 277, 1500 μl). Dabei lag über einem Potentiostat zwischen Arbeitselektrode und einer Ag/ AgCl-Referenzelektrode ein gleichbleibendes Potential von 400 mV an, bei welchem nach der schrittweisen Zugabe der Lösung die DA-Oxidation stattfand (bei DA-Konzentrationen von 50, 100, 500, 1000, 2000 und 5000 nM). Der daraus resultierende Stromkurvenverlauf wurde digital von einem PC gespeichert. Anhand dieses Verlaufes war es möglich, auf die Arbeitsweise der Elektrode zu schließen.

Operation und Messung

Sowohl die Operation der Ratten als auch die amperometrische Messung wurden unter Chloralhydratnarkose (400 mg/kg, i.p.) vorgenommen. Die Narkosetiefe ist während des Versuchsablaufes anhand des Kornealreflexes überprüft worden, gegebenenfalls wurde nachdosiert.

Die Tiere wurden mittels zweier Ohrstifte und eines Schneidezahnstiftes in einem stereotaktischen Rahmen fixiert, die Kopfhaut rasiert und durchtrennt und die Schädeldecke freipräpariert. Mit einem Dentalbohrer wurde der Schädelknochen über dem STR sowie gleichseitig in Höhe des MFB trepaniert und unter mikroskopischer Kontrolle Knochenreste sowie die harte Hirnhaut entfernt. Ebenfalls unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurden schließlich die CFE in das STR und die Stimulationselektrode in Richtung des MFB eingeführt (Abbildung 11). Die Koordinaten für CFE und Stimulationselektrode waren nach PAXINOS u. WATSON (1986) ausgehend von Bregma folgende:

Tieralter 7 Wochen: Striatum: *anterior:* 1,0 mm MFB: *posterior:* 3,9 mm
 lateral: 2,5 mm *lateral:* 1,5 mm
 ventral: 4,5 mm *ventral:* 7,0 mm

Tieralter 10 Monate: Striatum: *anterior:* 1,0 mm MFB: *posterior:* 4,4 mm
 lateral: 2,5 mm *lateral:* 1,5 mm
 ventral: 4,5 mm *ventral:* 7,0 mm

Nach Anschluss der Arbeits- und Referenzelektrode an einen Potentiostat, wodurch an diese ein gleichbleibendes Potential von 400 mV angelegt wurde und Anschluss der Reizelektrode an einen isolierten Stimulator, folgten in Abständen von 5 min die elektrische Stimulation des MFB, mit resultierender DA-Freisetzung im STR und DA-Oxydation an der CFE. Die elektrische Stimulation erfolgte für eine Dauer von 2 Sekunden mit Rechteckimpulsen von 200 μ s, einer Stärke von 2 mA sowie einer Frequenz von 100 Hz. Der Kurvenverlauf des entstehenden DA-Oxidationsstromes wurde digital von einem PC aufgezeichnet. Vor Beginn der eigentlichen Messfolge wurde die Reizelektrode in Schritten von 0,2 mm in Richtung MFB abgesenkt und in der Tiefe eines optimalen DA-Signals belassen.

Nach 10 Messungen im Abstand von 5 Minuten wurde dem Tier GBR 12909 (20 mg/kg, i.p.), ein DA-Uptake-Inhibitor, verabreicht und nach 30 Minuten weitere 10 Messungen vorgenommen, nun unter Hemmung des hochaffinen DA-Uptakes. Das Ziel der Studie war, den striatalen hochaffinen DA-Uptake unter 5-HT-Läsion zu charakterisieren. Mit Hilfe des Inhibitors GBR 12909 wurde der hochaffine DAT-vermittelte DA-Uptake aus dem Gesamt-Clearance-Prozess herausgefiltert. Durch Differenz der Geschwindigkeitskonstanten k der Clearance vor und nach DAT-Blockade lässt sich der Anteil des DAT an der Gesamt-DA-Clearance ermitteln, was die Charakterisierung des DAT in seiner DA-Rückaufnahmefunktion ermöglicht.

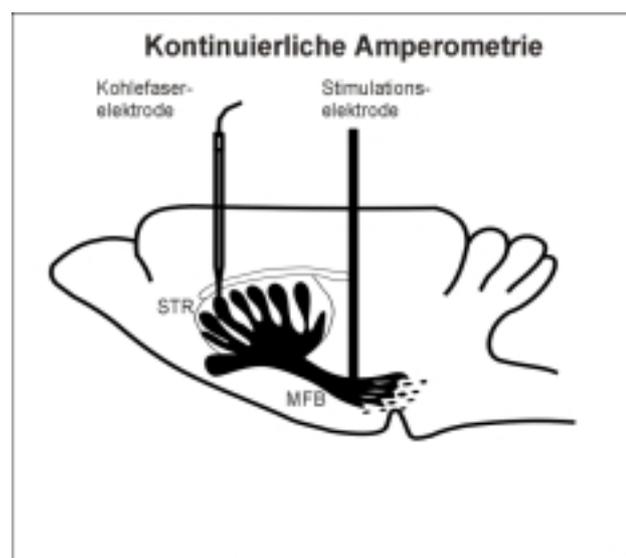
Im Anschluss an das Experiment wurden die Tiere in Vorbereitung auf die histologische Untersuchung perfundiert bzw. durch Gabe von Chloralhydrat in überdosierter Konzentration euthanasiert.

Um auszuschließen, dass 5-HT-Transporter am striatalen DA-Uptake beteiligt sind, wurde einer Gruppe von fünf Tieren unter Anwendung des beschriebenen Operations-, und Messverfahrens statt des DAT-Inhibitors GBR 12909 der 5-HT-Transport-Blocker Fluoxetin (15 mg/kg) verabreicht. Somit wurde bei diesen Tieren der DA-Uptake unter Hemmung der transportervermittelten 5-HT-Wiederaufnahme bestimmt.

Abbildung 11

Kontinuierliche Amperometrie/ Elektrodenlokalisation im ZNS

Die Darstellung zeigt schematisch die bei der CA gewählte Lokalisation von CFE und Stimulationselektrode in STR bzw. MFB.



4.7. Perfusion

In Vorbereitung auf die immunhistochemische Untersuchung folgte im Anschluss an die amperometrische Messung die Perfusion aller lädierten und einiger scheinlädierten und unbehandelter Tiere. Dazu wurden die unter tiefer Narkose stehenden Tiere in Rückenlage fixiert und Thorax, linke Herzkammer und rechter Vorhof eröffnet. Über eine Knopfkanüle, eingeführt in den linken Ventrikel, wurden mit Hilfe einer Peristaltikpumpe die Perfusionslösungen in das Gefäßsystem gepumpt und über den rechten Vorhof abgeleitet. Die Vorperfusion mit 250 ml Vorspüllösung erfolgte in einer Flussgeschwindigkeit von 100 ml/min. Die anschließende Perfusionsfixierung wurde in zwei Geschwindigkeitsstufen vorgenommen: 300 ml in einem Fluss von 100 ml/min und 1,7 l in 50 ml/min. Die Nachspülung mit 1 l einer phosphatgepufferten 5 %-igen Saccharoselösung erfolgte wiederum in einem Durchfluss von 100 ml/min.

Bis zur weiteren Untersuchung wurde das freipräparierte Gehirn bei 4°C in Nachspüllösung gelagert.

4.8. 5-HT-Immunhistochemie

Nach Perfusionsfixierung wurde das Gehirn in eine 5 %-ige und 24 h vor dem Gefrieren in eine 17,5 %-ige phosphatgepufferte Saccharoselösung überführt. Bis zur weiteren histologischen Aufbereitung erfolgte eine Aufbewahrung bei -80°C. Zu Beginn der Untersuchung erfolgte das Schneiden des Gewebes in einem Gefriermikrotom. Die zu untersuchende Gehirnregion (Raphekerne) wurde in koronaren Serienschnitten von 20 µm Dicke aufgeschnitten und diese anschließend in PBS überführt. Danach wurde in 1 %-iger Natriumborhydridlösung (Lsg. 2) über eine Dauer von 15 min bei Raumtemperatur reduziert und die Schnitte 2 x 15 min in PBS gewaschen. Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte daraufhin für 30 min mit Phenylhydrazin in 10 % Ziegen-Normalserum (Lsg. 5) behandelt und danach direkt in eine geeignet konzentrierte Lösung (1:5000) des Erstantikörpers (Lsg. 8) überführt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS und 60 minütiger Vorinkubation in PBS-A (Lsg. 3) erfolgte für weitere 24 h bei 4°C die Inkubation in der Zweitantikörperlösung (Lsg. 9). Im Folgenden wurde 3 x mit PBS gespült und nach 30-minütiger Vorinkubation die Schnitte 6 h in PBS-A bei Raumtemperatur in dem Elite-ABC-Komplex (Lsg. 10) inkubiert. Nach wiederum zweimaligem Waschen wurden die Schnitte für 15 min in Vorinkubationslösung (Lsg. 14) vorinkubiert und anschließend die gebundene Peroxydase

durch sechsminütiges Überführen in Inkubationslösung (Lsg. 16) dargestellt. Im Weiteren erfolgte nach zweimaligem Spülen das Aufziehen der Schnitte auf Objektträger und eine Lufttrocknung für maximal 30 min. Die aufgezogenen Schnitte wurden danach durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in Xylol überführt und in Entellan eingedeckt.