

---

## **III. Material und Methoden**

### **III.1. Material**

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden Gehirnschädel und Meningen von 66 Vogelspezies aus 21 der 50 Ordnungen der Klasse Aves verwendet. Die insgesamt 89 Tiere erreichten ein Alter zwischen wenigen Tagen und über 35 Jahren, allerdings war bei vielen nur eine Unterscheidung aufgrund des Federkleides in juvenil und adult möglich. Beide Geschlechter sind vertreten, es war aber nicht immer eine Geschlechtsbestimmung möglich. Eine Übersicht über die zoologische Einordnung der verwendeten Spezies einschließlich Anzahl der Individuen und deren Geschlecht gibt *Anhang 1*.

Das Material wurde ausschließlich aus intakten Köpfen von Leichen oder Schlachttieren gewonnen. Die überwiegende Anzahl der Tierkörper stammt aus dem Bestand des **Zoologischen Gartens Berlin**, ein Teil von **der Wattenmeerstation Sylt (in der Alfred-Wegener-Stiftung für Polar- und Meeresforschung)**, der **Klinik und Poliklinik für Kleine Haustiere der FU Berlin**, **Tierarztpraxen** und **Hofschlachtereien**. Alle Vögel, die nicht aufgrund eines Traumas gestorben oder euthanasiert worden waren, wurden vor der Probenentnahme durch das Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen des **Berliner Betriebs für zentrale gesundheitliche Aufgaben** auf Zoonosen untersucht und zur weiteren Bearbeitung freigegeben.

Tiere mit perforierenden Schädeltraumata gelangten nicht zur Untersuchung, solche mit intaktem Hirnschädel (z.B. nach Flug gegen Glasscheiben etc.) wurden akzeptiert. Bis auf zwei tiefgefrorene Tierkörper (-18°C) wurde nur gekühltes (+2°C, bis zu 36 h post mortem) oder frisches Material (bis 2 h post mortem) verwendet. Zur Materialgewinnung wurden die Köpfe enthäutet und entfleischt, die Kieferknochen und übrigen Anteile des Gesichtsschädels wurden entfernt, bis das intakte Neurocranium übrig blieb.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen standen je zwei weibliche Ratten und Hühner zur Verfügung. Die Ratten mußten krankheitsbedingt euthanasiert werden, die Vögel waren Schlachtgeflügel. Die Ratten hatten ein Alter von ca. sechs und acht Monaten, die Hühner waren beide fünf Monate alt.

Außerdem wurden Schnitte aus Material angefertigt, das aus früheren Untersuchungen des Instituts für Veterinär-Anatomie stammt. Es handelt sich dabei um Präparate der Riechschleimhaut von einer Katze und einer Taube.

## **III.2. Methoden**

### **III.2.1. Paraffinhistologie**

#### **III.2.1.1. Vorversuch**

Im Vorversuch wurden von ganzen Gehirnen dreier Enten, eines Huhns, eines Wellensittichs und eines Kronenkranichs Paraffin-Serienschnitte angefertigt, um die in Frage kommenden Meningenabschnitte auszuwählen. Zu Präparation, Einbettung und Schnitttechnik siehe die Schemata 1 und 2 der Hauptversuche.

#### **III.2.1.2. Hauptversuche**

Wegen der unterschiedlichen Größe der Köpfe wurde das Material in zwei Gruppen geteilt.

##### **a) große Schädel**

Bei Vögeln, deren Schädelgröße mindestens der des Huhns entsprach, wurde das Foramen magnum mit einer Laminektomie-Zange nach Friedmann unter Schonung der Dura mater bis auf wenigstens 0,5 cm Durchmesser erweitert. Die Schädel wurden in 10%igem Formalin oder Bouin-Fixans vorfixiert, bis das Gehirn fest war (mind. 1 Woche).

Danach konnte mit der Laminektomiezange und feinen Pinzetten der Schädelknochen so entfernt werden, daß die Dura am Gehirn verblieb. Das vom Knochen vollständig befreite, von allen Hirnhäuten umschlossene Gehirn wurde je nach Vorfixierung in 4%igem Formalin oder Bouin-Fixans, gefolgt von 70%igem Ethanol, nachfixiert (mind. 1 Woche).

Da das Vorhandensein PACCHIONischer Granulationen an Durasinus geknüpft ist, fanden in dieser Untersuchung nur die Meningen um den Bulbus olfactorius, dorsal zwischen den Großhirnhälften und dorsal des Cerebellum Verwendung. Sie enthalten den basalen Sinus sagittalis olfactorius (SSO), der über die Sinus olfactorii (SO) Verbindung mit dem Sinus sagittalis dorsalis (SSD) erhält, sowie die Venae cerebrales dorsorostrales, die Sinus transversi (ST) und den Sinus occipitalis (SOC).

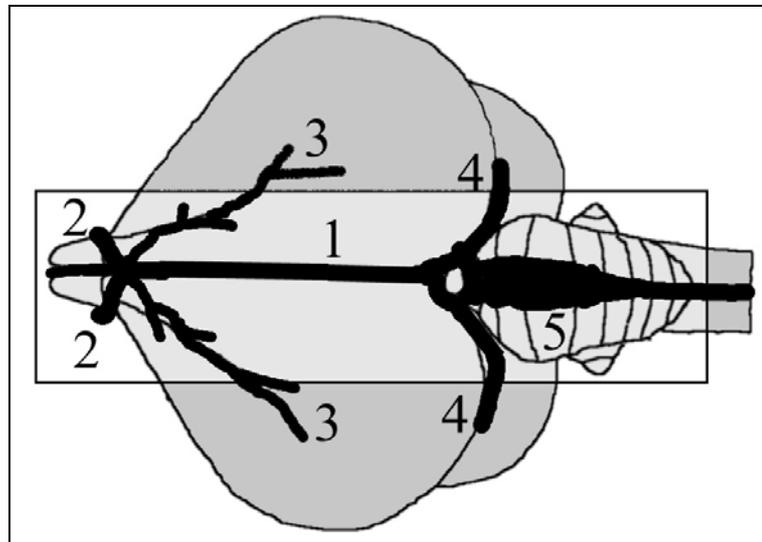


Abb. 7: Lage der verwendeten Meningenteile und ihrer Sinus durae matris am Beispiel eines schematisierten Hühnerhirns von dorsal. Kasten: verwendete Meningenteile. 1 Sinus sagittalis dorsalis, 2 Sinus olfactorius, 3 Vena cerebralis dorsorostralis, 4 Sinus transversus, 5 Sinus occipitalis.

Die zur Untersuchung vorgesehenen Abschnitte der Meningen wurden mittels einer Irisschere ausgeschnitten und unter Erhalt ihres natürlichen Zusammenhangs vom Hirn abgezogen. Dabei riss meist der Bulbus olfactorius vom Hirn ab und verblieb an den Meningen. Entwässert wurde in aufsteigender Alkoholreihe, die Paraffinlöslichkeit wurde durch Xylol ermöglicht. Vor dem Einbringen in Xylol erwies sich Methylbenzoat als vorteilhaft, um das Gewebe weicher und damit besser schnittfähig zu machen. Nach dem Vor-Paraffinieren in weichem Paraffin (Schmelzpunkt 37-40°C) wurde zur Einbettung hartes Paraffin (Rotiplast® oder eine Hausmischung, Schmelzpunkt 56-59°C) verwendet.

Waren die Gehirne sehr groß (>4cm), wurden die Meningen vor dem Einbetten in zwei bis drei Abschnitte geteilt. Um zu überprüfen, ob beim Abziehen der Meningen vom Gehirn alle Leptomeningeschichten im Präparat enthalten waren, wurde bei einer Elster, einer Ente und einem Kronenkränich der fragliche Bereich als eine Scheibe durch zwei Paramediane Schnitte mit einer scharfen Rasierklinge aus dem Gehirn herausgetrennt, eingebettet und in paramedian geschnittenen Serien untersucht. Diese Präparate enthielten auch die großen basalen Blutsinus. Alle Schichten der mit dem Hirn zusammenhängenden Meningen fanden sich auch in den durch Abziehen gewonnenen Präparaten wieder.

Es wurden Serienschritte von den Proben angefertigt, wobei sich die paramedianen Längsschnitte gegenüber den Querschnitten als übersichtlicher erwiesen. Jeder zweite Schnitt (Schnittdicke 10 µm) wurde in Reihe in destilliertem Wasser aufgefangen und aufbewahrt. Alle 100 µm wurde ein Schnitt aufgezoogen und mit Hämalaun-Erythrosin (HE) gefärbt und beurteilt. Bestand der Verdacht, es könne eine Granulation angeschnitten sein, wurden die dazwischenliegenden Schnitte ebenfalls aufgezoogen und mit einer Trichrom-Methode zur besseren Differenzierung des Bindegewebes gefärbt. Fand sich kein Anschnitt einer Granulation, wurden alle Schnitte verworfen.

Beurteilt wurden die gefundenen PACCHIONISchen Granulationen in Hinblick auf Verteilung, Größe, Form und Bestandteile.

Genaue biometrische Messung über die Größe der PACCHIONISchen Granulationen wurden zwar in dieser Untersuchung nicht vorgenommen, weil dies wegen der zum Teil sehr deutlichen postmortalen Veränderungen, der starken Schrumpfung des Materials bei Fixation und Entwässerung und der Abtrennung von der Hirnunterlage durch Zug nicht zuverlässig erschien. Es wurde jedoch von der Anzahl der Serienschritte (à 10 µm), die

Anschnitte einer Granulation zeigten, auf ein Mindestmaß geschlossen und mit einem Eichokular eine grobe Schätzung der angeschnittenen Fläche vorgenommen, um auf die Form und Ausdehnung der PACCHIONIschen Granulationen schließen zu können.

#### **b) kleine Schädel**

Da sich der spröde Vogelknochen nicht leicht ohne Perforation der Dura entfernen lässt, konnten die Gehirne kleiner Vogelarten (Tauben und kleiner) ohne Beschädigung der Meningen nicht vom Knochen befreit werden. Deshalb wurde bei diesen Tieren das gesamte Neurocranium fixiert (über die Opticus-Scheide, das Foramen magnum und die übrigen Schädellöcher dringt bei Kleinvögeln ausreichend Fixans ein). Die Fixation erfolgte meist mit 10%igem Formalin, teilweise auch in Bouin-Fixans, über mindestens eine Woche. Anschließend wurden die Schädel über fünf bis sieben Tage in einer wässrigen EDTA-Tris-Puffer-Lösung entkalkt, gründlich mit Wasser ausgespült, wie oben entwässert und eingebettet.

Die bei der Fixation und Entwässerung entstandenen Schrumpfungsräume füllten sich mit Luft, die kurz vor dem Einbetten in einem Vakuumschrank entfernt wurde. Die Einbettung der Neurocrania erfolgte mit den gleichen Materialien wie bei den großen Gehirnen.

Vor dem Schneiden wurden die in toto eingebetteten Neurocrania getrimmt, wobei ein Sicherheitsabstand zum gewünschten Bereich von mindestens 2 mm eingehalten wurde. Serienschnitte wurden von den in Schema 1 beschriebenen Meningenanteilen angefertigt; naturgemäß kamen hier auch die basalen Durasinus zur Untersuchung. Die Schnittdicke betrug ebenfalls 10 µm. Es wurden alle 50 µm HE-Kontrollfärbungen angefertigt, bei Verdacht auf PACCHIONIsche Granulationen wurden die Zwischenschnitte mit derselben Trichrom-Methode wie in Schema 1 gefärbt und nach den gleichen Kriterien beurteilt.

### **III.2.2. Elektronenmikroskopie**

#### **a) Ratten**

Bei den Ratten wurde direkt nach der Euthanasie die rostrale Schädelkalotte eröffnet und das rostrale Hirnstück ca. 2-3 mm caudal des Bulbus olfactorius mit einem Skalpell quer abgetrennt. Das Dach und die Wände der Nasenhöhle wurden eröffnet und die caudalen Conchae nasales, die Siebbeinplatte und der abgetrennte Teil des Gehirns mit Meningen in einem Stück entfernt. Anschließend wurde das bilateralsymmetrische Stück längs in seine beiden Hälften geteilt.

Die Fixation erfolgte in 4%iger Glutaraldehydlösung mit Cacodylatpuffer, um die Schrumpfungartefakte gering zu halten. Nach ca. zwei Stunden wurden die Proben in hinreichend kleine Stücke aus folgenden Bereichen unterteilt: Concha nasalis, Siebbeinplatte mit rostralem Bulbus, caudaler Bulbus mit Großhirn.

Während der nächsten 24 Stunden wurde die Fixation mit Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fortgesetzt. Nach der Entkalkung in EDTA-Tris-Puffer und Kontrastierung mit 1%igem Osmiumtetroxyd ( $\text{OsO}_4$ ) und 5%igem Uranylacetat wurden die Proben in EPON eingebettet. An mit Methylenblau gefärbten Semidünn-Schnitten ( $2\mu\text{m}$ ) wurde der Bereich ausgewählt, von dem Ultradünn-Schnitte angefertigt wurden. Die Untersuchung erfolgte an einem ZEISS EM 10 Transmissionselektronenmikroskop.

#### **b) Hühner**

Prinzipiell wurde bei den untersuchten Vögeln genau so verfahren wie bei den Ratten, nur dass durch das Fehlen einer Siebbeinplatte die Nervi olfactorii aus dem Knochenkanal herausgelöst wurden. Lediglich am Bulbus olfactorius verblieb wegen zu großer Gefahr von Zerreißen ein kleiner Knochenrest.

Die Proben wurden in folgende Stücke unterteilt: Concha nasalis, Nervus olfactorius, Bulbus olfactorius mit Übergang in den Nervus olfactorius. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie bei den Ratten.

### **c) Katze und Taube**

Das Material von Katze und Taube lag in Form von bereits angeschnittenen Blöckchen aus EPON vor, die im Rahmen früherer Untersuchungen im Institut für Veterinär-Anatomie angefertigt wurden und jetzt mit genutzt werden konnten. Die Fixation wurde seinerzeit mittels Perfusion mit Glutaraldehyd durchgeführt, die weitere Verarbeitung entspricht dem oben beschriebenen Vorgehen.