

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Zur Untersuchung der prae- und postnatalen Entwicklung der Hundekralle standen insgesamt 23 Tiere zur Verfügung. Bei den Foeten handelte es sich um verschiedene Hunderassen unterschiedlichen Geschlechtes. Sofern aus dem Vorbericht die Trächtigkeitsdauer nicht bekannt war, wurde zur Altersbestimmung der Foeten die Scheitelsteißlänge (SSL) gemessen und aus dieser anhand der in der Literatur bekannten Wachstumskurve von NODEN und DE LAHUNTA (1985) die Trächtigkeitsdauer (Texttabelle 1) ermittelt. Das Untersuchungsmaterial bestand aus Foeten mit einer Scheitelsteißlänge zwischen 44 mm und 220 mm, aus vier Welpen mit einem Alter von einem Tag bis eine Woche post natum sowie aus einem vier Wochen alten Welpen und drei adulten Hunden (Texttabelle 2).

Die Foeten sowie adulten Tiere stammten zum Teil aus dem Fundus des embryologischen Laboratorium des Institutes für Veterinäranatomie der FU Berlin und zum Teil aus dem Institut für Veterinärpathologie der Universität Leipzig. Für die Untersuchung wurden jeweils die Krallen sowohl der Vorder- als auch der Hintergliedmaßen herangezogen. Das Geschlecht wurde nicht berücksichtigt, da keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Entwicklung auftreten.

TEXTTABELLE 1: ÜBERBLICK ÜBER DAS ALTER (TRÄCHTIGKEITSDAUER) DER VERWENDETEN HUNDEFETEN, NACH SCHEITELSTEIßLÄNGE (SSL) IN MILLIMETER (mm) GEORDNET.

PRÄPARAT-NR.	SSL (mm)	TRÄCHTIGKEITSDAUER (d)
1	44	33
2	44	33
3	44	33
4	47	34
5	50	35
6	54	37
7	58	38
8	63	42
9	63	42
10	80	44
11	130	53
12	140	54
13	150	55
14	220	63

TEXTTABELLE 2: ÜBERBLICK ÜBER DIE VERWENDETEN HUNDEWELPEN, NACH ALTER IN TAGEN (d) GEORDNET.

PRÄPARAT-NR.	SSL (mm)	ALTER (d)
15		0 (geburtsreif)
16		1
17	220	x ¹⁶
18		7
19		7
20		30
21		adult
22		adult
23		adult

3.2 METHODEN

3.2.1 METHODEN DER MESOSKOPISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Zur mesoskopischen Untersuchung wurden formalinfixierte Krallen unter einer Präparierlupe (Zeiss AG, Oberkochen) untersucht. Dabei wurden die Krallenform sowie die Krallengröße bestimmt.

3.2.2 METHODEN DER LICHTMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Krallen der älteren und geborenen Hundefoeten resp. -welpen sowie adulten Hunde im Zehengrundgelenk oder Zehennittelgelenk abgesetzt und in 4 %igem Formalin (ROMEIS, 1989) fixiert. Bei den jüngeren Stadien wurden aufgrund der geringeren Größe der komplette Vorder- und Hinterfuß abgetrennt und fixiert. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate in Paraffin (Paraplast[®]) eingebettet. Von den eingebetteten Präparaten wurden transversale, horizontale oder sagittale Serienschritte auf einem Schlittenmikrotom (Fa. REICHERT-JUNG, Heidelberg) mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt.

Für die anschließenden histologischen Färbungen wurden die jeweiligen Schnitte mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in Aqua dest. verbracht. Nach durchgeführter Färbung wurden die histologischen Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in Xylol geklärt und mit Eukitt eingedeckt.

¹⁶ Die Angabe der foetalen SSL von 220 mm überschreitet die in der Tabelle von NODEN und DE LAHUNTA (1985) angegebenen Werte zur Errechnung des Alters des Foeten.

Die folgenden histologischen Färbungen wurden angewendet:

- FÄRBUNG MIT HÄMATOXYLIN UND EOSIN (HE) (ROMEIS, 1989): Diese Übersichtsfärbung stellt basophile Strukturen (Nucleinsäuren des Zellkerns, ribosomale Nucleinsäuren, keratinfilamentassoziierte Proteine der Keratohyalin granula) dunkelblau dar. Mit einer Gegenfärbung durch Eosin (rot) werden azidophile Strukturen des Zytoplasmas hervorgehoben.

- PERJODSÄURE-SCHIFF-REAKTION (PAS) nach Mc MANUS (ROMEIS, 1989): Diese Färbemethode dient der Darstellung von Glykogen, Glykoproteinen und Glykolipiden. Zwischen der Entparaffinierung und der PAS-Färbung werden die Schnitte mit 1 %iger Diastase inkubiert, wodurch das Glykogen herausgelöst wird und nur Glykoproteine und Glykolipide angefärbt werden. PAS-positive Substanzen stellen sich blassrosa bis violett dar.

- SILBERIMPRÄGNATION nach BODIAN (ROMEIS, 1989): Die Silberimprägnation dient der Darstellung von retikulären und kollagenen Fasern in der bindegewebigen Grundsubstanz, sowie in der Basalmembran. Retikuläre Fasern stellen sich tiefschwarz, kollagene Fasern eher braunschwarz dar.

- LEKTINHISTOCHEMISCHE Untersuchung der Krallendermis und -epidermis:
Lektine sind „nichtimmunogene“ pflanzliche oder tierische Proteine oder Glykoproteine, die spezifisch an Zuckerreste (Polysaccharide und Glykoproteine) intrazellulär und extrazellulär binden können. Die glykohistochemische Charakterisierung mittels spezifischer Lektin-Bindung ermöglicht eine funktionelle Differenzierung von Zellen anhand der jeweiligen zellmembranständigen Glykoprotein-Komponenten. Diese Bindung ähnelt einer ganz spezifischen Antigen-Antikörperreaktion, weshalb Lektine auch als antikörperähnliche Substanzen bezeichnet werden. Die Expression der bindenden Zellkomponenten (Polysaccharide und Glykoproteine) ist differenzierungs- bzw. funktionsabhängig, so dass sich das Lektinbindungsverhalten von Zellen in verschiedenen Entwicklungs- bzw. Funktionsstadien verändert (KALTER u. GABIUS, 2001).

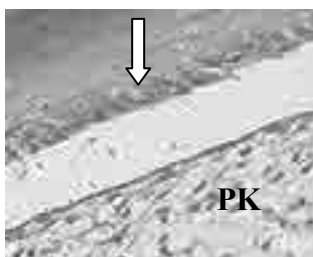
Die lektinhistochemische Untersuchung erfolgte an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Präparaten. Dabei wurde nach dem institutsinternen etablierten Verfahren vorgegangen (HASHIMOTO et al., 1992). Das verwendete Lektin ist Bandeiraea

simplicifolia Agglutinin I (BSL I), der dazugehörige reaktive Zuckerrest ist N-Acetylgalactosamin und α -Galactose.

3.2.3 METHODEN DER RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG

Zur Darstellung des segmentspezifischen Papillarkörpers wurden unfixierte Krallen in 1 %ige Essigsäure bei 37 °C für einen Zeitraum von 48 bis 60 Stunden eingelegt, anschließend eine Stunde mit Aqua bidest. gespült. Darauf folgend wurde die Krallenepidermis vorsichtig von der Krallenlederhaut mit zwei feinen Pinzetten unter einer Präparierlupe (ZEISS AG, Oberkochen) getrennt (Methode nach GREB, 1940 sowie BAIER, 1950). Anschließend wurden die Präparate in 4 %igem Formalin für mehrere Tage fixiert.

Die schon formalinfixierten Präparate wurden nach der Methode von KOBAYASHI (1990) getrennt. Nach gründlicher Wässerung wurden die Präparate eine Woche bei Raumtemperatur in 3 normale Salzsäure gelegt, wodurch die Basallamina abgebaut wurde und sich so die Epidermis von der Lederhautunterlage leicht trennen ließ. Anschließend wurden die Proben in 4 %igem Formalin fixiert. Zur Probenentnahme für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung sind bei älteren Hundefoeten die Krallen je nach Größe in zwei Teile längs bzw. in vier Teile längs und quer getrennt worden. Bei jüngeren Feten wurde aufgrund der geringeren Größe die gesamte Zehe untersucht. Die fixierten Proben wurden nun gründlich mit Aqua bidest. gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Hexamethyldisilazanlösung (HMDS, Firma Roth, Karlsruhe) getrocknet, anschließend mit elektrisch leitfähigem Klebstoff (Leit C nach Göcke, Fa. PLANO, Marburg) auf Objekteller geklebt und dann in einem Kathodenzerstäubungsgerät (Fa. POLARON, Watford/England) mit Gold zwei Minuten besputtert. Danach konnten die Proben im Rasterelektronenmikroskop (Bausch & Lomb, Canada, 2000) untersucht werden.



TEXTABBILDUNG 4:

Trennungsebene im lichtmikroskopischen Längsschnitt einer Hundekralle mit 80 mm SSL im Bereich des Rückenwulstes. Der untere Bildausschnitt zeigt den Papillarkörper (PK), während der obere Bildausschnitt den epidermalen Teil wiedergibt. Die Pfeilspitze ist auf die Basalzellen gerichtet.