

17

RAT FÜR GEGENSEITIGE WIRTSCHAFTSHILFE
STÄNDIGE KOMMISSION LANDWIRTSCHAFT

K O O R D I N I E R U N G S Z E N T R U M

zum
Problem

"Erarbeitung biologischer Grundlagen der industriemäßigen
Tierproduktion"

E m p f e h l u n g
für die Forschung

"Anwendung histologischer und histochemischer Methoden zur
Untersuchung des Muskelgewebes in der Tierzuchtforschung"

Erarbeitet im Rahmen der Unteraufgabe 3.3.2.

"Erarbeitung von Methoden zur direkten und
indirekten Bestimmung der geweblichen Beschaffen-
heit am Schlachtkörper und am lebenden Tier"

Bestätigt durch den Rat der Bevollmächtigten zum Problem
auf der 16. Sitzung im Mai 1987 in Dubrovica

Dummerstorf, im Mai 1987

Die Empfehlung

"Anwendung histologischer und histochemischer Methoden
zur Untersuchung des Muskelgewebes in der Tierzucht-
forschung"

wurde erarbeitet unter Federführung von

Prof. Dr. sc. K. E n d e r	Forschungszentrum für Tierproduktion (FZT) Dummerstorf-Rostock	DDR
----------------------------	--	-----

wissenschaftliche Bearbeiter:

Dr. I. Fiedler	FZT Dummerstorf-Rostock	DDR
Dr. Ch. Rehfeldt	FZT Dummerstorf-Rostock	DDR
Dr. J. Wegner	FZT Dummerstorf-Rostock	DDR

Unter Mitwirkung von:

Prof. Dr. A. Pinkas Doz. P. Marinova	Forschungsinstitut für Tierproduktion Kostinbrod	VRB
Prof. Dr. J. Kresan	Landwirtschaftliche Hochschule	CSSR
Doz. Dr. V. Uhrin	Forschungsinstitut für Tierproduktion Nitra	CSSR
Doz. Dr. D. Klosowska Dr. B. Klosowski	Institut für Fleisch- und Fettindustrie Warschau, Abt. Fleisch- forschung, Bydgoszcz	VRP

1. Kurzcharakteristik der Empfehlung

Die Empfehlung beinhaltet eine Zusammenstellung und Bewertung von Methoden zur histologischen und histochemischen Untersuchung des Muskelgewebes von landwirtschaftlichen Nutztieren und Modelltieren.

Es werden Empfehlungen gegeben zur

- Probenentnahme im Schlachthaus, Labor und in Produktionsanlagen
- Herstellung histologischer und histochemischer Präparate
- quantitativ-mikroskopischen Auswertung

Von den RGW-Ländern (DDR, VRB, VRP, CSSR) wurden zu diesen Schwerpunkten Beiträge geleistet. Die Empfehlung erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit hinsichtlich aller Möglichkeiten der histologischen und histochemischen Untersuchung von Muskelgewebe. Sie bezieht sich insbesondere auf die methodische Lösung der speziellen Probleme der Muskel- und Fleischuntersuchung in der Tierproduktion.

2. Begründung für die Erarbeitung der Empfehlung

Die gesellschaftlichen Anforderungen an die Tierproduktionsforschung sind auf eine ständige Erhöhung der Fleischproduktion mit Rindern, Schweinen, Schafen und Geflügel gerichtet. Dabei hat die Tierzüchtung sowohl zur Erhöhung des Umfangs der Produktion als auch zu deren effektiverer Gestaltung einen wichtigen Beitrag zu leisten. Voraussetzung dafür ist die Erhöhung der Produktivität der Tierbestände, d.h. unter anderem die Erhöhung der Fleischleistung jedes Tieres. Die Realisierung dieser Zielstellung ist heute ohne die Erarbeitung biologischer Grundlagenkenntnisse nicht mehr denkbar. In diesen Komplex ist die mikroskopische Untersuchung des Muskelgewebes sinnvoll eingeordnet. Für die Ausprägung von Fleischansatz, Fleischbeschaffenheit und für die Reaktionen des lebenden Tieres auf Streßbelastungen sind mikrostrukturelle Merkmale der Muskulatur von kausaler Bedeutung. Muskeluntersuchungen zeigen die funktionelle und strukturelle Heterogenität der Muskeln auf.

Sie erlauben, den metabolischen Muskelfaser- und Muskeltyp zu bestimmen und auf zellulärer Ebene die strukturellen und funktionellen Veränderungen mit Fleischansatz und Fleischqualität in Beziehung zu bringen.

3. Anwendungsbereich

Untersuchungslabore der Muskel- und Fleischforschung im Bereich der Land- und Nahrungsgüterwirtschaft sowie der Universitäten, Hoch- und Fachschulen

Inhaltsverzeichnis :	Seite
1.	Kurzcharakteristik der Empfehlung 3
2.	Begründung für die Erarbeitung 3
3.	Anwendungsbereich 4
4.	Detaillierte Beschreibung 5
4.1.	Gliederung 5
4.2.	Methoden der Muskelprobenentnahme 6
4.2.1.	Schlachtkörperproben 6
4.2.2.	Biopsieproben 6
4.2.3.	Einfrieren, Transport und Lagerung 8
4.3.	Empfehlung für die Anwendung histo- logischer und histochemischer Methoden für die Untersuchung von Muskelgewebe 9
4.3.1.	Allgemeine Anwendungsaspekte 9
4.3.2.	Detaillierte Beschreibung der Prozeduren 14
4.3.2.1.	Schnittherstellung 14
4.3.2.2.	Histologische Färbungen 14
4.3.2.2.1.	Hämalaun-Eosin-Färbung 14
4.3.2.2.2.	Chromalaun-Carmin-Eosin-Färbung 15
4.3.2.2.3.	Bindegewebsfärbungen 15
4.3.2.3.	Histochemische Nachweismethoden 20
4.3.2.3.1.	Lipide 20
4.3.2.3.2.	Glykogenfärbung 20
4.3.2.3.3.	NADH-Tetrazoliumreduktase 21
4.3.2.3.4.	Sukzinatdehydrogenase 22
4.3.2.3.5.	Myoglobin-Peroxidase 22
4.3.2.3.6.	Myofibrilläre ATPase 23
4.4.	Quantitativ-mikroskopische Auswertung 30
5.	Bedingungen für die Wirksamkeit der Empfehlung 31
6.	Literaturverzeichnis 32

4.2. Methoden der Muskelprobenentnahme

4.2.1. Schlachtkörperproben

Diese traditionelle Art der Probenentnahme wird seit langem in allen Laboratorien der Fleischforschung angewendet. Aus dem zu untersuchenden Muskel wird nach der Tötung des Tieres unter Beachtung des Faserverlaufs ein Gewebestück herausgeschnitten und für die Präparation vorbereitet (M. longissimus dorsi: in Höhe der 13./14. Rippe; M. semitendinosus: in Höhe des Muskelbauches). Der Zeitpunkt der Entnahme richtet sich nach der Zielstellung des Versuches und den Bedingungen im Schlachthaus.

Es werden folgende Zeitpunkte der Probenentnahme praktiziert: 5 Min., 20 Min., 45 Min., 60 Min., 24 Std. p.m.

Eine allgemeingültige Empfehlung zum bestmöglichen Zeitpunkt kann nicht gegeben werden. Es ist jedoch darauf zu achten, daß eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nur bei Verwendung desselben Zeitpunktes gegeben ist.

Die Größe der zu untersuchenden Schlachtkörperprobe wird generell mit 10 x 5 x 5 mm angegeben. Wegen des inhomogenen Aufbaus des Muskels ist die Entnahmestelle ebenfalls gleichzuhalten. Es wird die Mitte des Muskelquerschnitts bevorzugt.

Für die Untersuchung von kleineren Modelltieren (z.B. Labormäuse) wird empfohlen, die vollständigen Muskeln bzw. Muskelgruppen zu entnehmen, da diese meist mit dem Ziel durchgeführt werden, Aussagen über den gesamten Muskel zu treffen.

4.2.2. Biopsieproben

Die Probenentnahme mit Hilfe der Biopsietechnik gestattet es, Muskelgewebe vom lebenden Tier im Produktionsbetrieb, vor oder nach dem Transport und im Schlachthaus zu gewinnen. Sie ist eine entscheidende Voraussetzung für histologisch-histochemische Untersuchungen am lebenden Tier und kann für eine breite Anwendung empfohlen werden (LAHUCKY u.a. 1980, HENNEBACH u.a. 1983, WEGNER und SCHÖBERLEIN 1984, WEGNER und SCHÖBERLEIN 1986).

Mit dem Schußbiopsiegerät können in Abhängigkeit von der Tierart, dem Alter des Tieres und dem zu bioptierenden Muskel mit einem Schuß bis zu 6 Muskelproben der Größe 5 x 5 mm für histologische und histochemische Untersuchungen gewonnen werden. Sollte diese Menge nicht ausreichend sein, ist es auch möglich, mehrere Schußbiopsien am selben Tier vorzunehmen.

Die Vorteile der Schußbiopsie lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die histologisch-histochemische Struktur des Muskelgewebes ist in der Schußbiopsieprobe sehr gut erhalten.
2. Es ist keine Fixierung der Tiere, keine Narkose oder Lokalanästhesie notwendig und damit keine Beeinflussung des Gewebestoffwechsels gegeben.
3. Die Schußbiopsie stellt eine minimale Belastung des lebenden Tieres dar. Obwohl die Wunde nicht zugenäht wird, ist eine sehr gute Wundheilung auch bei mehrmaliger Biopsie des gleichen Muskels zu beobachten. Eine Beeinflussung der Futteraufnahme und der Masttagszunahme ist nicht vorhanden.
4. Die äußerst schnelle Probenentnahme ermöglicht eine sehr hohe Arbeitsproduktivität, etwa 10 Tiere können von 2 Personen pro Stunde bioptiert werden einschließlich Zuschneiden und Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff.
5. Durch die Möglichkeit zur Einstellung der Schußtiefe können Tiere verschiedenen Alters bioptiert werden. Erfahrungen liegen beim Schwein ab 70. Lebenstag vor, beim Rind ab 150. Lebenstag.

Das Biopsie-Schußgerät nach SCHÖBERLEIN (1976) hat sich in der DDR und der CSSR bei Rind und Schwein zur Entnahme von Muskelproben für biophysikalische, biochemische, elektronenmikroskopische und vor allem für histologisch-histochemische Untersuchungen bewährt. Es besteht aus einem umgebauten Schlachtviehbetäubungsapparat, an dessen Schußbolzen eine Kanüle befestigt ist. Den Umbau des Schlachtviehbetäubungsapparates zum Biopsieschußgerät kann eine feinmechanische Werkstatt durchführen.

Beim Zurückschnellen des Bolzens wird die ausgestanzte Probe mit Hilfe von Abtrennelementen innerhalb der Kanüle herausgezogen. Nach dem Abtrennen kontrahiert der Muskel, und durch Auspusten oder vorsichtiges Herausschieben aus der Kanüle wird ein quergeschnittenes Muskelband von etwa 3 mm Höhe, 5 mm Breite und 5 bis 30 mm Länge entsprechend der Schußtiefe vorgelegt (Masse etwa 0,5 bis 1 g). Als günstigste Muskeln für eine Schußbiopsie haben sich beim Schwein der *M. longissimus dorsi* und beim Rind der *M. semitendinosus* erwiesen.

Biopsieproben zeigen, vor allem wenn der Schnitt zu dick ist, störende Kontraktionsartefakte, die sich durch eine etwa 30 sec. lange Fixierung der Schnitte in Formolkalzium bzw. eine Beschichtung der Objektträger mit Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), 3 prozentige Lösung, beseitigen lassen.

4.2.3. Einfrieren, Transport und Lagerung

Das Einfrieren der Muskelproben in flüssigen Stickstoff erfolgt direkt im Stall, Schlachthaus oder im Labor. Mit einem scharfen Messer, Skalpell oder einer Rasierklinge werden unter Berücksichtigung des Faserverlaufs aus den Proben Blöckchen mit einer Kantenlänge von 5 - 10 mm geschnitten. Diese Blöckchen werden mit Tragacanth (2 %) auf eine etwas größere Korkscheibe aufgeklebt, mit Talkum gepudert und mit einer langen Pinzette 20 bis 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Gleichzeitig wird das Aufbewahrungsröhrchen (Höhe 3,5 cm, Durchmesser 2 cm) aus Plaste im Stickstoff gekühlt. Die Korkscheiben und die Röhrchen können zur Kennzeichnung der Proben genutzt werden. Das Röhrchen erhält unten und im Deckel ein kleines Loch, damit die Proben beim weiteren Transport und der Lagerung allseitig von Stickstoff umgeben sind. Zum Transport und zur Lagerung der Muskelproben in flüssigem Stickstoff dienen kryobiologische Gefäße.

4.3. Empfehlung für die Anwendung histologischer und histochemischer Methoden für die Untersuchung von Muskelgewebe

4.3.1. Allgemeine Anwendungsaspekte

Die mikroskopische Untersuchung des Muskelgewebes zur Erfassung struktureller Merkmale hat in den letzten 20 Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Daher gehören histologische und histochemische Techniken auch zum Untersuchungsspektrum der Muskel- und Fleischlaboratorien der RGW-Mitgliedsländer (Übersicht Tab. 1; siehe auch UHRIN u. KULISEV 1979, MICHEL u. SALOMON 1981).

- Histologie

Die histologischen Färbemethoden zur Sichtbarmachung des Zytoplasmas, des Bindegewebes oder der Kerne dienen einerseits zur Übersichtsdarstellung im Gewebsschnitt, andererseits der selektiven Darstellung der einzelnen Komponente. Die Auswertung der histologischen Präparate umfaßt Zählungen und Messungen der Komponenten sowie die Gesamtbeurteilung des Schnittbildes, z.B. auch das Feststellen von degenerativen und atypischen Veränderungen.

- Histochemie

Für die Beurteilung der Muskelstruktur in ihrer Beziehung zum Fleischbildungsprozeß und den p.m.-Eigenschaften des Fleisches erweist sich die histochemische Analyse als eine wertvolle Methode. Mit den histochemischen Nachweisreaktionen an Querschnittspräparaten der Muskulatur werden zwei Ziele verfolgt:

1. Durch Präzipitation der unlöslichen Reaktionsprodukte an den Orten der Enzymwirkung oder durch den Nachweis von Lipiden, Glykogen o.a. werden in den Muskelfasern die genannten chemischen Eigenschaften der Muskelfasern nachgewiesen.

2. Jede Muskelfaser kann im Ergebnis des histochemischen Nachweises einem bestimmten Reaktionstyp (Stoffwechsel, Kontraktion) zugeordnet werden, wodurch Fasertypen selektiv sichtbar gemacht werden. Dadurch besteht die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der durchschnittlichen Faserdicke jedes Typs (Messung) sowie des Muskelfasertypenprofils (Zählung).

Die Auswahl der anzuwendenden Methode richtet sich nach der Untersuchungsproblematik, dem Versuchsumfang sowie nach den Anforderungen, die an die Qualität der Fasertypendifferenzierung gestellt werden (FIEDLER u. WEBER 1981). Robust und wenig aufwendig für die Darstellung der Fasertypen sind die Nachweise der oxidativen Enzyme SDH, NADH-TR und der Lipidnachweis mit Sudanschwarz B. Diese Methoden sind besonders zu empfehlen, wenn der Umfang der zu untersuchenden Tiere hoch ist, oder von mehreren Muskeln Präparate hergestellt werden sollen. Im Ergebnis der Nachweise können Aussagen zu den Stoffwechseleigenschaften der Muskeln getroffen werden. Der Myoglobinnachweis mittels Peroxidase zeigt die Lokalisation des roten Muskelfarbstoffes an. Er liefert sehr gute Resultate hinsichtlich der Fasertypendifferenzierung und der Homogenität der Farbstoffverteilung. Er kann wegen der Instabilität des Reaktionsproduktes (Präparate bei +4° C ca. 8 Wochen haltbar) jedoch nur empfohlen werden, wenn eine kurzfristige Auswertung möglich ist.

Für die Beurteilung von glykolytischen Vorgängen in der p.m.-Muskulatur wird der Glykogen-Nachweis empfohlen. Er erlaubt einerseits eine Fasertypendifferenzierung, darüber hinaus gibt die Intensität der Färbung Hinweise auf die Geschwindigkeit des Glykogenabbaus in der Zelle.

Für die Darstellung der Kontraktionseigenschaften ist der ATPase-Nachweis an Gefrierschnitten die Methode der Wahl. Er erfordert jedoch einen höheren Aufwand und ist relativ stör anfällig. Im Hinblick auf Faserabgrenzung, Homogenität der Färbung und Kontrast ist der ATPase-Nachweis anderen Methoden überlegen, jedoch als Routine-Methode für die Untersuchung von großen Stichproben ungeeignet.

Es existieren auch kombinierte Methoden zum Nachweis eines Stoffwechsel-Enzyms und der ATPase am selben Schnitt, die gute Möglichkeiten der Auswertung beider Reaktionen liefern.

- Klassifizierung der Fasertypen

Der ATPase-Nachweis gibt Auskunft über die Art der Kontraktion (schnell oder langsam) und der oxidative Enzymnachweis über den primären Stoffwechselweg der Energiegewinnung (vorwiegend oxidativ, vorwiegend glykolytisch). Eine Zuordnung ist relativ eindeutig bei der Klassifizierung der Fasertypen nach der einen oder anderen Art des Enzymnachweises (slow twitch, fast twitch bzw. rot, intermediär, weiß). Häufig wird auch eine Klassifizierung auf der Grundlage der Kombination beider Nachweise vorgenommen, wobei die ATPase-Reaktion der dominante Faktor ist (STO, FTO, FTG bzw. β r, ϵ r, α w). Dabei ist jedoch zu beachten, daß beim Nachweis nur eines Enzyms, z.B. der ATPase oder der SDH, nicht ohne weiteres auf das Ergebnis der anderen Reaktion geschlossen werden kann. ATPase- und oxidative Enzymaktivität müssen nicht unbedingt korrelieren; hier gibt es tierart- und muskelspezifische Abhängigkeiten. Daher ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei kombinierter Klassifizierung mit Ergebnissen einfacher Klassifizierung nur bedingt zulässig. Die Art der Klassifizierung ist wiederum nach der Fragestellung auszuwählen.

Tab. 1: Übersicht der im RGW für Muskel- und Bindegewebe vorwiegend angewendeten histologischen und histochemischen Methoden

Methode	nachgewiesene Komponenten	Quellen-nachweis
1	2	3
<u>I. Histologische Methoden</u>		
Eosinfärbung	Zytoplasma hellrot	ROMEIS 1968
Hämalaun-Eosin	Kerne dunkelblau, Plasma rot	ROMEIS 1968
Hämalaun-Eosin	Kerne dunkelblau, Plasma rot	DUBOWITZ u.a. 1973
Chromalaun-Carmin-Eosin-Färbung	Kern-Chromatin blauschwarz, Zytoplasma, hellrot	ROMEIS 1968
HBFP-Methode	rote Anfärbung pathologisch veränderter Fasern (Riesenfaser)	BURCK 1975
Anilinblau - Orange G	Kollagenes Bindegewebe blau, Zytoplasma orange	n. MALLORY, ROMEIS 1968 mod.n.BELLER 1960
Retikuläres Bindegewebe	Retikuläre Fasern schwarz	ROMEIS 1968
Elastinfasern mit Aldehydfuchsin	Elastinfasern hell - lila	ROMEIS 1968
Trichromfärbung	Kerne dunkelblau, Cytoplasma rot, Schleim u. kollagene Fasern grün	n. MASSON, ROMEIS 1968

II. Histochemische Methoden

1	2	3	
Glykogennachweis - PAS-Reaktion	Glykogenhaltige Muskelfasern rosa bis dunkelrot	n.MC MANUS	1946
Lipidnachweis m. Sudan- schwarz B	lipidhaltige (rote) Muskelfasern blauschwarz, Fettzellen tiefschwarz	OGATA	1958
Myoglobin-Peroxidase	Muskelfasern in Abstufungen gelb- lich bis dunkelbraun Fasertypendifferenzierung	MORITA u.a.	1969
-Glycerophosphatdehydro- genase	Marker des glykolytischen Stoffwechsels	WATTENBERG u. LEONG	1960
Sukzinatdehydrogenase- Nachweis (SDH)	Mitochondriale SDH-bzw. NADH-TR- Aktivität als Marker d. oxidativen Stoffwechsels Fasertypendifferenzierung durch den unterschiedlichen Mitochondrien- gehalt in den Muskelfasern	n.NACHLAS u.a.	1957
NADH-Tetrazoliumreduktase- Nachweis (NADH - TR)		SPANNHOF	1967
		DUBOWITZ u.a.	1973
Nachweis myofibrillärer ATPase mit saurer u. alka- lischer Vorinkubation	Myofibrilläre ATPase-Aktivität korreliert mit den Kontraktions- eigenschaften der Muskelfasern. Alkalistabile ATPase- schnell kontrahierend, säurestabile ATPase langsam kontrahierend Orte d. Enzymaktivität dunkelbraun bis hellbraun, ohne Akt. weiß. Fasertypendifferenzierung	n.NOVIKOF u.a.	1961
		PADYKULA/HERMAN	1955
		KLEMM	1970
		GUTH/SAMAH	1970
		TUNELL u. HART	1977
		KHAN	1972
		SZENTKUTI u. EGGERS	1985
Kombinierter Myosin-ATPase/ NADH-TR-Nachweis	Simultane Darstellung o.g. Kompo- nenten in einem Schnittpräparat zur gleichzeitigen Beurteilung oxidati- ver Enzymaktivität u. myofibrillärer ATPase-Aktivität	ZIEGAN	1979
		HORAK	1983

4.3.2. Detaillierte Beschreibung der Prozeduren

4.3.2.1. Schnittherstellung

Bei der Herstellung der Muskeldünnschnitte für die Präparation wird nach recht einheitlichen Richtlinien verfahren (ROMEIS 1968). Als Methoden kommen die Paraffin- und die Gefrierschnitt-technik in Betracht. Für alle histologischen Färbemethoden sind sowohl fixierte Paraffinschnitte als auch Gefrierschnitte geeignet, jedoch haben sich speziell für das Muskelgewebe Gefrierschnitte sehr gut bewährt. Die histochemischen Nachweismethoden müssen vorwiegend an nativen oder schonend fixierten Gefrierschnitten durchgeführt werden. Als Geräte für die Herstellung der Schnitte kommen verschiedene Typen von Paraffin- und Gefriermikrotomen zur Anwendung. Für die Paraffinschnitte steht im RGW das Paraffinmikrotom MC-2 (SU-Produktion) zur Verfügung. Als Gefriermikrotome werden offene Systeme (z.B. Gefriermikrotom der Firma Jung, BRD) oder geschlossene Systeme (Kryostaten englischer und amerikanischer Produktion) eingesetzt. Wenn kein Gefriermikrotom zur Verfügung steht, wird empfohlen, ein Paraffinmikrotom durch den Zusatz einer elektrischen Kühlung zu einem Gefriermikrotom umzubauen. Die Schnittdicke der Präparate richtet sich nach der nachzuweisenden Substanz. Sie wird zwischen 8 und 15 μ m gewählt.

4.3.2.2. Histologische Färbungen

4.3.2.2.1. Hämalaun-Eosin-Färbung (ROMEIS 1968)

Als kombinierte Kern-Plasma-Färbung sehr gut geeignet.

Methode:

1. Einbringen der unfixierten Gefrierschnitte in 4 %iges Formolcalcium 1 - 2 min
2. Spülen in Aqua dest. 5 min
3. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach MAYER 5 min
4. Spülen in Leitungswasser (mehrfach wechseln) 20 min
5. Einstellen in Aqua dest. 1 min
6. Plasmafärbung in 1 %igem wässr. Eosin 10 min
7. Einbetten in Glyzeringelatine oder - nach aufsteigender Alkoholreihe - in Kanadabalsam

Resultat: Kerne erscheinen dunkelblau, Zytoplasma rot

4.3.2.2.2. Chromalaun-Carmin-Eosin-Färbung (mod. nach ROMEIS)

Als kombinierte Kern-Plasma-Färbung ist die Methode zu empfehlen, wenn mehrere Schnitte eines Tages gesammelt werden müssen, da die Färbedauer relativ lang ist.

Methode:

1. Einbringen der unfixierten Gewebeschnitte in 4 %iges Formol-Calcium 1 - 2 min
2. Spülen in Aqua dest. 5 min
3. Kernfärbung mit Chromalaun-Carmin (s.u.) 8 -18 h
4. Spülen in Aqua dest. 5 min
5. Plasmafärbung mit 1 %igem wässer. Eosin 10 min
6. Einbetten in Glyzeringelatine oder - nach aufsteigender Alkoholreihe - in Kanadabalsam

Resultat:

Das Chromatin der Kerne ist blauschwarz gefärbt, das Zytoplasma hellrot.

Bemerkung:

Herstellung des Chromalaun-Carmins: 6 g reiner Chromalaun werden in 100 ml Aqua dest. heiß gelöst und danach 1 g Carmin zugesetzt. Die Mischung wird 15 min gekocht und nach dem Erkalten filtriert. Nach Zusatz von Thymol ist die Lösung lange Zeit haltbar.

4.3.2.2.3. Bindegewebefärbungen

Anilinblau-Orange-Färbung (mod. nach Beller 1960)

Methode:

1. Fixierung der Schnitte in MÖLLER'scher Lösung 1 min
2. Spülen in Aqua dest. 1 min
3. Färbung mit Orange G 5 min
4. Spülen in Aqua dest. 1 min
5. Färbung in Anilinblau 30 sec
6. Spülen in Aqua dest. 1 min
7. Einbetten in Glyzeringelatine oder Kanadabalsam

Resultat:

Perimysium und Epimysium erscheinen hellblau gefärbt, das Zytoplasma der Muskelfasern orange.

Bemerkung:

Herstellung der Anilinlösung: 0,5 g Anilinblau (wasserlöslich) werden in 5 ml Essigsäure gelöst, auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und aufgeköcht.

Herstellung des Orange G: 4 g Orange G (wasserlöslich) werden in 5 ml Essigsäure gelöst, auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und aufgeköcht.

Herstellung der MÖLLER'schen Lösung:

2,5 g Kaliumbichromat, 1 g Natriumsulfat, 100 ml Aqua dest.

Darstellung des retikulären Bindegewebes (RÖMEIS 1968)

Methode:

1. Oxydierung in einer 0,5 %igen Kaliumpermanganatlösung 5 sec
2. Abspülen in Aqua dest.
3. Spülen in einer 1 %igen Lösung von Oxalsäure 5 sec
4. Abspülen in Aqua dest.
5. Einbringen in 2,5 %ige Eisen-Ammoniumsulfat-Lösung 5 sec
6. Abspülen in Aqua dest.
7. Imprägnierung in einer 1 %igen Lösung von frisch
bereitetem ammoniakalkalischem Silbernitrat
8. Abspülen in Aqua dest. 30 sec
9. Reduktion in 4 %igem Formaldehyd 15 sec
10. Abspülen, Entwässern und über Xylol Einbettung
in Kanadabalsam

Resultat:

Das retikuläre Bindegewebe erscheint schwarz gefärbt.

Bemerkung:

Herstellung der Silbernitratlösung:

5 ml 10 % AgNO_3 werden mit 5 ml 3 % NaOH versetzt.

Tropfenweise wird Ammoniak hinzugegeben und so lange geschüttelt, bis der Niederschlag sich auflöst, dann erneute Zugabe von AgNO_3 tropfenweise, so lange der Niederschlag sich auflöst. Wenn die Lösung beginnt, trübe zu werden, wird auf 100 ml aufgefüllt.

Darstellung elastischer Fasern mit Aldehydfuchsin (ROMEIS 1968)

Methode:

1. Oxydation in Lugolscher Lösung 1/2 - 1 h
2. Aufhellung der Schnitte in 5 %iger Lösung
von Natriumthiosulfat 1 - 2 min
3. Abspülen der Schnitte in Aqua dest.
4. Färbung in einer Lösung des Aldehydfuchsin 5 min
5. Abspülen in 70 %igem Alkohol
6. Differenzieren in 70 %igem Alkohol
7. Nachfärbung der Kerne mit Hämatoxylin nach
HARRIS
8. Abspülen, Entwässern und über Xylol Einbettung
in Kanadabalsam

Resultat:

Die elastischen Fasern färben sich hell-lila.

Bemerkung:

Herstellung des Fuchsin:

In 100 ml 70 %igem Alkohol werden unter Wärmeeinwirkung 0,5 g basisches Fuchsin gelöst. Abkühlen und Zusetzen von 1 ml Chlorwasserstoffsäure und 1 ml Paraldehyd. Bei Zimmertemperatur 24 - 48 h stehen lassen. Nach dieser Zeit färbt sich die Lösung dunkelviolett.

Trichrom-Färbung nach MASSON (ROMEIS 1968)

Methode:

Bedingung: Fixierung in Bouin, Zenker oder Helly

Das Formol-Material muß zusätzlich in 6 %igem acidum picronitricum in 96 %igem Alkohol zwei Min. gebeizt werden. Dann 5 Min. in destilliertem Wasser spülen und nach Vorschrift fortfahren.

1. Färbung in Weigertschem Eisen-Hämatoxylin 30 - 60 sec
2. Aqua dest. - 3 x spülen
3. Spülen in Leitungswasser 10 min
4. Differenzieren in 1 %iger Essigsäure, wenn erforderlich, das Bindegewebe zu entfärben
5. mit Aqua dest. abspülen
6. Färbung in Fuchsin-Ponceau 5 - 20 sec
7. Aqua dest. - 3 x spülen
8. Spülen in 1 %iger Phosphomolybdän-Säure I 5 - 10 min
9. Spülen in 1 %iger Phosphomolybdän-Säure II 5 - 10 min
10. Färbung in Methylgrün ohne Abspülen der Phosphomolybdän-Säure 5 - 10 min
11. Aqua dest. - 3 x spülen
12. 1 %ige Essigsäure 1 - 3 min
13. 96 %igen Alkohol - abspülen
14. absoluter Alkohol - abspülen
15. Xylol 3 - 5 min
16. Einbetten in Kanadabalsam

Resultat:

Kerne dunkelblau, Cytoplasma ziegelrot, Schleim und kollagene Fasern scharf grün

Bemerkung:

Die Färbung ist erst nach der Einbettung komplett zu erkennen.

Bereitung der Lösungen:

1. Fuchsin	1 g
Aqua dest.	100 ml
Essigsäure	1 ml
2. Ponceau (Geigy)	1 g
destilliertes Wasser	100 ml
Essigsäure	1 ml
3. Anilinblau oder Methylgrün	2,5 g
destilliertes Wasser	160 ml

Das Wasser wird erhitzt, danach werden der Farbstoff und die Essigsäure zugesetzt.

Färbung mit der HBFP-Methode (BURCK 1975)

Methode:

1. Färbung in Hämatoxylin	10 min
2. Spülen in Leitungswasser	5 min
3. Färbung in 0,1 %iger alkalischer Fuchsinlösung	5 min
4. Abspülen in Aqua dest.	10 min
5. Abspülen in Azeton	10 min
6. Differenzierung in 0,1 %iger Pikrinsäure in Azeton bis zum Schwund der Farbstoffstreifen	20 min
7. Abspülen mit Azeton	
8. Einbetten in Kanadabalsam - nach aufsteigender Alkoholreihe -	

Resultat:

Pathologisch veränderte Fasern färben sich hellrot.

4.3.2.3. Histochemische Nachweismethoden

4.3.2.3.1. Lipide (OGATA 1958)

Methode:

1. Fixierung der Gewebeblöckchen in 4 % Formol-Calcium 24 h
2. Spülen in fließendem Leitungswasser 4 - 5 h
3. Herstellung von Gefrierschnitten
4. Einstellen der Schnitte in 70 % Athanol 5 min
5. Färbung der Schnitte mit Sudanschwarz B 20 min
6. Spülen in 50 %igem Athanol (kurz)
7. Spülen in Aqua dest. 1 min
8. Einbetten in Glyzeringelatine

Resultat:

Rote und intermediäre Muskelfasern reagieren positiv, erscheinen grauschwarz und hellgrau gefärbt. Fettzellen des intramuskulären Fettgewebes sind tiefschwarz gefärbt.

4.3.2.3.2. Glykogenfärbung (MC MANUS 1946)

Methode:

1. Fixierung im absoluten Alkohol 12 - 24 h
Danach werden die Gewebeproben in Paraffin oder in Zelloidin eingebettet.
2. Paraffinschnitte von Paraffin befreien
3. Schnitte 5 min bei Zimmertemperatur in Perjodsäure oxydieren
4. Schnitte in 70 %igem Alkohol abspülen
5. Schnitte in Schiff'schem Reagenz 15 - 45 min bei Zimmertemperatur inkubieren
6. Schnitte 3 x 5 min in SO₂-Wasser spülen
7. In fließendem Wasser 5 bis 20 min waschen
8. Kerne mit "Kernrot" oder mit Hämatoxylin färben
Es ist wünschenswert, 1 sec in alkoholischer Salzsäurelösung zu differenzieren.
9. 10 min in fließendem Wasser waschen
10. Im Bedarfsfalle das Zytoplasma mit Malachitgrün, Orange G u.a. nachfärben
11. Schnell in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässern und über Xylol in Kanadabalsam einbetten

Resultat:

Glykogen stark purpurrot, Kerne blau oder rot

Bemerkung:

Diese Methode ist sehr genau und spezifisch. Glykogen ist wasserlöslich, deshalb muß es für die histologische Färbung in absolutem Alkohol fixiert werden. Nur in frischem und schnell verarbeiteten Material kann man Glykogen nachweisen.

4.3.2.3.3. NADH-Tetrazoliumreduktase (NOVIKOFF u.a. 1961)

Methode:

1. Gefrierschnitte von unfixiertem Gewebe herstellen und 5 min bei Zimmertemperatur trocknen lassen
2. Schnitte für 60 min ins frisch bereitete Inkubationsmedium übertragen (37° C):

NADH , Na ₂	16 mg
0,1 M Phosphatpuffer,	
pH 7,4	3,2 ml
Nitro-BT (1 mg/ml	
Aqua dest.)	4,0 ml
Aqua dest.	4,8 ml
3. Spülen in Aqua dest. 5 min
4. Einbetten in Glyzeringelatine

Resultat:

Enzymhaltige Strukturen reagieren positiv (blaue Granula).

Bemerkung:

Die mitochondriale Enzymaktivität wird durch blaue Granula demonstriert. Mitochondrienreiche Muskelfasern erscheinen tiefblau, mitochondrienarme Muskelfasern haben vereinzelt Granula. Der Intermediärtyp ist durch mittlere Aktivität der Enzyme gekennzeichnet (beim Schwein: randständig erhöhte Enzymaktivität der intermediären Fasern). Eine Nachfärbung des Zytoplasmas mit Eosin ist möglich.

4.3.2.3.4. Sukzinatdehydrogenase (NACHLAS u.a. 1957)

Methode:

1. Gefrierschnitte von unfixiertem Gewebe herstellen
2. Schnitte für 30 - 60 min in frisch vorbereitetes Inkubationsmedium bringen (37° C):

0,2 M Phosphatpuffer	pH 7,5	5 ml
0,2 M Natriumsukzinat		
(3,24 g auf 100 ml Aqua dest.)		5 ml
Nitro - BT (1 mg /ml Aqua dest.)		10 ml
3. Spülen in Aqua dest. 5 min
4. Einbetten in Glyzeringelatine

Resultat u. Bemerkungen:

(siehe NADH-Tetrazoliumreduktase)

4.3.2.3.5. Myoglobin-Peroxidase (MORITA u.a. 1969)

Methode:

1. Fixierung der Muskelproben

6 - 22 h in:	2,5 ml	25 % Glutaraldehydlösung
	25 ml	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei Raumtemperatur
2. Waschen in fließendem Leitungswasser 4 h
3. Tauchen in 30 %ige Saccharose in 1 % Gummi acacia Lösung für 16 h und mehr (Aufbewahrung kann hierin 1 Woche erfolgen)
4. Gefrieren der Blöckchen in flüssigem Stickstoff
5. Herstellen von Gefrierschnitten von 30 µm Dicke
6. Schnitte 30 min bei Raumtemperatur frei schwimmen lassen in 10 ml gesättigter wäßriger Benzidinlösung (30 mg Benzidin in 10 ml Aqua dest.) und 0,5 ml 3 %igem H₂O₂
7. Waschen in Aqua dest. und Übertragen auf Objektträger, Einbetten in Glyzeringelatine

Ergebnis:

braune, hellbraune und weiße Fasern entsprechend ihres Myoglobingehaltes. Drei Fasertypen können unterschieden werden.

Bemerkung:

Färbung nicht stabil! Präparate im Kühlschrank aufbewahren.

4.3.2.3.6. Myofibrilläre ATPase

Zur Darstellung der myofibrillären ATPase wird in der Literatur eine Reihe von Methoden vorgestellt, die im wesentlichen auf das Prinzip der Metallsalzmethode nach PADYKULA/HERMAN (1955) zurückgehen.

A. Alkalistabile ATPase

I. Methode nach SZENTKUTI und EGGERS (1985)

für Schweinemuskeln

1. Gefrierschnitte herstellen bei -20°C
2. Trocknen der Schnitte bei Zimmertemperatur 10 - 15 min
3. Vorspülen in gepufferter CaCl_2 -Lösung 2 x 1 min
(12,1 g Tris, 100 ml einer 0,18 M
(2 %igen) CaCl_2 -Lösung, 850 ml Aqua bidest.,
pH 7,3)
4. Alkalische Vorinkubation bei Zimmertemperatur
und pH 10,4 5 min
Vorinkubationslösung:
7,44 g Glycin, 10 g CaCl_2 , 800 ml Aqua bidest.,
100 ml gesättigtes Formalin langsam zuführen,
pH-Wert auf 10,4 einstellen.
5. Spülen in Tris-Calcium-Puffer pH 7,3 2 x 30 sec
6. Inkubation der Präparate bei 37°C 90 min
Inkubationslösung: 10 ml einer 0,1 M
(2,1 %igen) Natriumbarbital-Lösung,
5 ml einer 2 %igen CaCl_2 -Lösung, 76 mg ATP
(gelagert im Gefrierschrank), Aqua bidest.
ad 40 ml, pH-Wert auf 9,4 einstellen,
auffüllen auf 50 ml
7. Spülen in einer CaCl_2 -haltigen Spüllösung
(13,3 g CaCl_2 auf 1 l Aqua bidest.) 3 x
8. Einbringen der Präparate in eine 2 %ige Cobalt-
chloridlösung 3 min

9. Spülen in Aqua bidest. 3 x 30 sec
10. Einbringen der Präparate in eine frische
1 %ige Ammoniumsulfidlösung 30 sec - 2 min
11. Spülen in langsam fließendem Leitungswasser 10 min
12. Einbetten in Glyzeringelatine

Resultat:

Typ I - Fasern erscheinen hell, Typ II A hellbraun,
Typ II B dunkelbraun

II. Methode nach KHAN (1972) - Citrophosphattechnik

Methode:

1. Gefrierschnitte von 6 - 8 µm Dicke auf Objektträger bringen,
40 min bei Raumtemperatur (20 - 23° C) trocknen lassen.
2. Fixieren bei 0 - 5° C für 15 min in 1 %igem Formaldehyd
(frisch aus Paraformaldehyd bereitet) pH = 7,4 mit 2 %
Tetranatriumpyrophosphat (Tetranatriumdiphosphat) und 13 %
Saccharose
3. 8 x 5 min in kaltem Aqua dest. waschen
4. Inkubieren 5 - 15 min bei 37° C im Medium, das unmittelbar
vor Gebrauch bereitet wird.

Lösung A: 30 ml 0,1 M Tris-Maleat-Puffer pH 7,4

320 mg CaCl_2

60 mg Citronensäure

100 mg ATP (Dinatriumsalz)

Lösung B: 800 mg Gelatine in 10 ml 0,1 M Tris Maleat-
Puffer (pH 7,4) lösen

Die Lösungen A und B mischen und mit 1 M NaOH pH 9,4
einstellen. Das klare Medium wird dann in ein vorgewärmtes
Reaktionsgefäß (55° C) gegeben und bei 37° C gehalten.

5. 3 x 2 min in Aqua dest. waschen
6. 3 min in frisch bereitete 2 %ige CaCl_2 -Lösung übertragen.
7. 3 x 2 min in Aqua dest. waschen
8. 1 min in 1 %ige Ammoniumsulfidlösung tauchen
9. Waschen in fließendem Leitungswasser 3 min
10. Einbetten in Glyzeringelatine oder - nach aufsteigender
Alkoholreihe - in Kanadabalsam

Resultat:

Typ I-Fasern, hell; II A, mittelbraun; II B, dunkelbraun

Bemerkungen:

Bereitung des Vorinkubationsmediums:

Für 500 ml: 3,72 g Glycin, 5,0 g CaCl_2 , 425 ml Aqua dest. und 50 ml Formalin (37%ig) langsam zugeben. Mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und pH 7,25 mit 1 N NaOH einstellen.

B. Alkalistabile und säurestabile ATPase

IV. Methode nach GUTH und SAMAHA (1970)

a) mit alkalischer Vorinkubation

1. Gefrierschnitte herstellen
2. Trocknen 30 - 180 min bei Raumtemperatur
3. 5 min fixieren in

Formaldehydlösung (40 %ig)	50 ml
Na-cacodylat	31 g
CaCl_2	10 g
Saccharose	115 g

auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, pH 7,6 einstellen
4. Waschen 1 min mit Bewegung,
Waschlösung ablaufen lassen
18 mM CaCl_2 in 100 mM Tris, pH 7,8:
Tris 12,1 g, CaCl_2 (0,18 M) 100 ml, Aqua dest. 900 ml
pH 7,8 mit HCl (1 bis 6 N) einstellen
5. Vorinkubation 15 min

1,5 M 2-Amino-2-Methyl-1-Propanol	3,35 ml
CaCl_2 (0,15 M)	10 ml
Aqua dest.	40 ml

pH 10,4 mit KOH (1 - 10 N) einstellen
6. 2 x 1 min waschen in Waschlösung (s. Pkt. 4) und ablaufen lassen
7. Inkubation 15 - 60 min bei 37° C (Inkubationslösung in die Farbküvette filtern, die auf 60°C erwärmt ist).

Inkubationslösung:

2-Amino-2-Methyl-1-Propanol (1,5 M) 3.35 ml

CaCl₂ (0,18 M) 5 ml

KCl 185 mg

ATP (Dinatriumsalz) 76 mg

Aqua dest. 40 ml

auf pH 9,4 einstellen mit 6 N HCl und auf das Endvolumen von 50 ml mit Aqua dest. bringen.

8. 3 x 30 sec waschen in 1 %iger CaCl₂-Lösung
9. 3 min in 2 %ige Cobaltchloridlösung einstellen
10. 4 x 30 sec waschen in alkalischer Waschlösung
1,5 M 2-Amino-2-Methyl-1-Propanol 13,4 ml
Aqua dest. 160 ml
auf pH 9,4 einstellen mit HCl (1-6 N) und
auf 200 ml mit Aqua dest. auffüllen
11. 3 min in 1 %ige Ammoniumsulfidlösung einstellen
12. 3 - 5 min in fließendem Leitungswasser waschen
13. Einbetten in Glyzeringelatine

b) mit saurer Vorinkubation

1. und 2. wie a)

3. Vorinkubation der unfixierten Schnitte bei pH 4,35
für 5 - 30 min:

CaCl₂ (0,18 M) 100 ml

Essigsäure 3 ml

Aqua dest. 900 ml

pH 4,35 mit KOH (1-5 N) einstellen und auf 1000 ml bringen.

4. Die Präparation nach den Schnitten 6 - 13 der alkalischen Variante vollenden.

Resultat:

Bei saurer Vorinkubation wird die ATPase der Typ II-Fasern gehemmt, die Typ I-Fasern erscheinen am dunkelsten. Bei alkalischer Vorinkubation erhält man dunkle und intermediäre Typ II-Fasern und helle Typ I-Fasern.

Bemerkung:

Nicht dieselbe Inkubationslösung verwenden bei alkalischer und saurer Vorinkubation!

V. Methode nach KLEMM (1970)

Methode:

1. Trocknen der Präparate 30 min - 2 h
2. Inkubation
 - a) saure Präinkubation pH 4,0 - 4,5
100 ml CaCl_2 (0,18 M)
3 ml Essigsäure
895 ml Aqua dest.
 - b) alkalische Präinkubation pH 7,0 - 7,2
75 ml Formalin (37 - 40 %ig) mit CaCO_3 neutralisiert
3,75 g NaCl
425 ml Aqua dest.
Fixierlösung muß im Eisschrank aufbewahrt werden.
pH nach Anfertigung und vor dem Gebrauch messen.
3. Spülen in Aqua dest. bis zum Schwund des Formalingeruchs
4. Inkubationslösung (pH 9,4 - 10,0) Temperatur 37°C; 30 min
5 ml Barbital-Natrium (0,1 M)
2,5 ml CaCl_2 (0,18 M)
68,9 mg ATP (Natriumsalz)
17 ml Aqua dest.
5. Präparate in 1 %iger CaCl_2 -Lösung spülen 1 min
6. Präparate für 3 min in 2 %ige Kobaltchloridlösung einlegen, Lösung direkt vor dem Gebrauch anfertigen
7. Spülen in Aqua dest. 1 min
8. Präparate für 3 min in 1 %ige Ammoniumsulfid-Lösung bringen
9. Spülen in Leitungswasser 5 min
10. In 70 %igen, 96 %igen, absoluten Alkohol je 1 min entwässern
11. Xylol I und II je 2 min
12. In Kanadabalsam einbetten

Resultat:

Bei saurer Vorinkubation wird die ATPase der Typ II-Fasern gehemmt, die Typ I-Fasern erscheinen am dunkelsten. Bei alkalischer Vorinkubation erhält man dunkle und intermediäre Typ II-Fasern und helle Typ I-Fasern.

- c) Kombinierte Methoden
ATPase - NADH-TR

VI. Methode nach ZIEGAN (1979)

1. Gefrierschnitte herstellen, auf dem Objektträger antauen, bis zum erneuten Einfrieren im Kryostaten belassen, anschließend mit Fön (kalt) 40 min lang trocknen und über Nacht bei Raumtemperatur stehenlassen.
- a) Alkalische Kombination:
2. Inkubation 30 min bei 37° C in
NADH. NA₂ 4,0 mg
Phosphatpuffer (0,1 M, pH = 7,4) 0,8 ml
Nitro-BT (1 mg/ml wäßrige Lösung) 1,0 ml
Aqua bidest. 1,2 ml
3. 2 x spülen in Aqua bidest.
4. Fixation nach MEIJER (1970):
5 min in 4° C kalter, wäßriger Lösung aus Paraformaldehyd,
2 % CaCl₂ und 6 % Dextran (MG 70 000)
pH 6,3 - 6,6
5. 3 x spülen in kaltem Aqua dest.
6. Spülen bei Zimmertemperatur in Aqua bidest.
7. Alkalische Vorinkubation bei 37° C
15 min in Pufferlösung pH 10,4
0,02 M Calcium-Veronalpuffer
(CaCl₂ 0,444 g, Natriumbarbiturat 0,412 g,
Aqua bidest. 100 ml, Einstellen mit 1 N NaOH)
8. 3 x spülen in Aqua bidest.
9. ATPase-Reaktion nach MEIJER (1970):
20 min bei 37° C

Inkubationsmedium: 600 mg Gelatine lösen in 40 ml 0,1 M
Tris -Maleat-Puffer pH 7,2

dazu : 40 mg ATP, 3 ml wäßrige 1,5 %ige Bleinitratlösung,
4 ml 5 %ige CaCl_2 -Lösung, 1 ml Aqua bidest.

Einstellen auf pH 7,2

10. 3 x spülen in Aqua bidest.
11. Einstellen in frische 1 %ige Ammoniumsulfidlösung
12. gründlich spülen
13. Einbetten in Glyzeringelatine

b) Saure Kombination

Statt o.a. Schritt Nr. 7 erfolgt die saure Vorinkubation
5 min in einer 0,2 M Essigsäure-Acetat-Pufferlösung pH 4,35
bei Zimmertemperatur. Anschließend 10 min in eine Puffer-
lösung pH 9,3 bei Zimmertemperatur bringen (0,02 M Calcium-
Veronalpuffer oder 0,02 M Glycinpuffer)

Resultat:

Gleichzeitige Darstellung von Typ I, Typ II-Fasern sowie
roten, weißen und intermediären Fasern in einem Schnitt.

4.4. Quantitativ-mikroskopische Auswertung

Die quantitativ-mikroskopische Auswertung der Muskelquerschnittspräparate beinhaltet die Messung des Muskelfaserdurchmessers bzw. der Querschnittsflächen der einzelnen Muskelfasern sowie die Zählung der Muskelfasern, getrennt nach Fasertyp zur Ermittlung des prozentualen Anteils. Es gibt zahlreiche Methoden und Geräte zur Erfassung der genannten Merkmale. Es werden Okularmikrometer verschiedener Bauart, z.B. das Lanameter, benutzt. Wenn keine speziellen Meßgeräte zur Verfügung stehen, kann die Analyse des Muskelpräparates mit Hilfe der Punkt- oder Trefferanalyse erfolgen.

Seit einigen Jahren sind auch Geräteordnungen mit Mikrorechner in Benutzung, die für die Muskelfasermessung empfohlen werden können (SIMON u.a. 1984). Mit dem Zählgerät "Eltinor 4", gekoppelt mit einem Zählstift, können Muskelfasern am projizierten Bild gezählt werden, wobei die Anzahl Muskelfasern pro mm^2 zugleich eine indirekte Maßzahl für die Querschnittsfläche der Muskelfasern darstellt (WEGNER und MÜLLER 1976).

Eine wesentliche Weiterentwicklung zum Messen und gleichzeitigen Zählen von Muskelfasern ist der rechnergestützte Muskelfaseranalysator "MFA 1" (BEYERSDORFER u.a. 1985). Mit dem Meßaufsatz auf dem Mikroskop wird die Bildaufspaltung zur Messung des Krumbein'schen Durchmessers, eines statistischen Korngrößenmaßes, realisiert und in den Mikrorechner eingegeben.

Nach Beendigung der Messung von 500 - 1000 Muskelfasern pro Präparat werden vom Rechner daraus folgende Werte berechnet und digital angezeigt: mittlerer Durchmesser der einzelnen Fasertypen, Standardabweichung, Variationskoeffizient, Anzahl Muskelfasern eines Typs in Prozent (rot, intermediär, weiß) und andere entsprechend der Aufgabenstellung programmierte Parameter. Die Vorteile des Gerätes liegen darin, daß das mikroskopische Präparat direkt ausgewertet wird und daß dabei eine hohe Arbeitsgeschwindigkeit erreicht wird.

In einer Stunde können mit dem "MFA 1" ca. 1200 Muskelfasern gemessen, gezählt und die genannten Parameter der Muskelstruktur berechnet werden. So kann dieses Gerät für die mikroskopische Auswertung größerer Versuchsserien empfohlen werden.

Da die morphometrische Auswertung der histologisch-histochemischen Präparate jedoch trotz dieser halbautomatischen Systeme einen wesentlichen Arbeitszeitfonds beansprucht, ist die Einführung der automatisierten mikroskopischen Bildanalyse anzustreben. Mit ihr kann eine beachtliche Effektivitätssteigerung bei der objektiven Auswertung der Muskelpräparate erreicht und eine mit konventionellen Mitteln kaum erreichbare Informationsfülle garantiert werden.

Auf der Leipziger Herbstmesse 1986 zeigte die Firma "Robotron" das Gerätesystem "AMBA / R-med- Automatisierte Mikroskopbildanalyse für Medizin und Biologie". Dieses System wird zukünftig auch in den Muskelhistologischen Laboratorien Bedeutung haben.

5. Bedingungen für die Wirksamkeit der Empfehlung

Voraussetzung für die Anwendung der empfohlenen Methoden ist ein histologisch-histochemisches Labor mit folgender Ausstattung:

- Geräte zur Paraffin- und Gefrierschnittechnik
- Kühl- und Brutschränke
- div. Glasgeräte und Feinchemikalien
- Mikroskopische Auswertungstechnik

6. Literaturverzeichnis

- BEYERSDORFER, G., OHLERICH, M., WEGNER, J.:
Ein halbautomatisches Meßgerät zur Morphometrie von
Muskelfasern im mikroskopischen Querschnittspräparat
Z. mikrosk.-anat. Forsch. 99(1985)4, 671-675
- BURCK, H. Ch.: Technika histologiczna PZWL, Warszawa 1975
- DUBOWITZ, V., BROOKE, M.H., NEVILLE, H.E.:
Muscle Biopsy: A Modern Approach W.B. Saunders company
Ltd. London, Philadelphia, Toronto, 1973
- FIEDLER, I., WEBER, Ch.: Methodische Untersuchungen zur Auswahl
einer histochemischen Routinemethode für die Differenzie-
rung von Muskelfasertypen
Z. mikrosk.-anat. Forsch. Leipzig 95(1981)6, 1027-1034
- GUTH, L., SAMAHA, F.J.:
of
Procedure for the histochemical demonstration actomyosin
ATPase
Exp. Neurol. 28(1970) 365-367
- HENNEBACH, H., LENGERKEN, G. v., PFEIFFER, H.,
SCHÜBERLEIN, L.: Methoden der Muskelfaserprobenentnahme am
lebenden Schwein und Aussagefähigkeit bioptischer Kennwerte
zur Frühinformation der Fleischbeschaffenheit
Mh. Vet. Med. 38(1983) 9, 339-345
- HORAK, V.: A successive histochemical staining for succinate
dehydrogenase and "reversed" - ATPase in a single section
for the skeletal muscle fibre typing
Histochemistry 78(1983) 545-553
- KHAN, M.A., PAPADIMITRIOU, J.M., HOLT, P.G., KAKULAS, B.A.:
A calcium-citro-phosphate technique for the histochemical
localization of myosin ATPase
Stain Techn. 47(1972) 277-281
- KLEMM, R.D.: Histochemical demonstration of actomyosin ATPase
in avian muscle tissue
Exp. Neurol. 28(1970) 2, 365

- LAHUCKY, R., RAJTAR, V., SIDOR, V., KOVAC, :
Die Entnahme von Muskel- und Fettgewebe vom lebenden Tier
und mögliche Anwendungsgebiete
Veterinärstvi, Praha 30 (1980)2, 77-79
- MC MANUS, J.F.A.: Histological demonstration of mucin after
periodic acid. Nature 158(1946) 202
- MICHEL, G.; SALOMON, F.-V.: Zur Morphologie der Skelettmusku-
latur und ihrer Bedeutung für die Tierproduktion
Tierzucht 35(1981)5, 235-237
- MORITA, S., CASSENS, R.G., BRISKEY, E.J.: Localization of
myoglobin in striated muscle of the domestic pig;
benzidine and NADH₂-TR reactions
Stain Techn. 44(1969) 283-286
- NACHLAS, M.M., TSOU, K.C., SOUZA, E. de, CHENG, C.S., SELIGMAN,
A.M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by
the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole,
J. Histochem. Cytochem. 5(1957), 420-436
- NOVIKOFF, A.B., SHIN, W., DRUCKER, J.: Mitochondrial localiza-
tion of oxidative enzymes staining results with two tetra-
zolium salts
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9(1961) 47-61
- OGATA, T.A.: A histochemical study of red and white muscle
fibers
Acta Med. Okayama 12(1958) 216-240
- PADYKULA, H.A., HERMAN, E.: The specificity of the histochemical
method for adenosine triphosphatase
J. Histochem. Cytochem. 3(1955) 170-195
- ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik
R. Oldenburg München 1968
- SCHÖBERLEIN, L.: Die Schußbiopsie - eine neue Methode zur
Entnahme von Muskelproben
Mh. Vet.-Med. 31(1976) 457 - 460
- SIMON, H., VOSS, K., WENZELIDES, K.: Automated Microscopic
Image Analysis. Application in Experimental and Human
Pathology
VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena 1984

- SPANNHOF, L.: Einführung in die Praxis der Histochemie
VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena 1967
- SZENTKUTI, L., EGGERS, A.: Eine zuverlässige Modifikation
der Myosin-ATPase-Reaktion zur histochemischen Dar-
stellung von drei Fasertypen in der Skelettmuskula-
tur von Schweinen
Fleischwirtsch. 65(1985)11, 1398-1404
- TUNELL, G.L., HART, M.N.: Simultaneous determination of
skeletal muscle fiber types I, II A and II B by
histochemistry
Arch. Neurol. 34(1977) 171-173
- UHRIN, V., KULISEK, V.: Mikroskopické metody při hodnotení
rastu svalov a kvality mäsa
Vyskomny ustav chovu a slachtenia hydiny, nositel
radu prace
Ivanka pri Dunaji (1979) 94 S.
- WEGNER, J., MÖLLER, U.: Ein Beitrag zur Rationalisierung
quantitativ-mikroskopischer Untersuchungen
Z. med. Labortechnik 17(1976) 357-359
- WEGNER, J., SCHÖBERLEIN, L.: Eignung des Schußbiopates für
morphometrische und histochemische Untersuchungen
des Muskelgewebes
Mh. Vet.-Med. 39(1984) 665-667
- WEGNER, J., SCHÖBERLEIN, L.: Auswirkungen der Muskel-Schuß-
biopsie beim Kalb
Mh. Vet.-Med. 41(1986) 590-592
- ZIEGAN, J.: Kombinationen enzymhistochemischer Methoden zur
Fasertypendifferenzierung und Beurteilung der Skelett-
muskulatur
Acta histochem. 65(1979) 34-40