

C. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen wurden an den Haupt- und Afterklauen von 46 Vorder- bzw. Hintergliedmaßen erwachsener Rinder sowie von drei Kälbern bis zu einem Alter von drei Monaten vorgenommen. Es handelte sich dabei um Rinder der Rassen Deutsche Schwarzbunte, Rotbunte, Fleckvieh und Charolais. Der größte Teil der untersuchten Gliedmaßen stammte von Mastbullen im Alter von zwei bis zweieinhalb Jahren der Rassen Fleckvieh und Charolais. Die adulten Tiere stammten hauptsächlich aus dem Schlachtgut des Schlachthofes Eberswalde-Britz, zum Teil auch aus dem des Schlachthofes Berlin/Beusselstraße. Die Kälbergliedmaßen stammten aus dem Patientengut der Klinik für Klauentiere bzw. aus dem Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin; bei diesen Tieren konnte auf einen Vorbericht zurückgegriffen werden.

Für die Untersuchung der "normalen" Blutgefäßarchitektur der Rinderklaue wurden nur Gliedmaßen ausgewählt, deren Klauen eine regelmäßige Form und einen normalen Pflegezustand aufwiesen, und die nach eigener makroskopischer Untersuchung bzw. nach dem Vorbericht klauengesund waren.

Für die Untersuchung der Blutgefäßveränderungen bei Klauenerkrankungen, insbesondere bei Klauenrehe und Rehe-assoziierten Klauenerkrankungen, wurden Gliedmaßen ausgewählt, deren Klauen makroskopisch die typischen symptomatischen Veränderungen aufwiesen. Zu den makroskopischen Veränderungen gehören sogenannte Reheringe (divergierende Hornrinnen in der Wand des Klauenschuhes), Ballenhornerosion, Veränderungen im Zwischenklauenbereich, wachsartige Konsistenzveränderungen und gelbe bis rötliche Verfärbungen des Klauenhorns, Doppelsohlenbildung, Verbreiterung und Zusammenhangstrennungen in der Weißen Linie sowie umschriebene hyperämische Bezirke an der Prädispositionsstelle für das RUSTERHOLZ'sche Klauensohlengeschwür. Die Präparate mit den letztgenannten Veränderungen wurden aus den ausgeschuhten Gliedmaßenenden (s. u.) ausgewählt, bei denen häufig eine lokalisierte rote Verfärbung der Klauenlederhaut an der typischen Klauensohlengeschwürsstelle auffällig war.

Die distalen Gliedmaßenabschnitte sämtlicher Tiere wurden nach der Schlachtung bzw. nach der Tötung im Karpal- resp. Tarsalgelenk abgesetzt und so bald wie möglich weiter verarbeitet. Für die Korrosionspräparate nach Injektion vasoaktiver Substanzen wurden schlachtfrische Klauen verwendet, für die Herstellung von Korrosionspräparaten ohne diese vorherige Behandlung wurden die Gliedmaßenenden unterschiedlich lange (siehe Kap. 2.1) bei 4 °C kühl gelagert bzw. direkt nach

der Schlachtung bei -22 °C tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt bei 4 °C aufgetaut und gelagert. Für die Herstellung von ausgeschuhten Präparaten wurden die Gliedmaßenenden nach der Schlachtung bzw. nach dem Auftauen nach der Methode von OSSENT und LISCHER (1997) ausgeschuht und danach direkt für die Gewinnung lichtmikroskopischer Proben (siehe Kap. 3) weiterverarbeitet bzw. für die korrosionsanatomische Untersuchung entsprechend (s. u.) unterschiedlich lange bei 4 °C kühl gelagert.

2. Injektionspräparate

Die Injektion der verschiedenen Substanzen erfolgte über Kunststoffkatheter (sterile Ernährungssonden Nr. 1 bis 5, Fa. Rüschi, Kernen) bzw. Metallkanülen (Fa. Hauptner, Solingen), die in die jeweiligen freiparierten Gefäße eingebunden wurden. Bei der Präparation der Gefäße wurde besonders darauf geachtet, möglichst wenig des umliegenden Gewebes und der darin enthaltenen Gefäße zu zerstören, um die Zahl der Stellen zu minimieren, an denen das Injektionsmedium unbeabsichtigt ausfließen kann.

Über folgende Gefäße wurde injiziert: an der *Schulterextremität* die A. metacarpea dorsalis III und die A. digitalis palmaris communis III bzw. die V. digitalis dorsalis communis III und die V. digitalis palmaris communis III; an der *Beckengliedmaße* die A. metatarsa dorsalis III und die A. digitalis plantaris communis III bzw. die V. metatarsa dorsalis II und die V. digitalis plantaris communis III.

2.1 Herstellung von Korrosionspräparaten

Die Vorperfusion der Gefäße und auch die Injektion der verschiedenen Kunststoffe erfolgte über 20 ml oder 50 ml Einmalspritzen per Hand, die Injektionsmedien wurden vorher stets im Kühlschrank bei 6 bis 8 °C aufbewahrt und gekühlt injiziert, um die Reaktionszeit der auspolymerisierenden Kunststoffe möglichst zu verlängern. Die Injektion der Kunststoffe erfolgte nach den ersten Injektionsversuchen immer an der "stehend" gelagerten Gliedmaße, das Aushärten bei aufgehängten Gliedmaßen. Da es sich bei allen verwendeten Kunststoffen um Methylmethacrylate handelt, wurden die Injektionen in einem gut belüfteten Raum unter dem Abzug vorgenommen, wobei Handschuhe und Schutzbrille getragen wurden.

Nach gelungener Injektion wurden die Hauptklauen in Höhe des Fesselgelenkes abgesetzt und auch die Afterklauen einzeln abgesetzt. Alle vier Klauen einer Gliedmaße wurden der Korrosion unterworfen.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Injektionsmedien und -techniken
(Ermittlung des Injektionsdruckes siehe S. 62)

Injektionsmedium	Mischungsverhältnis	Inj.-Zeit	Injektions-Druck	Polymer.-dauer
Technovit® 7143	1 : 1 (Pulver : Flüssigkeit)	5-7 min	2026 mbar kontinuierlich	6 h
Technovit® 7143 + Methylmethacrylat (MMA)	4:4:1 (Pulver : Flüssigk. : MMA)	5-7 min	2026 mbar kontinuierlich	6 h
Tensolzement®	1 : 30 (Härter : Flüssigkeit)	1,5 h	5571 mbar intermittierend	48 h
Tensolzement® + Ethylacetat (EA)	1 : 3 : 30 (Härter : EA : Flüssigk.)	1,5 h intermittierend	5571 mbar	48 h
Mercocox®	1 : 50 (Acc. : Flüssigkeit)	5 min	2026 mbar kontinuierlich	6 h
Mercocox® + MMA	1 : 16 : 64 (Acc. : MMA : Flüssigkeit)	10 min	2026 mbar kontinuierlich	6 h
Plastoid®	5 : 1,5 (Flüssigkeit : Pulver)	10 h	2026 mbar diskontinuierlich	48 h

Für die Herstellung von *Gefäßübersichtspräparaten* von Gliedmaßenenden adulter Tiere wurde *Technovit® 7143* (Fa. Kulzer, Wehrheim) über intravasal eingebundene Kunststoffkatheter (Nr. 5) injiziert. Die Gliedmaßen wurden hierfür zum Teil schlachtfrisch verwendet bzw. zwei bis vier Tage bei 4 °C kühl gelagert. Die Injektion erfolgte über die A. metacarpea dorsalis III bzw. die A. digitalis metatarsa dorsalis III für die arteriellen Präparate, und über die V. digitalis dorsalis communis III bzw. die V. metatarsa dorsalis II für die venösen Präparate.

Vor Injektion des Kunststoffes wurden eventuell vorhandene Blutreste durch eine Perfusion mit 500 ml gefilterter physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. Einem Teil der Präparate wurde Natriumnitrit (0,2 %ig) zur Gefäßdilatation und/oder Heparin (100.00 I.E., Na-Heparin aus boviner intestinaler Mukosa, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) zur Gerinnungshemmung zugesetzt.

Technovit® 7143 wurde wie folgt angewendet: es wurden 2 bzw. 1,5 bzw. 1 Gewichtsteil Pulver zu 1 Teil Flüssigkeit gegeben, diese kurz mit einem Glasstab verrührt und dann möglichst schnell injiziert. Für eine Gliedmaße wurden ca. 120 bis 150 ml verwendet. Gefäße, aus denen der flüssige Kunststoff während der Injektion ausfloß, wurden mit Arterienklemmen komprimiert. Die Polymerisation des Kunststoffes begann nach 5 bis 7 min. Die Injektionspräparate härteten einige Stunden bei Raumtemperatur aus.

Nach dieser Methode wurden je fünf arterielle Präparate von Schulter- und Beckengliedmaßen und ebenfalls je drei venöse Präparate hergestellt. Um diese insgesamt 16 auswertbaren Präparate zu erhalten, mußten jedoch doppelt so viele Gliedmaßenenden injiziert werden, da die

Technovit[®] 7143-Injektion an frischen Klauen häufig mißlingt. Durch Mischung von Technovit[®] 7143 mit monomerem Methylmethacrylat (MMA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) (100 ml Technovit-Flüssigkeit + 25 ml MMA + 100 g Technovit-Pulver) konnte die Viskosität des Injektionsmediums reduziert und damit der Füllungsgrad verbessert werden. Mit diesem Injektionsmedium wurden je ein auswertbares Präparat einer Vorder- und Hintergliedmaße eines adulten Rindes erstellt, dafür mußten viermal so viele Gliedmaßen injiziert werden.

Für die Herstellung von *Korrosionspräparaten für die REM-Untersuchung* mit möglichst vollständiger Füllung des Gefäßbettes bis in den Kapillarbereich hinein wurden die folgenden Kunststoffe und Injektionstechniken benutzt:

Tensolzement[®] Nr. 7 (ICI Chemicals und Polymers Ltd., Darwen, Lancastershire, GB)

Tensolzement[®] soll nicht kapillargängig sein (BUGGE, 1963), deshalb wurde als Verdünnungsmittel Ethylacetat (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) zugemischt, um Kapillargängigkeit zu erreichen. Ethylacetat wurde 5 bzw. 10prozentig zu Tensolzement[®] zugegeben (modifiziert nach MEINERTZ, 1969). Das Methylmethacrylat wurde mit dem Härter im Verhältnis 1 : 20 bzw. 1 : 30 angemischt, kurz mit einem Glasstab verrührt und dann über 1 bis 1,5 Std. langsam injiziert, wobei kurzfristig hohe Drücke ausgeübt werden mußten. Pro Gliedmaße konnten ca. 120 bis 150 ml injiziert werden, die venösen Gefäße wurden bei Ausfließen des Injektionsmediums während der Injektion komprimiert. Die besten Erfolge wurden bei dieser Methode erzielt, wenn die Gliedmaßen zwei bis drei Wochen bei 4 °C kühl gelagert und nicht vorgespült wurden. Die fertigen Injektionspräparate härteten zwei Tage lang aufgehängt bei Raumtemperatur aus, bevor sie der Mazeration zugeführt wurden.

Für die Untersuchung der unveränderten Gefäßarchitektur der Klaue wurden sieben Präparate von den Hintergliedmaßen adulter Rinder sowie ein Präparat von der Vordergliedmaße eines Kalbes angefertigt. Für diese acht auswertbaren adulten Präparate mußten 20, für das Kälberpräparat drei Gliedmaßen injiziert werden, da bei Tensolzement-Injektionen oftmals Schwierigkeiten auftraten. Zusätzlich wurden je ein Korrosionspräparat einer adulten Vorder- und Hintergliedmaße angefertigt, die mit L-Laktat (250 ml 1 %ige, gekühlte Laktatlösung, Fa. Fluka, Buchs) vorgespült wurden. Die Injektion mit dem Tensolzement[®]-Ethylacetat-Gemisch konnte besonders gut bei *ausgeschuhten* Klauen zum Einsatz gebracht werden: diese Präparate zeigten eine sehr gute Füllung im Bereich des Wandsegmentes, wo andere Präparate häufig große Füllungsdefekte aufwiesen. Es wurden zwei Präparate von den Hintergliedmaßen klauengesunder, erwachsener Rinder angefertigt. Da es bei dieser Methode jedoch häufig zur Verletzung des Gewebes und dadurch zum Ausfließen des

Injektionsmediums kommt, mußten für diese zwei auswertbaren Präparate zehn Gliedmaßen injiziert werden. Nach dem Einbinden der Katheter wurden die Gliedmaßen wie oben beschrieben gespült. An den durch das Ausschuhlen entstandenen Lederhautläsionen wurde mittels Thermokauterisierung der eröffneten kleineren Gefäße versucht, ein unbeabsichtigtes Ausfließen des Injektionsmediums möglichst gering zu halten. Fertig injizierte ausgeschuhete Klauen wurden während des Aushärtevorgangs mit warmem Wasser berieselt, um das Polymerisieren des Kunststoffes in den Lederhautgefäßen zu beschleunigen und eventuell aus verletzten Stellen austretendes, polymerisierendes Material wegzuspülen. Dadurch sollte das Auftreten von Artefakten an den Gefäßausgüssen eingeschränkt werden.

Mercox[®] CL-2R-5 bzw. CL-2B-5 (Japan Vilene Hospital Co. Ltd., Tokyo, Japan)

Mercox[®] wurde unverdünnt und verdünnt mit monomerem Methylmethacrylat (Fa. Fluka) arteriell injiziert (nach ROMEIS, 1989). Auch bei diesem Injektionsmedium konnten die besten Resultate nach mindestens zweiwöchiger Lagerung der Gliedmaßen erzielt werden. Die Injektionszeit betrug etwa 10 bis 15 min für ca. 150 ml. Die Injektion konnte unter leichtem Druck vorgenommen werden, die größeren Gefäße wurden während der Injektion mit Gefäßklemmen komprimiert, es kam jedoch gegen Ende der Injektion zum Ausfließen des Mediums aus fast allen Hautgefäßen. Die Aushärtung erfolgte über einen Tag bei Zimmertemperatur. Für die Untersuchung der "normalen" Gefäßarchitektur der Klaue wurden vier Präparate von den Hintergliedmaßen adulter Rinder sowie drei Präparate von Vorder- und ein Präparat von Hintergliedmaßen von Kälbern angefertigt. Für diese acht auswertbaren Präparate mußten zehn Gliedmaßen injiziert werden. Zusätzlich wurden auch mit Mercox[®] Präparate von ausgeschuhten Klauen angefertigt; hierbei traten jedoch stärkere Extravasate als bei der Verwendung von Tensolzement[®] auf.

Zusätzlich wurden je ein Korrosionspräparat einer adulten Vorder- und Hintergliedmaße erstellt, die mit Laktat (s. o.) bzw. Histamin (0,1 %ige gekühlte Histaminlösung, Fa. Fluka, Buchs) vorgespült wurden.

Plastoid[®] (Röhm Pharma, Darmstadt)

Plastoid wurde im Verhältnis fünf Gewichtsteile Flüssigkeit zu eineinhalb Teilen Pulver angemischt und langsam über mehrere Stunden arteriell und venös injiziert. Nach Abschluß der Injektion wurden die Gefäße abgeklemmt und der Polymerisationsvorgang durch Einlegen in eine 5 bis 10%ige Formaldehydlösung ausgelöst, deren Temperatur anfangs 35 °C betrug und nach 1 bis 2 Std. auf 50 °C erhöht wurde. Die vollständige Aushärtung dauerte zwei bis drei Tage. Plastoid[®] wurde über lange Metallkanülen injiziert (Fa. Hauptner, Melsungen), da es Kunststoffkatheter

während der langen Injektionszeit auflösen würde. Trotz der guten Injektionsergebnisse bei Verwendung von Plastoid® konnten nur wenige Korrosionspräparate erstellt werden, da das Präparat nicht mehr im Handel erhältlich ist. Für die Untersuchung der unveränderten Gefäßarchitektur der Klaue wurden drei Präparate von den Vordergliedmaßen adulter Rinder und ein Präparat von der Vordergliedmaße eines Kalbes angefertigt. Für diese insgesamt vier auswertbaren Präparate mußten sechs Gliedmaßen injiziert werden. Die venös und arteriell injizierten Präparate eigneten sich auch sehr gut als Übersichtspräparate für die Untersuchung der makroskopisch faßbaren Angioarchitektur der Rinderklaue.

Korrosionspräparate von makroskopisch krankhaft veränderten Klauen adulter Rinder

Zusätzlich wurden insgesamt fünf Präparate (Tensolzement®-Ethylacetat bzw. Mercox®-MMA) von makroskopisch veränderten Klauen adulter Rinder angefertigt. Zwei Präparate zeigten bei der Voruntersuchung mit bloßem Auge ein rundliches, stark gerötetes Lederhautareal an der typischen Klauensohlengeschwürsstelle mit verändertem bzw. unregelmäßigem Zottenbild. Die drei restlichen Präparate zeigten Veränderungen in der Form des Hornschuhes, in der Klauenhornfarbe und -konsistenz und/oder wiesen Ballenhornerosionen sowie Veränderungen im Zwischenklauenbereich und/oder in der Weißen Linie auf. Bei der Injektion von Gliedmaßenenden mit veränderten Klauen traten sehr häufig Schwierigkeiten während des Injektionsvorganges auf, so daß zur Erstellung der fünf auswertbaren Präparate mit guter Gefäßfüllung sehr viel mehr Gliedmaßenenden injiziert werden mußten.

Exemplarische Ermittlung injektionsrelevanter Eigenschaften der verwendeten Injektionsmedien:

Injektionsdruck

Die jeweiligen Injektionsmedien wurden in Kunststoffspritzen (20 ml) zusammen mit einer definierten Menge Luft (V_1 : 2 ml) aufgezogen. Während des Injektionsvorganges wurde die Spritze mit der Spitze nach unten verwendet, so daß die Luftblase (V_1) zum Kolben der Spritze aufstieg. Zur Berechnung des jeweiligen applizierten Injektionsdruckes wurde die Volumenänderung der Luftblase in der Injektionsspritze ermittelt und der Druck nach der Formel $P_1 \times V_1 = P_2 \times V_2$ (P_1 = Luftdruck bei Raumtemperatur, V_1 = Luftvolumen vor Injektion, P_2 zu ermittelnder Injektionsdruck, V_2 = Luftvolumen während der Injektion) berechnet¹. Die Druckermittlung wurde bei allen Injektionsversuchen vorgenommen.

¹ Nach BRAGULLA (1997), persönliche Mitteilung.

Diese Formel kann eigentlich nur für geschlossene Systeme angewendet werden. Beim Injektionsvorgang handelt es sich streng genommen jedoch nicht um ein solches, weil das Injektionsmedium abfließt. Da das Abfließen des Injektionsmedium jedoch am Anfang des Injektionsvorganges nur sehr zögerlich erfolgt, kann die Luftvolumenänderung bis zum Beginn des Abfließens des Injektionsmediums zur näherungsweisen Berechnung des Injektionsdruckes (siehe Diskussion, S. 120) herangezogen werden.

Viskosität des Injektionsmediums

Die kinetische Viskosität der jeweiligen verwendeten Injektionsmedien wurde mit dem bei GANNON (1978) beschriebenen Verfahren ermittelt (sechs Messungen pro Injektionsmedium).

Schrumpfungsfaktor der Injektionsmedien nach der Auspolymerisation:

Die verschiedenen verwendeten Injektionsmedien wurden wie zur Injektion frisch angemischt in Glas- bzw. Kunststoffbehälter mit definierten Innendurchmessern und definierter Füllhöhe eingefüllt und unter den gleichen Bedingungen wie bei der Gefäßinjektion zum Aushärten gebracht. Nach erfolgreicher Auspolymerisierung wurden die Außendurchmesser und die Höhe der Ausgüsse mit Hilfe einer Schiebelehre ermittelt und zu den Innendurchmessern der Behälter und der ursprünglichen Füllhöhe in Beziehung gesetzt. Dadurch konnte der Schrumpfungsfaktor bezüglich der Gefäßdurchmesser und der Gefäßlänge ermittelt werden. Es wurden jeweils sechs Proben pro Injektionsmedium vermessen.

Ermittlung der Dichte der unterschiedlichen Injektionsmedien:

Nach Berechnung des Volumens (V) der für die Ermittlung des Schrumpfungsfaktors hergestellten zylindrischen Probekörper ($V = \pi r^2 \cdot h$, wobei r = Radius und h = Höhe des Probekörpers) wurde deren Masse (m) mit Hilfe einer Waage ermittelt und aus diesen Daten die Dichte (δ) des jeweiligen auspolymerisierten Injektionsmediums bestimmt: $\delta = m/V$. Es wurden jeweils sechs Proben pro Injektionsmedium vermessen.

Berechnung des Gesamtvolumens der Klauenkorrosionspräparate

Das Gesamtvolumen der Klauenkorrosionspräparate wurde nach Bestimmung der Masse (m) der Präparate nach der Formel $V = m/\delta$ berechnet (nach LAMETSCHWANDTNER et al., 1990). Die Klauenkorrosionspräparate wurden für diese Berechnung im Zwischenklauenspalt voneinander getrennt und jeweils vorsichtig bis zum proximalen Rand des Saumsegmentes freipräpariert. Die so erhaltenen Ausgußpräparate der medialen bzw. lateralen Hauptklauen wurden einzeln gewogen. Die

Afterklauenausgüsse wurden ebenfalls - soweit möglich - vorsichtig voneinander getrennt und bis zum proximalen Rand des Saumsegmentes freipräpariert und dann gewogen.

Zur Gewebsmazeration wurden alle Präparate in 25 %ige Natronlauge in einem Wärmeschrank bei 45 bis 50 °C verbracht. Alle zwei bis drei Tage wurden die Präparate mit warmen Leitungswasser gespült und gröbere Gewebsbestandteile und verseifte Fette aus der Mazerationslösung abgeschöpft. Nach etwa 14 Tagen erhielt man die fertigen Gefäßausgüsse, nur noch die Knochen blieben vom umgebenden Gewebe erhalten. Anfangs wurden die Präparate zur Knochenmazeration in 4 %ige Salzsäurelösung verbracht; dies führte jedoch zur starken Verkalkung der Gefäßausgüsse. Statt dessen erfolgte nach der Mazeration in der Lauge ein 1 bis 2 tägiges Bad in Leitungswasser, dem einige Tropfen eines Detergens (Fairy Ultra[®], Fa. Procter & Gamble, Mainz) zugesetzt wurden, wodurch die Fette emulgiert und das Knochengewebe so mürbe und brüchig wurde, daß es bereits partiell mit einer Pinzette vorsichtig entfernt werden konnte. Anschließend erfolgte ein ca. einwöchiges Bad in 10 %iger Biozym[®] SE-Lösung (Amylasen und Proteinase vom Serintyp, Fa. Spinnrad, Gelsenkirchen), wodurch das restliche Knochengewebe und auch eventuell verbleibende Gewebsreste auf den Gefäßausgüssen entfernt wurden. Die Korrosionspräparate können auch ohne Laugenmazeration direkt in Biozym[®] SE, evtl. kombiniert mit Biozym[®] F (Lipidasen, Fa. Spinnrad, Gelsenkirchen) mazeriert werden. Bei dieser Methode dauert der Mazerationsvorgang mehrere Monate, ermöglicht jedoch eine gefahrlosere Handhabung der Präparate während der Spülvorgänge. Die Gefäßausgüsse der Afterklauen wurden direkt nach der Korrosion in Natronlauge in das Biozym[®] SE-Bad verbracht, eventuell vorhandene Reste der zugehörigen Zehenknochen wurden vorher vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Die gesäuberten Gefäßausgüsse wurden erst gründlich mit warmem Leitungswasser gewässert und dann in Aqua dest. und bidest. gespült. Die Trocknung erfolgte im Wärmeschrank bei 45 °C, die Aufbewahrung in Glasbehältern über Kalziumchlorid.

2.2 Herstellung von Injektionspräparaten für die lichtmikroskopische Untersuchung

Zur Darstellung der Gefäßlumina bzw. der Gefäßwände wurden verschiedene Gelatine- und Farbstofflösungen verwendet. Bei Verwendung von Gelatinelösungen wurden die Extremitäten im Wasserbad auf 40 °C erwärmt, ansonsten erfolgte die Injektion bei Zimmertemperatur (ROMEIS, 1989). Folgende Injektionslösungen wurden verwendet: saures Hämatoxylin nach EHRlich (GRANT, 1930), gesättigte Berliner-Blau-Lösung sowie Berliner-Blau-Gelatine (HEINZE u. KANTOR, 1972a; ROMEIS, 1989). Nach der Injektion wurden die Gelatine-Präparate zwei Tage

bei 4 °C gekühlt. Aus den Präparaten wurden 1,5 cm dicke Sagittalscheiben entnommen und diese in 3,5 %igem Formol immersionsfixiert (ROMEIS, 1989).

2.3 Herstellung von Injektionspräparaten für die postmortale Angiographie

Als Kontrastmittel für die postmortale Angiographie wurde Barium-Sulfat gewählt. Die Injektion erfolgte an zwei klauengesunden und zwei krankhaft veränderten (Dermatitis digitalis, chronische Klauenrehe) Hintergliedmaßen adulter Rinder arteriell in die im Wasserbad auf 40 °C erwärmte Extremität mit Barium-Sulfat-Gelatine (2 %ige Gelatinelösung und gesättigte Barium-Sulfat-Lösung zu gleichen Teilen). Zur Homogenisierung der Injektionslösung wurde diese maschinell gemischt und in einer Vakuumpumpe entlüftet. Die injizierten Gliedmaßen wurden über 2 Tage bei 4 °C gekühlt gelagert, um die Gelatine auszuhärten, und in 4 %igem Formol immersionsfixiert (SCHOENMACKERS, 1960; ROMEIS, 1989). Mit Hilfe einer Röntgenaufnahme erfolgte eine Überprüfung des Füllungszustandes der Gliedmaßen; war dieser ausreichend, wurden die Klauen tiefgefroren und mit einer Bandsäge in Sagittalscheiben zerlegt. Die Sagittalscheiben wurden auf Holographieplatten (CO/R, Fa. ORWO, Filmfabrik Wolfen) gelegt und in einem geschlossenen Röntgengerät für 10 bis 20 Minuten bei 40 bis 100 kV belichtet. Anschließend erfolgt die Entwicklung mit frisch angesetztem Entwickler für Kodak-Fotoplatten (Ansatz: 4-Methyl-aminophenol-sulfat, Natriumsulfit, Natriumcarbonat, Hydrochinon, Kaliumbromid). Die entstandenen Aufnahmen konnten auch lichtmikroskopisch untersucht werden, da die Holographieplatten sehr feinkörnig und kontrastreich sind und damit eine sehr gute Zeichenschärfe erreicht wird.

3. Lichtmikroskopische Untersuchung

3.1 Probengewinnung und Herstellung von histologischen Präparaten

Zusätzlich zu den nach 2.2 erstellten Sagittalscheiben wurden auch entsprechende Sagittalscheiben aus nicht injizierten, klauengesunden Klauen (frisch geschlachtet bzw. direkt nach der Schlachtung tiefgefroren) entnommen. Außerdem wurden entsprechende Sagittalscheiben aus einer mit Mercocox[®]-MMA-Gemisch injizierten, makroskopisch unveränderten Hintergliedmaße erstellt.

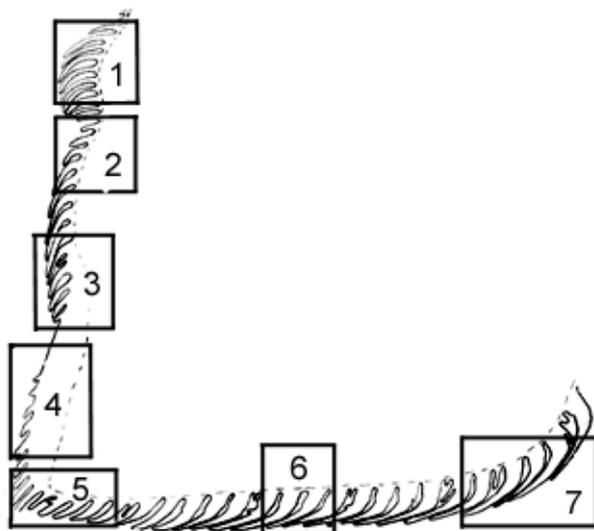
Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden diesen Sagittalscheiben Blöckchen mit einer Größe von 0,5 cm x 0,5 cm x 0,5 cm herausgesägt, die so orientiert waren, daß die spätere Schnittrichtung horizontal, sagittal oder transversal zur Klauenachse ausgerichtet war. Die genauen Lokalisationen der Probenentnahme sind in der nachfolgenden Abbildung (Textabb. 1) angegeben.

Insgesamt wurden aus jeweils acht Hauptklauen von adulten Vorder- bzw. Hintergliedmaßen Proben aus allen Segmenten entnommen.

Die Fixation der Proben erfolgte in 4 %iger wäßriger Formaldehydlösung für mindestens sieben Tage, wobei das Fixans nach ein, zwei und nach 24 Stunden gewechselt wurde. Die ausfixierten Präparate wurden 24 Stunden in fließendem Leitungswasser gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Einbettung erfolgte in Hydroxyethylmethacrylat (Technovit® 7100, Fa. Kulzer, Wehrheim). Für die Einbettung der Epidermis, Dermis und - soweit vorhanden - Subkutis bzw. nur Dermis und Subkutis (ausgeschuhte Präparate) umfassenden Proben wurde die Einbettungsvorschrift und -technik der Fa. Kulzer modifiziert (BRIEST-FORCH et al., 1993). Die eingebetteten Präparate wurden mit Technovit® 3040 aufgeblockt.

Auf einem motorgetriebenen Kunststoffmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) wurden ca. 5 µm dicke Serienschnitte angefertigt, wobei nur jeder zweite Schnitt verwendet wurde. Die Schnitte wurden im Wasserbad gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und für zwei bis drei Stunden auf einer 60 °C warmen Heizplatte getrocknet.

Die Proben aus der mit Mercocox® injizierten Gliedmaße wurden in Paraffin eingebettet.



Textabbildung 1: Lokalisation der Probenentnahmestellen für die histologische Untersuchung

- | | |
|---|---|
| 1 | Saumsegment mit Übergang zur behaarten Haut |
| 2 | Kronsegment |
| 3 | Kronsegment mit Übergang in das Wandsegment |
| 4 | Wandsegment |
| 5 | Wand-Sohlensegment-Übergang |
| 6 | distaler Abschnitt des Ballensegmentes |
| 7 | proximaler Abschnitt des Ballensegmentes |

3.2 Histologische Färbungen

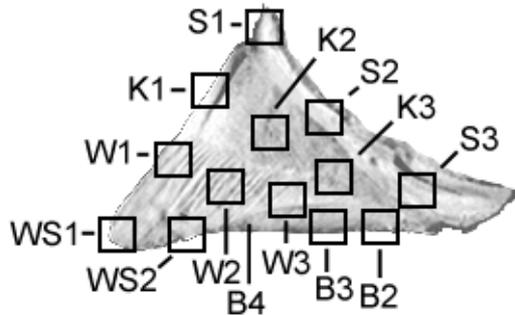
- H.-E. Färbung, modifiziert für Technovit® (GERRITS, 1985; ROMEIS, 1989)
- Perjodsäure-Schiff-(PAS)-Reaktion, modifiziert für Technovit® (GERRITS, 1985; ROMEIS, 1989)

4. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Aus den insgesamt 46 Korrosionspräparaten (siehe Tab. 2) der unveränderten Gliedmaßenenden adulter Rinder, den drei Kälberpräparaten sowie den fünf Präparaten veränderter Klauen wurden mit Hilfe eines Thermokaustikus bzw. mit feinen Pinzetten und Scheren ca. 1 cm x 1 cm x 1 cm große Proben aus allen Segmenten, vor allem aus den Bereichen entnommen, die bei der Untersuchung mit dem Stereomikroskop eine ausreichende Gefäßfüllung erkennen ließen. Zum Teil wurden auch Proben aus weniger gut gefüllten Bereichen entnommen, um die tiefen dermalen und die subkutanen Gefäße zu beurteilen. Aus jedem Segment wurden axiale, abaxiale und zentrale Proben entnommen. Die Probenentnahmestellen aus den insgesamt 49 Korrosionspräparaten von Gliedmaßenenden mit unveränderten Klauen und den fünf Präparaten mit pathologisch veränderten Klauen wurden in Textabbildung 2 dargestellt. Zur Befestigung der Proben auf kleinen Aluminiumtellern diente Leit-C nach Göcke (Fa. Plano, Marburg). Die Proben wurden dabei zum überwiegenden Teil so orientiert, daß jeweils die tiefen dermalen bzw. subkutanen Gefäßnetze auf den Teller aufgeklebt wurden, so daß die Spitzen der Papillen bzw. die Firste der Blättchen nach oben zeigten, die Telleroberfläche also parallel zur dermo-epidermalen Grenzfläche verlief. Einige Präparate aus den zöttchentragenden Segmenten wurden so aufgeklebt, daß die Längsachsen der Zöttchen parallel zur Telleroberfläche verliefen. Dadurch sollte eine kontinuierliche Untersuchung der tiefen Gefäßnetze und deren Fortsetzung in die Zöttchen ermöglicht werden. In einem Kathodenzerstäubungsgerät (Fa. Polaron, Watford, England) wurden die Proben mit Gold besputtert (Besputterungszeit: 2 resp. 3 min, Schichtdicke: 30 bis 50 nm).

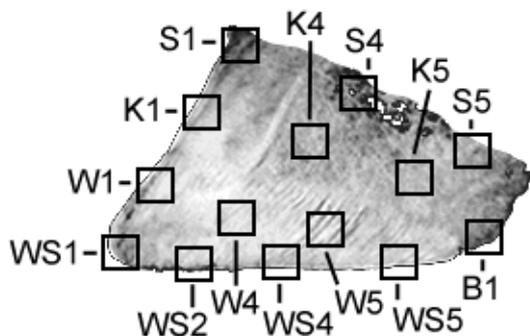
Die Befunderhebung und -dokumentation erfolgten am institutseigenen Rasterelektronenmikroskop Typ. Nanolab 2000 (Bausch & Lomb, Canada) bei 10 kV Beschleunigungsspannung.

Textabb. 2: Probenentnahmestellen für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung



Mikrokorrosionspräparat, axiale Ansicht.

- S1** Saumsegment am Klauenrücken, mit Übergang zur behaarten Haut und zum Kronsegment
- S2** Saumsegment axial, mit Übergang zum Kron- bzw. Zwischenklauensegment
- S3** Saum-Ballensegment-Übergang axial palmar/plantar
- K1** Kronsegment am Klauenrücken, mit Übergang zum Wandsegment
- K2** Kronsegment axial, mit Übergang zum Wandsegment
- K3** Kronsegment axial palmar/plantar, mit Übergang zum Saum-, Ballen- und Wandsegment
- W1** Wandsegment am Klauenrücken
- W2** Wandsegment axial
- W3** Wand-Sohlensegment-Übergang axial
- WS1** Wand-Sohlensegment-Übergang am Klauenrücken
- WS2** Wand-Sohlensegment-Übergang axial
- B2** Ballensegment proximal, Ballenwulst
- B3/** Ballensegment distal, mit Übergang
- B4** zum Sohlensegment



Mikrokorrosionspräparat, abaxiale Ansicht.

- S1** Saumsegment am Klauenrücken
- S4** Saumsegment abaxial, mit Übergang zur behaarten Haut und zum Kronsegment
- S5** Saum-Ballensegment-Übergang abaxial palmar/plantar
- K1** Kronsegment am Klauenrücken
- K4** Kronsegment abaxial, mit Übergang Wandsegment
- K5** Kronsegment abaxial palmar/plantar, mit Übergang Saum-, Ballen- und Wandsegment
- W1** Wandsegment am Klauenrücken
- W4** Wandsegment abaxial
- W5** Wandsegment abaxial palmar/plantar, mit Übergang zum Kron- und Ballensegment
- WS1** Wand-Sohlensegment-Übergang am Klauenrücken
- WS3** Wand-Sohlensegment-Übergang abax.
- WS4** Wand-Sohlensegment-Übergang abaxial palmar/plantar, mit Übergang zum Ballensegment
- WS5** Wand-Sohlensegment-Übergang abax.
- B1** Ballensegment proximal palmar- bzw. plantar, mit Übergang behaarte Haut und Zwischenklauensegment

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl und Art der angefertigten Korrosionspräparate (Haupt- und Afterklauen) von Gliedmaßen mit makroskopisch unveränderten Klauen

Rind adult	unausgeschuht		ausgeschuht		Laktat		Histamin	
	vo	hi	vo	hi	vo	hi	vo	hi
T	10	6						
	16 Übersichtspräparate							
T+MMA	1	1						
	2 Übersichtspräparate							
TZ/TZ+EA	1	7		2	1	1		
	12 Präparate							
M/M+MMA	3	4	1	1	1	1	1	1
	13 Präparate							
Plastoid	3							
	3 Präparate							
	insgesamt 46 Präparate adulter Gliedmaßen							

Kalb	unausgeschuht	
	vo	hi
TZ/TZ+EA	1	
M/M+ MMA		1
Plastoid	1	
	Insgesamt 3 Kälberpräparate	

T=Technovit[®] 7143, TZ=Tensolzement[®], M=Mercox[®]