

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Tiere, Haltungsbedingungen und Entnahmekriterien

Untersucht wurden 94 Putenhähne unterschiedlicher Altersstufen eines Aufzucht- und Mastbetriebes. Es handelt sich um Tiere der Linie Big 6 des Züchters British United Turkey (B.U.T.).

Die Hähne wurden in einem 1600 qm großen, mit Folienjalousien versehenem Stall auf Hobe!spantiefstreu, welche regelmäßig gefräst wurde, gehalten.

Die Besatzdichte lag in der Aufzucht bis zur fünften Lebenswoche bei 12 Tieren je m², am Anfang der Mast bei vier Tieren je m² und in der Endmast ab der 17. Woche bei 2,75 Tieren je m².

Die Fütterung erfolgte ad libitum. In den ersten zwei Lebenswochen bekamen die Tiere ein relativ eiweißreiches (27% Rohprotein) und kohlenhydratarmes Futter mit 11,40 MJ ME/kg. Sukzessive wurde in sechs Schritten bis zur 18. Lebenswoche der Eiweißanteil im Futter auf 16% Rohprotein reduziert und der Kohlenhydratanteil angehoben (Energiegehalt: 13,00 MJ ME/kg). Einer ausgewogenen Mineralstoff- und Vitaminzufuhr wurde Rechnung getragen.

Es kam kein spezielles Beleuchtungsprogramm zur Anwendung. Die Tiere wurden bei gleichbleibender Tageslänge von 16 Stunden Licht zu acht Stunden Dunkelheit gehalten. Hierzu wurde die Tageslichtlänge, in den frühen Morgen- und späten Abendstunden durch Kunstlicht ergänzt. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von Ende Juli bis Ende Dezember.

Die Verluste an Tieren lagen laut bestandsbetreuendem Tierarzt in der Aufzucht bis zur fünften Lebenswoche bei ungefähr zwei Prozent, in der Mast erhöhten sie sich um weitere fünf Prozent. Direkte Verluste durch Erkrankungen der Hinterextremität lagen bei ca.1%.

Für die Untersuchung wurden der Herde des Putenmastbetriebes, mit dem ersten Lebenstag beginnend, wöchentlich vier (in den ersten drei Wochen sechs) willkürlich ausgewählte Hähne entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass es sich um klinisch gesunde, gut entwickelte, dem Durchschnitt der Herde entsprechende und kein Anzeichen einer Lahmheit zeigende Tiere handelte.

Noch vor Ort erfolgte nach Betäubung die Tötung durch Dislozierung der Halswirbelsäule und gleichzeitiger Eröffnung der großen Halsgefäße.

Tab.5: Tiergruppen und Probenumfang über den Untersuchungszeitraum, Lebenstag (LT), Lebenswoche, (der Schlupf- bzw. Einstallungstag ist als LT null definiert)

LT	Tier-Nr.	L-Woche	LT	Tier-Nr.	L-Woche	LT	Tier-Nr.	L-Woche		
1	T1	0	56	T39	8	119	T75	17		
	T2	0		T40	8		T76	17		
	T3	0		T41	8		T77	17		
	T4	0		T42	8		T78	17		
	T5	0	63	T43	9	126	T79	18		
	T6	0		T44	9		T80	18		
7	T7	1	63	T45	9	126	T81	18		
	T8	1		T46	9		T82	18		
	T9	1	70	T47	10	133	T83	19		
	T10	1		T48	10		T84	19		
	T11	1		T49	10		T85	19		
	T12	1		T50	10		T86	19		
14	T13	2	77	T51	11	140	T87	20		
	T14	2		T52	11		T88	20		
	T15	2		T53	11		T89	20		
	T16	2		T54	11		T90	20		
	T17	2	84	T55	12	147	T91	21		
	T18	2		T56	12		T92	21		
21	T19	3	84	T57	12	147	T93	21		
	T20	3		T58	12		T94	21		
	T21	3		91	T59		13			
	T22	3			T60		13			
28	T23	4	91	T61	13					
	T24	4		T62	13					
	T25	4		98	T63			14		
	T26	4			T64			14		
35	T27	5	98	T65	14					
	T28	5		T66	14					
	T29	5		105	T67			15		
	T30	5			T68			15		
42	T31	6	105	T69	15					
	T32	6		T70	15					
	T33	6		112	T71			16		
	T34	6			T72			16		
49	T35	7	112	T73	16					
	T36	7		T74	16					
	T37	7								
	T38	7								

3.2. Probenaufbereitung, Untersuchungsmethoden und ihre Auswertverfahren

3.2.1. Körpermassebestimmung

Die Bestimmung der Körpermasse erfolgte im ausgebluteten Zustand ungefähr drei Stunden nach der Schlachtung. In der Zwischenzeit waren die Tiere in Plastiksäcken verpackt und wurden gekühlt, so dass ein Masseverlust durch Austrocknung zu vernachlässigen ist. Die bei der Tötung durch Blutentzug entstandene Massedifferenz zur Lebendmasse kann aufgrund des etwa gleichbleibenden Anteils an der Gesamtkörpermasse ebenfalls vernachlässigt werden.

Die Tiere wurden bis zu einem Gewicht von 10 kg mit einer OHAUS Tischwaage I – 20W, Modell I SW-12 mit einem maximalen Wägebereich von 12 kg und einer Genauigkeit von 0,001 kg gewogen. Die schwereren Tiere wurden mit einer BIZERBA MC I Bodenwaage mit einem Wägebereich von 0,4 – 60 kg und einer Anzeigegenauigkeit von 0,02 kg gewogen.

3.2.2. Pathologisch anatomische Untersuchung

Nach dem Wiegen der Tiere wurden die Hinterextremitäten eingehend untersucht, es wurde darauf geachtet, dass keine Tiere mit Verkrümmungen der Beinachse oder äußeren Veränderungen der Ständer zur weiteren Untersuchung kamen. Anschließend wurden die Tiere eröffnet und die Organe auf eventuell vorliegende pathologische Veränderungen untersucht. Hierbei wurden keine für die Untersuchung relevanten, von der Norm abweichenden Befunde erhoben.

3.2.3. Feuchtmassebestimmung des Femur

Im Anschluß wurden der linke Femur (F), Tibiotarsus (TT) und Tarsometatarsus (TMT), sowie der rechte F und TT der 94 Tiere präpariert und vom umgebenden Weichteilgewebe und Periost befreit.

Unmittelbar nach der Präparation erfolgte die Wägung der rechten Femurknochen mit einer OHAUS Tellerwaage PRECISION Plus TP 600. Die Anzeigegenauigkeit liegt bei 0,01 g.

Der rechte TT wurde in Formalin fixiert und als Reserve zur Klärung weiterer Fragestellungen asserviert.

3.2.4. Makroskopische Messungen

Die Knochen der linken Beckengliedmaße wurden nach der Präparation vermessen. Die Länge des linken F, TT und TMT wurde mit einem Stahllineal zwischen den am weitesten entfernten Knochenpunkten der proximalen und distalen Gelenkflächen ermittelt.

Die Bestimmung der kraniokaudalen Diaphysendurchmesser des F und TT erfolgte auf halber Knochenlänge, unter Zuhilfenahme einer Schublehre INOX mit einer Genauigkeit von 0,05 mm.

3.2.5. Mikroskopische Messungen an für knochenpathologische Veränderungen prädisponierten Regionen der Beckengliedmaße

Für die histologischen Untersuchungen wurden die unter 3.2.3. genannten präparierten Knochen der linken Beckengliedmaße der 94 Tiere weiter aufbereitet.

Jeweils

- das proximale und distale Knochenendstück des F; (188 Proben)
- das proximale und distale Knochenendstück des TT; (188 Proben)
- das proximale Knochenendstück des TMT; (94 Proben)

wurden mittels Skalpell bzw. Tischkreissäge oder Bandsäge durch einen transversal (latero-medial) geführten Längsschnitt in der Mitte des Knochens, geteilt.

Die Schnittflächen der kranialen bzw. dorsalen Knochenteilstücke wurden auf Freiheit von makroskopisch sichtbaren pathologischen Veränderungen überprüft, fotografisch dokumentiert und diese Knochenstücke über Nacht in vierprozentigem neutralem Formalin fixiert. Es folgte die elektrische Entkalkung nach RICHMANN, GELFAND und HILL (1968). Nach 24 stündiger Wässerung wurden die Knochen in ein Entkalkungsmedium bestehend aus Ameisensäure, Salzsäure und destilliertem Wasser verbracht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (zwei Ampere/ zwölf Volt) über zwei Platinelektroden kommt es zur Elektrolyse der Knochen, so dass die Ca-Ionen beschleunigt aus dem Knochen abtransportiert werden. Folglich wird die

Einwirkungsdauer der Säuren verkürzt und eine Schädigung des Gewebes möglichst gering gehalten.

Nach bis zu 72 Stunden andauernder Entkalkung (Kontrolle durch Schnittprüfung einzelner Proben) wurden die Knochen in ein anderes Gefäß verbracht, indem das Neutralisieren der Säure in fünfprozentiger wässriger Natriumsulfatlösung über 24 Stunden erfolgte. Hierauf wurden die Proben über weitere 24 Stunden fließend gewässert und anschließend in einen Einbettungsautomaten verbracht, entwässert und paraffiniert.

Folgend wurden die Proben für die Einbettung in Paraffin zugeschnitten, so dass die histologischen Schnitte von der Transversalfläche der kranialen bzw. dorsalen Knochenhälfte angefertigt werden konnten.

Von den 470 Knochenendstücken wurden jeweils vier 6 - 8 µm starke histologische Schnitte angefertigt. Die Paraffinschnittpräparate wurden mit Hämatoxylin - Eosin gefärbt.

An allen Wachstumsplatten (WP) (proximaler und distaler linker F; proximaler und distaler linker TT und proximaler TMT) wurden folgende Daten über die gesamte Wachstumsperiode histometrisch erfaßt:

Die Wachstumsplattendicke ergab sich aus der Messung der Distanz zwischen der deutlich erkennbaren proximalen Grenze der Proliferationszone bis zum metaphysären Ende der überwiegend noch zusammenhängenden hypertrophen basophilen Knorpelzellstränge der Ossifikationszone. Der Zeitpunkt des Wachstumsplattenschlusses wurde anhand des Verlustes einer annähernd durchgehenden Linie von hypertrophen Chondrozyten und damit dem Schwinden einer basophilen Grenze zur Epiphyse ermittelt.

Folgende Zonen der Wachstumsplatte wurden getrennt erfaßt:

Die Proliferationszone (PZ) von der Ruhezone (RZ) bis zur Prähypertrophenzone (PHZ), erkennbar an den dicht gepackten, kleinen, teils in Säulen angeordneten stark basophilen z.T. diaphysär halbmondförmig geöffneten Chondrozyten.

Die Stärke der hypertrophen Zone (HZ) beinhaltet die PHZ, die sich als avaskulärer Anteil mit deutlich größeren sphäroiden zytoplasmareichen und weniger dicht angeordneten Zellen darstellt, sowie die eigentliche hypertrophe Zone aus großen kugeligen zytoplasmareichen, gleichmäßig von teils mineralisierter Matrix

umgebenen Zellen, welche von metaphysären Gefäßen durchzogen wird. Die Ossifikationszone (OZ) der HZ, welche sich durch gefäßnahe Osteoblasten und daraus reifende Osteozyten, sowie diaphysär mineralisierendes Osteoid und dazwischenliegende Inseln hypertropher Knorpelzellen darstellt, wurde nicht mitgemessen.

Bei jedem transversal geschnittenem Knochenendstück wurden drei Senkrechten der WP bei 1/4, 1/2 und 3/4 der seitlichen Ausdehnung des Knochens vermessen und die Mittelwerte der WP und ihrer Zonen errechnet. Am prox. TMT, der das phylogenetische Produkt aus der Verschmelzung von Os metatarsale II-IV darstellt, wurde entsprechend den anderen WP jedes Teilstück der dreigeteilten WP einfach gemessen und die Mittelwerte aus den drei Meßwerten gebildet.

An der WP des linken proximalen Tibiotarsus wurden bei Tieren im Alter von einem Lebenstag bis zur 16. Lebenswoche zusätzliche Untersuchungen vorgenommen.

Bestimmt wurden:

- Die Anzahl der penetrierenden epiphysären Gefäße (PEV) bzw. deren Gefäßkanäle (EVC) je mm WP.
- Die Durchmesser der Gefäßkanäle der PEV.
- Die Anzahl der metaphysären Gefäße (MV) bzw. deren Gefäßkanäle (MVC) je mm WP.
- Der Abstand der proximalen metaphysären Gefäßspitzen zu den distalen Gefäßspitzen der PEV (avaskuläre Zone).

Die Bestimmung der Anzahl der EVC's erfolgte durch die Bildung des Quotienten aus der Anzahl der Gefäßkanäle dividiert durch die Breite der WP im Bereich des Übergangs der PZ in die Zone der hypertrophen Knorpelzellen.

Der Durchmesser der knorpeligen epiphysären Gefäßkanäle wurde auf halber Länge an der jeweils breitesten Ausdehnung ermittelt. Für die Bestimmung des mittleren Durchmessers wurden alle PEV – Kanäle eines Schnittes berücksichtigt.

Die Vorgehensweise zur Bestimmung der Anzahl der MVC's je mm WP erfolgte analog der der EVC's.

Der gefäßfreie Anteil der WP (avaskuläre Zone) wurde durch Messen des jeweiligen Abstandes der proximalen Gefäßspitzen der MV zu einer gedachten Linie, die die

distalen Gefäßspitzen der PEV miteinander verbindet, ermittelt. Die avaskuläre Zone ergab sich aus dem Mittelwert dieser Einzelmessungen.

Die Messungen an den histologischen Schnittpräparaten erfolgte mit Hilfe eines Bildanalysesystems der Firma LEICA CAMBRIDGE Ltd. bestehend aus einem Mikroskop (LEITZ LABORLUX S), einer Kamera (KAPPA CF 15/1) sowie einem Rechner mit der Bildanalysesoftware QUANTIMED Q 500C. Zur Messung größerer Strecken kam ein Makroskop M 420 (WILD HEERBRUGG) zur Anwendung.

Die histometrisch ermittelten Daten wurden zur Auswertung und graphischen Darstellung in ein Tabellenkalkulationsprogramm (EXCEL) überführt.

Weiterhin wurden die Chondroepiphyse, die WP und ihre Zonen sowie der embryonale Knorpelkegel (Ablösung von der WP; Zeitpunkt der Resorption) histologisch beurteilt.

3.2.6. Röntgenologische Untersuchung der Knochen der Beckengliedmaße

Von den 282 unter 3.2.3. genannten, vom Weichteilgewebe befreiten Femora, Tibiotarsi und Tarsometatarsi der linken Beckengliedmaße wurden im Anschluß an die makroskopische Vermessung Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen angefertigt. Es wurde jeweils eine anterior-posterior und eine mediolaterale Aufnahme erstellt. Folgend wurde mit einer Bandsäge aus der Mitte der Diaphyse des Femur und Tibiotarsus ein ca. 4 mm starker Knochenring herausgesägt und mit proximodistalem Strahlengang ebenfalls geröntgt.

Genutzt wurde ein Industrieröntgengerät der Firma Phillips Typ MTK 140 Be, bei dem es sich um ein geschlossenes System handelt, aus dem keine Strahlung entweichen kann. Folienlose Filme der Firma Du Pont, Cronex NDT 55, Cronar Base und Fuji, Envelopak Typ 80 kamen zur Anwendung. Dies sind Filme aus der Materialprüfung, die werkseitig in lichtundurchlässige Umschläge verpackt ohne Kassette genutzt werden können, wodurch ein minimaler Objekt – Film Abstand gegeben ist, der einen verschwindend geringen Vergrößerungseffekt und damit eine hohe Objektschärfe mit Originalabmessungen ergibt. Das Gerät arbeitet mit sehr großen Belichtungszeiten,

die aufgrund der Unbeweglichkeit der Objekte kein Problem darstellen und sehr feinzeichnende exakte Aufnahmen liefern.

An den röntgenologischen Aufnahmen wurden folgende Strukturen beurteilt bzw. vermessen:

- Der embryonale Knorpelkegel (F, TT, TMT).
- Die sekundären Ossifikationszentren (TT, TMT).
- Der Wachstumsplattenschluß (TT, TMT).
- Das Verhältnis von Markraum zur Kompaktafläche am Diaphysenquerschnitt von F und TT.

Alle untersuchten Epiphysen wurden hinsichtlich der Existenz, der Ausdehnung und des Abbaus der EK beurteilt.

Am prox. und dist. TT und prox. TMT wurden das erste Auftreten von sekundären Ossifikationszentren und markante Punkte im Verlauf der Ausdehnung dieser beurteilt.

Der röntgenologische Wachstumsplattenschluß wurde durch den Verlust der horizontal verlaufenden Aufhellungslinie und der epiphysär von ihr liegenden Verschattungsfront definiert.

Die Flächenverhältnisse des Markraums zur Kompaktafläche wurden an den Röntgenaufnahmen der Knochenringe mit dem Bildanalysesystem der Firma LEICA CAMBRIDGE Ltd., bestehend aus einer in einem Stativ fixierten Kamera (KAPPA CF 15/1) mit Makroobjektiv sowie einem Rechner mit der Bildanalysesoftware QUANTIMED Q 500C, ermittelt, indem vom Gesamtknochenquerschnitt der Markraumquerschnitt subtrahiert wurde.

3.2.7. Durchführung der Veraschung und Mineralstoffanalyse des Femurschaftes

Der unter 3.2.3. präparierte rechte Femur der 94 Tiere wurde im Tiefkühlraum, bei -20°C bis zur Veraschung, Mineralstoffbestimmung und Dichtemessung zwischengelagert.

Die in Kunststoffolie eingeschweißten asservierten rechten Femurknochen wurden aufgetaut. Mit einer Bandsäge wurden die Knochenenden (Epi- und Metaphysen) für die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte Dichtemessung abgetrennt und die verbleibenden Ringe der Diaphysenschäfte mittels Sonde und hartem Wasserstrahl vom Mark befreit. Die Knochenfragmente wurden mit Zellstoff getrocknet und anschließend in einem Stahlmörser zu einem feinem Granulat zerkleinert. Das Granulat jeder Diaphyse wurde gründlich durchmischt und danach 0,5 g der Probe mit einer Satorius Analysewaage (Genauigkeit 0,1mg) abgewogen. Aus den Einzelproben wurden Wochengruppensammelproben von jeweils 2,0 g hergestellt. Aufgrund der geringen Knochenmenge konnten aus den ersten zwei Wochengruppen nur 0,5 g bzw. 1,0 g große Sammelproben gewonnen werden.

Bis zur Trocknung im Wärmeschrank bei 105°C über vier Stunden verblieben die Proben luftdicht verpackt im Tiefkühlraum. Nach erneuter Wägung zur Feststellung der Trockensubstanzgehalte (g je kg Knochenfeuchtgewicht) wurden die Proben über 18 Stunden bei 550°C im Muffelofen verascht und zur Bestimmung des Rohaschegehaltes (g je kg Trockensubstanz) erneut gewogen.

Die Bestimmung des Kalziumgehaltes der Rohasche erfolgte atomabsorptionsspektrometrisch. Die Bestimmung des Phosphorgehaltes der Rohasche erfolgte photometrisch nach NEUMANN u. BASSLER (1993).

Hierzu wurden die Rohascheprobe mit konzentrierter Salzsäure (37%) aufgelöst und nach Zugabe von Aqua bidest 45-60 Minuten im Infrarot-Bad erhitzt. Nach Abkühlung und Wiederauffüllung mit Aqua bidest wurden die Proben durch einen Faltenfilter in Plastikflaschen filtriert.

Für die Kalziumbestimmung folgte eine Verdünnung auf den optimalen Meßbereich zwischen 2 und 6 ppm. Zur Ausschaltung von Störionen wurde den Probelösungen sowie einer Standardlösung Lanthan in einer Endkonzentration von 0,2% beigegeben. Nach Erstellung einer Eichkurve mittels Kalziumstandardlösungen konnten die Kalziumgehalte der Trockensubstanz der Wochengruppen atomabsorptionsspektrometrisch (Perkin Elmer Typ 303) gemessen werden. Die Konzentrationen werden in mg je g Trockensubstanz angegeben.

Für die Phosphorbestimmung (Vanadatmolybdatmethode) wurden die Proben mit Phosphorreagenz (Nitrovanadatmolybdat-Reagenz) versetzt. Parallel dazu wurden eine Leerwert- und eine Eichlösung mit Phosphorreagenz angesetzt. Mit dem Spectrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia) wurde die Absorption der Probenansätze bei einer Wellenlänge von 436 nm bestimmt und folgend die Phosphorkonzentration in mg je g Trockensubstanz errechnet.

3.2.8. Osteodensitometrische Untersuchung der Femurmetaphyse

Das bei der Durchführung der Veraschung nicht genutzte proximale Ende der 94 rechten Femora wurde für die Dichtemessung herangezogen. Es konnten Messungen ab der fünften Lebenswoche durchgeführt werden (68 Proben)

Es kam ein in der Humanmedizin genutztes Zwei-Spektren-Röntgenstrahlabsorptionsmessgerät der Firma LUNAR Corp., Madison, WI, USA Typ DPX-L gekoppelt mit einem Rechner zur Anwendung. Dieses Gerät arbeitet mit zwei Energiestufen von 40 keV und 70 keV.

Das Prinzip der Absorptimetrie ist die Schwächung eines Photonenstrahles beim Durchgang durch ein Objekt unabhängig von der Strahlenquelle. Bei dem Verfahren wird die zweidimensionale Flächendichte (areal density) berechnet und in $g\ je\ cm^2$ angegeben.

Die Knochen wurden auf der Untersuchungsfläche, unter welcher sich der Collimator befindet, so positioniert, dass der Strahlengang in kraniokaudaler Richtung verlief. Zur Messung ist eine Weichteilsimulation erforderlich. Hierzu wurden zwei mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte 5-Liter-Infusionsbeutel über und unter die Knochen gelegt, so dass die Objekte von jeweils 6 cm Wassersäule umgeben wurden. Gemessen wurde im Scan - Modus „Schenkelhals“.

Es folgte die manuelle Analyse, bei der Meßfelder (ROI's) am Übergang der Metaphyse zur Diaphyse des prox. Femur positioniert wurden. Diese ROI's wurden über die gesamte Knochenbreite gelegt, so dass die gesamte Kortikalis mit erfaßt wurde.

Die Meßfelder konnten in ihrer Ausdehnung der jeweiligen Knochengröße so angepaßt werden, dass immer ein prozentual zur Probe gleichgroßes Stück gemessen werden konnte. Es wurden zwei Scans je Knochenprobe ausgewertet.

3.3. Statistische Auswertung

Die Darstellung und Beschreibung der ermittelten Daten beruht auf den arithmetischen Mittelwerten der entsprechenden Wochengruppen und der zugehörigen Standardabweichungen. Diese werden vornehmlich in Form von graphischen Darstellungen wiedergegeben. Die Zulässigkeit der Verwendung des arithmetischen Mittelwertes wurde stichprobenartig bei allen ermittelten Daten des 14., 49., 77., und 105. Lebensstages überprüft. Aufgrund der geringen Abweichung bzw. der Übereinstimmung des arithmetischen Mittelwertes und des Medianwertes wird bei allen Merkmalen von einer annähernd symmetrischen Verteilung ausgegangen. Der Zweck dieser Arbeit besteht in der Beschreibung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Auf weitergehende statistische Prüfverfahren kann somit verzichtet werden.