

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen wurden Krallen der Vorder- und Hintergliedmaßen von 22 Katzenfeten mit einer Scheitelsteißlänge (SSL) von 40 mm bis 160 mm und 6 Katzenwelpen mit einem Alter von bis zu 22 Tagen verwendet. Das Geschlecht wurde nicht berücksichtigt. Alle Tiere gehörten der Rasse Europäisch-Kurzhaar an.

Die Feten stammen zum Teil aus dem Fundus des embryologischen Laboratoriums (Professor Donat) des Institutes für Veterinäranatomie der FU Berlin und zum Teil aus Tierarztpraxen, wo sie im Rahmen von Katzenkastrationen anfielen. Die Katzenwelpen stammen aus der Katzenzucht des Institutes für Veterinäranatomie der FU Berlin.

Die Scheitelsteißlänge wurde als Abstand zwischen einer Verbindungslinie der temporalen Augenwinkel und der Schwanzwurzel gemessen. Sie steht in Abhängigkeit zur Trächtigkeitsdauer, was in Form von Wachstumskurven in der Literatur (EVANS und SACK, 1973) dargestellt ist. Die Literatur bezieht sich dabei auf Mittelwerte. Anhand dieser Wachstumskurven wurde das Stadium der Trächtigkeit ermittelt und in Tabelle 1 wiedergegeben. Dabei ist die Altersbestimmung am Ende der Trächtigkeit problematisch, da die SSL der Katzenfeten zu diesem Zeitpunkt stark von der Wurfgröße abhängig ist (ZIETZSCHMANN und KRÖLLING, 1955).

Tabelle 1: Überblick über die verwendeten 22 Katzenfeten, nach Scheitelsteißlänge (SSL) in Millimeter (mm) geordnet.

Präparat-Nr	SSL (mm)	Trächtigkeitsdauer (d)
1	40	33
2	55	37
3	60	38
4	75	42
5	81	43
6	88	45
7	92	47

Präparat-Nr	SSL (mm)	Trächtigkeitsdauer (d)
8	95	47
9	100	48
10	104	49
11	109	51
12	114	52
13	117	52
14	121	54
15	125	55
16	130	56
17	134	58
18	140	60
19	145	61
20	150	62
21	155	(63)
22	160	(66)

Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Katzenwelpen, nach Alter in Tagen (d) geordnet.

Präparat-Nr	Alter (d)
1	0 (Neugeboren)
2	3
3	7
4	10
5	21
6	22

2. Methoden

2.1 Methoden der mesoskopischen Untersuchungen

Ganze oder halbe, formalinfixierte Krallen wurden mit einer Präparierlupe (Zeiss AG, Oberkochen) mesoskopisch untersucht und mittels Tessovar[®] (Zeiss AG, Oberkochen) fotografiert.

2.2 Methoden der lichtmikroskopischen Untersuchungen

Die Krallen der älteren fetalen und geborenen Stadien wurden im Zehengrundgelenk oder -mittelgelenk abgesetzt und in 4 %igem Formaldehyd (ROMEIS, 1989) fixiert. Bei den jüngeren Stadien wurde aufgrund der geringen Größe der komplette Vorder- bzw. Hinterfuß abgetrennt. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate in Paraffin (Paraplast[®]) eingebettet. Von den eingebetteten Krallen der Vorder- und Hintergliedmaßen wurden jeweils Schnittserien in Sagittal- und Transversalrichtung auf einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) angefertigt. Die Schnittdicke betrug 7 µm. Vor der Färbung wurden die Schnitte mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in Aqua dest. verbracht. Nach durchgeführter Färbung wurden sie über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in Xylol geklärt und mit Eukitt eingedeckt.

Folgende Färbemethoden wurden angewandt:

- Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H/E) (ROMEIS, 1989; S. 235 f.)

Mit Hämatoxylin nach MEYER (1920) (ROMEIS, 1989; S. 215) werden basophile Strukturen dunkelblau dargestellt. Dies sind Nukleinsäuren des Zellkerns, ribosomale Nukleinsäuren des Zytoplasmas und die, für das Stratum granulosum charakteristischen, keratinfilamentassoziierten Proteine der Keratohyalin granula. Die mit Eosin durchgeführte Gegenfärbung kennzeichnet azidophile Strukturen des Zytoplasmas.

- Karminfärbung nach BEST (1906) (ROMEIS, 1989; S. 211 f.)

Bei dieser Färbung wird Glykogen leuchtend rot dargestellt.

- Feulgen-Reaktion (ROMEIS, 1989; S. 352 f.)

Mit dieser spezifischen histochemischen Färbung wird selektiv DNS nachgewiesen, die sich tief purpurrot färbt. Mitosen im Gewebe sind somit darstellbar. Die Schnittpräparate wurden mit 1% Lichtgrün gegengefärbt.

- Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) nach McMANUS (ROMEIS, 1989; S. 393 f.)

Diese histochemische Färbung erfaßt Glykogen, Glykoproteine und - lipide. Durch eine Inkubation mit 1%iger Diastase zwischen Entparaffinierung und PAS-Färbung wird das Glykogen herausgelöst, so daß nur Glykoproteine und -lipide angefärbt werden. PAS-positive Substanzen stellen sich rosa bis violett dar.

- Trichromfärbung nach Goldner (1938) (ROMEIS, 1989; S. 499 f.)

Die Trichromfärbung ermöglicht eine Differenzierung von Epithel und Bindegewebe. Zellkerne beider Gewebe färben sich blauschwarz, Epithel- und Hornzellen färben sich von blaurot über rot bis gelborange, die kollagenen Fasern des Bindegewebes stellen sich grün dar.

- Silberimprägnation nach Gomori (1937) (ROMEIS, 1989; S. 510 f.)

Durch die Silberimprägnation werden retikuläre und kollagene Fasern in der Grundsubstanz des Bindegewebes und der Basalmembran sichtbar gemacht. Retikuläre Fasern werden tief-schwarz, kollagene Fasern braunschwarz dargestellt.

- Rhodamin B-Färbung (LIISBERG, 1968)

Diese histochemische Färbung ist für Keratine spezifisch. Sie stellen sich blaßrosa bis violett dar.

- Phloxin - Tartrazin (SMITH u. BRUTON, 1979)

Diese ebenfalls für Keratine spezifische Färbung stellt sie von blaßrosa über kräftig rot bis violett dar. Anderes Gewebe färbt sich gelb an.

- Darstellung von Sulfhydrylgruppen und Disulfidbrücken (BARNETT u. SELIGMANN, 1952a und b, 1954)⁷

Dihydroxy-Dinaphthyl-Disulfid (DDD) bindet an freie Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen), was mit dem Farbstoff Fast-Blue B dargestellt werden kann. Mit einem Ansteigen der Konzentration der SH-Gruppen ändert sich der Farbniederschlag von rosa über rot und violett zu blau. Durch eine Blockierung der SH-Gruppen mit N-Ethylmaleinimid und eine anschließende Reduktion der Disulfidbrücken (SS-Gruppen) mit Natriumthioglykolat zu SH-Gruppen lassen

⁷ Im weiteren Text wird diese Darstellungsmethode als DDD-Reaktion bezeichnet.

sich auch die SS-Gruppen darstellen. Nach einer Blockierung der SH-Gruppen ohne anschließende Reduktion der SS-Gruppen bleiben die Kontrollschnitte farblos.

Tabelle 3: Bezeichnung der Färbung und der daraus abgeleiteten Reaktionsintensität und Konzentration beim SH-/SS-Gruppennachweis (in Anlehnung an KORTE, 1987; MÜLLING, 1993 und BRAGULLA, 1996)

Färbung	Reaktionsintensität	Konzentration der SH-, bzw. SS-Gruppen
farblos	keine Reaktion	keine enthalten
rosa	schwach positiv	geringste Konzentration
rosarot	schwach bis mittelgradig positiv	geringe Konzentration
dunkelrot	mittelgradig positiv	geringe bis mittlere Konzentration
rotviolett	mittelgradig bis stark positiv	mittlere Konzentration
violett	stark positiv	mittlere bis hohe Konzentration
blauviolett	stark bis sehr stark positiv	hohe Konzentration
blau	sehr stark positiv	höchste Konzentration

- Immunhistochemische Keratindarstellung in der Krallenepidermis

Der Keratinnachweis wurde an formaldehydfixierten, in Paraffin eingebetteten, Präparaten geführt. Dabei wurde nach der Vorgehensweise von BRAGULLA (1996) verfahren. Es kamen die Anti-Zytokeratine AE 1 und AE3 von Boehringer zur Anwendung. AE1 weist die Zytokeratine (CK) 1 und 5 mit einem Molekulargewicht von 65-67 kDa bzw. 58 kDa nach. Sie haben ihren isoelektrischen Punkt im basischen Bereich. AE 3 weist die Zytokeratine 10 und 14 mit einem Molekulargewicht von 56,5 kDa bzw. 50 kDa nach, deren isoelektrischer Punkt im sauren Bereich liegt. Die Antikörper richten sich gegen Zytokeratine, die in der Haut des Menschen oder im ektodermalen Epithel von menschlichen Feten nachgewiesen sind. CK 1 kommt in lebenden Epidermiszellen oberhalb des Stratum basale, CK 5 im Stratum basale und den unteren Schichten des Stratum spinosum der Epidermis vor. CK 10 hat die gleiche Verteilung wie CK 1, CK 14 kommt nur im Stratum basale der Epidermis vor.

Tabelle 4: Bezeichnung der Färbung und der daraus abgeleiteten Reaktionsintensität, bzw. des Gehaltes an Zytokeratinen mittels des immunhistochemischen Keratinnachweis (in Anlehnung an Bragulla, 1996).

Farbniederschlag	Reaktionsintensität	Gehalt an spezifischen Keratinen
kein	negativ (-)	Keratine nicht synthetisiert oder nicht darstellbar
hellbraun	schwach positiv (+/-)	in niedriger Konzentration enthalten
mittelbraun	positiv (+)	in mittlerer Konzentration enthalten
dunkelbraun	stark positiv (++)	Keratine in hoher Konzentration enthalten

2.3 Methoden der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen

Zur Probenentnahme wurden für die ultrastrukturelle Untersuchung bei älteren Feten Krallen je nach Größe in zwei bis drei Teile quer durchtrennt. Aus proximalen und distalen Querschnitten wurden verschiedene Blöckchen, deren Form durch die Krallenform bestimmt war, herausgeschnitten. Dabei wurden alle Krallensegmente berücksichtigt. Bei jüngeren Feten wurde aufgrund der geringen Größe die gesamte Kralle eingebettet und im eingebetteten Zustand mit einer Rasierklinge zurechtgetrimmt. Die Proben wurden in 2,5 %ige phosphatgepufferte Glutaraldehydlösung 24 Stunden immersionsfixiert. Nach Spülung mit Phosphatpuffer wurde mit 1 %iger Osmiumtetroxidlösung 4 Stunden nachfixiert. Alternativ wurden zur Darstellung der phosphorlipidhaltigen Membransysteme Proben direkt in 1 %iger Osmiumtetroxydlösung fixiert. Nach einer Blockkontrastierung in 5 %igem Uranylacetat wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend in Epon eingebettet. An einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) wurden 1-2 µm dicke Semidünnschnitte mit einem Glasmesser und 60-80 nm dicke Ultradünnschnitte mit einem Diamantmesser angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau oder Methylenblau und Azur (ROMEIS, 1989) gefärbt und zur lichtmikroskopisch vorgenommenen Auswahl der Ultradünnschnittbezirke herangezogen. Die Ultradünnschnitte wurden auf befilmte Kupfernetze aufgefangen und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert.

Die Auswertung dieser Schnitte und fotografische Dokumentation der Befunde erfolgt an einem Transmissionselektronenmikroskop des Typs EM 10 der ZEISS AG.