

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

Es wurden die Meningen von insgesamt 34 Hühnern und Hähnen untersucht. Die Tiere stammten aus der institutseigenen Hühnerzucht des Institutes für Veterinär-Anatomie der FU Berlin, sowie aus dem Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin. Die Tiere waren beiderlei Geschlechts, zwischen 3 Monaten und 2 Jahre alt und wiesen keine makroskopisch sichtbaren pathologischen Veränderungen an Gehirn und Meningen auf.

<u>Tier-Nr.</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Rasse</u>	<u>Alter</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Tötungsart</u>
1	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	5 Monate	w	Ketamin/Xylazin i.v.
2	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	11 Monate	w	Ketamin/Xylazin i.v.
3	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	1 Jahr	w	Ketamin/Xylazin i.v.
4	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	1 Jahr	w	Ketamin/Xylazin i.v.
5	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	1,3 Jahre	w	Ketamin/Xylazin i.v.
6	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	1,3 Jahre	w	Ketamin/Xylazin i.v.
7	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	2 Jahre	w	Eutha 77® i.v.
8	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	2 Jahre	m	Eutha 77® i.v.
9	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	1 Jahr	w	Eutha 77® i.v.
10	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	4,5 Monate	w	Eutha 77® i.v.
11	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	Eutha 77® i.v.
12	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	8 Monate	m	Ketamin/Xylazin i.v.
13	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	8 Monate	m	Ketamin/Xylazin i.v.
14	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	8 Monate	w	geschlachtet
15	Institut für Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	8 Monate	m	geschlachtet
16	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet

17	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet
18	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet
19	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet
20	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet
21	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet
22	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet
23	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet
24	Institut für Geflügelkrankheiten	Leghorn-Hybrid	5 Monate	m	geschlachtet
25	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	10 Monate	w	Eutha 77® i.v.
26	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	2 Jahre	w	Eutha 77® i.v.
27	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	2 Jahre	w	Eutha 77® i.v.
28	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn-Hybrid	2 Jahre	w	Ketamin/Xylazin i.v.
29	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn	1 Jahr	m	Ketamin/Xylazin i.v.
30	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn - Hybrid	8 Monate	m	Ketamin/Xylazin i.v.
31	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn - Hybrid	2 Jahre	w	Ketamin/Xylazin i. v.
32	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn - Hybrid	3 Monate	m	Ketamin/Xylazin i.v.
33	Institut f. Veterinär-Anatomie	Leghorn - Hybrid	1,5 Jahre	w	Ketamin/Xylazin i.v.
34	Institut f. Veterinär - Anatomie	Leghorn	7 Monate	m	Ketamin/Xylazin i.v.

3.2 PROBENENTNAHME

Die Tiere wurden entweder mit Eutha 77® oder mit einer Ketamin-Xylazin-Kombination euthanasiert. Die Hühner aus dem Institut für Geflügelkrankheiten wurden, nachdem sie durch einen Schlag auf den Kopf betäubt worden waren, geschlachtet. Die Entnahme von Gehirn und Meningen erfolgte, sofern nicht perfundiert wurde, möglichst kurzfristig nach Eintreten des Todes.

3.2.1 Probenentnahme für die Transmissionselektronenmikroskopie

Die Leibeshöhle wurde durch einen Schnitt lateral des Brustbeins eröffnet. Nachdem das Brustbein entfernt worden war, wurde der Herzbeutel samt Inhalt freipräpariert und so das Herz freigelegt.

Anschließend wurden die beiden Arteriae subclaviae und die Aorta descendens abgeklemmt, eine spitze Kanüle in den linken Ventrikel geschoben und der rechte Vorhof eröffnet.

Die Perfusion erfolgte bei einem Druck von 80-100 mm Hg zuerst mit ca. 100 ml PBS¹-Pufferlösung und danach mit ca. 100 ml 4%igem Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer. Danach wurde der Kopf abgesetzt und von Haut und Muskulatur befreit. Der so freigelegte Schädel wurde vom Foramen magnum aus vorsichtig mittels einer Knochenzange entfernt. Anschließend wurde das Gehirn samt Meningen aus der Schädelhöhle herauspräpariert und 24 h lang in einer 2,5%igen cacodylatgepufferten Glutaraldehyd-Lösung nachfixiert. Im rostradorsalen Gehirnbereich wurden etwa 0,5 x 0,5 cm große Gewebstücke (Gehirn samt Meningen) herausgeschnitten.

3.2.2 Probenentnahme für die Rasterelektronenmikroskopie

Um einen Negativabdruck der Granulationen zu erhalten, wurde das meningeale und cerebrale Gefäßsystem mit polymerisierenden Kunstharzverbindungen ausgegossen. Dazu wurde die Leibeshöhle des vorher euthanasierten Tieres eröffnet und die Venae jugulares freipräpariert. Nachdem eine Braunüle in beide Venae jugulares geschoben worden war, wurde mit einer Heparin-NaCl-Lösung (10 IU/ml Heparin in 0,9%iger NaCl) gespült. Anschließend erfolgte eine Infusion einer Mercocox®-Methylmetacrylat-Mischung (im Verhältnis 4:1) die bei Raumtemperatur nach 12 h auspolymerisierte. Danach wurden die Weichteile in einer Na OH-Lösung abgelöst. Um Fettreste abzulösen, erfolgte eine Immersion in 10%igem Biozym SE (Fa. Spinnrad) für 1 Tag. Abschließend wurde der die Gefäße umgebende Knochen in 2%iger HCl-Lösung aufgelöst. Auf diese Weise entsteht ein Kunststoffausguss, der das Gefäßsystem des Kopfes wiedergibt. Mit einer kleinen Schere wurden die Gefäßabschnitte herausgetrennt,

¹ Phosphate balanced salt solution

die auf Granulationseindrücke rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden sollen. Anstelle der Mercocox®-Methylmetacrylat-Mischung wurden auch Ausgüsse mit einer Tensolzeiment-Ethylacetat-Mischung (im Verhältnis 1:30) sowie mit Reckli®- Injektionsharz angefertigt. Trotz der Verwendung von drei verschiedenen polymerisierenden Kunstharzverbindungen, waren die rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse nicht zufriedenstellend. Daher wurde nach anderen Techniken gesucht, um die Granulationen rasterelektronenmikroskopisch darstellen zu können: Dazu wurden die Schädelknochen, vom Foramen magnum beginnend, vorsichtig abpräpariert. Anschließend wurde im rostralen und dorsalen Bereich des Gehirns vorsichtig die Dura mater, bzw. der schädelwärts gelegene Teil der Durasinus entfernt, so dass die Granulationen sichtbar wurden. Die so präparierten Gehirnabschnitte wurde vom restlichen Gehirn abgetrennt und für 24 h in 4%igem Glutaraldehyd fixiert.

3.2.3 Probenentnahmen für die Histologie

An den Köpfen der euthanasierten Tiere wurde das Gehirn mit den Meningen herauspräpariert und anschließend nach BOUIN fixiert (ROMEIS, 1989).

3.3 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPISCHE TECHNIKEN

3.3.1 Einbettung und Kontrastierung

Die wie im Abschnitt "Probenentnahmen für die Elektronenmikroskopie" beschriebenen, in Glutaraldehyd fixierten Proben wurden 24 Stunden lang in Spülpuffer¹ gespült, wobei der Puffer mindestens einmal gewechselt wurde. Anschließend wurden die Präparate mit 1%igem Osmiumtetroxid 2 Stunden lang nachfixiert. Danach erfolgt eine Blockkontrastierung mit 5%igem Uranylacetat. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zum absoluten Alkohol entwässert und anschließend mit Propylenoxid behandelt. Die Einbettung erfolgt in Epoxidharz (Agar 100). Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultracut S der Firma Leica angefertigt, aufgezogen und nach Reynolds nachkontrastiert. Die Befunderhebung

¹ Na-Cacodylatpuffer mit Saccharosezusatz

und fotografische Dokumentation erfolgte an einem Elektronenmikroskop 101 der Firma Siemens und an einem Zeiss Elektronenmikroskop EM 10.

3.3.2 Darstellung der Interzellularspalten

Zur besseren Darstellung der Interzellularspalten innerhalb der Meningen wurde ein Teil der Proben mit Lanthannitrat immersionsfixiert. Zur Fixierung diente ein Gemisch aus 4%igem Glutaraldehyd, dem eine 4%ige Lanthan-Lösung im Verhältnis 1:1 zugefügt wurde. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben. Auf diese Weise konnte die Permeabilität der Meningen für niedermolekulare Stoffe dargestellt werden.

3.4 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE TECHNIKEN

Das wie unter Punkt 3.2 gewonnene, in Glutaraldehyd fixierte Material wurde in Spülpuffer (Na-Cacodylatpuffer mit Saccharosezusatz) 24 Stunden lang gespült. Danach wurden die Proben mit 1%igem Osmiumtetroxid nachfixiert. Anschließend wurden die Präparate zur Trocknung langsam in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 80 % bis zum absoluten Alkohol, jeweils 5 bis 15 Minuten) entwässert. Es folgt eine Behandlung mit Hexamethyldisilazane (HMDS; Roth, Karlsruhe) für 15 Minuten. Abschließend wurden die Präparate bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Ein Teil der Präparate wurde mittels der Critical-Point-Trocknung getrocknet. Die unterschiedlichen Trocknungsmethoden hatten keinen Einfluss auf die Präparate. Die auf einen Probenhalter montierten Objekte wurden drei Minuten lang mit Gold besputtert (Edwards Sputter Coater S 150 B).

Die Untersuchung der Präparate erfolgt an einem Rasterelektronenmikroskop, Typ Nanolab 2000 der Firma Bausch & Lomb.

Um das Innere der Granulationen im Rasterelektronenmikroskop dreidimensional darstellen zu können, wurde der Gehirnblock vor der Trocknung in flüssigen Stickstoff getaucht und die Granulationen entweder in einem Kryostaten bei -30°C aufgeschnitten oder mit Hilfe eines gekühlten Mikroskalpells aufgebrochen. Danach wurde wie oben beschrieben verfahren.

3.5. LICHTMIKROSKOPISCHE TECHNIKEN

3.5.1 Histologie

Die entnommenen Proben (siehe 3.2.3) wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe, Methylbenzoat und Xylol in Paraffin gebracht. Anschließend wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Paraffinschnitte Hämatoxylin-Erythrosin (HE) und Trichrom gefärbt (ROMEIS, 1989). In HE gefärbten Präparaten nehmen die Zellkerne eine blaue Färbung an, das Zytoplasma färbt sich rötlich. Die Trichrom-Färbung ist eine Kombination aus drei verschiedenen Farbstoffen. Sie dient der besseren Differenzierung der einzelnen Gewebsarten und insbesondere der verschiedenen Fasern. Die Kerne färben sich bei dieser Kombinationsfärbung dunkelblau bis violett. Das Zytoplasma stellt sich rötlich dar. Retikulinfasern nehmen eine wasserblaue Färbung an. Elastische Fasern erscheinen blass-orange. Kollagene Fasern färben sich in einem kräftigen Hellblau.

Zur Darstellung der retikulären Fasern wurde die Imprägnationstechnik nach GOMORI gewählt (ROMEIS, 1989). Die retikulären Fasern nehmen aufgrund ihres kleineren Durchmessers und der daraus resultierenden größeren Oberfläche, mehr Silbernitrat auf und erscheinen dadurch im lichtmikroskopischen Bild tiefschwarz, während sich die kollagenen Fasern bräunlich-violett darstellen.

3.5.2 Immunhistologische Techniken

Für die Immunhistologie wurden die Gehirne mit Meningen in 4%igem Formalin 24 h fixiert (Paraformaldehyd, 4%ig in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit abschließendem Xylol-Bad entwässert. Das Material wurde ebenfalls in Paraffin eingebettet. 6 µm dicke Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen.

3.5.2.1 Immunhistochemische Differenzierung von Kollagentyp I und III

Als Antikörper wurden verwendet:

Ra-bovine-Collagen I (*Biodesign T 40111 R*, Lagerung bei -20 °C)

1:50 in TBS¹ + 2,5 % NShS²

Ra-human-Collagen III (*Quartett C0 III 5-01-12*, Lagerung bei -20°C)

1:50 in TBS + 2,5 % NShS

ShaRIgBiotinF(ab')₂ (*Boehringer 1214659*, Lagerung bei -20°C)

1:200 in TBS + 2,5 % NShS

StreptAB-Komplex-Kit (*Boehringer K 0377*, je 10 µl auf 1 ml TBS)

Kaninchen-Ig (*DAKO X-0903*, Lagerung bei 4 °C)

1:1000 in TBS + 2,5 % NShS

NShS (*DAKO X-0503*, Lagerung bei 4 °C)

TBS (0,05 M Tris-HCl, pH 7,6 + 0,9 % NaCl)

Für den Peroxidase-Nachweis wurden verwendet:

DAB	25,0 mg
Tris-HCl, 0,05 M pH 7,6	50,0 ml
<u>H₂O₂ 30 %</u>	<u>25,0 µl</u>
End-pH 7,6	50,0 ml

Die Schnitte wurden entparaffiniert und bis zum Aqua bidest. eingewässert. Danach wurden sie 5 Minuten lang in TBS-Puffer gespült. Anschließend erfolgte die Trypsinierung mit 0,1 % Trypsin in TBS-Puffer und 0,1 % CaCl₂ 5 Minuten bei 37 °C. Dann wurden die Schnitte 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer mit TBS-Puffer + 5 % NShS vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium abgegossen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h. Dabei wurden für jeden Objektträger 100 µl des Primärantikörpers verwendet. Die Kontrollen wurden mit Kaninchen-Ig auf die gleiche Weise durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte 2 mal 5 Minuten lang bei Zimmertemperatur in TBS-Puffer gespült und anschließend 35 Minuten lang bei 37 °C mit Schaf-Ig-Biotin F(ab)₂ inkubiert. Danach wurde wieder 2 mal 5 Minuten in Puffer gespült. Anschließend

¹ Tris buffered saline

² normales Schafserum

erfolgte eine Inkubation mit StreptAB-Komplex 30 Minuten bei Raumtemperatur mit darauffolgender Spülung in Puffer. Für den Peroxidase-Nachweis wurde das Medium vor Zugabe des Wasserstoffperoxids durch einen harten Filter filtriert und für 12 h bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Darauf folgte eine Spülung in 0,05 M Tris-HCl für 2 mal 5 Minuten. Zum Schluss wurden die Objekte in Aqua bidest. gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckt. Die Ergebnisse waren leider nicht zufriedenstellend, da der Antikörper nicht mit dem Hühnergewebe reagierte.

3.5.2.2 Immunhistologischer Vimentin-Nachweis

Als Reagenzien wurden verwendet:

- MaBo Vimentin (Fa. DAKO, M 7020; monoklonal, 1:100 in TBS-Puffer + 2,5 % NShS, Lagerung bei 4 °C; ca. 60 mg Ig G₂/l)
- Mouse-Ig G (Fa. DAKO X 0931; 100 mg Ig G₁ / l; verdünnt 1:10 in TBS-Puffer + 2,5 % NShS, Lagerung bei 4 °C)
- ShaMIgBiotin (Fa. Boehringer 1198971; verdünnt 1:200 in TBS-Puffer + 2,5 % NShS, Lagerung bei -20 °C)
- StreptAB-Komplex/HRP-Duett, Mouse/Rabbit (DAKO K0492, Lagerung bei 4 °C; Goat-anti-Mouse/Rabbit-Ig-Biotin + StreptAB-Komplex-HRP
- (jeweils 10 µl Reagenz A und B in 1 ml TBS-Puffer) verwendet.
- Trypsin (Boehringer 109827) 0,05 % in TBS + 0,1 % CaCl₂

Als Normalseren dienen:

- normales Schafserum (NShS; DAKO X 0503; Lagerung bei 4 °C, Vorinkubation NShS 1:5 in TBS
- TBS = 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6 + 0,9 % NaCl

Für den Peroxidase-Nachweis wurden verwendet:

25 mg DAB +

100 ml TBS +

50 µl 30 % H₂O₂, pH 7,6 (Filtration durch Filter SS 593)

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und über eine aufsteigende Alkoholreihe bis zur Stufe des bidestillierten Wassers eingewässert. Danach wurden sie in TBS-Puffer bei Raumtemperatur 5 Minuten lang und weitere 5 Minuten in 0.01 M Citratpuffer (pH 6,0) gespült. Anschließend wurden die Objektträger mit den Proben 7 Minuten bei 370 W in der Mikrowelle in 0.01 M Citratpuffer (pH 6,0) in einer Kunststoffküvette (jeweils 4 Stück pro Arbeitsgang) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Küvette mit den Objektträgern 15 Minuten in kaltem Wasser abgekühlt. Anschließend wurden die Präparate nochmals 5 Minuten in TBS-Puffer gespült.

Alternativ zur Mikrowellenvorbehandlung erfolgte eine Trypsinierung mit 0,05 % Trypsin in TBS-Puffer und 0,1 % CaCl₂ für 15 Minuten bei 37 °C. (Die vorherige Anwärmzeit des Mediums lag bei 20 Minuten). Anschließend wurden die Objektträger mit Aqua bidest. abgespült und zwei mal 5 Minuten lang in TBS-Puffer gespült.

Die Schnitte wurden mit Normalserum (s. o.) in einer feuchten Kammer 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach ließ man das Schafserum abtropfen. Nachdem das Schafserum abgetropft war, erfolgte anschließend eine Inkubation mit jeweils 50 µl Anti-Vimentin-Verdünnung pro Objektträger über Nacht bei 4 °C, bzw. bei den trypsinisierten Schnitten mit 75 µl Vimentin-Lösung pro Objektträger für 2 Stunden bei 37 °C. Die Kontrollen wurden statt mit Anti-Vimentin-Verdünnung mit 50 µl Mouse-IgG inkubiert (ansonsten gleiche Vorgehensweise wie oben beschrieben). Am nächsten Tag wurde zweimal eine 5 Minuten lange Spülung mit TBS-Puffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Inkubiert wurde anschließend 35 Minuten lang mit biotinyliertem 2. Antikörper (s. o.) bei Raumtemperatur. Danach erfolgten wiederum 2 Spülungen mit TBS-Puffer, jeweils 5 Minuten lang. Anschließend wurden die Kontrollen mit StreptAB-HRP-Komplex 35 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte der Peroxidase-Nachweis 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden danach zwei mal 3 Minuten lang in Aqua bidest. gespült, auf einer Wärmeplatte luftgetrocknet und mit Entellan eingedeckt.