

## C. MATERIAL UND METHODEN

### 1. DAS UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Untersucht wurden vier verschiedene Hautstellen von insgesamt 12 Hühnerküken aus drei Versuchstiergruppen mit jeweils vier Tieren. Die Masthühner vom Typ „poulet de chair“ und der Rasse „vedette“ waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme drei Wochen alt. Das Experiment startete mit Eintagsküken, die in drei Gruppen: M, K und B gehalten wurden. Jede Gruppe erhielt einheitlich eine halbsynthetische Biotinmangeldiät (siehe Anhang). Der Gruppe M wurde zusätzlich 2 % Avidin zugesetzt, um mögliche Restmengen an Biotin im Futter oder intestinal von Mikroorganismen gebildetes Biotin durch kovalente Bindung der Resorption zu entziehen. Gruppe K erhielt 2 % Casein (vitaminfrei) zugesetzt, und Gruppe B erhielt 2 % Casein und zusätzlich 500 µg Biotin (Rovimix H<sub>2</sub>) / kg Futter. Die Tiere wurden in drei übereinander angeordnete Käfige gehalten, wobei die Gruppe M oben, die Gruppe K mittig und die Gruppe B unten angesiedelt waren. Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum.

**Tabelle 1:** Futterrationen der verschiedenen Versuchstiergruppen

Gruppen	Futtermittelrationen <sup>1)</sup>
M	Halbsynthetische Biotinmangeldiät + 2% Avidin
K	Halbsynthetische Biotinmangeldiät + 2% Casein (vitaminfrei)
B	Halbsynthetische Biotinmangeldiät + 2% Casein (vitaminfrei) + 500 µg Biotin/kg Futter

<sup>1)</sup> Die drei verschiedenen Futtermittelrationen wurden den Tieren in Form von 2 mm langen Pellets angeboten.

### 2. DIE PROBENENTNAHME

Der in Frankreich genehmigte Tierversuch ist von der Pharmafirma Hoffmann-La Roche AG (Frankreich / Ville de Neuf) durchgeführt worden. Unmittelbar nach der

Tötung sind von allen Tieren vier Hautproben entnommen und fixiert worden. Die Proben der Brusthaut sind links und rechts des Brustbeinkammes, die Proben der Rückenhaut über der Brust- und Lendenwirbelsäule entnommen worden. Die Proben der Schuppenhaut wurden zum einen dorsal am Tarsometatarsus und von den Zehenrücken („scutate scales“), zum anderen vom Metatarsalballen („reticulate scales“) entnommen. Die Proben wurden in einer Größe von zirka 1 cm<sup>2</sup> Fläche mit dem Skalpell herausgeschnitten. Die Tiefe des Gewebestücks umfaßte die Epidermis, in aller Regel die gesamte Dermis und teilweise auch die Subkutis.

Die Proben für die lichtmikroskopischen Untersuchungen sind in Formol-Kalzium nach BAKER (1946), die Proben für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen sind im vollen Probenumfang sowohl in dem Glutaraldehyd-Formaldehyd - Gemisch nach KARNOVSKY (1965), als auch in einer 1 %igen phosphatgepufferten Osmiumtetroxidlösung fixiert worden. Für die Rasterelektronenmikroskopie und die lichtmikroskopische Fettdarstellung sind distale Gliedmaßenabschnitte im Bereich des Fußwurzelgelenks abgetrennt und bis zur Verarbeitung bei -60 °C tiefgefroren worden.

### **3. DIE PROBEN ZUR LEBERGEWICHTS- UND BIOTINBESTIMMUNG**

Es wurde von jedem Versuchstier der Gruppen M, K und B die Leber entnommen, um deren Organgewicht und den Biotingehalt zu bestimmen. Außerdem wurden Blutproben entnommen zur Untersuchung des Biotingehaltes.

### **4. DIE RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN TECHNIKEN**

Für die SEM-Untersuchungen sind Proben von der dorsal gelegenen Schuppenhaut des Tarsometatarsus und des Metatarsalballens der tiefgefrorenen Gliedmaßenabschnitte entnommen worden.

#### **4.1 Die Proben zur Darstellung der Hautoberfläche**

Zur Untersuchung der Schuppenoberfläche wurden die Proben osmiumfixiert, mehrmals in Phosphatpuffer (SØRENSEN) ausgewaschen und langsam über eine Alkoholreihe entwässert. Zum Trocknen wurden die Proben für 1 - 2 Stunden in Hexamethyldisilazane (HMDS; ROTH<sup>®</sup>, Karlsruhe) eingelegt und über Nacht in einem Vakuumschrank aufbewahrt. Danach wurden die Proben mit je einem Tropfen HMDS benetzt und unter dem Abzug getrocknet. Die getrockneten Proben wurden auf kleinen Aluminiumtellern mit Leit-C<sup>®</sup> nach GÖCKE (Fa. Plano, Marburg) aufgeklebt und mit einem Kathodenzerstäubungsgerät (Fa. Polaron, Watford/England) mit Gold in einer Schichtdicke von 50 nm bedampft.

#### **4.2 Die Proben zur Darstellung der epidermalen Schichten**

Zur Untersuchung der Epidermisschichten wurden die Proben in einer 2%igen Glutaraldehydlösung über Nacht fixiert und mehrmals in Phosphatpuffer ausgewaschen. Es schloß sich die Behandlung mit einer 30%igen und nachfolgend mit einer 60%igen Hexamethyldisilazane (HMDS) - Lösung für je eine Stunde an. Nach mehrmaligem Spülen in Pufferlösung und Markieren einer Sollbruchstelle wurden die Proben in Isopentan mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und durch eine einfache Gefrierbruchtechnik auseinandergelöst. Anschließend kamen die Proben für eine ½ Stunde in eine 1%ige Tanninsäurelösung und wurden danach für eine Stunde in einer 1%igen Osmiumtetroxidlösung nachfixiert. Nach anschließender Spülung in Phosphatpuffer erfolgte die Trocknung und Verarbeitung wie bereits in Kapitel 3. 1 beschrieben. Die Proben wurden an einem Rasterelektronenmikroskop NANOLAB 2000<sup>®</sup> der Firma BAUSCH & LOMB / ARL (Canada/Ottawa) untersucht.

#### **4.3 Die Proben zur Untersuchung der Papillarkörperoberfläche**

Untersucht wurden die Papillarkörperoberflächen der beiden Schuppenhauttypen. Die Trennung von Korium und Epidermis erfolgte nach einer Methode, die von GREB (1940) an der menschlichen Haut und von BAIER (1950) am Huf und an der Klaue

angewandt wurde. Die Proben stammen von tiefgefrorenen distalen Gliedmaßenabschnitten. Zur Darstellung der Grenzflächen zwischen der Dermis und der Epidermis wurden die Proben für 2 Stunden bei 37 °C in eine 1%ige Essigsäurelösung verbracht. Nach dieser Zeit ließen sich die Hautproben, die dorsal am Tarsometatarsus entnommen wurden, in Dermis und Epidermis trennen. Ebenfalls nach einer zwei-stündigen Inkubation ließen sich die Schuppenhautproben des Metatarsalballens von Tieren der Gruppe B in Epidermis und Dermis trennen, während bei den Tieren der Gruppe M die Inkubationszeit um eine Stunde verlängert werden mußte. Anschließend wurden die Hautstücke in einer 2%igen gepufferten Glutaraldehydlösung für 24 Stunden immersionsfixiert. Danach wurden die Proben in Phosphatpuffer ausgewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

## **5. DIE LICHTMIKROSKOPISCHEN TECHNIKEN**

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an fixierten Paraffin- und Kunststoffschnitten sowie an fixierten (Enzymnachweise, Nilblausulfat-Reaktion) und unfixierten Kryostatschnitten (Sudanschwarz B-Fettfärbung). Die weichen Hautstellen wie Brust- und Rückenhaut sind in Paraffin, die härteren Schuppenhautproben sind sowohl in 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (Technovit 7100<sup>®</sup>, Fa. KULZER, Friedrichsdorf) als auch in Paraffin eingebettet worden.

### **5.1 Das Herstellen von Paraffinschnitten**

#### **5.1.1 Die Paraffineinbettung**

Die zur Paraffineinbettung bestimmten Proben sind direkt nach der Probenentnahme in einem 4%igen Formol-Calcium-Gemisch nach BAKER (1946) verbracht und für zirka 20 Stunden immersionsfixiert worden. Die Fixierlösungen wurden mehrmals gewechselt. Nach dem Fixieren sind die Proben mit dem Skalpell auf eine Kantenlänge von etwa 0,5 cm × 0,5 cm zugeschnitten worden. Anschließend wurde das Probenmaterial 24 Stunden in einer 30%igen Saccharoselösung, die mehrmals gewechselt wurde, gespült. Die fixierten und gespülten Hautproben wurden in einer

aufsteigenden Alkoholreihe in üblicher Weise entwässert und in Xylol sowie anschließend in Paraplast verbracht. Danach sind die Proben zu Blöckchen ausgegossen worden.

### 5. 1. 2 Das Schneiden der Paraffinblöckchen

Die Paraffinblöckchen sind an einem Schlittenmikrotom in 5 bis 7 µm dicke Scheiben geschnitten, in einem Wasserbad von 40 °C gestreckt und anschließend auf Poly-L-Lysin -(SIGMA<sup>®</sup>, Deisenhof) oder 3 Aminopropyltriethoxy-Silane - beschichteten Objektträgern aufgezogen worden. Beide Substanzen erhöhen die Haftung der dünnen Schnitte auf den Objektträgern und sollen das Abschwimmen der Proben verhindern. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, daß die mit Silane - beschichteten Objektträger größere Haftwirkung als Poly-L-Lysin - beschichtete Objektträger aufweisen. Danach blieben die mit Probenmaterial bestückten Objektträger für 30 min auf einer Heizplatte bei 40 °C und wurden daraufhin über Nacht im Brutschrank bei 37 °C getrocknet. Bis zur Weiterbearbeitung wurden die bestückten Objektträger bei Raumtemperatur gelagert.

## 5. 2 Das Herstellen von Kunststoffschnitten

### 5. 2. 1 Die Kunststoffeinbettung (Technovit<sup>®</sup>-Einbettung)

Zur Technovit<sup>®</sup>-Einbettung sind die Hautstücke zum einen mit KARNOVSKY`S Fixans (1965) und anschließend mit Osmiumtetroxyd und zum anderen ausschließlich mit Osmiumtetroxyd behandelt worden. Die Fixierung dauerte 24 Stunden. Anschließend wurde das Probenmaterial für 12 Stunden in einer 30%igen Saccharoselösung, die mehrmals gewechselt wurde, gespült. Danach sind die Proben mit dem Skalpell auf eine Kantenlänge von zirka 0,5 cm × 0,5 cm × 0,5 cm zugeschnitten worden. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in einer Mischung von Technovit 7100<sup>®</sup> und 100%igem Ethanol im Verhältnis 1 : 1 für 3 bis 4 Stunden inkubiert. Danach sind die Proben in ein Infiltrationsmedium (Technovit 7100<sup>®</sup> plus Härter 1) verbracht und über Nacht in einem Vakuumschrank aufbewahrt worden. Es schloß sich das Ausgießen der Proben mit Technovit 7100<sup>®</sup>

plus Härter 2 an und nach einem Aushärten von 2 bis 3 Stunden und einem zweektägigem Trocknen wurden die Kunststoffblöckchen mit Technovit 3040<sup>®</sup> aufgeblockt.

### 5.2.2 Das Schneiden der Kunststoffblöckchen

Die Kunststoffblöckchen wurden an einem Schlittenmikrotom der Firma REICHERT-JUNG, Heidelberg mit einem HK-3 Messer in 4 bis 5 µm dicke Schnitte abgenommen und in einem Wasserbad von 40 °C gestreckt. Nach dem Aufziehen der Schnitte auf die Objektträger wurden sie auf einer Heizplatte bei 80 °C aufgebrannt.

## 5.3 Das Anfertigen von Kryostatschnitten

Die lichtmikroskopischen Enzymnachweise der sauren Phosphatase, der Thiaminpyrophosphatase und der Adenosintriphosphatase wurden an allen vier beschriebenen Hautstellen vorgenommen, während die Fettfärbungen nur an Hautproben der dorsalen Schuppenhaut des Tarsometatarsus und der Zehen sowie des Metatarsallballs durchgeführt wurden.

### 5.3.1 Die lichtmikroskopischen Enzymnachweise

Die Proben für die Enzymnachweise wurden in 4%iges Formol-Kalzium nach BAKER (1946) für vier Stunden bei 4 °C fixiert (Blockfixierung). Danach wurde das fixierte Material in 30%iger Saccharoselösung mehrfach über 24 Stunden ausgewaschen und anschließend für weitere 12 Stunden gewässert. Die Proben wurden daraufhin mit flüssigem Stickstoff in Isopentan schockgefroren und in Tissue-Tek<sup>®</sup> (MILES Inc., USA) mit Hilfe der Objektschnellkühlung auf den Präparatehalter des Kryostaten vom Typ 500 (MICROM, Heidelberg) angefroren. Bei einer Schneidetemperatur von 25 °C wurden mit einem C-Messer 8 bis 10 µm dicke Schnitte angefertigt und zur flotierenden Inkubation in die jeweiligen Inkubationsmedien verbracht. Die Kontrollen wurden ohne Substrat inkubiert bei sonst gleicher Behandlung.

#### Nachweis der sauren Phosphatase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der sauren Phosphatase wurde das Azokupplungsverfahren nach LOJDA (1962; BENES et al. 1961; BARKA u. ANDERSON,

1962) angewandt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37 °C in das Inkubationsmedium mit dem Substrat Naphthol-AS-Bi-phosphat verbracht, danach in Aqua destillata gespült und ohne Dehydrierung auf mit Poly-L-Lysin® (SIGMA, Deisenhof) - beschichteten Objektträgern aufgezogen und in Glycerin-Gelatine eingedeckt.

Die saure Phosphatase kommt hauptsächlich in Lysosomen vor. Extralysosomale saure Phosphatase findet man entweder im endoplasmatischen Retikulum oder im Grundplasma. Enzymaktive Stellen sind rot gefärbt.

#### Nachweis der Thiaminpyrophosphatase

Der Nachweis der Thiaminpyrophosphatase ist nach der Bleisalz-Methode modifiziert nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961) durchgeführt worden. Demnach wurden die Hautproben für zwei Stunden bei 37 °C im Inkubationsmedium mit dem Substrat Thiaminpyrophosphat-Tetrahydrat zusammengebracht. Anschließend wurden die Proben in Aqua destillata gespült und in Glycerin-Gelatine eingedeckt. Aktive enzymatische Stellen färben sich bei diesem Nachweis braun-schwarz. Die Thiaminpyrophosphatase wird relativ fest am Golgi-Apparat gebunden und dient daher zur Markierung dieser Zellorganellen.

#### Nachweis der Adenosintriphosphatase

Der Nachweis der membranständigen Adenosintriphosphatase erfolgt nach der Bleisalz-Methode, modifiziert nach WACHSTEIN und MEISEL (1975). Die Hautproben wurden nach dem Fixieren und Spülen in das Inkubationsmedium verbracht, das Adenosintriphosphat als Substrat enthält, und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Inkubationsmedium abgegossen, die Gewebeproben in Aqua destillata gespült und für zwei Minuten in 1%iges Ammoniumsulfid eingestellt. Nach nochmaligem Spülen in Aqua destillata wurden die enzyminkubierten Schnitte in Glyzerin-gelatine eingedeckt. Die Reaktionsprodukte sind braun-schwarz gefärbt.

### 5. 3. 2 Die Fettnachweise

Es wurden Fettnachweise mit Sudanschwarz-B und Nilblausulfat durchgeführt. Die Proben stammen von den tiefgefrorenen, unfixierten Gliedmaßenabschnitten, die bei -60 °C gelagert wurden. Es wurden Hautproben in einer Größe von zirka

0,8 cm × 0,8 cm × 0,8 cm entnommen und wie im obigen Abschnitt erläutert schockgefroren und ebenfalls in 8 bis 10 µm dicke Schnitte am Gefriermikrotom zerlegt. Die Schnitte für die Fettnachweise wurden auf Silane - beschichtete Objektträger aufgezogen und mit Hilfe eines Kaltluftföns für zirka 10 Sekunden aufgepreßt. Außerdem wurden die Schnitte flotierend gefärbt, was die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Qualität der Färbung ergab. Für den Nilblausulfat-Nachweis wurden die abgenommenen 8 bis 10 µm dicken Kryostatschnitte vor der Färbung in 4%iges Formalin fixiert.

#### **5.4 Die histologischen Übersichtsfärbungen**

Paraffinschnitte: H. E.- Färbung (Hämalaun nach MAYER/ Eosin) aus ROMEIS (1989)

Kunststoffschnitte: H. E.- Färbung (Hämatoxylin nach GILL / Eosin) aus KULZER (1985)

Paraffinschnitte: Trichromfärbung nach MASSON-GOLDNER aus ROMEIS (1989)

Paraffinschnitte: Färbung nach MARINOTTI aus „Histologische Technik der Haut“ von H. HOEPKE (1930)

#### **5.5 Die histochemischen Nachweise**

##### **5.5.1 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)**

An den Paraffinschnitten wurde die PAS-Reaktion nach McMANUS (ROMEIS, 1989) durchgeführt. Die Kunststoffschnitte wurden nach KULZER (1985) modifiziert PAS behandelt. Die Perjodsäure-Schiff-Reaktion dient dem semiquantitativen Nachweis von Glykoproteinen, Glykolipiden und von Glykogen. PAS-positive Strukturen werden purpurrot, schwach positive hellrosa und PAS-negative Strukturen werden farblos dargestellt. Als Kontrolle für den ordnungsgemäßen Reaktionsablauf wurden zum einen Schnitte von in Paraffin eingebetteter Hundeleber und zum anderen Schnitte von in Technovit<sup>®</sup> eingebettetem Klauenhorn des Rindes und Hufhorn des Pferdes

verwendet. Für den Nachweis von Glykogen wurden Schnitte eine Stunde mit Diastase (2 g Diastase mit > 1300 U/g in 100 ml H<sub>2</sub>O) bei 37 °C inkubiert (ARNOLD, 1968). Dies führt zu einem enzymatischen Abbau von Glykogen. Nach mehrmaligem Spülen in Aqua destillata wurde die PAS-Reaktion durchgeführt. Am jeweiligen Kontrollschnitt wurde eine PAS-Reaktion ohne vorherige Diastaseinkubation vorgenommen. Glykogen reagiert nach Diastaseinkubation PAS-negativ, da es diastase-labil ist. Es kann somit von den anderen PAS-positiven Substanzen abgegrenzt werden. Glykoproteine und Glykolipide sind demgegenüber diastasestabil und reagieren nach Diastaseinkubation unverändert PAS-positiv. Teilweise wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt.

#### 5. 5. 2 Semiquantitativer Nachweis von Sulfhydrylgruppen und Disulfidbrücken in der Epidermis (SH- und SS-Gruppennachweis)

Die im folgenden aufgeführten Reaktionen beschreiben BARNETT und SELIGMANN (1952, 1954) für in Paraffin eingebettete Proben. Um ein Abschwimmen der Schnitte von den Objektträgern zu vermeiden, wurden die Schnitte wie folgt celloidinisiert. Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert, für 2 bis 3 min in absoluten Alkohol überführt und anschließend für 3 bis 5 min in 0,5%ige Celloidinlösung verbracht. Danach ließ man die Objektträger abtropfen und kurz trocknen. Die Aushärtung des Celloidin erfolgte für einige Minuten in 70%igem Ethanol.

##### Der Sulfhydrylgruppennachweis (SH-Gruppennachweis)

Die Dihydroxy-Dinaphtyl-Disulfid-Reaktion (DDD-Reaktion) nach BARNETT und SELIGMANN (1952) wurde zum Nachweis der Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) eingesetzt. Ein niedriger SH-Gruppen-Gehalt ergibt durch einseitige Kopplung des Fast-Blue-B-Salzes eine rote Färbung, ein hoher Gehalt durch bilaterale Kopplung eine Blaufärbung. Als Kontrollproben für den korrekten Reaktionsablauf wurden Schnitte von paraffineingebettetem Hufhorn vom Pferd mitgeführt.

##### Der Disulfidgruppennachweis (SS-Gruppennachweis)

Der SS-Gruppennachweis erfolgt mit der DDD-Reaktion nach vorheriger Blockierung der SH-Gruppen und anschließender Reduktion der SS- zu SH-Gruppen (BARNETT und SELIGMANN, 1954). Zunächst wurden die vorhandenen SH-Gruppen mit N-Ethylmaleinimid oder Monojodsäure bei 37 °C für 12 bis 24 Stunden blockiert. An-

schließlich wurde zuerst in einer 1%igen Essigsäurelösung und danach in Aqua destillata gespült. Es schließt sich die Reduktion der SS-Gruppen mit Natriumthioglykolat zu SH-Gruppen an, die bei 56 °C für 2 h durchgeführt wurde. Die neu entstandenen SH-Gruppen repräsentieren die ursprünglich vorhandenen Disulfidbrücken. Sie wurden durch eine sich anschließende Dihydroxy-Dinaphtyl-Disulfid-Reaktion nachgewiesen. Eine Rotfärbung entspricht einem niedrigen Gehalt, eine Blaufärbung einem hohen Gehalt an SS-Gruppen. Als Kontrollmaterial diente wieder Hufepidermis.

#### Die Kontrolle der SH-Gruppen-Blockierung

Nach 12- bis 24-stündiger Blockierung in N-Ethylmaleinimid oder Monojodsäure wurden die Proben wie oben beschrieben ausgewaschen und die DDD-Reaktion angeschlossen. Positive Reaktionen sind auf reduzierende Nicht-SH-Gruppen zurückzuführen und von den SH-Gruppen nachweisen „abzuziehen“.

Die Auswertung der Farbniederschläge und ihre Zuordnung erfolgt nach KORTE (1987) auf einer Skala von 0 bis 7:

**Tabelle: 2** Bezeichnung der Reaktionsstärke beim SH-/SS-Gruppen nachweis in Abhängigkeit vom Farbton (in Anlehnung an KORTE, 1987):

REAKTIONSENTENSITÄT	FÄRBUNG	GEHALT AN SH-/SS-GRUPPEN
0 = keine Reaktion 1 = schwach positiv 2 = schwach bis mittelgradig positiv 3 = mittelgradig positiv 4 = mittelgradig bis stark positiv 5 = stark positiv 6 = stark bis sehr stark positiv 7 = sehr stark positiv	farblos rosa rosarot dunkelrot rotviolett violett blauviolett blau	keine SH-/SS-Gruppen        hoher Gehalt an SH-/SS-Gruppen

### 5. 5. 3 Fettfärbung mit Sudanschwarz-B

Die Färbung wurde an Kryostatschnitten durchgeführt und dient dem Nachweis von Lipiden in den Zellen und im Interzellularkitt der Epidermis. Eine schwarzgraue Färbung entspricht einem hohen -, eine hellgraue Färbung einem niedrigen Gehalt an Lipiden. Die Gegenfärbung erfolgte mit Kernechtrot.

### 5. 5. 4 Fettnachweis mit Nilblausulfat

Dieser Nachweis differenziert neutrale Lipide von sauren Lipiden. Neutrale Lipide färben sich rosa und saure Lipide färben sich blau an.

### 5. 5. 5 Feulgensche Nuklealreaktion

Die Reaktion dient der Darstellung der Zellkernstruktur und der mitotischen Teilungsfiguren. Die DNA färbt sich purpurfarben an. Als Gegenfärbung schließt sich die Färbung mit Lichtgrün an.

### 5. 5. 6 Rhodamin B-Färbung nach LIISBERG (1968)

Mit dieser Färbung erfolgt eine spezifische Keratindarstellung. Zur Darstellung der Zellkerne schließt sich eine Färbung mit Toluidinblau an, gegenüber den Angaben von LIISBERG (1968), die für Paraffinschnitte gelten, wird für die Kunststoffschnitte die Färbezeit verdoppelt. Gegensätzlich zu den Angaben von LIISBERG, der eine Differenzierung in 70%igem Alkohol bis zur Farbkonstanz vorschlägt, gelingt der Nachweis bei den Hühnerhautproben und den zur Kontrolle mitgeführten Hufepidermisproben vom Pferd und Klauenhornproben vom Rind nur dann, wenn die anschließende Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe rasch von statten geht, das heißt wenn pro Alkoholkonzentrationsstufe maximal eine halbe Minute, oder ausschließlich in absolutem Alkohol für maximal 2 min dehydriert wird. Ansonsten entfärben sich die Proben vollständig während der Dehydrierung. Die Keratine in den verhornten Epidermiszellen werden leuchtend rot gefärbt.

### 5. 5. 7 Nachweis von Histidin nach LANDING und HALL (1956), modifiziert von BACHMANN und SEITZ (1961)

Der Nachweis von Histidin dient der Darstellung aller Strukturen, die die Aminosäure Histidin enthalten, wie Keratohyalin granula im Stratum granulosum der Epidermis.

Diese Strukturen färben sich je nach Konzentration rotbraun bis blaubraun. Durch Jodieren nehmen Tyrosin- und Tryptophangruppen nicht an der Reaktion teil.

## 6. DIE TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN TECHNIKEN

Die in 1%iger wässriger Osmiumtetroxidlösung und in KARNOVSKY's Fixans immersionsfixierten Proben zur morphologischen Untersuchung am TEM wurden mehrmals in Phosphatpuffer gespült. Danach sind die Os<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-fixierten Präparate und ein Teil der mit KARNOVSKY's Fixans behandelten Präparate nachosmiert, entwässert und in Epon<sup>®</sup> eingebettet worden.

### 6.1 Die Enzymnachweise

Die elektronenmikroskopischen Enzymnachweise wurden nach folgenden Methoden durchgeführt:

Enzyme	Methode
Saure Phosphatase	Enzymnachweis nach GOMORI, modifiziert durch BARKA (1964)
Thiaminpyrophosphatase	nach ESSNER und NOVIKOFF (1962)
Adenosintriphosphatase	nach ESSNER und NOVIKOFF (1962)

#### 6.1.1 Der Nachweis der sauren Phosphatase

Die Proben für diesen Nachweis wurden in einer cacodylatgepufferten 6%igen Glutaraldehydlösung für 2 Stunden bei 4°C immersionsfixiert. Nach mehrmaligem Spülen in 0,1 M Cacodylatpuffer mit 7,5 % Saccharosezusatz und dem Anfertigen von 50 µm dicken Schnitten an einem Gefriermikrotom wurden die Proben in einer Bleinitrat-Natrium-β-glycerophosphat-Lösung bei 37°C für 20 min inkubiert. Danach wurden die Proben zweimal in Aqua bidestillata gewaschen, zwischen diesen Waschungen in 2%iger Essigsäure kurz gespült, und in gepufferter 1%iger Osmium-

tetroxidlösung für eine Stunde nachfixiert. Danach sind die Proben gespült, entwässert und in Epon<sup>®</sup> eingebettet worden.

### 6. 1. 2 Der Nachweis der Thiaminpyrophosphatase

Die Proben sind wie zum Nachweis der sauren Phosphatase fixiert, gewaschen und geschnitten worden und anschließend in einer wässrigen Thiaminpyrophosphat-chlorid-Lösung nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961) für 20 min bei 37 °C inkubiert worden. Danach wurden die Proben in einem 0,1 M Cacodylatpuffer, der 0,2 M Saccarose enthält, gewaschen und in 1%iger Osmiumtetroxidlösung für 1 Stunde bei 4 °C nachfixiert. Die Proben wurden anschließend gespült, entwässert und in Epon<sup>®</sup> eingebettet.

### 6. 1. 3 Der Nachweis der Adenosintriphosphatase

Die Proben sind wie zum Nachweis der sauren Phosphatase fixiert, gewaschen und geschnitten worden. Anschließend wurden sie in eine Adenosin-5-triphosphat-dinatriumsalz-Lösung nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961) bei 37 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden die Proben in einer 5%igen wässrigen Saccharoselösung ausgewaschen und in gepuffertem OsO<sub>4</sub>-Lösung nachosmiert. Nach dem Entwässern wurden sie in Epon<sup>®</sup> eingebettet.

Die Kontrollen zu den Enzymnachweisen erfolgten durch Weglassen des jeweiligen Substrates in den Inkubationsmedien.

## 6. 2 Das Schneiden der Semi- und Ultradünnschnitte

Von allen TEM-Probenblöckchen wurden an einem Ultramikrotom (Fa. Reichert - Jung, Heidelberg) mit Glasmessern 1 µm dicke Semidünnschnitte abgenommen und mit 1%iger Methylenblau-Azurlösung oder mit Methylenblau/Pyroninrot (ROMEIS, 1989) für die lichtmikroskopische Untersuchung gefärbt. Anhand dieser Schnitte wurden geeignete Gewebeareale für Ultradünnschnitte ausgewählt. Letztere sind mit

einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) in einer Dicke von 50 bis 60 nm hergestellt, auf befilmte Kupfer- oder Nickelringblenden aufgezogen und nach VENABLE und COGGESHALL (1965) mit Bleizitrat schnittkontrastiert worden. Die Auswertung erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 10 CR der Firma Zeiss AG, Oberkochen.