
3. Material und Methoden

3.1. Untersuchtes Material

Von sieben Hündinnen und sechs Rüden, die in den Monaten August bis November 1992 im Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin sezirt worden sind, sind jeweils Gewebeproben aus Magen, Duodenum, Lunge, Mandibularlymphknoten, Uterus und Haut von der Stirn entnommen worden.

Nationale und pathologisch-anatomischen Gesamtbefunde der 13 untersuchten Hunde sind der Tabelle 9 (Seite 29) zu entnehmen.

Ausgewählt wurden nur diejenigen Fälle, die zum Zeitpunkt der Sektion nicht länger als 24 Stunden tot waren. Die für die weitere Untersuchung ausgewählten oben genannten Organe wiesen histologisch keine Anzeichen autolytischer Prozesse auf.

Von allen Hunden wurden die formalinfixierten Schnitte mit Hilfe der Kombination einer enzymhistochemischen und einer immunhistochemischen Reaktion zum Nachweis von Tryptase und Chymase ausgewertet. Anschließend sind Hunde mit auffälligen Befunden in den ausgewählten Organen von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen worden.

Von den Hunden mit den Sektions-Nummern 1320, 1446, 1474, 1622, 1658 und 1707 sind alle Organe in allen vier Fixations-Färbe-Kombinationen ausgewertet worden, von dem Afghanen (S-Nr. 1590) nur die Lunge. Der Tabelle 20 (Seite 40) ist zu entnehmen, wie viele Hunde und wie viele Lokalisationen pro Organ in der jeweiligen Fixierungs- und Färbekombination ausgewertet worden sind. Den Einzeltiertabellen im Anhang (Seite 154 ff) ist zu entnehmen, welche Werte bei jedem einzelnen Hund dabei erhoben worden sind. In einzelnen Fällen ist ein Vergleich der Durchschnittswerte der bei unterschiedlichen Fixationsmethoden gewonnenen Ergebnisse durch die ungleiche Anzahl untersuchter Hunde erschwert. Insbesondere wenn die in der Carnoyfixierung nicht ausgewerteten Tiere in der Formalinfixierung durch über- oder unterdurchschnittlich hohe Mastzeldichten aufgefallen sind.

Tab. 9 Nationale und pathologisch-anatomische Gesamtbefunde der 13 untersuchten Hunde

Sektions-Nr. .../1992	Rasse, Geschlecht, Alter, Gewicht	Pathologisch-anatomische und – histologische Diagnose	Todesart	Sektion (h p.m.)
1208	Dalmatiner M, 6 J	Seminom	Euthanasie	< 24
1320	Rottweiler M, 6 J, 41 kg	Osteosarkom distaler Radius	Euthanasie	21
1328	Deutscher Schäferhund W, 9 J, 22 kg	Adenokarzinom der Mamma	Gestorben	22
1349	Mischling W, 10 J, 8 kg	Jejunitis	Gestorben	14
1370	Deutscher Schäferhund M, 4 Mon, 7 kg	Parvo / Staupe	Gestorben	19
1380	Boxer M, 9 J, 34 kg	Skirrüses Adenokarzinom im Pylorus	Euthanasie	20
1381	Yorkshire-Terrier W, 13 J, 2 kg	Konzentrische Myokardhypertrophie, Adenokarzinom der Mamma	Euthanasie	15
1446	Rauhhaar-Teckel W, 12 J, 8 kg	Exzentrische Myokardhypertrophie	Euthanasie	14
1474	Labrador-Spitz Mix M, 18 kg	Dekompensierter Schock	Gestorben	13
1590	Afghane W, 2 J, 21 kg	Enterale und zentralnervöse Staupe (kein Virusnachweis)	Gestorben	< 24
1622	Zwergpudel W, 13 J, 3 kg	Dekompensierte hypertrophe Kardiomyopathie	Gestorben	11
1658	Beagle M, 1 J, 15 kg	Dekompensierte hypertrophe Kardiomyopathie	Gestorben	< 24
1707	Boxer W, 10 J, 35 kg	Hämangiosarkomatose	Euthanasie	< 24

m: männlich; w: weiblich; J: Jahre; Mon: Monate; h p.m.: Stunden postmortal

3.1.1 Materialgewinnung

Es wurden jeweils zwei benachbarte Gewebeproben aus den folgenden Lokalisationen entnommen (Tabelle 10):

Tab. 10 Gewebeentnahmestellen

Organ	Lokalisation	Größe einer Probe
Magen	Große Krümmung des Fundus ventriculi	ca. 0,5 x 1cm
Duodenum	Querschnitt aus der Pars ascendens	ca. 0,5cm breiter QS
Lunge	Dorsale Krümmung eines Hauptlappens	ca. 0,5cm breiter QS
Mandibularlymphknoten	Querschnitt	ca. 0,5cm breiter QS
Uterus	Querschnitt aus einem Uterushorn	ca. 0,5cm breiter QS
Haut	Waagrecht orientierter QS in Höhe der Processus frontales der Oberkieferbeine	ca. 0,5 x 1cm

QS: Querschnitt

Eine der beiden Proben wurde 24 -36 Stunden in 4 %igem Formalin (pH-Wert 7,7) fixiert. Diese Fixationsdauer war ausreichend, um das Einsetzen bzw. Fortschreiten autolytischer Reaktionen zu verhindern. Anschließend wurde das überschüssige Fixationsmittel unter fließendem Leitungswasser ausgespült. In der aufsteigenden Alkoholreihe (50% -100%) wurde die Probe schließlich in einem Einbettungsautomaten entwässert, in Xylol überführt und abschließend in Paraffin eingebettet. Die benachbarte Gewebeprobe wurde zunächst 3-4 Stunden in Carnoy´scher Lösung und danach in 100 %igem Alkohol fixiert, wodurch die Probe gleichzeitig auch dehydriert wird. Anschließend wurde das Gewebe ebenfalls in Paraffin eingebettet. Die Carnoy´scher Lösung besteht aus Methanol (60%), Chloroform (30%) und Eisessig (10%) und hat einen pH-Wert von 3,25. Die beiden verschiedenen Fixantien wurden benutzt, um sowohl den Nachweis der formalinresistenten als auch den der formalinempfindlichen Mastzellen zu ermöglichen. Als ideales Fixationsmittel für Mastzellen wurde die Carnoy´sche Lösung schon 1959 von KELLY und BLOOM betrachtet. STROBEL et al. (1981) führten die exzellente Erhaltung der Mastzellgranula darauf zurück, dass die Lösung sauer ist und dadurch die Bindung zwischen Glykosaminoglykanen und dem kationischen Farbstoff erleichtert. Formaldehyd dagegen soll zu einer Blockade der anionischen Gruppen der Proteoglykane führen und damit eine Anlagerung kationischer Farbstoffe, wie Methylenblau, verhindern (MILLER und WALSHAW, 1972; WINGREN und ENERBÄCK, 1983; ENERBÄCK, 1986).

Von den Paraffinblöckchen wurden mit einem Rotationsmikrotom Serienschnitte mit einer Dicke von ca. 4 µm angefertigt und auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte im Brutschrank bei 37° C über Nacht getrocknet. Zur Gewährleistung der Nachweisbarkeit der Antigenstruktur und der Enzymreaktion wurde auf eine optimale Temperatur bei der Trocknung der Schnitte und bei allen weiteren Schritten geachtet. Temperaturen von 60° C und darüber führen zu einer Denaturierung der Proteinstruktur und Temperaturen unter 37° C verlangsamen die Reaktionsgeschwindigkeit der Mastzellproteasen. Beide Effekte hätten zur Folge, dass die Färbeergebnisse schwächer oder negativ ausfallen.

3.2. Untersuchungsmethoden

3.2.1. Histologische Darstellungsverfahren

Von jeder Organprobe wurde je ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (ROMEIS, 1989) und ein zweiter mit Methylenblau nach UNNA entsprechend dem Paragraphen 1524 (ROMEIS, 1968) gefärbt.

Die Schnitte wurden vor der jeweiligen Färbung für 20 min in Xylol entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe (100% - 50%) rehydriert und in Aqua destillata überführt. Die für die histologische Gewebeaufbereitung und -färbung verwendeten Chemikalien sind in der Tabelle 11 (Seite 31) aufgelistet.

Tab. 11 Verwendete Geräte, Chemikalien und Farbstoffe

Substrat	Hersteller (Bestellnummer)
Einbettungsautomat 1	Miles Scientific
Einbettungsautomat 2	Savimed
Paraffin (Medim-Plast 58)	MEDIM (10-005 B167026)
Semi-Dünnschnitt-(Universal) Mikrotom	MEDIM (Typ DDM 0036)
Xylol	Merck (6025)
Hämatoxylin	Merck (15938)
Eosin	Chroma Gesellschaft (2E 052)
Methylenblau polychromes, UNNA	Chroma Gesellschaft (2 C 180)
Glyzerinäther	Chroma Gesellschaft (3C 260)
Methylenblau polychromes, UNNA	Chroma Gesellschaft (2 C 180)
Entellan	Merck (7960)

Chroma Gesellschaft Schmid GmbH + Co, D- 7316 Köngen/N
 MEDIM Medizinische Diagnostik-Methoden GmbH D- 6300 Giessen

Anhand der HE-Färbung erfolgte die histologische Beurteilung der Gewebeproben, um pathologische oder autolytische Prozesse zu erkennen und die entsprechenden Hunde aus der weiteren Untersuchung auszuschließen.

Die Methylenblaufärbung diente der Darstellung der sulfatierten sauren Glykosaminoglykane in Mastzellgranula. Im Detail wurde sie wie in Tabelle 12 dargestellt durchgeführt.

Tab. 12 schematische Darstellung der Färbearbeitung für die **UNNA- Färbung** (ROMEIS, 1968)

Schnitte entparaffinieren	
1 % polychromes Methylenblau	10 min
Kurz Abspülen in Leitungswasser	
Glyzerinäther (1:5 mit Aqua dest. Verdünnt: 10 ml Glyzerinäther + 40 ml Aqua dest.)	Differenzierung (unter anschließender mikroskopische Kontrolle) durch ca 3 x kurz eintauchen bis der Schnitt blau ist und die Mastzellen metachromatisch sind
Spülen in Leitungswasser	2 min
Abtrocknen mit Filterpapier	
100% Alkohol	Kurz eintauchen
Überführen in Xylol	
Eindecken in Vitro-Clud	

Die übrigen Schnitte sind für die miteinander kombinierten enzym-immunzytochemischen Reaktionen zur Darstellung der Mastzellproteasen verwendet worden.

3.2.2 Enzym – Immunzytochemischer Proteasennachweis

Tryptase und Chymase können sowohl enzym- als auch immunhistochemische nachgewiesen werden. Für die vorliegende Untersuchung wurde eine Kombination gewählt, bei der Tryptase immunhistologisch mittels eines polyklonalen - aus dem Kaninchen stammenden und gegen vom Menschen gewonnene Tryptase gerichteten - Antikörpers (HARVIMA et al., 1988a) und Chymase enzymhistochemisch mit Naphthol AS-D Chlorazetat als Substrat (SIGMA DIAGNOSTICS, 1992) nachgewiesen wurde. Durch diese Kombination zweier histochemischer Reaktionen mit anschließender Farbstoffmarkierung gelang es, die beiden mastzellspezifischen Proteasen Tryptase und Chymase gleichzeitig in ein und derselben Zelle darstellen zu können. Als Ergebnis der Reaktion stellen sich **Tryptase**-haltige Mastzellgranula **rot** und **Chymase**-haltige Mastzellgranula **blau** dar.

Eine Übersicht über die Nachweismethoden und die Färberegebnisse liefert die Tabelle 13.

Tab. 13 Methoden zum Nachweis der mastzellspezifischen Proteasen Tryptase und Chymase

Mastzell-Protease:	Chymase	Tryptase
Nachweismethode:	Enzymzytochemisch	Immunzytochemisch
Substrat/Reagenz für den Nachweis:	Naphthol AS-D Chlorazetat	polyklonaler Kaninchen-anti-Mensch - Haut Tryptase AK
Arbeitsablauf entsprechend:	Gebrauchsanweisung	APAAP-Methode
Farbstoff:	Fast Blue	Fast Red
Granulafärbung:	Blau	Rot

Im Detail wurde der Proteasennachweis wie in Tabelle 14 (Seite 33) dargestellt durchgeführt: Der enzymzytochemische Nachweis der Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase erfolgt entsprechend der von der Firma Sigma mit den Reagentien gelieferten Gebrauchsanweisung (SIGMA DIAGNOSTICS, 1992). Anstelle von Fast Red wurde jedoch Fast Blue verwendet. Das Grundschemata der immunzytochemischen Färbung des polyklonalen Anti-Tryptase-Antikörpers basiert auf der von CORDELL et al. (1984) entwickelten APAAP-Technik und folgt der von WALTER (1992) vorgeschlagenen Modifikation des Arbeitsschemas. Die verwendeten Reagenzien, Antiseren, Substanzen und Lösungen werden in den Tabellen 15 und 16 (Seite 34 und 35) aufgelistet.

Tab. 14 schematische Darstellung des enzym- und immunzytochemischen Proteasennachweises

1. Entparaffinieren	Xylol 3 x 10 min
2. Rehydrieren	Azeton 15 min Azeton/TBS 2 x 10 min TBS 2 x 5 min Spülen in Aqua dest 2 x 5 min
Enzymzytochemischer Nachweis von Chymase:	
3. Naphthol AS-D Chlorazetat-Lösung ansetzen:	1 ml Fast-Blue Base in ein Plastikröhrchen, 1ml Natriumnitritlösung hinzufügen, vorsichtig umschwenken und 2 min stehen lassen, dann in 40 ml vorgewärmtes A.dest (37°C) geben. 5 ml TRISMAL™ 6.3 Puffer Konzentrat und 1 ml Naphthol AS-D Chlorazetat Lösung hinzufügen, gut mischen und in die Küvette mit den Objektträgern gießen.
4. Inkubieren	15 min lichtgeschützt (im 37° Brutschrank)
5. Spülen in A.dest	
Immunhistochemischer Nachweis der Tryptase:	
6. Verdauung:	Präparate mit 0,1% Pronase-Lösung bedecken, 10 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubieren
7. Spülen in TBS	2 x 5 min
8. Objektträger in Coverplates einsetzen.	
9. Primärantikörper gegen Tryptase	(100 ml pro Schnitt, 1:2000 verdünnt in RPMI 1) 30 min bei Zimmertemperatur inkubieren
10. Spülen in TBS	2 x 5 min
11. "Mausifikation"	mit mouse-anti-rabbit IgG Antikörper (100 ml pro Schnitt, 1:200 verdünnt in RPMI 2) 30 min bei Zimmertemperatur inkubieren
12. Spülen in TBS	2 x 5 min
13. Brückenantikörper (Rabbit-anti-mouse IgG)	(100 ml pro Schnitt, 1:100 verdünnt in RPMI 2) 30 min bei Zimmertemperatur inkubieren
14. Spülen in TBS	2 x 5 min
15. APAAP-Komplex	(100 ml pro Schnitt, 1:100 verdünnt in RPMI 1) 30 min bei Zimmertemperatur inkubieren
16. Spülen in TBS	2 x 5 min
17. Wiederholen der Schritte 14 – 16	mit jeweils 15 min Inkubation
18. Spülen in TBS	1 x 5 min
19. Entnahme der Schnitte aus den Coverplates	
20. Spülen in TBS	1 x 5 min auf dem Magnetrührer
21. Entwickeln im Fast-Red -Substrat	30 min auf dem Magnetrührer
22. Spülen in Leitungswasser	3 x 5 min
23. Spülen in A.dest	2 x 5 min
24. Eindecken mit KAISER's Glyzeringelatine (mit 0,1% Na-Azid) ohne Gegenfärbung	

3. Material und Methoden

Tab. 15 Verwendete Reagenzien, Antisera und Substanzen

Substrat	Hersteller (Bestellnummer)
Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase Enzym-Kit bestehend aus:	Sigma (91-C)
Naphthol AS-D Chlorazetat Lösung	Sigma (91-1)
Fast Blue BB Base Lösung	Sigma (91-7)
TrizmalTM 6,3 Konzentrat	Sigma (91-3)
Natriumnitritlösung	Sigma (91-4)
Primärer polyklonaler Antikörper:	
Rabbit-anti-Human-Tryptase	HARVIMA et al., 1988a
Sekundäantikörper, Brückenantikörper, APAAP-Komplex:	
Mouse-anti-Rabbit-IgG	Dianova (211-005-109)
APAAP-Dualsystem, bestehend aus: - Rabbit-anti-Mouse-IgG - APAAP-Komplex	Dianova (ADS 101)
Substanzen:	
Trizma Base	Sigma (T 1503)
Trizma Hydrochlorid	Sigma (T 3253)
Natriumchlorid reinst	Merck (6400)
Protease Typ XXV (Pronase E)	Sigma (P 6911)
RPMI (Royal Park Memorial Institute) 1640	Seromed (F 1215)
Inaktiviertes fetales Kälberserum	Seromed (SO 113)
Na-Azid	Merck (6688.0100)
Fast Red TR Salt	Sigma (F 2768)
Naphthol-AS-Mix-Phosphat	Sigma (N 4875)
Dimethylformamid	Merck (8222 75)
Levamisol	Sigma (L 9756)
Poly-L-Lysin 0,1%	Sigma (P 6282)
Kaiser´s Glyzeringelatine	Merck (9242)

Alle Reagenzien und Substanzen wurden den Herstellerempfehlungen entsprechend kühl oder tiefgefroren gelagert und nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitszeit verwendet. Pufferlösungen wurden vor jedem Färbedurchgang frisch angesetzt. Der primäre Antikörper wurde in kleinen Portionen und vorverdünnt tiefgefroren gelagert und erst kurz vor Gebrauch auf die endgültige Verdünnung verdünnt.

Tab. 16 Verwendete Lösungen

Poly-L-Lysin:	
Poly-L-Lysin wird als Gebrauchslösung 0,01%ig in Aqua tridestillata hergestellt und ist als solche 4 Wochen haltbar.	
TBS (Tris buffered saline), pH 7,4-7,6:	
Trizma Base	4,5 g
Trizma Hydrochlorid	33,0 g
Natriumchlorid	43,9 g
RPMI-Verdünnungspuffer 1:	
RPMI 1640	50 ml
Inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)	5 ml
Na Azid	50 mg
mit Trizma-HCL und Trizma-Base pH auf 7,4 bis 7,6 einstellen	
RPMI-Verdünnungspuffer 2:	
RPMI 1640	50 ml
Inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)	10 ml
Na Azid	50 mg
mit Trizma-HCL und Trizma-Base pH auf 7,4 bis 7,6 einstellen	
Fast Red:	
TBS pH 8,2	98 ml
Naphthol-AS-MX-Phosphat	20 mg
Dimethylformamid (DMF)	2 ml
Levamisol 1M in Aqua dest. gelöst	2,408 mg in 100 ml
Fast-Red-TR-Salz	100 mg
Naphthol-AS-MX phosphat in DMF lösen, dann mit TBS pH 8,2 auffüllen (sind zusammen im Kühlschrank mindestens 4 Wochen haltbar)	
Unmittelbar vor Gebrauch Levamisole hinzufügen und Fast-Red Salz lösen und alles in eine Küvette filtrieren.	

3.2.2.1 Anmerkung zur alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Methode (APAAP)

Der Arbeitsgang der für die immunzytochemische Darstellung der Tryptase eingesetzten APAAP-Methode wurde entsprechend der Anleitung von WALTER (1992) durchgeführt. Das Grundschemata dieser Färbung für polyklonale Antikörper basiert auf der von CORDELL et al. (1984) entwickelten Technik, in der ein unmarkierter Brückenantikörper (rabbit-anti-mouse) zur Markierung eines primären monoklonalen Antikörpers verwendet wird.

Stammt der primäre Antikörper nicht aus der Maus, sondern wie in der vorliegenden Untersuchung aus dem Kaninchen, muß als Zwischenschritt die Inkubation mit einem entsprechenden Antikörper - hier ein mouse-anti-rabbit Antikörper - eingefügt werden. Dieser Zwischenschritt wird auch als "Mausifikation" bezeichnet.

An den Brückenantikörper wird der APAAP - Komplex gekoppelt. Durch die Entwicklung mit Naphtholsalz und Fast Red als Substrat ergibt sich ein leuchtend rotes Reaktionsprodukt (CORDELL et al. 1984). Da das Reaktionsprodukt sehr gut zu erkennen ist, eignet sich die Technik besonders zum Nachweis geringer Mengen von Antigen. Es ist möglich, die Intensität der APAAP-Reaktion durch wiederholtes Inkubieren mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex zu verstärken.

Kriterien für die Wahl der APAAP-Methode

Im Gegensatz zu den Immunperoxidase-Methoden, wie der Peroxidase-anti-Peroxidase- (PAP) und der Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex- (ABC) Methode, sind bei der APAAP-Methode keine Mißinterpretationen aufgrund einer unspezifischen Bindung von Avidin an Mastzellen oder einer unspezifischen Bindung des primären Antikörpers an endogene Peroxidasen zu befürchten. Die unspezifische Färbung von Mastzellen durch den avidin-biotinylierten Peroxidase-Komplex wurde 1983 von BUSSOLATI und GUGLIOTTA beschrieben. Sie führten diese auf eine Bindung des positiv geladenen Avidin-Peroxidase Komplexes an die sulfatierten Gruppen des Heparins in den Mastzellgranula zurück.

3.2.2.2 Fehlerquellen

unspezifische Färbung

Bei der APAAP-Methode wird zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase-Aktivität dem Substrat Levamisol zugefügt (CORDELL et al. 1984). Levamisol blockiert spezifisch nur die nicht-intestinalen endogenen Phosphatasen, nicht jedoch die im APAAP-Komplex gebundene alkalische Phosphatase, die aus dem Kälberdarm stammt. Damit wird einerseits die Spezifität der Färbung gewährleistet, andererseits die unspezifische Färbung endogener intestinaler Phosphatasen nicht verhindert. Aufgrund morphologischer Unterschiede ist jedoch die Identifizierung der Mastzellen und damit die Unterscheidung der mastzellspezifischen Färbung von der unspezifischen Anfärbung von Schleimhautzellen möglich. Die endogene alkalische Phosphatase ist hier vorwiegend an Oberflächen mit Mikroville oder Bürstensäumen lokalisiert (ROMEIS 1989).

Das in den Verdünnungspuffern enthaltene fetale Kälberserum verhindert darüberhinaus unspezifische Bindungen der Antikörper mit dem Gewebe.

Um unspezifische Färbungen zu erkennen, wurde bei jedem Färbedurchgang jeweils ein Schnitt nicht mit dem primären Antikörper inkubiert und als Negativkontrolle mitgeführt.

Antigenmaskierung durch Formalinfixierung

Durch Quervernetzungen zwischen dem Aldehydanteil des Formalins und der spezifischen Antigenstruktur kommt es bei der Verwendung von Formalin als Fixationsmittel zu einer Maskierung der Antigene / Proteine im Gewebe (BATTIFORA und KOPINSKI, 1986; HED und ENESTRÖM, 1981). Je nach Dauer der Einwirkung und je nach Konzentration des Fixationsmittels kann die immunhistochemische Darstellung dadurch mehr oder weniger verhindert werden. Eine Demaskierung ist durch eine vor die Inkubation eingeschobene Phase der sogenannten Verdauung mit einer Protease möglich (BATTIFORA und KOPINSKI, 1986; HED und ENESTRÖM, 1981). Die optimale Länge und die zu verwendende

Konzentration der Protease ist an die vorher eingesetzte Fixationsdauer anzupassen (BATTIFORA und KOPINSKI, 1986). Alle in der vorliegenden Untersuchung genommenen Gewebeproben wurden daher in einer einheitlich konzentrierten Formalinlösung und möglichst gleich lange fixiert. Inkubationszeit und Konzentration der Pronase-Lösung (10 min, 0,1 %) wurden für alle Färbungen einheitlich eingehalten.

Weitere technische und methodische Fehler konnten durch die Verwendung einwandfreier Reagenzien und die exakte Einhaltung der Vorschriften für die Gewebeaufbereitung und Färbung weitestgehend ausgeschlossen werden.

3.2.3 Auswertung der Schnitte

3.2.3.1 Identifizierung der Mastzellen

Mastzellen wurden anhand ihren typischen Granula, bzw. der in diesen lokalisierten spezifischen Inhaltsstoffe, identifiziert. Bei Verwendung von Methylenblau wurden die metachromatisch anfärbbaren Proteoglykane (Heparin) nachgewiesen, während mit Hilfe der enzym-immunzytochemischen Reaktionen mit anschließender Farbstoffmarkierung die beiden mastzellspezifischen Proteasen Tryptase und Chymase rot bzw. blau dargestellt werden konnten. Bei der Beurteilung der mit Methylenblau gefärbten Schnitte gibt es keine Verwechslungsmöglichkeiten mit anderen Zellen, da die metachromatische Färbung der Mastzellgranula mastzellspezifisch ist. Beim Nachweis der Chymase mit Hilfe des enzymhistochemischen Nachweises der Naphtol AS-D-Chlorazetat Esterase müssen Mastzellen von neutrophilen Granulozyten und Promyelozyten abgegrenzt werden, da die Chlorazetat Esterase in diesen Zellen eine vergleichbar starke Aktivität wie in Mastzellen aufweist, während Monozyten und basophile Granulozyten eine nur geringe oder keine Aktivität aufweisen und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Megakaryozyten keine Chloazetatesteraseaktivität aufweisen (YAM et al., 1971). Während in chymasehaltigen Mastzellen 4,5 µg chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen/10⁶ Zellen nachgewiesen werden konnten (IRANI et al., 1986; SCHWARTZ et al., 1987a), waren es in neutrophilen Granulozyten und Monozyten nur 1 bzw. 0,05 µg/10⁶ Zellen (CAMPBELL et al., 1989). Blutzellen, die mit Mastzellen verwechselt werden könnten, sind demnach entweder aufgrund ihrer nur schwachen Farbreaktion, aufgrund ihrer Lokalisation im Gewebe (intravasal) oder/und durch ihre Morphologie (Zellgröße und Kernmorphologie) gut von Mastzellen unterscheidbar (CAUGHEY et al., 1988c).

3.2.3.2 Quantifizierung der Mastzellen, ausgewertete Lokalisationen

Es wurden nur Zellen gezählt, in denen der Kern oder zumindestens ein Teil desselben zu erkennen war.

Die mittlere Mastzellendichte und die prozentuale Verteilung der Mastzelltypen wurde für verschiedene Lokalisationen innerhalb eines Gewebes getrennt untersucht. Die untersuchten Lokalisationen für jedes Gewebe sind in den Tabellen 17-19 (Anhang 1-3) aufgeführt und in den Abbildungen 1 – 6 (Anhang 1-3) grafisch dargestellt.

Die jeweils ausgewertete Flächengröße wurde mit Hilfe eines Gitternetzes bei der 400er Vergrößerung (40er Objektiv, 10er Okular) bestimmt (siehe Abb. 7). Dazu wurde ein Okular benutzt, in dessen Feldlinse ein aus 10 x 10 Quadraten bestehende Gitternetz eingeschliffen war (ZEISS 46 40 43 - 9902).

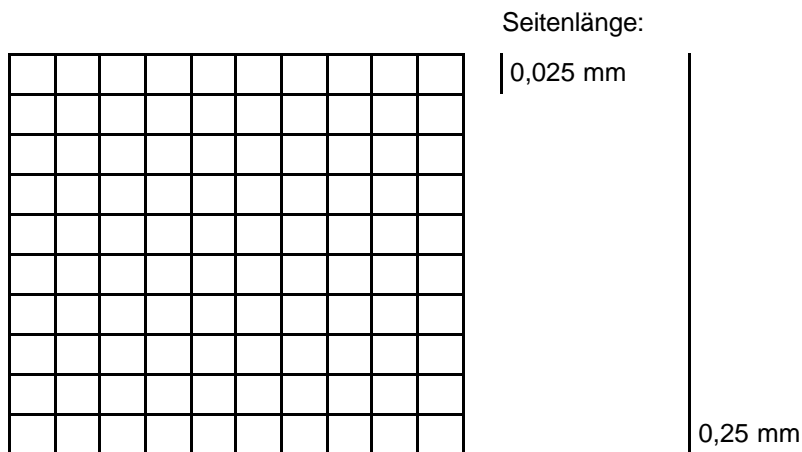


Abb. 7 Gitternetz aus 10 x 10 Quadraten mit einer Gesamtseitenlänge von 0,25 mm

Schritt für Schritt wurde der Objektträger unter dem Gitternetz mäanderförmig verschoben und die Anzahl der Quadrate, die jeweils über einer Lokalisation lagen, gezählt. Jedes der 100 Quadrate hatte eine Seitenlänge von 0,025 mm, bzw. eine Fläche von 0,000625 mm². Für jede Lokalisation wurde, sofern dies möglich war, die Zahl der Mastzellen in mindestens 1000 Quadraten gezählt. Das angestrebte Minimum der auszuwertenden Flächengröße war dementsprechend 0,6 mm². Im Idealfall wurde eine Fläche von etwa 1 mm² ausgewertet. Unabhängig vom Gewebe wurde beim Auszählen darauf geachtet, dass "Leerflächen" wie Lumina von Bronchien, Bronchiolen und Alveolen, größerer Gefäße und Drüsenschläuche (Krypten) nicht mitgezählt wurden.

Auf diese Weise wurde die Mastzellendichte sowohl für die Formalin-, als auch für die Carnoy-Fixierung und sowohl mit Hilfe der Methylenblaufärbung nach UNNA als auch für den enzym-immunzytochemisch kombinierten Proteasennachweis bestimmt. Um zu gewährleisten, dass dabei vergleichbare, möglichst eng benachbarte Flächen ausgewertet wurden, wurden erstens möglichst aufeinanderfolgende Schnitte aus der Serienschnittreihe ausgewählt und zweitens immer dieselben Strukturen im Schnitt aufgesucht. Durch die Notierung der Koordinaten des Kreuztisches für jeden der ausgewerteten Schnitte konnte ein sicheres Wiederauffinden und eine Reproduzierbarkeit gewährleistet werden. Da auch immer die Ausgangs- und Endpunkte jedes Durchganges durch den Schnitt mit den jeweiligen Koordinaten notiert wurde, konnte auch die Richtung des Durchfahrens wiedererkannt werden und jede Position relativ sicher wieder aufgefunden werden.

Die Anzahl der Tiere, deren Organe in der jeweiligen Fixierung/Färbung untersucht worden sind, ist der Tabelle 20 zu entnehmen.

Tab. 20 Übersicht über die **Anzahl der Lokalisationen** pro Organ sowie die Anzahl der untersuchten **Tiere** pro Organ und Untersuchungsmethode

Fixierungs- Färbungs- Kombina- tion	Anzahl der untersuchten Tiere				Anzahl der untersuchten Lokalisationen
	FCT	CaCT	FU	CaU	
Organ					
Magen	13	6	11	6	10
Duodenum	13	6	12	6	9
Lunge	13	7	10	7	7
Mandibularlymphknoten	13	6	10	6	8
Uterus	7	6	7	6	6
Haut	13	6	10	6	7

F: Formalin-Fixierung, Ca: Carnoy-Fixierung,
CT: Chymase/Tryptase-Nachweis, U Methyleneblaufärbung nach UNNA

Für jede Gewebeprobe wurden folgende **Parameter** bestimmt:

- ◆ die jeweils ausgewertete *Fläche*, die *Gesamtmastzelldichte*,
- ◆ die *Dichte der T-, TC- und C-Mastzellen*,
- ◆ die *Dichte der C-haltigen Mastzellen* (die Summe der Dichte der TC- und C-Mastzellen),
- ◆ der *prozentuale Anteil der T-, TC- und C-Mastzellen*.

Der *prozentuale Anteil der formalinsensitiven Mastzellen* wurde aus den ermittelten durchschnittlichen Dichten für jede Lokalisation berechnet. Dazu wurde zunächst die Differenz zwischen der Gesamtmastzelldichte nach Carnoy-Fixierung und der Gesamtmastzelldichte nach Formalin-Fixierung berechnet. Danach wurde der prozentuale Anteil dieser Differenz an der Gesamtdichte der nach Carnoy-Fixierung darstellbaren Mastzellen bestimmt. Entsprechend wurden *die prozentualen Anteile der formalinsensitiven Mastzellsubtypen* bestimmt.

Die ausführlichen Tabellen mit den für jeden Hund ermittelten Werten und Berechnungen für jedes Organ und jede Lokalisation finden sich im Anhang (Seite 154 ff). In diesen Tabellen sind auch jeweils die Medianwerte, 1. und 3. Quartil und Quartilsabstand sowie die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichung und Variationskoeffizient angegeben.

Die in den Tabellen und Grafiken des folgenden Ergebnisteiles angegebenen Werte sind Durchschnittswerte und folgendermaßen bestimmt worden: Die Mastzellichte einer Lokalisation ist durch Addition der Mastzellen aller untersuchten Hunde und anschließender Division durch die Summe der Flächen bestimmt worden. Alle prozentualen Werte beziehen sich auf diese Dichtewerte.

Für so relativ kleine Stichprobenumfänge, wie in der vorliegenden Arbeit sind Medianwerte die geeignetsten Mittelwerte, da sie nicht so stark von sogenannten "Ausreißern" beeinflusst werden. Bei der prozentualen Darstellung der drei Mastzelltypen ergibt sich jedoch die Schwierigkeit, dass die jeweils einem Hund zuzuordnenden Anteile der drei Mastzelltypen durch die für die Median- und Quartilberechnung notwendige Rangordnungsstruktur voneinander getrennt werden. Die Summe der Medianwerte der prozentualen Anteile der drei Mastzelltypen ergibt daher häufig nicht mehr 100%. Deutliche Abweichungen zwischen Durchschnittswerten und arithmetischem Mittelwerten auf der einen Seite und Medianwerten auf der anderen Seite sind als Hinweis für eine unsymmetrische, schiefe Verteilung zu werten und werden deshalb bei der Besprechung auffälliger Einzeltier-Ergebnisse (Kapitel 4.3 Seite 78) herausgestellt.

Der **nicht parametrische "Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test"** wurde zum Vergleich der Mastzellichten sowohl zwischen den beiden Fixierungstechniken bei gleicher Färbemethode als auch zwischen beiden Färbemethoden bei gleicher Fixierung durchgeführt. P- Werte von $< 0,05$ sprechen für einen signifikanten Unterschied der Mastzellichte in Abhängigkeit von der Fixierung bzw. Färbung, wenn die miteinander zu vergleichenden Werte "auf eine Grundgesamtheit verallgemeinerbar" sind. Da es sich bei den untersuchten Tieren jedoch nicht um eine solche Zufallsstichprobe handelt, die repräsentativ für eine Grundgesamtheit ist, wird im Folgenden nicht von "signifikanten" sondern von "auffallenden" Unterschieden gesprochen werden, wenn die berechneten p-Werte des nicht parametrischen "Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Tests" $< 0,05$ sind.