

3 Material und Methoden

3.1 Tierexperimenteller Teil

3.1.1 Versuchsdurchführung

Die Anzucht von *F. hepatica* erfolgte in Ratten. Die Versuchstiere wurden mit Metazerkarien infiziert. Der Infektionserfolg wurde acht Wochen nach der Infektion durch Kotuntersuchungen kontrolliert, anschließend erfolgte die Behandlung. Nach der Behandlung wurde der Kot mindestens sieben Tage lang täglich auf Wurmeier untersucht. Im Anschluss erfolgte die Präparation der Versuchstiere.

3.1.1.1 Versuchstiere

Die Infektion mit *F. hepatica* wurde bei männlich Ratten durchgeführt. Es handelte sich dabei um Tiere des Stammes Wistar. Es wurden 73 Tiere verwendet, deren Gewicht zwischen 300 und 600 g lag.

Bei den für die Untersuchungen verwendeten männlichen Schafen, handelte es sich um natürlich mit *F. hepatica* infizierte Tiere. Die 6 Schafe waren ca. sechs Monate alt und hatten ein Gewicht von ungefähr 50 kg.

3.1.1.2 Infektion der Versuchstiere

Die Ratten wurden mit je 14 Metazerkarien infiziert. Die Infektion wurde oral mittels einer Schlundsonde durchgeführt. Für die Infektion wurden die Ratten mit Ether narkotisiert.

3.1.1.3 Behandlung der Versuchstiere

Die Behandlung der Ratten erfolgte oral, subkutan, intraperitoneal und pour-on. Vor der Behandlung wurden die Tiere gewogen.

Für die orale Behandlung mittels Schlundsonde wurden die Versuchstiere mit Ether narkotisiert. Als Lösungsmittel für die orale Behandlung der Ratten wurde Olivenöl benutzt. Damit sich das Medikament besser im Öl löst, wurde der Ansatz im Wärmeschrank bei einer Temperatur von 65°C für 5 Minuten erhitzt. Für die Behandlungen mit Enhancer wurde dieser dem oben genannten Ansatz zugesetzt

und mit erhitzt. Für den Ansatz ohne Enhancer wurden 30 mg Albendazolsulfoxid in 2,5 ml Öl gelöst. Der Ansatz mit Enhancer besteht aus 30 mg Albendazolsulfoxid gelöst in 2,0 ml Öl und 0,5 ml Enhancer.

Für die pour- on Behandlung mussten die Versuchstiere nicht narkotisiert werden. Das Medikament wurde in DMSO gelöst. Auch dieser Ansatz wurde zur besseren Löslichkeit für 5 Minuten bei 65°C im Wärmeschrank erhitzt. Der Enhancer wurde dem Ansatz aus Albendazolsulfoxid und DMSO zugesetzt und mit diesem erhitzt. Für den Ansatz ohne Enhancer wurden 60 mg Albendazolsulfoxid in 2 ml DMSO gelöst. Der Ansatz mit Enhancer enthält 60 mg Albendazolsulfoxid gelöst in 1,6 ml DMSO und 0,4 ml Enhancer.

Die subkutanen und intraperitonealen Behandlungen erfolgten ebenfalls am nicht narkotisierten Tier. Für die Behandlung wurde eine Injektionslösung hergestellt. Die Herstellung erfolgte nach einem von der Firma Bayer zur Verfügung gestellten Rezept.

Tabelle 2: Rezept Injektions-
lösung ohne Enhancer
(Testlösung 1)

Substanz	Menge
Albendazolsulfoxid	400 mg
Ethanol	1000 µl
37 % HCl	350 µl
Glycerinformal	auf 10 ml

Tabelle 3: Rezept Injektions-
lösung mit Enhancer
(Testlösung 1)

Substanz	Menge
Albendazolsulfoxid	400 mg
Ethanol	1000 µl
37 % HCl	350 µl
Enhancer	200 µl
Glycerinformal	auf 10 ml

Die durchgeführten Behandlungen sind in den Tabellen 1 bis 12 dargestellt. Die Ratten wurden 8 Wochen nach der Infektion mit *F. hepatica* behandelt. In der Versuchsdurchführung 10 wurden die Ratten 5 Wochen nach der Infektion behandelt.

Behandlung der adulten *F. hepatica* Stadien:

Tabelle 4: Versuchsreihe 1

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	368 g	7,5 mg/kg ABZ-SO. + Öl	per- os	230µl
4	373 g	7,5 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	320 µl
5	416 g	7,5 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	260 µl
6	398 g	7,5 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	250 µl
7	320 g	15 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	480 µl
8	406 g	15 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	612 µl
9	385 g	15 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	578 µl
10	332 g	15 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	498 µl

Tabelle 5 : Versuchsreihe 2

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	410 g	20 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	513 µl
4	387 g	20mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	484 µl
5	360 g	20mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	450 µl
6	403 g	20mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	504 µl
7	408 g	45 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	611 µl
8	406 g	45 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	608 µl
9	408 g	45 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	611 µl
10	395 g	45 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pou-r on	592 µl
11	455 g	60 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	910 µl
12	435 g	60 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	870 µl
13	388 g	60 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	776 µl
14	396 g	60 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	792 µl

Tabelle 6 : Versuchsreihe 3

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	388 g	20 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	485 µl
4	418 g	20 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	522 µl
5	402 g	15 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	377 µl
6	397 g	15 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	368 µl
7	401 g	30 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	751 µl
8	393g	30 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	737 µl
9	402 g	80 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1071 µl
10	381 g	80 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1016 µl
11	476 g	80 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1370 µl
12	430 g	80 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1147 µl
13	419 g	90 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1257 µl
14	407 g	90 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1221 µl

Tabelle 7 : Versuchsreihe 4

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	480 g	100 µl/kg Enh. + Öl	per- os	240 µl
4	515 g	100 µl/kg Enh. + Öl	per- os	182 µl
5	422 g	90 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1266 µl
6	364 g	90 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1231 µl
7	433 g	90 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1299 µl
8	412 g	90 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1236 µl
9	455 g	100 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1517 µl
10	420 g	100 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1400 µl
11	424 g	110 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1555 µl
12	461 g	110 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1690 µl
13	470 g	120 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1880 µl
14	453 g	120 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1812 µl
15	398 g	130 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1725 µl
16	408 g	130 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1768 µl

Tabelle 8: Versuchsreihe 5

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	378 g	25 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	590 µl
4	385 g	25 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	601 µl
5	392 g	30 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	735 µl
6	361 g	30 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	677 µl
7	370 g	90 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1110 µl
8	366 g	90 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1098 µl
9	365 g	130 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1581 µl
10	398 g	130 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1725 µl

Tabelle 9: Versuchsreihe 6

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	402 g	20 mg/kg ABZ-SO + Öl + Enh.	per- os	503 µl
4	388 g	20 mg/kg ABZ-SO + Öl + Enh.	per- os	485 µl
5	395 g	30 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	740 µl
6	411 g	30 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	770 µl
7	407 g	90 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	1226 µl
8	409 g	90 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	2227 µl
9	397 g	130 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1720 µl
10	406 g	130 mg/kg ABZ-SO + DMSO	pour- on	1759 µl

Tabelle 10: Versuchsreihe 7

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	492 g	30 mg/kg Testlösung 2	i. p.	350 µl
4	430 g	20 mg/kg Testlösung 2	i. p.	220 µl
5	490 g	10 mg/kg Testlösung 2	i. p.	130 µl
6	430 g	5 mg/kg Testlösung 2	i. p.	30 µl
7	409 g	30 mg/kg Testlösung 1	i. p.	400 µl
8	409 g	20 mg/kg Testlösung 1	i.p.	210 µl
9	477 g	10 mg/kg Testlösung 1	i. p.	120 µl
10	457 g	5 mg/kg Testlösung 1	i. p.	40 µl

Tabelle 11: Versuchsreihe 8

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	457 g	30 mg/kg Testlösung 1	s. c.	340 µl
4	438 g	20 mg/kg Testlösung 1	s. c.	220 µl
5	445 g	30 mg/kg Testlösung 2	s. c.	339 µl
6	490 g	20 mg/kg Testlösung 2	s. c.	221 µl
7	445 g	10 mg/kg Testlösung 2	s. c.	130 µl

Tabelle 12: Versuchsreihe 9

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	490 g	20 mg/kg Testlösung 2	s. c.	228 µl
4	440 g	20 mg/kg Testlösung 2	s. c.	220 µl
5	457 g	30 mg/kg Testlösung 1	s. c.	340 µl
6	433 g	30 mg/kg Testlösung 1	s. c.	311 µl

Tabelle13: Versuchsreihe 10

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	430 g	15 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl + 75 mg/kg Prazi. + Enh. + Propyl.	per- os	537 µl 645 µl
4	400 g	15 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl + 75 mg/kg Prazi. + Enh. + Propyl.	per- os	500 µl 600 µl
5	415 g	15 mg/kg ABZ-SO + Öl + 75 mg/kg Prazi. + Propyl.	per- os	518 µl 626 µl
6	430 g	15 mg/kg ABZ-SO + Öl + 75 mg/kg Prazi. + Propyl.	per- os	537 µl 645 µl
7	490 g	60 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO + 150 mg/kg Prazi. + Enh. + DMSO	pour-on	640 µl 441 µl
8	390 g	60 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO + 150 mg/kg Prazi. + Enh. + DMSO	pour- on	670 µl 351 µl
9	419 g	60 mg/kg ABZ-SO + DMSO + 150 mg/kg Prazi. + DMSO	pour- on	719 µl 377 µl
10	420 g	60 mg/kg ABZ-SO + DMSO + 150 mg/kg Prazi. + DMSO	pour- on	720 µl 378 µl

Behandlung der juvenilen Stadien:

Tabelle 14: Versuchsreihe 11

Tier Nr.	Gewicht	Behandlung	Eingabe	Menge
1		ohne Behandlung		
2		ohne Behandlung		
3	312 g	20 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per-os	520 µl
4	316 g	20 mg/kg ABZ-SO + Enh. + Öl	per- os	527 µ
5	318 g	30 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	596 µl
6	331 g	30 mg/kg ABZ-SO + Öl	per- os	620 µl

Behandlung der Schafe:

Die Behandlung der Schafe erfolgte oral und pour on. Die orale Behandlung erfolgte mittels Schlundsonde.

Für die pour on Behandlung wurden die Schafe von Nacken beginnend bis zur Kruppe geschoren. Auf dem ca. 5 cm breiten fellfreien Bezirk wurde das Medikament appliziert. So konnte der Wirkstoff direkt über die Haut aufgenommen werden.

Tabelle 15: Versuchsreihe 12

Tier Nr.	Behandlung	Eingabe	Menge
Schaf 1	ohne Behandlung		
Schaf 2	ohne Behandlung		
Schaf 3	100 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	176 ml
Schaf 4	100 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	176 ml

Tabelle 16: Versuchsreihe 13

Tier Nr.	Behandlung	Eingabe	Menge
Schaf 1	ohne Behandlung		
Schaf 2	ohne Behandlung		
Schaf 3	150 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	264 ml
Schaf 4	200 mg/kg ABZ-SO + Enh. + DMSO	pour- on	334 ml

Tabelle 17: Versuchsreihe 14

Tier Nr.	Behandlung	Eingabe	Menge
Schaf 1	ohne Behandlung		
Schaf 2	ohne Behandlung		
Schaf 3	20 mg/kg ABZ-SO + Enh.	per- os	17 ml
Schaf 4	20 mg/kg ABZ-SO + Enh.	per- os	17 ml

3.1.1.4 Quantitative Untersuchung der Wurmeier

Die quantitative Untersuchung der Wurmeier erfolgte mittels Sedimentationsmethode. Dafür wurden 20 g Kot durch ein handelsübliches Sieb filtriert und in 50 ml Wasser sedimentiert. Nach 10 Minuten Sedimentation wurde die Flüssigkeit mittels eines Schlauchs dekantiert und erneut mit Wasser aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Es wurden 100 µl des Sediments mittels einer Pipette entnommen und mikroskopisch auf Wurmeier untersucht

3.1.1.5 Präparation

Der Behandlungserfolg wurde durch Präparation der Leber einschließlich der Gallenblase überprüft, dafür mussten die Versuchstiere euthanasiert werden. Die Ratten wurden in einen abdeckbaren Glaskasten verbracht, der zuvor mit Ether versehen worden war. Nach Eintritt des Atemstillstands erfolgte die Sektion durch

Haut- und Muskelschnitt in der Linea alba sowie zwei Entlastungsschnitte entlang der Rippenbögen. Nach Eröffnung der Bauchhöhle konnte die Leber mit anhängender Gallenblase stumpf herauspräpariert werden. Die Gallenblase wurde mit einer Präparationsschere eröffnet. Es erfolgte eine Untersuchung der Gallengänge der Leber auf *F. hepatica*.

3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.2.1 Versuchsdurchführung

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden *F. hepatica* in 9 Ratten angezüchtet. Es handelte sich um männliche Ratten des Stammes Wistar. Die Infektion mit 14 Metazerkarien erfolgte oral. Die Tiere wurden für die Infektion mit Ether narkotisiert.

Nach 8 Wochen wurde die Infektion durch Kotuntersuchung kontrolliert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Tiere. Die behandelten Versuchstiere, sowie das Kontrolltier wurden mittels Ether euthanasiert und die Würmer aus der Gallenblase freipräpariert. Im Anschluss wurden die Würmer fixiert, in Epon eingebettet und sowohl mittels Transmissionselektronenmikroskopie als auch mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

3.2.1.1 Behandlung der Versuchstiere

Es wurden neun Tiere mit Metazerkarien infiziert, wobei ein Tier als Kontrolle diente. Die übrigen Ratten wurden subkutan behandelt. Untersucht wurde die Wirkung der Substanz Albendazolsulfoxid, sowie die Wirkungsverstärkung dieser Substanz durch einen Enhancer. Es wurden vier Tiere mit 40 mg Albendazolsulfoxid pro kg KGW behandelt, zwei von diesen zusätzlich mit Enhancer. Desweiteren wurden vier Tiere mit 20 mg Albendazolsulfoxid pro kg KGW behandelt, von denen ebenfalls zwei zusätzlich mit Enhancer behandelt wurden. Je eins der gleich behandelten Versuchstiere wurde nach 24 Stunden euthanasiert, das andere nach 48 Stunden.

Tabelle 18: Behandlung der Versuchstiere

Versuchstier	Behandlung	Behandlungsdauer
Ratte Nr. 1	unbehandelte Kontrolle	
Ratte Nr. 2	40 mg ABZ-SO + Enhancer	24 Std.
Ratte Nr. 3	40 mg ABZ-SO + Enhancer	48 Std.
Ratte Nr. 4	40 mg ABZ-SO	24 Std.
Ratte Nr. 5	40 mg ABZ-SO	48 Std.
Ratte Nr. 6	20 mg ABZ-SO + Enhancer	24 Std.
Ratte Nr. 7	20 mg ABZ-SO + Enhancer	48 Std.
Ratte Nr. 8	20 mg ABZ-SO	24 Std.
Ratte Nr. 9	20 mg ABZ-SO	48 Std.

3.2.1.2 Präparation

Um die Würmer zu präparieren, mussten die Versuchstiere euthanasiert werden. Die Präparation erfolgte wie unter 3.1.1.5 beschrieben.

3.2.1.3 Fixierung

Im Anschluss wurden die Leberegel sofort in 5%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,3) bei 4°C anfixiert. Die Fixierung erfolgte in einer Petrischale. Um das Einrollen der Würmer zu verhindern, wurden sie mit einem Objektträger beschwert. Nach einer Vorfixierung von ca. 15 Minuten wurden die Würmer mittels einer Rasierklinge in dünne Scheiben geschnitten, um das optimale Eindringen des Fixierers zu gewährleisten. Die Proben wurden im Anschluss noch mindestens 24 Stunden bei 4°C weiterfixiert.

3.2.1.4 Einbettung nach SPURR

Die Einbettung des Versuchsmaterials wurde nach der von Spurr (1969) entwickelten Methode durchgeführt. Die Einbettung erfolgt in Epon.

Tabelle 19: Schema der durchgeführten Einbettung

Vorgang	Dauer
1. Waschen 4x in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer (pH 7,2- 7,4)	je 15 min.
2. Osmierung in 2% Osmiumtetroxid in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer	für 2 h
3. Waschen 4x in 0,1 M Na-Cacodylat- Puffer (pH 7,2- 7,4)	je 15 min.
4. Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe 2x in 50%igen Ethanol 1x in 70%igen Ethanol 1x in 70%igen Ethanol 2x in 90%igen Ethanol 2x in 96%igen Ethanol 2x in 100%igen Ethanol 2x in 100%igen Ethanol, getrocknet mit Molekularsieb	je 15 min. für 15 min. über Nacht je 15 min. je 15 min. je 15 min. je 15 min.
5. Einbettung in EPON in Propylenoxid in 1Teil EPON und 2 Teilen 100%igen Ethanol, getrocknet mit Molekularsieb in 1Teil EPON und 1 Teil 100%igen Ethanol, getrocknet mit Molekularsieb in 2Teile EPON und 1 Teil 100%igen Ethanol, getrocknet mit Molekularsieb in reinen EPON (im Exciccator)	für 30 min. für 1 h für 1 h über Nacht über Nacht
6. Einbettung in Flacheinbettungsformen mit frischem EPON in reinem EPON bei 40 °C in reinem EPON bei 60 °C	24 h 24 h

Tabelle 20: Ansatz für 100 ml 5% iges Glutaraldehyd:

Nr.	Substanz	Menge
1	25% Glutaraldehyd	20 ml
2	1 M Na-Cacodylat-Puffer	10 ml
3	aqua dest	auf 100 ml

Tabelle 21: Ansatz für 6 ml 2%iges Osmiumtetroxid in Na-Cacodylat-puffer :

Nr.	Substanz	Menge
1	4% Osmiumtetroxid	5 ml
2	1 M Na-Cacodylat-Puffer	1 ml
3	aqua dest	4 ml
4	Kaliumhexacyanoferrat	80 mg

Tabelle 22: Ansatz für 100 ml EPON :

Nr.	Substanz	Menge
1	Glycid ether	47, 4 ml
2	2- Dodeceny succinic a.a.	bis 72 ml
3	Methylnadic anhydride	bis 100 ml
4	Beschleuniger	+ 1,5 g

- 10 min rühren (erst ohne Beschleuniger)
- 15 min bei 60°C im Brutschrank (Farbumschlag)
- 10 min bei 45°C im Brutschrank, vor Gebrauch etwas abkühlen lassen

Für die Endeinbettung wurde EPON frisch angesetzt und in Flacheinbettungsformen gefüllt. Die Präparate wurden in den Vertiefungen, die durch eingelegte Papierstückchen beschriftet wurden, mit Nadeln ausgerichtet, so dass die Würmer später querschnitten werden konnten.

3.2.2 Lichtmikroskopische Schnitte

3.2.2.1 Semidünnschnitte

Die Semidünnschnitte wurden am Ultramikrotom (Ultracut OmU 3, Firma Reichert) hergestellt. Die Schnitte wurden mit einem Glasmesser angefertigt. Die Glasmesser wurden an einem mechanischen Messerbrechgerät (LKB 2178 Knifemaker II) hergestellt. Die Schnittdicke der Semidünnschnitte betrug ca. 0,5 µm. Es wurden jeweils von jeder Behandlungsstufe und von den Kontrollen Schnitte vom Vorderende, Mittelteil und Hinterende hergestellt. Die Schnitte wurden auf einen mit einem Wassertropfen versehenen gelatinisierten Objektträger überführt. Die Objektträger mit den Schnitten wurden bei 80 °C auf einer Wärmeplatte getrocknet.

3.2.2.2 Färbung

Für die Färbung wurde polychromes Methylenblau (Fa. Chroma) verwendet. Diese wurde auf die angetrockneten Semidünnschnitte verbracht. Nach kurzer Einwirkzeit (bis die Ränder eingetrocknet sind und grünlich erscheinen) wird die Farblösung mit Aqua bidest. abgespült.

Anschließend werden die Schnitte wieder bei 80 °C auf der Wärmeplatte getrocknet. Es entsteht eine intensive Blaufärbung der Schnitte. Die gefärbten Schnitte wurden mit Eukit/Cedax eingedeckt.

3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopische Schnitte

3.2.3.1 Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte wurden ebenfalls am Ultramikrotom (Ultracut OmU3, Firma Reichert) mit einem Diamantmesser angefertigt. Die etwa 50 bis 70 nm dicken Schnitte (Interferenzfarben silbrig bis Gold) wurden mit Chloroform gestreckt und auf mit Formvar befilmten Kupfernetzen (75, 100 und 150 mesh) aufgebracht.

3.2.3.2 Kontrastierung

Für die Kontrastierung der Schnitte wurde die Doppelkontrastierung mit Uranylacetatlösung und Bleicitrat (nach Reynolds, 1963) durchgeführt. Die 5%-ige Uranylacetatlösung wurde mit 50%-igem unvergälltem Ethanol angesetzt und vor Gebrauch etwa zwei Minuten lang abzentrifugiert. Mit der Bleicitratlösung wurde gleichermaßen verfahren.

Tabelle 23: Durchführung der Kontrastierung

Nr.	Substanz	Vorgang
1	Uranylacetatlösung	20 min
2	50 % Ethanol	10 x spülen
3	Aqua bidest	20x spülen und abspritzen
4	Bleicitratlösung	20 min
5	0,02 N Natriumhydroxidlösung	20 x spülen
6	Aqua bidest.	20 x spülen und abspritzen

Die kontrastierten Grids wurden im Anschluss vollständig an der Luft getrocknet und in einer Gridbox (EM Specimen) vor Staub geschützt aufbewahrt. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Schnitte erfolgte an einem Zeiss EM 902 A. Für die Fotografien wurden Planfilme von Kodak 4489 (8,3 x 10,2) verwendet.

3.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Tiere nach dem wie unter Punkt 3.2.1.1. beschrieben Schema behandelt. Die Leberegel wurden in 5%-igem Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer anfixiert. Die Fixierung erfolgt in einer Petrischale, um das Einrollen der Würmer zu verhindern, wurden sie mit einem Objektträger beschwert. Die Würmer wurden anschließend in zwei Teile geteilt. Die fixierten Proben wurden anschließend für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet.

Zunächst wurden die Proben nach folgendem Schema behandelt:

1. Waschen
2. Entwässerung über eine aufsteigende Acetonreihe

Anschließend wurden die Würmer mit Critical Point Dryer (Balzer Union) getrocknet und auf heiße Probenhalter, die mit Wachs überzogen wurden, aufgeklebt. Mittels des Sputtering Device (Balzers Union) erfolgte eine Bedampfung der Proben mit Gold.

Die Präparate wurden in einem Rasterelektronenmikroskop (Leitz-AMR 1000) untersucht und auf Agfa Film (APX 25) aufgenommen.

3.2.4.1 Aufbereitung der Proben

Die in 5%-igen Glutaraldehyd fixierten Rasterproben wurden folgenden Aufbereitungsschritten unterzogen:

Tabelle 24: Aufbereitung der Rasterproben

Vorgang	Dauer
1. Waschen 4x in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer (pH 7,2- 7,4)	je 30 min.
2. Entwässerung über eine aufsteigende Acetonreihe 1x in 20%igen Aceton 1x in 40%igen Aceton 1x in 60%igen Aceton 1x in 70%igen Aceton 1x in 80%igen Aceton 1x in 90%igen Aceton 1x in 95%igen Aceton 2x in 100%igen Aceton 1x in 100%igen Aceton, getrocknet mit Molekularsieb	für 20 min. für 20 min. für 20 min. für 20 min. für 20 min. für 20 min. für 20 min. je 20 min. für mind. 30 min.

3.2.4.2 Critical-Point-Trocknung

Diese Art der Probentrocknung wurde verwendet, um eine Schädigung der REM-Präparate zu vermeiden, die bei Lufttrocknung durch die Oberflächenspannung des Lösungsmittels bzw. Wasser durch Verdampfung entstehen würde.

Die wie oben beschrieben behandelten Proben werden in eine druckfeste Kammer gebracht, in der durch mehrmaliges Spülen mit flüssigem Kohlendioxid das Entwässerungsmittel Aceton substituiert wird. Nach sechsmaligem Spülen befindet sich nur noch flüssiges CO² in der Druckkammer. Das Kohlendioxid wird langsam erwärmt, bis Temperatur und Druck den kritischen Punkt erreicht haben (31 °C, 73,8 bar). Dabei nimmt das Übergangsmedium in seiner flüssigen und gasförmigen Phase die gleiche Dichte an und vermischt sich vollständig, ohne eine Phasengrenze zu durchwandern. Im Anschluss wird das gasförmige Kohlendioxid behutsam aus der Kammer entlassen. Die Proben werden auf einen heißen Probenteller mit Wachs aufgeklebt.

3.2.4.3 Goldbedampfung

Die Goldbedampfung der entwässerten, getrockneten nicht leitenden Proben dient der Herstellung einer leitenden Oberfläche bei gleichzeitiger Vermeidung negativer Ausdehnung.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf Ablenkung der durch die Proben emittierten Sekundärelektronen und einer plötzlichen Änderung im Sekundärelektronensignal ungleich verteilt negativer Ladung oder auch auf einer Ablenkung des Elektronenstrahls, wodurch das Bild aus unterschiedlichen Bereichen erzeugt wird.

Die auf den Träger aufgeklebten Präparate werden in den Kathodenzerstäuber eingelegt, in diesem wird nach Verschluss ein Vakuum von 0,1 bis 0,2 Torr erzeugt. Es erfolgt eine sechsmalige Flutung mit Argon, bis die Proben bei einem Unterdruck von 0,15 Torr und einer Stromstärke von 18 mA für 5 min in einer permanenten Argon- Atmosphäre bedampft werden.