

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Verwendete Tiere

Für die Untersuchungen wurden Hautproben von insgesamt 48 weiblichen Hühnern verschiedener Nutzungsrichtungen und Altersstufen aus Bodenhaltung verwendet, die keine erkennbaren krankhaften Hautveränderungen aufwiesen.

Es wurden je 24 Tiere der Mastrichtung (Elterntiere) und der Legerichtung gegenübergestellt. Dabei erfolgte die Einteilung in Altersstufen für beide Nutzungsrichtungen gleich und umfasste jeweils sechs Gruppen mit je vier Tieren.

Eine Übersicht zur Charakterisierung der Versuchstiere hinsichtlich Alter, Geschlecht, Herkunft und Fütterung sind den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

Tab. 5: Versuchsgruppen von Hühnern der Legerichtung (L) im Rahmen der histologischen Untersuchungen

Gruppe	Nutzungsrichtung	Alter	Geschlecht	Anzahl der Versuchst.	Herkunft	Fütterung
1	L	18. ET	weiblich	4	Lohmann braun	-
2	L	1. LT	weiblich	4	Lohmann braun	Kükenfutter
3	L	5. LW	weiblich	4	Lohmann braun	Kükenfutter
4	L	11. LW	weiblich	4	Lohmann braun	Junghennenfutter
5	L	15. LW	weiblich	4	Lohmann braun	Junghennenfutter
6	L	22. LW	weiblich	4	Lohmann braun	Legefutter I

Tab. 6: Versuchsgruppen von Hühnern der Mastrichtung (M) im Rahmen der histologischen Untersuchungen

Gruppe	Nutzungsrichtung	Alter	Geschlecht	Anzahl der Versuchst.	Herkunft	Fütterung
7	M	18. ET	weiblich	4	Lomamid	-
8	M	1. LT	weiblich	4	Lomamid	Mastkükenfutter
9	M	5. LW	weiblich	4	Lomamid	Mastkükenfutter
10	M	11. LW	weiblich	4	Lomamid	Masthennenfutter
11	M	15. LW	weiblich	4	Lomamid	Masthennenfutter
12	M	22. LW	weiblich	4	Lomamid	Masthennenfutter

3.1.2 Probenmaterial

Die Gewinnung der Hautproben erfolgte unmittelbar nach dem Töten der Tiere. An sechs topographisch-anatomisch und histomorphologisch unterschiedlichen Hautregionen, die in Tabelle 7 zusammengefasst sind, erfolgte die Entnahme einer jeweils 1 x 1 cm großen Hautstelle (Abb. 2). In den befiederten Regionen wurden zudem die Federn auf ca. 1 mm über der Hautoberfläche gekürzt.

Tab. 7: Hautregionen der Probenentnahme

Nr.	Hautregionen
1	Apterygium ventrale -Pars pectoralis- (Federrain der Brust)
2	Pterygia ventralis -Pars pectoralis- (Federflur der Brust)
3	Pterygia membri pelvici -Pars cruralis- (Federflur des Unterschenkels, erstreckt sich nach distal bis zum Intertarsalgelenk)
4	Scuta und Scutella der Podotheca (Schuppen der nicht befiederten Haut des Vogelfußes)
5	Crista carnea (Kamm als vertikale Hautduplikatur über dem Stirnbein)
6	Pulvillus metatarsalis (Sohlenballen)

Die Benennung der Hautregionen beim Huhn basiert auf den Nomina anatomica avium (CLARK, 1993).

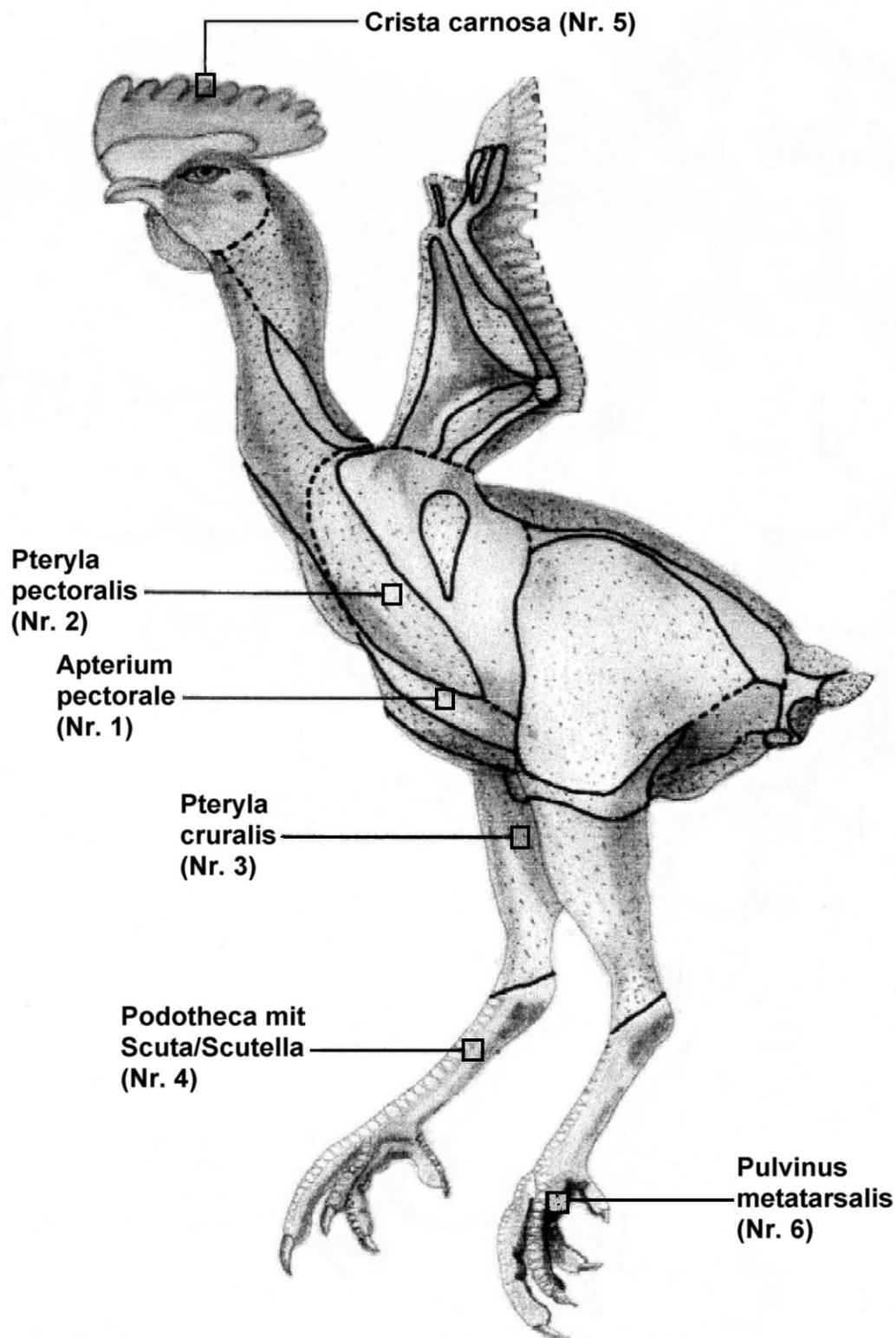


Abb. 2:

Die Hautstellen der Probenentnahme (Kästchen) in den verschiedenen Hautregionen beim Huhn, deren Nummerierung sich auf Tab. 7 bezieht (modifiziert nach LUCAS und STETTENHEIM, 1972).

3.1.3 Antikörper, Geräte und Chemikalien

3.1.3.1 Verwendete Antikörper

Auf die Eignung zur Darstellung von Hühnerhautanteilen wurden insgesamt 12 monoklonale Antikörper (sog. Zytokeratinmarker) mittels B-SA Methode getestet und ausgewertet. Sie sind in nachfolgender Tabelle 8 aufgeführt und beschrieben.

Tab. 8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft	Spezifikation	Vertrieb
AE 1	Maus, monoklonal	CK 10, 14, 16, 19	Zymed
AE 3	Maus, monoklonal	CK 1, 5, 8	Zymed
KL 1	Maus, monoklonal	CK 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 17, 18	Dianova-Immunotech, Hamburg
CAM 5.2	Maus, monoklonal	CK 8, 18	Becton Dickinson, Heidelberg
LP 34	Maus, monoklonal	CK 6, 18	Dako A/S Denmark
Ks 7.18	Maus, monoklonal	CK 7	Boehringer, Mannheim GmbH
DE-K 10	Maus, monoklonal	CK 10	Dako A/S Denmark
AE 8	Maus, monoklonal	CK 13	BioGenex, Hamburg
LL 002	Maus, monoclonal	CK 14	BioGenex, Hamburg
E 3	Maus, monoklonal	CK 17	Dako A/S Denmark
Ks 18.04	Maus, monoklonal	CK 18	Boehringer, Mannheim GmbH
Ks 19.1	Maus, monoklonal	CK 19	Boehringer, Mannheim GmbH

3.1.3.2 Geräte und Chemikalien

Die in Tabelle 9 aufgelisteten Materialien wurden für die Anfertigung histologischer Schnitte sowie deren HE- und immunhistochemischer Färbung benötigt.

Tab. 9: Materialien

Materialien	Hersteller	Bestellnummer
Objektträger	R. Langenbrinck	100236
Deckgläschen	-	-
Sequenza	Shandon	-
Cover-Plates	Shandon	72110013
Hämatoxilin	Chroma	5B535
Eosin	Merck	15935
Silane	Sigma	A 3648
Äthanol	-	-
Xylol	Merck	108685
Trizma-Base	Sigma	T 1508
Trizma-HCl	Sigma	T 3253
NaCl	Merck	6404
Aqua destillata	im Institut hergestellt	-
Link-Antikörper	BioGenex (Testkit)	QA 900599
Label-Antikörper	BioGenex (Testkit)	QA 900599
Protease	Sigma	P6911
Natrium-Nitrit	Sigma	S 2252
N, N-Dimethylformamid	Sigma	D 4254
Levamisol	Sigma	L 9756
Naphthol AS-BI-phosphat	Sigma	N2250-5G
Neufuchsin	Serva	30293
Natrium-Jodat	Merck	6525
Aluminium-Kalium-Sulfat	Merck	1047
Chloralhydrat	Merck	2425
Citronensäure DAB 6	Merck	2440500
Corbit-Balsam	Hecht	-

3.1.4 Methoden

3.1.4.1 Gewebeaufbereitung und histologische Untersuchung

Die entnommenen Hautproben wurden nach ihrer Durchfixierung mit neutral gepuffertem Formalin nach LILLIE (1954) entwässert und schonend über 24 Stunden in Paraffin eingebettet.

Für die histologische Untersuchung sind von jedem Paraffinblöckchen zwei 3 µm dicke Schnitte angefertigt worden, die, auf unbehandelte Glasobjektträger gebracht, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) eingefärbt wurden.

Insgesamt wurden 576 HE-Schnitte lichtmikroskopisch durchgemustert, um eine Übersicht der histomorphologischen Gegebenheiten der Haut, insbesondere der Epidermis, zu erhalten.

3.1.4.2 Immunhistochemische Voruntersuchungen

In Vorversuchen wurde die grundsätzliche Anwendbarkeit der Zytokeratinmarker mittels B-SA Methode getestet. Dafür wurden vom paraffinierten Probenmaterial der Tiere der Mastrichtung der 5. Lebenswoche 3 µm dicke Schnitte von allen sechs Hautregionen angefertigt (insgesamt 12 Schnitte), auf Silan-beschichtete Objektträger gebracht und eine Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

Insgesamt standen demnach für die Testung der 12 monoklonalen Antikörper 288 Hautschnitte zur Verfügung, wobei mit einem Antikörper jeweils 24 Hautschnitte behandelt wurden.

3.1.4.2.1 Antikörper und Vorbehandlungen

Um Aussagen über Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper zwischen Säuger und Huhn machen zu können, wurden 12 beim Säuger bereits etablierte Zytokeratinmarker am Hautmaterial der Hühner in verschiedenen Verdünnungsstufen (Tab. 10) geprüft.

Tab. 10: In den Voruntersuchungen verwendete Antikörper mit den getesteten Verdünnungstufen

Antikörper	Verdünnung
AE 1	1:50, 1:100, 1:500
AE 3	1:50, 1:100, 1:500
KL 1	1:50, 1:100
CAM 5.2	ohne
LP 34	1:50, 1:100, 1:500
Ks 7.18	1:20, 1:50
DE-K 10	1:50, 1:100
AE 8	1:10, 1:20
LL 002	1:10, 1:20
E 3	1:10, 1:20
Ks 18.04	1:10, 1:20
Ks 19.1	1:10, 1:20

Des Weiteren wurden zur Optimierung des Färbeverfahrens für jeden mAK jeweils zwei verschiedene Vorverdauungsverfahren geprüft:

- a) Vorverdauung der Schnitte in Protease für 15 min bei 37°C,
- b) Vorverdauung der Schnitte in Citratpuffer, 2 x 5 min in der Mikrowelle (MW), Stufe 2, anschließend Abkühlung der Schnitte für 15 min.

Außerdem wurden zwei Pufferarten getestet: phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) und Trisgepufferte Kochsalzlösung (TBS), die jeweils als Spüllösung und als Lösung zur Verdünnung der Antikörper bei allen Schritten der Immunfärbung Verwendung fanden.

Die Herstellung der einzelnen Lösungen sind unter 3.1.4.2.3 beschrieben.

3.1.4.2.2 Immunhistochemische Färbung

Als immunhistochemische Methode wurde aufgrund der Sensitivität das Biotin-Streptavidin (B-SA) Super Sensitive Nachweissystem eingesetzt.

Die B-SA-Reagenzien wurden dem B-SA-Kit der Firma BioGenex, Hamburg entnommen.

3.1.4.2.3 Herstellung der immunhistochemisch benötigten Reagenzien

1.) Herstellung Haftsilane- (APES = 3-Aminopropyltriethoxysilan) beschichteter Objektträger

Die Objektträger werden für 10 Sekunden in ein Gemisch aus 5 ml APES und 250 ml 99%-igem Äthanol gebracht. Im Anschluss werden sie je zweimal für 10 Sekunden in Äthanol getaucht und in A. dest. gespült. Die Trocknung erfolgt bei 37°C im Brutschrank über Nacht.

2.) Herstellung der Trisgepufferten Kochsalzlösung (TBS = Tris Buffered Saline)

Gemischt werden: Trizma-Base 4,5 g, Trizma HCl 33 g, NaCl 43,9 g, anschließend mit A. dest. auf 5000 ml auffüllen. Der pH-Wert wird auf 7,6 eingestellt.

3.) Herstellung der phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS = Phosphate Buffered Saline)

Gemischt werden: Dinatriumhydrogenphosphat 7,4 g, Kaliumhydrogenphosphat 2,15 g, NaCl 36,0 g, anschließend mit A. dest. auf 5000 ml auffüllen. Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt.

4.) Herstellung des 0,01 M Citratpuffers

Gemischt werden: Zitronensäure Monohydrat 2,1 g, A. dest. 900 ml, mit 13 ml 2 N NaOH auf pH 6,0 einstellen, anschließend mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.

5.) Herstellung der Protease-Vorverdauungslösung

Gemischt werden Protease 10,0 mg und TBS-Puffer 10,0 ml.

6.) Herstellung des 0,05 M Tris-HCl-Puffers

Gemischt werden Trizma-Base 6,1 g, A. dest. 900 ml, mit 1 n HCl auf pH 8,7 einstellen, anschließend mit A. dest auf 1000 ml auffüllen.

7.) Herstellung Neufuchsin-Substrat

Lösung A: 5%iges Neufuchsin (in 2 N HCl) 0,2 ml und 4%iges Natriumnitrit 0,5 ml, 0,05 M Tris-HCl-Puffer 100 ml und 1 M Levamisol 100 µl hinzufügen.

Lösung B: Naphthol AS-BI-phosphat 50 mg in N, N-Dimethylformamid 0,6 ml lösen.
Lösung A und B mischen und filtern.

8.) Herstellung der Hämalaunlösung, sauer, nach P. MAYER

Gemischt werden Hämatoxilin 3,0 g, Na-jodat 0,2 g, Kaliumaluminiumsulfat 50,0 g Chloralhydrat 50,0 g, Citronensäure DAB 6 1,0 g, anschließend mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.

3.1.4.2.4 Färbeprotokoll

Dem angewendeten Färbeprotokoll lag die Gebrauchsanleitung für die B-SA Methode als Super Sensitivem Nachweissystem zugrunde, die in den Voruntersuchungen in einigen Teilen, zur Optimierung der Färbung von Hühnerhautanteilen, modifiziert werden musste (hier kursiv gedruckt).

1.) Entparaffinierung der Schnitte wie folgt:

30 min in Xylol, 2-3 min absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 50%).

2.) Spülung der Schnitte für 1 x 5 min in *TBS*-Puffer.

3.) Vorbehandlung der Schnitte je nach mAK mit Protease *für 15 min bei 37°C* oder mit *Citratpuffer in Mikrowelle* 5 x 2 min bei Stufe 2 (°C).

Abkühlung der Schnitte für 15 min nach Mikrowelle.

4.) Spülung der Schnitte für 1 x 5 min in *TBS*-Puffer.

- 5.) Auflegung der Schnitte auf *Cover-Plates*® und Einstellung in die Färbestation *Sequenza*TM.
- 6.) Nochmalige Spülung der Schnitte für 1 x 10 min mit *TBS*-Puffer.
- 7.) Inkubation der Schnitte mit dem jeweiligen primären mAK in spezifischer Verdünnung für 30 min oder 1 *Stunde* bei Raumtemperatur mit je 100 µl pro Schnitt. Die Negativkontrolle wird mit 100 µl *TBS*-Puffer inkubiert.
- 8.) Spülung der Schnitte für 3 x 5 min mit *TBS*-Puffer.
- 9.) Inkubation der Schnitte mit dem Link-Antikörper des BS-A Kits für 20 min bei Raumtemperatur mit jeweils einem Tropfen pro Objektträger.
- 10.) Spülung der Schnitte für 3 x 5 min mit *TBS*-Puffer.
- 11.) Inkubation der Schnitte mit dem Label-Antikörper des BS-A Kits für 20 min bei Raumtemperatur mit jeweils einem Tropfen pro Objektträger.
- 12.) Spülung der Schnitte für 2 x 5 min mit *TBS*-Puffer.
- 13.) Entfernung der Schnitte aus dem *Sequenza*TM und von den *Cover-Plates*®.
- 14.) Nochmalige Spülung der Schnitte für 1 x 5 min in *TBS*-Puffer.
- 15.) Inkubation der Schnitte in Neufuchsin für 20 min.
- 16.) Spülung der Schnitte für 1 x 5min in *TBS*-Puffer.
- 17.) Gegenfärbung der Schnitte in *Hämalaun* für 3 bis 6 min.
- 18.) Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 15 min.
- 19.) Entwässern der Schnitte in aufsteigender Alkohohlreihe (50%, 70%, 90%, 100%) und Xylol für jeweils 2 bis 3 min.
- 20.) Eindecken mit Corbit-Balsam und einem Deckgläschen.

3.1.4.3 Immunhistochemische Hauptuntersuchungen

Nach Erarbeitung des Färbeprotokolls wurden von allen 288 paraffinierten Hautproben vier Serienschnitte von ca. 3 µm Dicke angefertigt, auf Silanbeschichtete Objektträger gebracht und eine Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

Die in den Voruntersuchungen positiv getesteten mAK, AE1, AE3, LP34 und LL002, wurden an je einem Schnitt angewendet, so dass insgesamt 288 Hautschnitte pro Antikörper zu Verfügung standen. Das durch die Voruntersuchungen modifizierte B-SA Färbeprotokoll diente als Grundlage.

3.1.4.4 Kontrollen für die Immunhistochemie

3.1.4.4.1 Positive Kontrolle

In den Vor- und Hauptuntersuchungen wurde bei jedem Färbevorgang ein Hautschnitt mitgeführt, der mit einem positiven Färbeergebnis einen methodischen Fehler im Färbeverfahren ausschließt. In den Voruntersuchungen wurden für die jeweiligen Antikörper spezifische Gewebeschnitte (Haut, Leber) vom Hund verwendet, während in den Hauptuntersuchungen allein Hundehaut als Positivkontrolle diente.

3.1.4.4.2 Negative Kontrolle

Als Negativkontrolle diente bei jedem Färbevorgang ein Hühnerhautschnitt, der statt mit dem primären mAK mit TBS-Puffer inkubiert wird. Bei Reaktionsspezifität der primären mAK (positive Ergebnisse) darf die entsprechende Negativkontrolle in keinem Fall eine positive Färbung aufweisen.

3.1.4.6 Auswertungsverfahren

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der immunhistochemisch behandelten Schnitte wurden die Schnitte einerseits nach den Farbqualitäten der spezifischen Immunreaktionen beurteilt, andererseits nach der Lokalisation der Färbung in den Schichten der Epidermis bewertet. Unter dem Oberbegriff Farbqualitäten wurden dabei die Parameter Farbintensität und Farbregeelmäßigkeit zusammengefasst.

1. Farbqualitäten (Farbintensität und Farbreelmäßigkeit)

In einer gemeinsamen Skala wurden Farbintensität und Farbreelmäßigkeit als Farbqualitäten wie folgt zusammengeführt:

Positive Färbeergebnisse wurden mit einem Pluszeichen gekennzeichnet, wobei die Einordnung nach Farbintensität auf einer Farbskala von (+) bis (+³) bzw. + bis +³ erfolgte. Die Bezeichnung 0 wurde als negatives Ergebnis gewertet.

Die mit Klammern dargestellten positiven Färbeergebnisse wiesen auf eine unregelmäßige Anfärbung der Epidermis hin, d.h., nur punktuell konnte in der Epidermis ein entsprechendes Resultat erzielt werden. Dagegen wiesen die positiven Resultate ohne Einklammerung die Regelmäßigkeit einer Anfärbung in der Epidermis aus.

Wurden zwei Färbeergebnisse mit einem Schrägstrich versehen, kennzeichnete dies eine deutliche Farbabstufung innerhalb einer Epidermisschicht. Das links des Schrägstriches ausgewiesene Ergebnis gibt die schwächste, das rechts des Schrägstriches stehende Resultat die kräftigste Stufe auf der Farbskala an, die in dieser Schicht beobachtet wurde.

Übersichtsskala der Farbqualitäten

0	keine Anfärbung
(+)	schwache, unregelmäßige Anfärbung (Epidermis punktuell blassrosa)
(+ ²)	mäßige, unregelmäßige Anfärbung (Epidermis punktuell rosarot)
(+ ³)	kräftige, unregelmäßige Anfärbung (Epidermis punktuell leuchtend rot)
+	schwache und gleichmäßige Anfärbung (Epidermis regelmäßig blassrosa)
+ ²	mittelstarke und gleichmäßige Anfärbung (Epidermis regelmäßig rosarot)
+ ³	kräftige und gleichmäßige Anfärbung (Epidermis regelmäßig leuchtend rot)
/	zeigt den Wechsel der Farbintensität in einer Epidermisschicht an

2. Lokalisation

Die Bewertung der Lokalisation der Färbungen in der Epidermis erfolgte in Analogie zu den histomorphologischen Gegebenheiten der einzelnen Hautregionen.

In der geschichteten Epidermis der befiederten und unbefiederten Areale wurden zum einen die basalen und suprabasalen Zelllagen des Stratum germinativum unterschieden. Daneben fanden Wechsel der Farbtintensität innerhalb der einzelnen Zelllagen besondere Beachtung und entsprechende Beschreibung. Zum anderen wurden die Farbreaktionen in den Zellreihen der Hornschicht gesondert aufgeführt. Außerdem wurden in der befiederten Epidermis die epidermalen Anteile der Federfollikel extra erfasst. Entsprechend erfolgte die Betrachtung der Epidermis nach einem einheitlichen Raster, das sich in der Zusammenfassung so darstellt:

basal	Die Zellreihen des Stratum basale wurden erfasst.
suprabasal	Die Zellreihen des Stratum intermedium und Stratum transitivum wurden erfasst.
Horn	Die Zellreihen des Stratum corneum wurden erfasst.
Federfollikel	Die epidermalen Anteile des Federfollikels wurden erfasst.