

C Material und Methoden

1 Untersuchungsmaterial

1.1 Tiere

Die in dieser Arbeit untersuchten Hornproben stammen von Milchkühen der Rasse Schwarzbunt x Holstein-Friesian. Die Tiere wurden in einem landwirtschaftlichen Betrieb im Landkreis Weser-Ems im Laufstall mit Betonspalten und Liegeboxen gehalten. Der Betrieb verfügte bereits über Erfahrung aus vorangegangenen Versuchen und zeichnete sich durch zuverlässiges Management und hohe Motivation des Besitzers aus. Die Tiere wurden bedarfsgerecht mit betriebseigenen Futtermitteln (Silage zu 1/3 aus Mais- und 2/3 Grassilage, sowie Heu) und einem handelsüblichen Kraftfutter (184 G) gefüttert. Nach der ersten Probenentnahme wurde einem Teil der Kühe (Biotingruppe) über das Kraftfutter Biotin (20 mg/Tier/Tag, Soja-Biotin, Fa. Miavit, Essen (Oldb.)) supplementiert. Dies war der einzige Unterschied in der Fütterung.

1.2 Gewinnung der Klauenhornproben

Die Hornproben für die morphologischen und analytischen Untersuchungen wurden im Rahmen der routinemäßigen Klauenpflege entnommen. Die Klauen wurden zuvor klinisch untersucht, die Befunde in Protokollen (Kap. I Anhang, S. 126) dokumentiert und die Fußungsflächen der Klauen fotografiert.

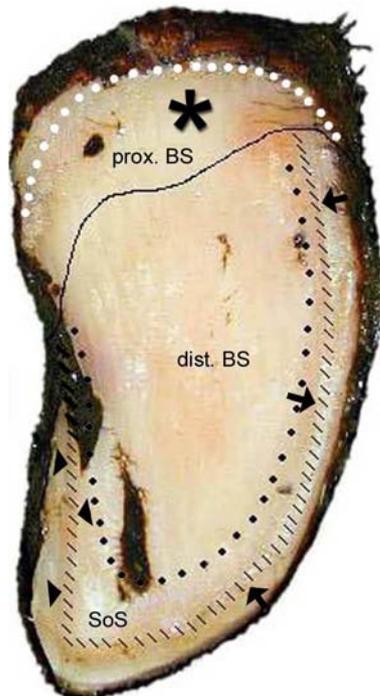
Die Proben für die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Rinnhufmesser aus dem proximalen Ballensegment der Außenklauen hinten rechts geschnitten (Textabb. 1, S. 33).

Für die gaschromatographischen Lipidanalysen wurde das Horn, welches im Rahmen der normalen Klauenpflege anfällt, von allen vier Klauenpaaren pro Kuh gesammelt.

Die Hornproben wurden mit kaltem Leitungswasser gereinigt, in verschließbaren Plastikbehältern transportiert und für die morphologischen Untersuchungen

entsprechend weiterverarbeitet. Die Proben für die Lipidanalysen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren gelagert.

Textabbildung 1: Halbschematische Darstellung der Fußungsfläche einer Außenklaue zur Darstellung der Probenentnahmestelle.



Die Probenentnahmestelle (**Stern**) liegt im proximalen Ballensegment (**prox. BS**).

Weißer Punktlinie = die Grenze zwischen fußendem und nicht fußendem Abschnitt des proximalen Ballensegmentes.

Durchgezogene Linie = die Grenze zwischen proximalem und distalem Ballensegment (**dist. BS**).

Schwarze Punktlinie = Grenze zwischen Ballen- und Sohlensegment (**SoS**).

Schrägstrichlinie = die weiße Linie

Pfeilköpfe = der axiale Schenkel der weißen Linie.

Pfeile = der abaxiale Schenkel der weißen Linie

1.3 Begleitende Untersuchungen

1.3.1 Milchproben

Zur Überprüfung der Biotinsupplementierung wurden Milchproben gezogen. Die Proben wurden während der routinemäßigen Milchprüfung im Betrieb gewonnen. Somit konnten von allen laktierenden Kühen Milchproben vom Morgen- und Abendgemelk gezogen werden (10 ml pro Tier).

Der Biotingehalt wurde mit der mikrobiologischen Methode nach Frigg und Brubacher (1976) in den Laboratorien der Firma Hoffmann-La Roche AG in Basel bestimmt.

1.3.2 Futtermittelproben

Zur Bestimmung des Biotingehaltes in den Futtermitteln wurden vor und nach dem Versuchszeitraum Proben von dem Zusatz- (Soja-Biotin, Fa. Miaavit, Essen

Material und Methoden

(Oldb.)) und dem Grundfuttermittel (Mais- und Grassilage, am Hof hergestellt) genommen. Der Biotingehalt wurde in den Laboratorien der Firma Hoffmann-La Roche AG in Basel bestimmt.

2 Methoden

2.1 Versuchsaufbau und Ablauf

In dieser Arbeit sollte die Wirkung von Biotin, auf das Ballenhorn, nach 13 Monaten Biotinsupplementierung untersucht werden. Da die Probenentnahmen im Rahmen der routinemäßigen, halbjährigen Klauenpflege stattfanden, wurden dreimal Proben gewonnen.

Bei dem ersten Probenentnahmetermine wurden die Versuchsgruppen zusammengestellt. Da die Kühe in keiner festgelegten Reihenfolge - also „freiwillig“ - in den Klauenstand kamen, konnten insgesamt 76 Kühe zufällig dem Versuch zugeordnet werden, ohne dass dabei weitere Auswahlkriterien (z.B. Alter, klinischer Status der Klaue, Gesundheitszustand oder Milchleistung der einzelnen Tiere) berücksichtigt wurden.

Die Kraftfuttergabe an die Kühe erfolgte über eine computergestützte Transponderfütterung in Futterstationen (Kraftfutterdosierer gesteuert mit dem Herdenmanagementprogramm DP5, beides Fa. Westfalia). An den Futterstationen waren Zusatzdosierer für Mineralstoffe angebracht, über die ein Biotin-, Sojagemisch (Fa. Miavit, Essen (Oldb.)) gefüttert wurde. So konnte 43 Tieren (Biotingruppe) nach dem ersten Probenentnahmetermine gezielt Biotin (20mg/Tag/Tier) über das Kraftfutter zugeführt werden. Die verbleibenden 33 Kühe bildeten die Kontrollgruppe. An ihrer Fütterung wurde keine Veränderung vorgenommen. Es wurden, abgesehen von der Biotinsupplementierung an die Kühe der Biotingruppe, keine weiteren Änderungen im Ablauf des landwirtschaftlichen Betriebes vorgenommen.

Bei jedem Probenentnahmetermine kamen die Tiere in einen Klauenstand, in dem die Gliedmaßen einzeln hochgebunden wurden. So war es möglich, vor der Klauenpflege durch Adspektion und Palpation den klinischen Status der Klauen zu erheben. Die von zwei Tierärzten erhobenen makroskopisch-klinischen

Befunde wurden in Protokollen (Kap. I Anhang, S. 126) festgehalten. Die klinische Untersuchung der einzelnen Klauen erfolgte durchschnittlich in ein bis zwei Minuten. Die Fußungsflächen der Klauen wurden zusätzlich mit einer Digitalkamera (Olympus Camedia 2000 Z) fotografiert.

Im Verlauf dieses Feldversuches kam es zu einer Ausfallrate unter den ursprünglichen Versuchstieren. Im Rahmen des betrieblichen Ablaufs wurden einzelne Tiere verkauft oder der Schlachtung zugeführt. Des Weiteren wurden trockenstehende Kühe aus dem Stall auf die Weide gebracht. Dort konnte kein Biotin zugefüttert werden, und diese Tiere standen zum nächsten Termin der Probenentnahme nicht mehr zur Verfügung. Zudem musste während des Versuchszeitraums ein neues Computersystem auf dem Hof installiert werden. Das hatte zur Folge, dass die Gruppeneinteilung bei einigen Tieren nicht mehr eindeutig nachzuvollziehen war. Alle Tiere deren Guppenzugehörigkeit nicht eindeutig war, wurden aus dem Versuch herausgenommen.

Für alle weiteren morphologischen und analytischen Untersuchungen wurden insgesamt 24 Kühe (Kerngruppe, 12 Biotin- und 12 Kontrolltiere, Texttabelle 1, S. 36) herangezogen, von denen zu jedem der drei Termine Hornproben gewonnen werden konnten.

Material und Methoden

Texttabelle 1: Angaben zu den Kühen der Kerngruppe, die ausgewertet wurden

Kuhdaten der Kerngruppe				
Name	Stall- nummer	Geburtsdatum	Anzahl der Kalbungen (bis zum 3.Termin)	Versuchsgruppe
Güste	89	01.01.1996	2	Biotin
Alma	99	22.12.1996	2	Biotin
Erika	100	10.12.1996	2	Biotin
Frigga	106	01.01.1996	1	Biotin
Clara	112	13.11.1996	2	Biotin
Trude	117	27.10.1996	2	Biotin
Petra	118	23.02.1997	2	Biotin
Quirina	120	25.10.1996	2	Biotin
	123	16.02.1997	2	Biotin
Sofie	124	31.01.1997	2	Biotin
Kerstin	125	11.12.1996	2	Biotin
Norma	126	24.02.1997	1	Biotin
Doris	20	01.04.1989	9	Kontroll
Ulla	54	10.12.1994	3	Kontroll
	59	25.12.1995	3	Kontroll
Birgit	74	08.03.1996	2	Kontroll
Oma	81	09.08.1996	2	Kontroll
Leila	86	01.01.1996	2	Kontroll
Marianne	95	28.08.1996	2	Kontroll
Jana	102	25.02.1997	2	Kontroll
	104	30.10.1996	2	Kontroll
Hilde	109	06.12.1996	2	Kontroll
	115	17.01.1997	2	Kontroll
Rita	129	05.02.1997	2	Kontroll

2.2 Lichtmikroskopie

2.2.1 Herstellung der histologischen Präparate

Aus dem Hornmaterial des proximalen Ballensegments wurden für die lichtmikroskopische Untersuchung ca. 5 x 5 x 5-10 mm große Blöckchen, sowie Blöckchen für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung (siehe Kap. C Material und Methoden, unter 2.3.1, ab S. 38) unter der Stereolupe (Fa. Zeiss, Jena) mit Rasierklingen herausgeschnitten.

Die Hornblöckchen wurden ohne weitere Behandlung mit einem Epoxidharz-Kleber (UHU plus[®] schnellfest, 2 Komponenten Epoxidharz-Kleber) auf Holzblöcke (ca. 2 x 2 x 1 cm) geklebt. Es wurden Nativschnitte an einem Schlittenmikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) mit einem Mikrotommesser (Fa. Jung, D-Schliff) hergestellt. Die ca. 5 µm dicken Nativschnitte wurden bis zur Färbung in destilliertem Wasser aufbewahrt. Es folgte die flottierende Färbung mit Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach MCMANUS (ROMEIS, 1989). Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Kanadabalsam eingedeckelt.

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte blind (d.h. es war nicht bekannt, welches Tier beurteilt wird) mit Hilfe eines Bewertungsschlüssels (Textabb. 2, S. 38).

Die einzelnen Schritte der Auswertung werden unter Statistische Methoden (Kap. C Material und Methoden, unter 2.5.1, ab S. 49) erläutert.

2.2.2 Histochemischer Nachweis

Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) nach MCMANUS (ROMEIS, 1989)

Die PAS-Reaktion eignet sich zum semiquantitativen Nachweis von Glykoproteinen und Glykolipiden, die im Bereich der Zellgrenzen, im Interzellularkitt vorkommen.

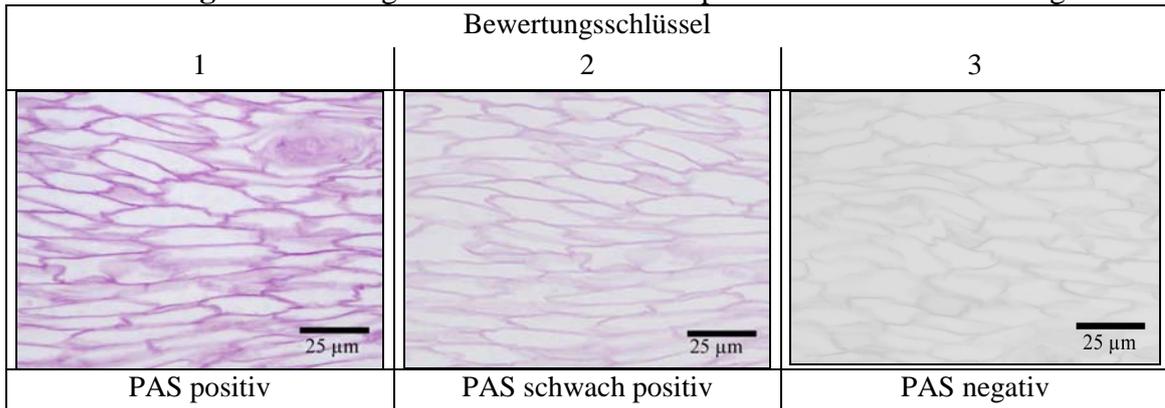
Bei dieser Reaktion oxidiert Perjodsäure die Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate

Material und Methoden

zu Aldehydgruppen, die wiederum durch Leukofuchsin (SCHIFFs-Reagens, Fa. Merck, Darmstadt) rosarot angefärbt werden.

PAS-positive Strukturen färben sich stark rosarot, schwach positive sind hellrosa, während PAS-negative Strukturen farblos bleiben.

Textabbildung 2: Bewertungsschlüssel mit Referenzproben für die PAS Färbung



2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

2.3.1 Herstellung der transmissionselektronenmikroskopischen Präparate

Für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung wurden aus dem Hornmaterial des proximalen Ballensegmentes pro Tier zwei ca. 3 x 3 x 5 mm große Blöckchen nach dem für die Lichtmikroskopie beschriebenen Verfahren (siehe Kap. C Material und Methoden, unter 2.2.1, ab S. 37) herausgeschnitten. Die Blöckchen wurden zum einen zur Herstellung von Nativschnitten nach der Methode von BUDRAS et al. (2002) und zum anderen zur Einbettung in Epoxidharz verwendet.

Einbettung in Epon[®]

Je ein Hornblöckchen aus dem proximalen Ballensegment wurde in Epoxidharz (Epon[®], Fa. Serva, Heidelberg) eingebettet. Die Blöckchen wurden zunächst in 2,5%iger phosphatgepufferter Glutaraldehydlösung immersionsfixiert. Nach der Spülung in Phosphatpuffer nach SØRENSEN (Romeis, 1989) wurden die Hornblöckchen in 1%iger Osmiumtetroxidlösung nachfixiert und nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe in Epon[®] eingebettet.

Herstellung der Semidünnschnitte

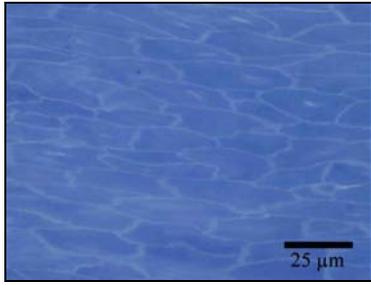
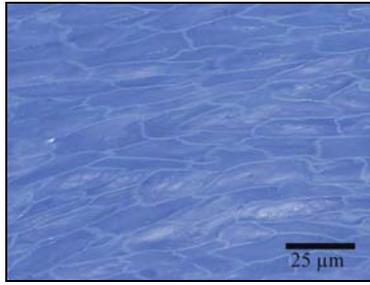
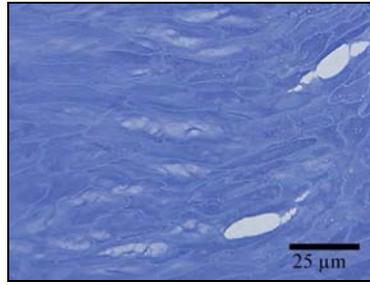
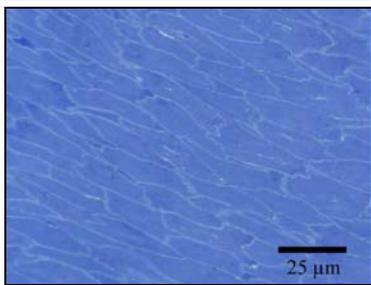
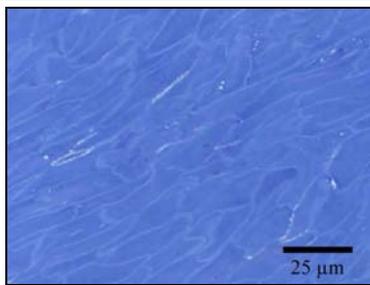
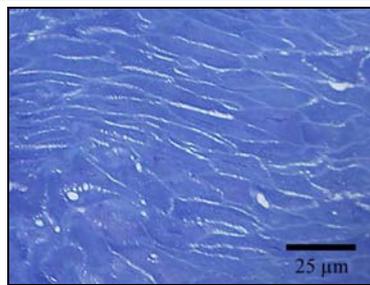
Von den in Epon[®] eingebetteten und von den unbehandelten Hornblöckchen wurden Semidünnschnitte angefertigt. Die ca. 0,5-1 µm dicken Semidünnschnitte wurden am Ultramikrotom OmU2 (Fa. Reichert, Wien) mit einem Glasmesser geschnitten, in destilliertem Wasser aufgefangen und auf Objektträger aufgezogen. Nach der Trocknung wurden die Semidünnschnitte mit 1%iger Methylenblau- und 1%iger Azur-II-Lösung (Verhältnis 1:1) gefärbt.

Die nativen Semidünnschnitte wurden mit den in Epon[®] eingebetteten Schnitten von zwei Untersuchern unabhängig voneinander verglichen. Die Nativschnitte stellten sich im Gesamtschnitt etwas kontrastreicher und vor allem besser gefärbt dar. Bei den eingebetteten Schnitten war besonders das Zentrum der Schnitte sehr blass und kaum beurteilbar. Nachdem sich auch bei den Ultradünnschnitten die Nativschnitte kontrastreicher darstellten (siehe Kap.C Material und Methoden, unter 2.3.2, ab S. 40), wurde die weitere Auswertung an den Nativschnitten vorgenommen. Im Kapitel H Abbildungen, ab S. 120 sind exemplarisch in Epon[®] eingebettete Schnitte und entsprechende Nativschnitte gegenübergestellt.

Die Semidünnschnitte wurden mit Hilfe des in der Textabbildung 3 (siehe S. 40) dargestellten Bewertungsschlüssels lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Beurteilung der Qualität der Hornzellen und ihrer Verbindung untereinander erfolgte blind (d.h. es war nicht bekannt, welches Tier beurteilt wird). Zusätzlich wurden geeignete Areale zur Herstellung der Ultradünnschnitte ausgewählt.

Die einzelnen Schritte der Auswertung werden unter Statistische Methoden (Kap. C Material und Methoden, unter 2.5.1, ab S. 49) erläutert.

Textabbildung 3: Bewertungsschlüssel mit Referenzproben für die Auswertung der Semidünnschnitte.

Bewertungsschlüssel		
1	2	3
		
die Zellen sind homogen (gleichmäßig gefärbt)	die Zellen sind teilweise inhomogen	die Zellen sind inhomogen (ungleichmäßig gefärbt)
		
im Interzellularspalt sind keine Zusammenhangstrennungen	im Interzellularspalt sind teilweise Zusammenhangstrennungen	im Interzellularspalt sind deutliche Zusammenhangstrennungen

Herstellung der Ultradünnschnitte

Nach der lichtmikroskopischen Voruntersuchung der Semidünnschnitte wurden jeweils von den entsprechenden Hornblöckchen Ultradünnschnitte am Ultramikrotom Ultracut E (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) hergestellt. Die mit einem Diamantmesser geschnittenen, ca. 75 nm dicken Ultradünnschnitte, von den in Epon[®] eingebetteten- und den Nativblöckchen, wurden auf befilmte Nickelnetze aufgefangen. Die Nativschnitte wurden zusätzlich auf unbefilmte Nickelnetze aufgefangen.

2.3.2 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte auf den befilmten Nickelnetzen wurden direkt mit fertig angesetzttem, stabilem Bleicitrat und Uranylacetat (Fa. Leica, Wien) per Hand kontrastiert.

Die Schnitte von den unbehandelten Nativblöckchen, die zusätzlich auf unbefilmten Nickelnetzen aufgefangen wurden, wurden zur besseren Darstellung der Lipide erst mit 1%iger Osmiumtetroxidlösung osmiert und dann mit fertig angesetztem, stabilem Bleicitrat und Uranylacetat (Fa. Leica, Wien) per Hand kontrastiert.

Die in Epon[®] eingebetteten Schnitte wurden mit den entsprechenden Nativschnitten von zwei Untersuchern unabhängig voneinander verglichen. Da sich bei den in Epon[®] eingebetteten Ultradünnschnitten die Kontrastierung nur in der Peripherie deutlich zeigte und die Nativschnitte sich im gesamten Schnitt kontrastreicher darstellten, wurde die weitere Auswertung im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich an den Nativschnitten vorgenommen.

Die Lipide waren auf den zusätzlich osmierten Nativschnitten (auf den unbefilmten Nickelnetzen) geringfügig besser zu sehen. Da diese Schnitte auf den unbefilmten Netzen im Elektronenmikroskop nicht immer ausreichend stabil waren, wurden die Nativschnitte auf den befilmten Netzen bei Bedarf zusätzlich zur Auswertung herangezogen.

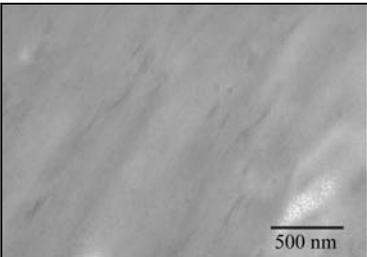
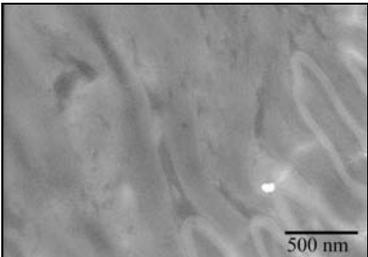
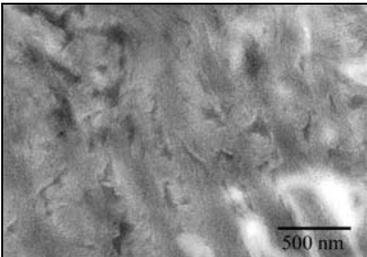
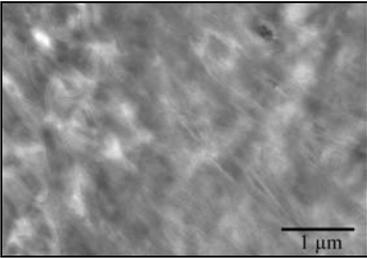
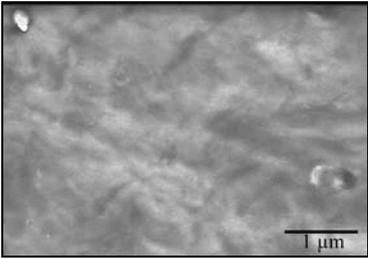
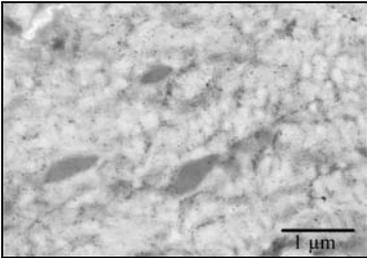
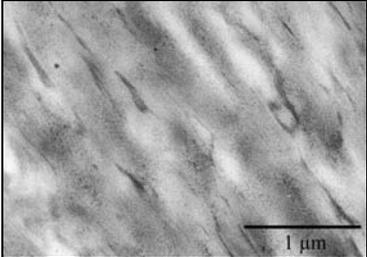
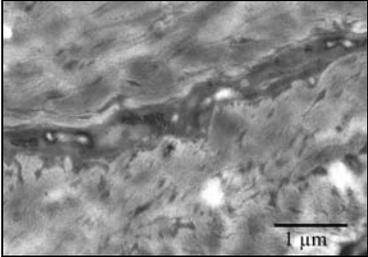
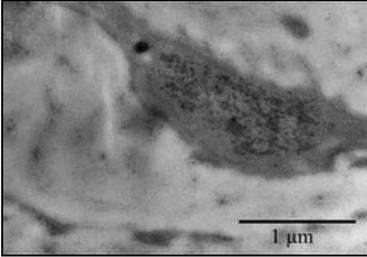
Im Kapitel H Abbildungen, ab S. 120 sind exemplarisch in Epon[®] eingebettete Schnitte den entsprechenden Nativschnitten gegenübergestellt und der Vergleich zwischen befilmten und unbefilmten Netzen dargestellt.

Die intra- und interzellulären Strukturen wurden in jeweils drei Kriterien eingeteilt. Die Auswertung der Schnitte wurde von zwei Untersuchern mit Hilfe eines Bewertungsschlüssels (Textabb.4a und 4b, S. 42 und 43) unabhängig voneinander am Elektronenmikroskop EM10 (Fa. Zeiss AG, Oberkochen) durchgeführt. Bei der Bewertung war den beiden unabhängigen Untersuchern nicht bekannt, welches Tier sie beurteilten.

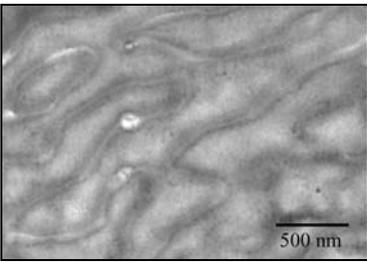
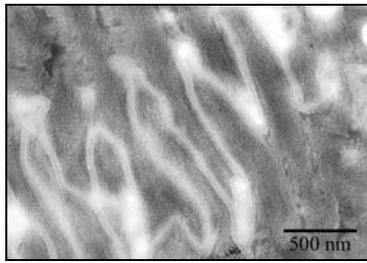
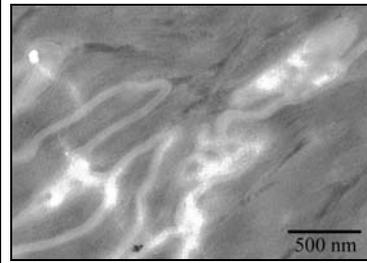
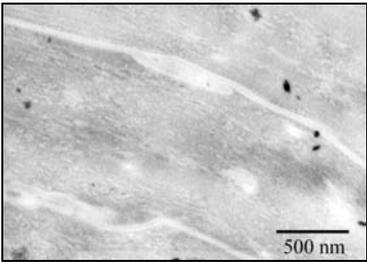
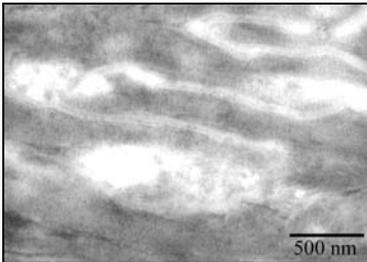
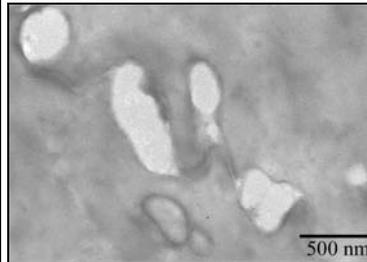
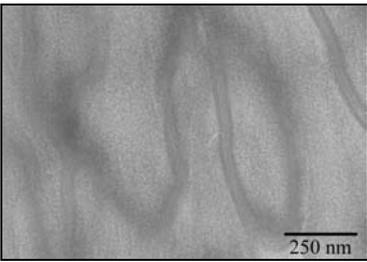
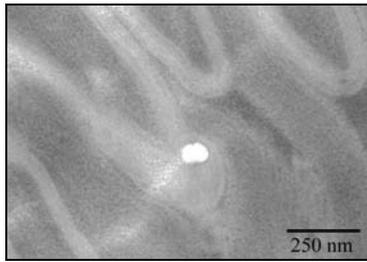
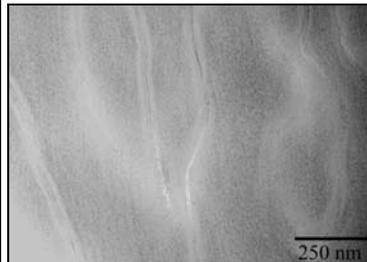
Die einzelnen Schritte der Auswertung werden unter Statistische Methoden (Kap. C Material und Methoden, unter 2.5.1, ab S. 49) erläutert.

Material und Methoden

Textabbildung 4a: Bewertungsschlüssel mit Referenzproben für die Auswertung der intrazellulären Faktoren

Bewertungsschlüssel		
1	2	3
		
Keratinfilamente sind gleichmäßig angeordnet und es sind nur geringe elektronendichtere Strukturen zwischen den Keratinfilamenten sichtbar (homogenes Bild)	Keratinfilamente sind gleichmäßig angeordnet und es sind elektronendichtere Strukturen zwischen den Keratinfilamenten sichtbar	Keratinfilamente sind ungeordnet und es sind deutliche elektronendichtere Strukturen zwischen den Keratinfilamenten gehäuft sichtbar (inhomogenes Bild)
		
es sind vereinzelt Lipidtropfen in einzelnen Zellen vorhanden	es sind vereinzelt Lipidtropfen in den meisten Zellen vorhanden	es sind zahlreiche Lipidtropfen in den meisten Zellen vorhanden
		
es sind keine Kern- oder Organellenreste sichtbar	es sind vereinzelt Kern- oder Organellenreste sichtbar	es sind gehäuft Kern- oder Organellenreste sichtbar

Textabbildung 4b: Bewertungsschlüssel mit Referenzproben für die Auswertung der interzellulären Faktoren

Bewertungsschlüssel		
1	2	3
		
der Interzellularspalt ist regelmäßig eng, mit vereinzelt kleinblasigen Erweiterungen	der Interzellularspalt ist unregelmäßig erweitert, mit kleinblasigen Erweiterungen	der Interzellularspalt ist unregelmäßig erweitert, mit großblasigen Erweiterungen
		
Erweiterungen des Interzellularspaltes sind überwiegend gefüllt	Erweiterungen des Interzellularspaltes sind teilweise gefüllt	Erweiterungen des Interzellularspaltes sind überwiegend ungefüllt
		
die Struktur der interzellulären Kittsubstanz ist fein gekörnt	die Struktur der interzellulären Kittsubstanz ist mittelmäßig gekörnt	die Struktur der interzellulären Kittsubstanz ist grob gekörnt

2.4 Lipidanalyse

Die Möglichkeit der Lipidanalyse in Aberdeen ergab sich erst nach dem ersten Probenentnahmetermine. Die Menge der gesammelten Hornproben vom ersten Probenentnahmetermine war nicht ausreichend um analysiert werden zu können..

Die Lipidanalysen der Hornproben der Biotin- (nach 13 Monaten Biotinsupplementierung) und der Kontrollgruppe wurde im Department of Agriculture and Forestry, University of Aberdeen, Scotland von Dr. Kathrin Meyer in Zusammenarbeit mit Dr. Jes Scaife und Mike Birnie durchgeführt (MEYER, 2004).

2.4.1 Vorbereitende Tätigkeiten

Die Hornproben wurden für den Weitertransport nach Aberdeen in Plastiktüten vakuumverpackt.

In Aberdeen wurden die Proben in Flüssigstickstoff gefroren, mit einem Hammer grob vorzerkleinert und mit einer Stickstoffmühle (Glen Creston Freezer Mill, Typ 6800) bis zum Analysefeinheitsgrad gemahlen. Das feingemahlene Hornpulver wurde bis zur Lipidextraktion bei 4°C gelagert.

2.4.2 Lipidextraktion

Die Lipidextraktion erfolgte in mehreren Schritten. Im ersten Schritt wurden die Gesamtlipide (die einfachen und komplexen Lipide) extrahiert. Es folgte die Extraktion der einfachen, bzw. neutralen Lipide (Lipid 1). Die komplexen, bzw. polaren Lipide (Lipid 2) wurden in einem weiteren Schritt extrahiert.

Um die Gesamtlipide (die einfachen und komplexen Lipide) aus dem Hornpulver zu extrahieren, wurde diesem in einem Quickfit Rundkolben eine Chloroform/Methanol Lösung (2:1) zugeführt. An einem Kondensorsystem angeschlossen, konnten so die Lipide in einem Refluxverfahren herausgelöst werden. Die entstandene Mischung wurde filtriert.

Das die einfachen Lipide (Lipid 1) enthaltende flüssige Lipidextrakt wurde in einen Rundkolben überführt. Der Pulverrückstand, d.h. die Hornreste, die die

komplexen Lipide (Lipid 2) enthielten, wurden getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Extraktion der einfachen Lipide (Lipid 1)

Das Lösungsmittel im flüssigen Lipidextrakt (Lipid 1) wurde mit einem rotierenden Evaporator (Rotavapor-R, Fa. Büchi, Schweiz) verdampft und die verbleibende Probe über Nacht in einem Vakuumschrank getrocknet.

Das getrocknete Lipidextrakt wurde gewogen, erneut in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Extraktion der komplexen Lipide (Lipid 2)

Dem getrockneten Pulverrückstand (Lipid 2) wurde 1 M Natronlauge in 90% Methanol zugegeben. Diese Mischung wurde für zwei Stunden in einem warmen Wasserbad (60°C) aufbewahrt und regelmäßig geschüttelt. Die Probe wurde mit Aqua destillata und Chloroform versetzt, gut geschüttelt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen.

Die Chloroformschicht (enthält Lipid 2) wurde entnommen und aufbewahrt (1. Extraktion). Der Rest der Probe wurde mit 6 M Salzsäure versetzt und, wie oben beschrieben, nochmals mit Chloroform versetzt und über Nacht stehen gelassen.

Die Chloroformschicht wurde wieder entnommen (2. Extraktion) und mit der Chloroformschicht der 1. Extraktion zusammengefügt und getrocknet. Die getrocknete Probe wurde in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst. Nachdem die Probe mit 2 M Kaliumchlorid in 0,1 M Salzsäure gewaschen worden war, wurde sie mit Hilfe eines Trennkolbens (Scheidetrichter) getrennt. Die Chloroformschicht wurde entnommen, getrocknet, gewogen und erneut in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst.

2.4.3 Extraktion und Aufbereitung der Fettsäuren aus Lipid 1 und 2

Fettsäure Methylester = FAME (fatty acid methyl ester)

Das Lösungsmittel der oben gewonnen Proben (Lipid 1 und 2) wurde mit einem rotierenden Evaporator verdampft.

Material und Methoden

Zur Gewinnung der Fettsäuren (FS) aus dem getrockneten Lipidextrakt wurden durch Zugabe von Bortrichlorid die FS (Fettsäuren) aus den Bindungen der komplexen Lipide gelöst und methyliert. Diese Mischung wurde in einem Wasserbad auf 50°C erwärmt, gelegentlich geschüttelt und für 24 Stunden aufbewahrt.

Die FAME (fatty acid methyl ester) wurden aus dieser Mischung mit Hilfe eines Trennkolbens (Scheidetrichter) dreimal mit jeweils 25 ml Hexan herausgelöst. Die drei Hexanextrakte wurden zusammengefügt und mit 2%igem Kaliumbikarbonat, zur Neutralisation der Säure gewaschen. Anschließend wurde das Hexanextrakt über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde mit dem rotierenden Evaporator (Rotavapor-R, Fa. Büchi, Schweiz) verdampft. Das getrocknete Extrakt wurde zur weiteren Verarbeitung in Hexan resuspendiert.

Dünnschichtchromatographie

Die extrahierten FAME beinhalten nicht-hydroxylierte Fettsäuren (non-OH-FS) und hydroxylierte Fettsäuren (OH-FS). Diese lassen sich anhand der Polarität mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auftrennen.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Glasplatten mit 0,5 mm Kieselgel Typ G beschichtet und zwei Stunden bei 120°C aktiviert.

Die aktivierten Glasplatten wurden mit den Proben und jeweils einem non-OH- und einem OH-Fettsäurestandard (Beide Fa. Sigma®) beladen. Die Chromatographie wurde in einem geschlossenen Tank mit einem Lösungsmittelsystem von Hexan und Diethylether (5,6:1) durchgeführt. Die Glasplatten wurden aus dem Tank entfernt, sobald die Solventfront 2 cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes angelangt war.

Die Glasplatten wurden zur Darstellung der Banden mit 0,02% Dichlorofluoreszein in 95 % Methanol besprüht. Die unter einem UV-Sichtsystem (Chromato-Vue® C-70 G, Fa. UVP, Inc.) fluoreszierenden Banden wurden den Standards entsprechend markiert und getrennt voneinander von den Glasplatten abgelöst.

Aufbereitung der nicht-Hydroxy-Fettsäuren Methylester (non-OH-FAME)

Das die non-OH FAME enthaltende Kieselgel wurde in einem Reagenzglas zweimal mit Hexan gespült und geschüttelt. Nach dem Absetzen des Gels wurde der Überstand in einem Quickfit Rundkolben gesammelt. Aus dem Überstand wurde mit einem rotierenden Evaporator (Rotavapor-R, Fa. Büchi, Schweiz) das Lösungsmittel verdampft. Die Proben wurden erneut in Hexan gelöst und in kleine Glasfläschchen für die Gaschromatographie überführt.

Aufbereitung der Hydroxy-Fettsäuren Methylester (OH-FAME)

Die OH-FAME wurden aus dem Kieselgel mit einem Chloroform/Methanol/Aqua destillata (50:50:1) Gemisch herausgelöst. Das Lösungsmittel wurde mit einem rotierenden Evaporator (Rotavapor-R, Fa. Büchi, Schweiz) verdampft.

Für die gaschromatographische Analyse der OH-FAME müssen die Hydroxygruppen acetyliert werden.

Zur Acetylierung wurden saures Anhydrid und Pyridin (1:1) hinzugefügt. Dieses Gemisch blieb unter einem Abzug bei Raumtemperatur über Nacht stehen. Die acetylierten FAME wurden zweimal mit Hexan extrahiert. Die Lösungsmittelschichten wurden jeweils gewonnen, zusammengefügt und getrocknet.

Zur Reinigung der acetylierten FAME erfolgte eine weitere Dünnschichtchromatographie. Die Chromatographie wurde mit einem Hexan/Diethylether/Essigsäure (70:30:1) Lösungsmittelsystem durchgeführt. Als Standards wurden α - und ω -acetylierte FAME (Fa. Sigma[®]) aufgetragen. Die Banden wurden entsprechend der Standards vom Kieselgel abgetragen.

Die acetylierten FAME wurden (wie oben beschrieben) mit Chloroform/Methanol/Aqua destillata (50:50:1) aus dem Gel gelöst. Das Chloroform-Methanol Extrakt wurde mit 2 M Kaliumchloridlösung gewaschen. Die Lösungsmittelschicht wurde mit einer 2,5%igen wässrigen Kaliumcarbonatlösung versetzt, um Fluoreszeinreste zu entfernen. Die dabei entstandene Lösungsmittelschicht wurde gewonnen und das Lösungsmittel verdampft.

Material und Methoden

Die getrockneten acetylierten FAME wurden in Hexan gelöst und für die Gaschromatographie in kleine Glasfläschchen überführt.

2.4.4 Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren

Die Analysen der Proben wurden mit einem Gaschromatographen 3800 (Fa. Varian, Inc., CA, USA) durchgeführt.

Nicht-Hydroxy-Fettsäuren Methylester (non-OH-FAME)

Die non-OH-FAME wurden unter Verwendung einer 30 m DB 225 Kapillarsäule (FA. J und W Scientific) analysiert. Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte auf der Basis der Retentionszeit im Vergleich mit bekannten Standards (Fa. Sigma®). Die Analysetemperatur lag zu Beginn bei 50°C und wurde bis zu einer Endtemperatur von 240°C gesteigert. Die Laufzeit betrug bis zu 83,7 Minuten.

Acetylierte-Fettsäuren Methylester (acetylierte-FAME)

Die Analyse der acetylierten FAME erfolgte mit einer 25 m BP 1 Kapillarsäule (FA. J und W Scientific). Zur Identifizierung der acetylierten FAME wurden acetylierte Fettsäure Standards (Fa. Sigma®) verwendet. Die Temperatur wurde von anfänglichen 50°C auf 300°C Endtemperatur erhöht, bei einer Laufzeit von bis zu 83,7 Minuten.

2.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung und Diagrammdarstellung der Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mit Hilfe von Excel 97® (Microsoft) am Computer.

Die Darstellung in Form von Boxplots war mit Excel® möglich, da im Internet (www.learn-line.nrw.de) Hilfsfunktionen zur Verfügung gestellt wurden, mit denen man benutzerdefinierte Diagrammtypen (Boxplot) in Excel® erstellen kann.

Statistische Auswertung der Lipidergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde von Dr. Kathrin Meyer (am Department of Agriculture and Forestry, University of Aberdeen, Scotland) durchgeführt. Die Daten aller Proben wurden mit einer speziellen Software (MINITAB 13, Minitap Inc., State College PA, USA) gesammelt, für die

statistische Auswertung nach der Anova-Methode bearbeitet und in Excel übertragen.

2.5.1 Beschreibende Statistik

Für die morphologischen Untersuchungen wurden Bewertungsschlüssel entwickelt, die es ermöglichten bei der jeweiligen Auswertung die sichtbaren Strukturen in auswertbaren Zahlen darzustellen.

Es wurden für die Licht- und Elektronenmikroskopie Kriterien ausgewählt, die sich auf die intra- und interzellulären Strukturen beziehen.

Die einzelnen Kriterien wurden jeweils in drei möglichen Erscheinungsformen definiert und entsprechend den Bewertungszahlen „1“, „2“ und „3“ zugeordnet. Bei der Auswertung der einzelnen Schnitte waren somit „Bewertungen“ in Form von definierten Bewertungszahlen möglich.

Die Bewertungsschlüssel sind im Kap. C Material und Methoden in den entsprechenden Unterkapiteln dargestellt (unter 2.2, S.38; unter 2.3, S. 40 und S. 42/43).

Erläuterung zu den Auswertungen der morphologischen Ergebnisse

Die Beurteilung der histologischen Schnitte (PAS-Reaktion, Semi- und Ultradünnschnitte) wurde jeweils zweimal, in voneinander unabhängigen Durchgängen, durchgeführt.

Es gab Schnitte, die nicht eindeutig einer Bewertungszahl zugeordnet werden konnten. Diese Schnitte wurden z.B. in einem Durchgang der „1“ und im weiteren Durchgang der „2“ zugeordnet. Abweichungen um mehr als eine Bewertungszahl kamen jedoch nicht vor. Diese Abweichungen wurden bei der Auswertung berücksichtigt, indem die Summe aus den Bewertungszahlen beider Durchgänge gebildet wurde.

Da bei allen drei Bewertungsschlüsseln drei Bewertungszahlen verwendet wurden, ergeben sich mögliche Summen zwischen 2 und 6. Bei geraden Summen wurden die Schnitte eindeutig einer Bewertungszahl zugeordnet, bei ungeraden Summen lagen sie zwischen zwei Bewertungszahlen.

Material und Methoden

Bei der Auswertung wurden die Summen verglichen. Die Veränderung ist dabei um so deutlicher, je größer die Differenz der Summen ist. Damit konnten auch die „nicht eindeutigen“ Schnitte in die Auswertung mit einbezogen werden.

Die Ultradünnschnitte wurden zusätzlich von einem zweiten Untersucher am Elektronenmikroskop, ebenfalls in zwei Durchgängen, beurteilt.

Für jeden Untersucher wurde, wie oben beschrieben, eine Summe gebildet. Beim Vergleich dieser beiden Summen wurden leichte Abweichungen um einen Summenwert festgestellt (Texttabelle 2, S. 51). Diese Abweichungen wurden durch die Bildung einer Gesamtsumme bei der Auswertung berücksichtigt. Da die Summen zwischen 2 und 6 liegen, ergeben sich mögliche Gesamtsummen zwischen 4 und 12.

Texttabelle 2: Die Anzahl der Übereinstimmungen und Abweichungen der Summen (von zwei Untersuchern) für die Kriterien der Ultradünnschnitte. Angaben in Anzahl der Tiere, bzw. der gesichteten Schnitte.

Gruppenzugehörigkeit	Kriterium zur Bewertung	Übereinstimmungen der Summen		Leichte Abweichungen (um einen Summenwert)		Starke Abweichungen (um mehr als einen Summenwert)	
		1	2	1	2	1	2
Biotingruppe (11 Kühe)	Keratinfilamente	8	6	3	5	0	0
	Lipidtropfen	7	8	4	3	0	0
	Kern-oder Organellen Reste	8	8	3	3	0	0
	Interzellularspalt	7	9	4	2	0	0
	Erweiterungen	7	7	4	4	0	0
	Kittsubstanz	10	7	1	4	0	0
Gesamt		47 (71%)	45 (69%)	19 (29%)	21 (31%)	0 (0%)	0 (0%)
Kontrollgruppe (9 Kühe)	Keratinfilamente	7	8	2	1	0	0
	Lipidtropfen	6	6	3	3	0	0
	Kern-oder Organellen Reste	6	5	3	4	0	0
	Interzellularspalt	4	5	5	4	0	0
	Erweiterungen	5	6	4	3	0	0
	Kittsubstanz	6	8	3	1	0	0
Gesamt		34 (62%)	38 (70%)	20 (37%)	16 (30%)	0 (0%)	0 (0%)

1= erster Probenentnahmetermin

2= letzter Probenentnahmetermin