

VETResearch 2013 Retreat



www.vetmed.uni-muenchen.de

LEHRE@VET
Research



Lena van Buggenum, Catherine Gutfried, Svenja Gerbig, Theresa Brünger, Dorothee Depka, Katharina Häffelin, Daniela Schmidle, Benjamin Faller, Caroline Fritz, Simon Früh, Franziska Heer, Anika Helfrich, Johanna Helmke, Anna Katharina Kistler, Alexander Lauda, Andreas Lange, Maria Lange, Regina Magner, Lisa Marr, Ina Schmauß, Simon Reiter, Birke Elisabeth Schwarz, Lisa Segeritz, Diana Seidel, Tanja Sonnewald-Daum, Christian Zenner

Herausgeber: Ludwig-Maximilians-Universität, Tierärztliche Fakultät,
Veterinärstr. 13, 80539 München, Tel: +49 (0) 89 / 2180 - 2512

Stand: März 2014



Dieses Vorhaben wird aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 01PL12016 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Einleitung

Bei allen Mitwirkenden möchte ich mich sehr herzlich für ihr Engagement bedanken! Die vielen positiven Rückmeldungen und Ideen für weitere Projekte zeigen, dass VETResearch 2013 guten Anklang in unserer Fakultät gefunden hat und ich freue mich, dass es weitergehen wird.

Wir sind immer an neuen Ideen interessiert! Derzeit finden zum Beispiel Gespräche mit anderen Fakultäten statt, um Möglichkeiten für einen fachlichen Austausch im Rahmen der studentischen Forschungsprojekte zu erarbeiten.

Wenn Sie Anregungen oder Fragen haben, melden Sie sich bei mir im Studiendekanat!

Dr. Christina Beitz-Radzio
Lehre@VET

Grußwort

VETResearch als Teilprogramm von Lehre@LMU erlaubt interessierten Studierenden erste Einblicke in aktuelle Forschungsprojekte an der Tierärztlichen Fakultät. Etwa 20 Forschungsprojekte konnten in der ersten Antragsrunde unterstützt und realisiert werden. Das zentrale Anliegen von **VETResearch** ist die Umsetzung forschungsorientierter Lehre. Studierende sollen frühzeitig für Forschung in der Tiermedizin begeistert werden, um damit ihre Zukunftsperspektiven um ein wichtiges Feld mit guten Berufsaussichten zu erweitern.

Das erste eigene Forschungsprojekt kann in seiner Wirkung auf Studierende gar nicht hoch genug eingeschätzt werden. Deshalb war es auch wichtig, exzellente Projektideen auszusuchen und zu fördern. Durch optimale Betreuung der Studierenden, klar konzipierte Projekte und letztlich engagierte Studierende und Betreuer wurden ganz hervorragende Ergebnisse erzielt. Kein Wunder also, dass sich aus den kurzen Forschungsprojekten bereits einige Anknüpfungspunkte und sogar definitive Dissertationsprojekte entwickelt haben. **VETResearch** ist daher schon in der ersten Runde sehr erfolgreich gestartet und soll zukünftig weiter ausgebaut werden.

Ein ganz herzliches Dankeschön an alle, die sich sehr für das Gelingen von **VETResearch** eingesetzt haben: insbesondere an Frau Dr. Beitz-Radzio als zentrale Koordinatorin des Projektes, an die stets für alle Fragen offene Mitarbeiter der Universitätsverwaltung, an die sehr engagierten Betreuer der Projekte, die durch viel Arbeit und persönlichen Ehrgeiz **VETResearch** erst realisiert haben und letztlich an die ganz hervorragenden, hoch motivierten Studierenden.

Prof. Dr. Thomas Göbel
Studiendekan

Grußwort

VETResearch ist ein innovatives Konzept, mit dem Studierenden der Tiermedizin früh Einblicke und erste Erfahrungen in verschiedensten Forschungsrichtungen geboten werden. Damit ergänzt **VETResearch** in idealer Weise unser breites Angebot an Wahlpflichtveranstaltungen, in denen der theoretische Hintergrund vermittelt wird. Diese Online-Broschüre fasst die Ergebnisse der ersten Projekt-Runde zusammen, die auch bei einem Retreat vorgestellt wurden. Ich war sehr begeistert zu sehen, wie gut die Projekt-Angebote angenommen und wie professionell die Ergebnisse präsentiert und diskutiert wurden. In unseren Forschungsschwerpunkten Translationale Medizin, Reproduktionsbiologie, Infektion und Immunität sowie Veterinary Public Health, aber auch in Gebieten wie der Paläoanatomie und Geschichte der Tiermedizin haben Tiermediziner hervorragende berufliche Perspektiven. Ich bin überzeugt davon, dass **VETResearch** entscheidend dazu beitragen kann, unseren Studierenden diese attraktive Sparte des tiermedizinische Berufstandes näher zu bringen. Insofern kann ich den Initiatoren von **VETResearch**, vor allem unserem Studiendekan Prof. Dr. Thomas Göbel, nur gratulieren.

Prof. Dr. Eckhard Wolf
Forschungsdekan

Rule-Outs in der Buiatrik

Lena van Buggenum, Catherine Gutfried, Svenja Gerbig, Theresa Brünger, Dorothee Depka, Katharina Häffelin, Daniela Schmidle

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
 Betreuer: Herr Dr. Stadler, Frau Prof. Dr. Knubben-Schweizer

Diese Art der Wissensvermittlung in der Medizin entspricht im Sinne der Praxisorientierung genau der Herangehensweise an einen Patienten im klinischen Alltag. Früher wurden hauptsächlich die verschiedenen Krankheiten gelehrt ohne das strukturelle Herangehen zu vermitteln, das in der Praxis notwendig ist. Die Lehrbücher sind – vor allem außerhalb des Kleintierbereichs – immer noch „herkömmlich“ aufgebaut. Durch die rasante Entwicklung in der Forschung und die immer größere Anzahl an diagnostischen Möglichkeiten, kann durch reines Auswendiglernen von Krankheiten keine Grundlage für gut ausgebildete Tierärzte geschaffen werden. Aus diesem Grund ist der Erwerb dieser Denkweise so relevant. Erst durch das Verstehen der physiologischen Vorgänge und die sorgfältige Betrachtung der Untersuchungsbefunde unter Einbeziehung der geschilderten Hauptsymptome, kann ein strukturiertes Aufarbeiten des Patienten erfolgen. Genau dieses Vorgehen möchten wir vermitteln. Darauf wird auch während der Teilnahme an der klinischen Rotation sehr großer Wert gelegt.




LMU
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN


TIERÄRZTLICHE FAKULTÄT


Klinik für Wiederkäuer
mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Rule-Outs in der Buiatrik – ein studentisches Projekt im Rahmen des Lehre@LMU Programms

L. v. Buggenum, C. Gutfried, S. Gerbig, T. Brünger, D. Depka, K. Häffelin, D. Schmidle,
 O. Stadler, G. Knubben-Schweizer

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der LMU München

Einleitung

Grundlage jeder Diagnostik und der daraus abgeleiteten Therapie ist die klinische Untersuchung. Für jeden der dabei erhobenen unphysiologischen Befunde gibt es verschiedene Ursachen die zusammen genommen die Erstellung einer Differentialdiagnosenliste ermöglichen. Die Erstellung einer solchen Liste ist für junge Assistierende in der Praxis jedoch schwierig. Der Umfang einer solchen Differentialdiagnosenliste hängt wesentlich von der Erfahrung und auch dem Wissen des Untersuchenden ab. Um zu einer möglichst vollständigen Differentialdiagnosenliste zu kommen, müssen wenig erfahrene Untersucher/-innen öfters Literatur heranziehen als die mehr Erfahrenen.

Da die meisten Lehrbücher nach Krankheiten, nicht aber nach Symptomen gegliedert sind, kann das Literaturstudium unter Umständen viel Zeit in Anspruch nehmen. Daher ist die Möglichkeit, über „Probleme“ bzw. über Symptome zu einer möglichst vollständigen Differentialdiagnosenliste zu gelangen, von großem Wert. Aus diesem Grund soll für das Fach „Innere Medizin der Wiederkäuer“ ein Katalog bestehend aus initial 20 Rule-Outs erstellt werden.

Material und Methoden

Studierende werden in Tandems jeweils mindestens zwei Rule-Outs ausarbeiten. Diese werden auf Grundlage der Standardliteratur erstellt und durch aktuelle Publikationen aus Fachzeitschriften ergänzt. Die fachliche Betreuung erfolgt durch Frau Prof. Knubben, die technische Betreuung durch Herrn Dr. Stadler. Den Studierenden werden neben der Literatur auch Arbeitsplätze zur Verfügung gestellt. Die Gesamtprojektdauer beträgt voraussichtlich 24 Monate.

Nutzen für die Lehre

Ein wichtiges Merkmal dieses Projekts ist, dass die Studierenden ganz gezielt ihre eigenen Ideen einbringen, so ist z.B. die Idee der Arbeit in Tandems gleich bei der Kick-Off-Veranstaltung in einem Brainstorming entstanden.

Ebenso sollen die Rule-Outs ganz bewusst aus der Sicht der Studierenden ausgearbeitet werden. Dies steht im Gegensatz zu den Rule-Outs der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München¹, diese folgen jeweils der Logik eines Fachspezialisten.

Das erste Ziel des Gesamtprojekts ist es, die Rule-Outs in Form eines „Wiki“ im Rahmen des Online-Rinderskripts² der Klinik für Wiederkäuer zu veröffentlichen. Das zweite Ziel besteht aus einer Form-Analyse der Rule-Outs in Hinsicht auf Unterschiede „Studierende vs. Fachspezialisten“ mit anschließender Publikation in einer Fachzeitschrift.

Bearbeitete RuleOuts

- Abmagerung (Kuh/Kalb)
- Ataxie
- Auftreibung des Bauches
- Azotämie
- Durchfall beim Kalb
- Durchfall beim erwachsenen Rind
- Dyspnoe
- Festliegen
- Fieber
- Husten
- Ikterus
- Juckreiz
- Ketonurie
- Kolik
- Krämpfe
- Ödeme
- Plötzliche Todesfälle
- Proteinurie
- Speicheln
- Veränderungen der Maulschleimhaut





¹ Hartmann K, Berg G, Schmid S. Rule-Outs für die Kleintiermedizin. 2010. Schlütersche Verlag, Hannover.

² Rinderskript. Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung, LMU München. 2013. <http://www.rinderskript.net>.

Biomechanische Eigenschaften von Klauenhorn bei Mastbullen mit unterschiedlichem Rohproteinanteil in der Mastration

Benjamin Faller

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Betreuer: Herr PD Dr. Maierl, Frau TÄ Lennermann

Das Ziel des Projekts ist es herauszufinden, ob und gegebenenfalls welchen Einfluss unterschiedliche Rohproteinanteile in der Mastration auf biomechanische Eigenschaften des Klauenhorns haben.

Der umfassendste Teil meiner Arbeit bestand darin, zur Entwicklung der Verfahrenstechnik bzw. Analysemethodik beizutragen und diese zu optimieren.

Neben grundsätzlich theoretischen und praktischen Fragestellungen, die von den beteiligten Personen erörtert wurden, bekam ich einen Einblick in den theoretischen Teil der wissenschaftlichen Arbeit.

Von 60 Mastbullen (Rasse Deutsches Fleckvieh) wurden zufallsverteilt je eine vordere und eine hintere Klaue verwendet und unter Berücksichtigung der unten genannten Punkte eingefroren. Diese Tiere waren in der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft bis zu einem Alter von durchschnittlich 500 Tagen gemästet worden. Hierbei waren verschiedene Mastrationen mit einem Rohproteinanteil von 9%, 11%, 13%, 15% und 17% an Gruppen von je 10 Tieren verfüttert worden.

Bei der praktischen Arbeit galt es zunächst, das Problem zu lösen, die Proben bei den einzelnen Schritten so schonend zu bearbeiten, dass die Belastung des Materials minimiert wurde, um Artefakte zu vermeiden. Zwischen den Bearbeitungsschritten wurde das Probenmaterial, wenn nötig, zur Lagerung eingefroren und eventuell noch in halb gefrorenem Zustand zur Analytik vorbereitet. Beim Einfrieren der Klauen bzw. der Hornproben zur Aufbewahrung musste jedoch ein Wasserverlust durch Gefrierbrand vorgebeugt werden, da der Wassergehalt maßgeblich die biomechanischen Eigenschaften des Klauenhorns beeinflusst. Aus diesem Grund wurden alle Hornproben in Beuteln mit reichlich Wasser eingefroren. So konnte der ursprüngliche Wassergehalt des Horns erhalten und eine Verfälschung der Horneigenschaften vermieden werden.

Für eine reproduzierbare Probenentnahme in Anlehnung an die „Bestimmungen für die Verleihung und Führung des DLG-Qualitätssiegels für Mittel zur Klauenpflege und Klauenhygiene“ wurde eine Schablone angefertigt, die es ermöglichte, die Hornproben aller Klauen an gleicher Lokalisation und mit gleicher Orientierung der Hornröhrchen zu entnehmen. Mithilfe dieser Schablone wurden aus den Klauen dorso-abaxial quadratische Hornproben mit einer Kantenlänge von ca.



2 cm gesägt. Mit einem Skalpell und einer groben Flex-Scheibe wurden die noch anhaftenden Lederhautreste entfernt. Die nur noch aus Klauenhorn bestehenden Proben mussten in einem weiteren Schritt mithilfe eines Dickenhobels plan gehobelt werden. Hierbei war die Befestigung des Probenmaterials zunächst das größte Problem. Eine mechanische Spannvorrichtung zur Fixierung stellte sich relativ schnell als ungeeignet heraus. Eine Befestigung der Hornproben mit Klebstoff in Vertiefungen einer Zuführeinrichtung aus Holz bewährte sich dagegen. Aus den entstehenden Hornplättchen mit einer Dicke von 2 mm können anschließend je 2 Prüfkörperchen ausgefräst werden.

Zu diesem Zweck wird eine computergesteuerte Portalfräse CNC Portalfräse GoCNC Hobby A4 Basic, www.gocnc.de, verwendet. Diese wird mit Hilfe einer Grafikdatei im für Plotter verwendbaren HPGL-Format (Corel Draw) gesteuert. Die Herstellung einzelner Prüfkörper konnte bereits fertig gestellt werden. Für die Produktion von Prüfkörperchen im großen Maßstab, muss noch eine dementsprechende Datei erstellt und angepasst werden.

Die fertigen Prüfkörperchen haben eine Größe von 5x10 mm². Eine mittige, sanduhrförmige Taillierung mit Materialbreite von 2 mm dient bei den anschließenden Zugversuchen als Sollbruchstelle. Die Querschnittsfläche an der Taillierung beträgt 2x2 mm².

Die biomechanischen Parameter werden in der Materialprüfmaschine Z 010 (Firma Zwick, Ulm) anhand der Daten ermittelt, die während des Versuchs aufgezeichnet werden.

Bestimmt werden soll zunächst vor dem Zugversuch die Härte der Probe in Grad Shorehärte C. Im Zugversuch selbst werden dann das Elastizitätsmodul des Klauenhorns und die maximale Kraft bei Bruch der Probe ermittelt.

Ein Großteil meiner Mitarbeit an diesem Projekt bestand darin, mich in die die Software der Maschine sowie das Programm zur Erstellung der Dateien einzuarbeiten und die entsprechenden Dateien zu generieren.

Nach erfolgreicher Beprobungen kann mit der Analyse und den Auswertungen begonnen werden.

Weitere Studien zu verschiedenen Fragen der Hornqualität, auch beispielsweise des Pferdes, sind außerhalb dieses Projekts angedacht, um die Erfahrungen in dieser schwerpunktmäßig methodischen Arbeit fort zu führen und systematisch zu vertiefen

Effekt der Phosphatbindung im Futter bei herbivoren Reptilien mit Niereninsuffizienz

Caroline Fritz

Medizinische Kleintierklinik

Betreuer: Frau PD Dr. Kölle

Ziel der Studie:

Die Studie diente dem Zweck, Verträglichkeit, Dosisfindung, Applikationsmethode, Wirksamkeit sowie Nebenwirkungen des Phosphatbinders Renalzin® bei Reptilien herauszufinden.

Versuchsaufbau und Versuchsablauf:

Den Tieren wurde täglich über einen Zeitraum von 4 Wochen eine individuell eingewogene Futtermischung aus Wildkräutern (3% des KGW) unter Zugabe der individuell errechneten Renalzin® – Dosis über das Futter verabreicht.

Täglich wurden das Allgemeinbefinden, die Futteraufnahme, die Akzeptanz und die Temperatur (Umgebungstemperatur, Tieretemperatur) sowie wöchentlich das Körpergewicht protokolliert. Wöchentlich wurde die Auswertung von Blutproben (Ca, P, Harnsäure, Harnstoff) der Tiere durchgeführt.

Patientenmaterial:

4 Landschildkröten, 1 Bartagame, 4 Chamäleons
(Auswahlkriterium: P > 1,3mmol/l bzw. inverses Ca:P – Verhältnis im Serum)

Ergebnisse:

Renalzin® wurde von den Tieren gut vertragen, lediglich bei den Chamäleons zeigte sich eine Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Bei der Dosisfindung diente die Herstellerempfehlung als Anhaltspunkt, wobei jedes Tier pro 100g Futtermischung 400mg Lanthanarbonat (1ml Renalzin® enthält 200mg Lanthanarbonat) erhielt. Renalzin® wurde über das Futter verabreicht und problemlos mit der Ration aufgenommen (keine Zwangsfütterung erforderlich). Bei allen Probanden konnte eine Senkung des Serumphosphatwertes erzielt werden.



Diskussion:

Im saisonalen Verlauf kann es zum natürlichen Absinken des Serumphosphatwertes kommen. Die Nährstoffabsorption im Dünndarm ist stark von der Umgebungstemperatur und der Spezies abhängig (Poikilothermie/POTZ).

Die verabreichte Renalzin® – Dosis richtet sich nach dem Trockensubstanzgehalt einer Ration für Katzen (carnivor); für die Studie wurden fast ausschließlich herbivore Tiere verwendet.

Der genaue Trockensubstanz- und Nährstoffgehalt einer Ration mit **Wildkräutern** ist nicht exakt zu bestimmen (jahreszeitliche Schwankung).

Für eine zuverlässige Aussagekraft über die Wirksamkeit fanden sich leider zu wenig Studienteilnehmer.

Die Anwendung bei Chamäleons führte zur Verschlechterung des Allgemeinbefindens (in Fachkreisen werden physiologisch hohe Serumphosphatwerte diskutiert).

Danksagung:

Ein herzliches Dankeschön geht an die Auffangstation für Reptilien e. V. für die gute Zusammenarbeit. ■

Neue *in vitro* Methoden zur Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion mit IBDV

Simon Früh

Institut für Tierphysiologie

Betreuer: Herr Prof. Dr. Kaspers, Frau Dr. Schermuly, Frau Kohn

Hintergrund:

Infectious Bursal Disease (=Gumboro-Krankheit) als weltweit vorkommende Infektionskrankheit der jungen Hühner.

Erreger ist das Infectious Bursal Disease Virus (Avibirnavirus).

Im Organismus sind die Zielzellen des Virus fast ausschließlich proliferierende B-Lymphozyten. Bisherige Erkenntnisse über das Virus stammen jedoch aus *in vivo* Experimenten (tierschutz-relevant) oder aus *in vitro* Zellkulturen mit Zellen, die keine Zielzellen des natürlichen IBDV-Infektionszyklus sind.

Zielsetzung:

Mit Hilfe des B-Zell-stimulierenden Faktors „CD40Ligand“ soll ein *in vitro* Zellkultursystem für IBDV-infizierte B-Lymphozyten entwickelt werden.

Methoden:

- Das Virus wird in CEF-Zellen vermehrt und aus dem Überstand ein eigener Virussock zur weiteren Verwendung hergestellt.
Zum Test auf Infektiosität wurde eine Virus-Titration des Virussocks durchgeführt und die überlebenden CEF-Zellen mittels Neutralrot angefärbt.
- Gewinnung von B-Lymphozyten aus der Bursa Fabricii eines jungen Huhnes mittels Dichtegradientenzentrifugation
In vitro Stimulation mit CD40Ligand und Infektion mit IBDV (10% bis 0,01% des Virussocks)
Vergleich der Anzahl lebender Zellen zwischen IBDV-infizierten und nicht infizierten Zellen.
Auswertung an Tag 2 mittels Durchflußzytometrie nach Lebend/Tot-Färbung.
- Analoges Vorgehen zu (2). Zusätzliches Anfärben durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen virale IBDV-Antigene VP2, VP3 und VP4.
Auswertung an Tag 2 nach Infektion mittels Durchflußzytometrie.

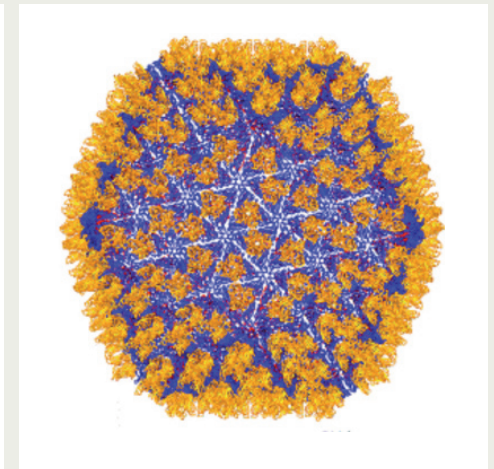
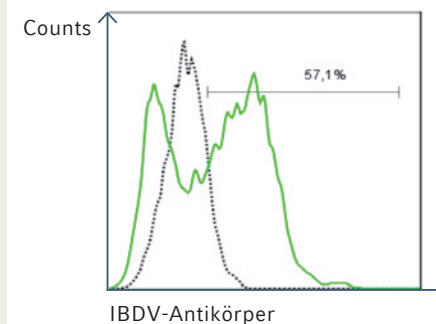


Ergebnis:

- Nach 0,1% IBDV-Infektion überlebten *in vitro* 1,8% der Lymphozyten mittels CD40Ligand im Vergleich zu 6,6% in der Mediumkontrolle mit 0% IBDV.
- Nach Stimulation mit CD40Ligand fanden sich 2 Tage nach 0,1% IBDV-Infektion in 57,1% der lebenden Lymphozyten virale IBDV-Antigene.

Zum ersten Mal konnte IBDV in lebenden B-Lymphozyten in Zellkultur nachgewiesen werden. Durch Stimulation mit CD40Ligand können B-Zellen *in vitro* zur Erforschung detaillierter Wirt-Pathogen-Interaktionen genutzt werden.

Zu (3.): 0,1% IBDV



Die Entwicklung der tierärztlichen Geburtshilfe im 19. und 20. Jahrhundert anhand der Instrumente für Schubkraft und Drehung

Franziska Heer

Institut für Paläoanatomie, Domestikationsforschung und Geschichte der Tiermedizin

Betreuer: Frau PD Dr. Goebel, Herr Prof. Dr. Peters

Inhalt

1. Kurzer Abriss über den Stand der tierärztlichen Geburtshilfe bis zum 19. Jahrhundert
2. Beschreibung ausgewählter Instrumente für Schubkraft und Drehung
3. Entwicklung der Geburtshilfe im 19. und 20. Jahrhundert anhand der beschriebenen Instrumente

Zu 1.: Kurzer Abriss über den Stand der tierärztlichen Geburtshilfe bis zum 19. Jahrhundert

Tieren in Geburtsnot wurde schon seit jeher Hilfe geleistet. Diese Aufgabe fiel vermutlich überwiegend den Bauern und Hirten zu, welche über die anatomischen Verhältnisse innerhalb des Mutterleibs so gut wie keine Kenntnisse hatten (Baumeister, 1844, S. 3). Aristoteles zeigte mit seinen Mitteilungen über Eihäute, Ernährung und Lage des Fetus den damaligen Wissensstand in Griechenland auf; über den Geburtsvorgang an sich schrieb er jedoch wenig. Die römischen Landwirtschaftsschriftsteller wie Columella befassten sich auch mit Geburtshilfe und Missbildungen und beschrieben z.B. den Abort, fehlerhafte Lagen, Embryotomie, Nachgeburtverhaltung und Uterusprolaps (Richter/Götze, 1950, S. 1). Die Geburtshilfe als wissenschaftliches Thema entwickelte sich bis zur zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts nicht wesentlich. Die Forschung über Geburtshilfe wurde erst Ende des 18. Jahrhunderts wieder aufgenommen. Es wurden erstmals Geburtsstricke und Haken zur Geburtshilfe eingesetzt.

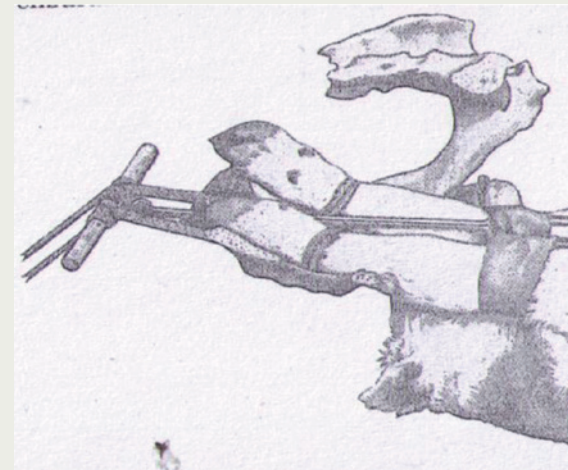
Mit der Gründung tierärztlicher Ausbildungsstätten in Deutschland Ende des 18. Jahrhunderts wurde der Grundstein für geburtshilflichen Unterricht der Tierärzte und die Veröffentlichung der Erfahrungen gelegt (Richter/Götze, 1950, S. 2). Zuerst wurden einzelne Themen in Zeitschriften dargelegt, und bald darauf entstanden die ersten Lehrbücher über die tierärztliche Geburtshilfe (Ludwig 1806, Jörg 1808). Insgesamt kann man sagen, dass die tiermedizinische Geburtshilfe der humanmedizinischen etwas hinterherhinkte, da das Instrumentarium sich in diesem Bereich nicht wie in einigen anderen Fachbereichen für Tier und Mensch verwenden lies (Hauptner, 1930, S. 59). Im folgenden Abschnitt sollen nun einige wichtige charakteristische Instrumente des 19. und 20. Jahrhunderts für Schubkraft und Drehung dargestellt werden. Da dieses Instrumentarium im Kleintierbereich keine Relevanz hat, liegt das Hauptaugenmerk auf den Geräten aus der Großtiergeburtshilfe.



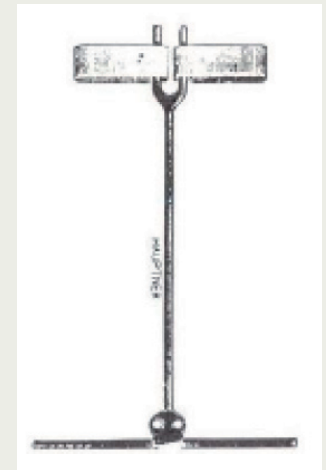
Zu 2.: Folgende Instrumente für Schubkraft und Drehung wurden beschrieben

- Stoßbecher nach Binz, deutlich vor 1900
- Geburtskrücke nach Günther, 1816/1830
- Geburtskrücke nach Kaiser, 1895
- Idealrepositor nach Kaiser, 1909
- Kolbenkrücke nach Becker, 1919
- Krücke nach Reindl, 1916
- Schlingenkrücke nach Kühn, 1933
- Retroverseur nach Darreau, 1852
- Torsionsgabel nach Caemmerer, 1932
- Torsionshaken nach Kalchschmidt, 1951

Darstellung aus dem Werk
„Lehrbuch der Tiergeburtshilfe“
von Richter/Götze



Torsionsgabel nach
Caemmerer aus Erdmann,
1964, S. 87 (Nr.7)



Zu 3.: Entwicklung der Geburtshilfe im 19. und 20. Jahrhundert anhand der beschriebenen Instrumente

Da Schubkraft und Drehung hauptsächlich in der Großtiergeburtshilfe, konzentriert sich der folgende Text auf den Großtierbereich.

Nachdem immer mehr fundierte Kenntnisse über die Lage des Fetus und den Ablauf der Geburt bestanden, waren auch mehr Fähigkeiten auf dem Gebiet der Geburtshilfe durch den Tierarzt gefragt. Im 19. Jahrhundert musste oftmals der Fetus mangels medikamenteller Unterstützungsmöglichkeit mit reiner Körperkraft wieder in den Mutterleib zurückgedrängt werden um einen geburtshilflichen Eingriff überhaupt zu ermöglichen. Dieser Schritt wurde nur mit den Armen des Geburtshelfers vollzogen. Da aber oftmals eine Armlänge nicht ausreichte, wurde ganz praktisch gedacht und Anfang des 19. Jahrhunderts eine einfache Astgabel verwendet, um die Lage des Jungtieres besser korrigieren zu können (Franck, 1876, S. 324). Da man Instrumente mehrmals verwenden wollte, wurde der ebenfalls aus Holz gefertigte stabile Stoßbecher nach Binz entwickelt. Mit zunehmendem geburtshilflichem Eingreifen der Tierärzte auf verschiedenen Betrieben waren aber Instrumente aus Holz nicht mehr zeitgemäß weil diese schwer sauber zu halten waren; daher kamen Instrumente aus Metall auf den Markt (selbst der Stoßbecher wurde im Hauptnerkatalog von 1913 auch in Vollmetall angeboten). Diese sollten auch variabler einsetzbar sein als der Stoßbecher, mit dem man ja nur Fehlstellungen beheben konnte, bei denen sich der Fetus in Vorderendlage befand und keine Extremitäten mit eingetreten waren (Erdmann, 1964, S. 80). Aus diesem Gedanken heraus wurden die Geburtskrücken entwickelt. Der Prototyp der Krücken war sozusagen die Krücke nach Günther. Da aber die Arbeitssicherheit und Schonung der Kräfte immer wichtigere Aspekte wurden (Hauptnerjubiläumskatalog 1930, S. 60), wurde diese Krücke des Öfteren modifiziert, sodass sie mittels Spitze oder Dorn nicht mehr so leicht abgleiten konnte und sogar noch durch ein Gewinde verlängert werden konnte (Krücken nach Meyer, Rauch, Williams, Trautvetter). Etwa zur selben Zeit war das Wissen über die Torsio uteri schon erheblich gewachsen und der Retroverseur entwickelt worden, welcher aber umständlich in der Anwendung war und somit die Aufdrehung lange Zeit mit Wälzen erfolgte (Franck, 1876, S. 240). Die Krücken jedoch entwickelten sich mit den Ansprüchen an die Geburtshilfe weiter. Der Tierarzt musste immer mehr Höfe anfahren bzw. anreiten und konnte nicht alle für ihn nützlichen Krücken auf einmal mitschleppen. Die Krücke nach Kaiser war im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Krücken vielseitig einsetzbar, da man nur die verschiedenen Aufsätze im Gepäck haben musste anstelle vieler verschiedener Instrumente. Diesem Beispiel folgten auch die Krücken nach Reindl und Fründt. Die bisherigen Krücken, obwohl sie leicht zu reinigen und



praktisch im Transport waren, boten aber immer noch nicht genügend Sicherheit gegen das Abrutschen. So entwickelte Kaiser seinen Idealrepositor mit den beweglichen stumpfen Haken, die bei zunehmendem Druck das Junge ohne es zu verletzen immer fester packten. Ein Jahrzehnt lang war die Krücke nach Kaiser eines der am meisten eingesetzten Instrumente für Schubkraft (Erdmann, 1964, S. 78). Noch mehr Stabilität gab dann die erste Krücke mit einem integrierten Seil, und zwar die Krücke nach Becker 1919. Damit konnte eine Gliedmaße sicher tief im Mutterleib angeschleift werden und sogar gleichzeitig Druck und Zug ausgeübt werden. Hiermit nahm die Vielseitigkeit der Instrumente noch einmal deutlich zu. Am Ende der Entwicklung stand dann die Kühn'sche Schlingenkrücke, die alle praktischen Eigenschaften in sich vereinte (Richter/Götze, 1950, S. 232/233). Diese Krücke hat sich als einzige bis in die heutige Zeit gehalten. Etwa zur gleichen Zeit als die Kühn'sche Krücke entwickelt wurde, wurden auch die Instrumente zur Behebung der Torsio uteri wieder aktuell, da hier auch die Zeit- und Personeneinsparung der Behebung eine Rolle spielte. So kam die Gabel nach Caemmerer auf den Markt, die leicht in der Anwendung und auch gut zu reinigen und transportieren war. Die Manschetten hielten aber nicht immer der Drehbewegung stand und es war auch nicht immer ganz leicht die Gabeläste in die Manschetten einzufädeln (Erdmann, 1964, S. 84). So entwickelte Kalchschmidt einen einfachen Haken, der nebenbei auch zur Haltungsberichtigung genutzt werden konnte und der in ein in Achtertouren angelegtes reißfestes Seil eingehängt wurde. Die zwei Instrumente zur Behebung der Torsio haben sich bis heute gehalten und werden je nach persönlicher Neigung des Geburtshelfers verwendet (Erdmann, 1964, S. 85).

Im Verlauf des 20. Jahrhunderts wurden dann Medikamente zur Tokolyse oder Wehenförderung entwickelt, welche das Zurückdrängen und Ausziehen des Fetus erheblich erleichterten, sodass der Einsatz von Instrumenten nicht mehr so häufig nötig war. Durch gezielte Zucht und künstliche Besamung wurden Komplikationen bei der Geburt allgemein reduziert.

Zusammenfassend kann man folgende Motive zur Weiterentwicklung der Geburtshilfe und ihres Instrumentariums nennen:

- leichtes Reinigen der Instrumente
- leichte Zerlegbarkeit und Verlängerungsmöglichkeit – sicheres Arbeiten am und im Tier
- Kräfteschonung des Geburtshelfers
- kleines Transportgewicht
- vielfältige Einsatzmöglichkeit
- einfache Anwendung

Regulative Mechanismen bei der klinischen und subklinischen Endometritis beim Rind

Anika Helfrich
 Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
 Betreuer: Herr Dr. Weber, Frau Hilmer, Herr Prof. Dr. Zerbe



LEHRE@VET
 Research



Primeroptimierung für die CCL5-Genexpressionsanalyse

Helfrich A, Zerbe H, Kirsch S, Weber F

Zielsetzung:

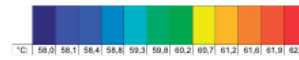
Im Rahmen der Forschung nach diagnostischen Markern zur zuverlässigen Erkennung subklinischer Endometritiden wird mittels RT-PCR an isolierten Endometriumseithelzellen die Expression verschiedener Chemokine gemessen. Da die Durchführung der RT-PCR für das Gen CCL5 bislang zu unregelmäßigen Ergebnissen der Schmelzkurve der Negativkontrolle geführt hat, wird im Rahmen von VETResearch eine Primeroptimierung durchgeführt.

Verfahren:

Zur Primeroptimierung werden in der Real-Time-PCR bekannte Verdünnungsstufen (10^6 – 10^2 Kopien/ μ l) des Standards des Gens CCL5 sowie entsprechende Negativkontrollen verwendet. Dabei werden folgende Parameter verändert:

Temperatur:

Temperaturgradient für die Phase der Primer-anlagerung von 58 - 62°C, verteilt über 12 Spalten im PCR-Cycler



Primerkonzentrationen:

Variation des Verhältnisses von forward- zu reverse-Primer (ursprünglich: 0,8 μ l:0,8 μ l)

Mastmix:	Primer for., c = 5 μ mol/l:	Primer rev., c = 5 μ mol/l:
C1	1,50 μ l	0,25 μ l
C2	1,50 μ l	1,50 μ l
C3	1,50 μ l	4,50 μ l
C4	4,50 μ l	0,25 μ l
C5	4,50 μ l	1,50 μ l
C6	4,50 μ l	4,50 μ l

Tabelle 2: Verhältnis von forward- zu reverse-Primer

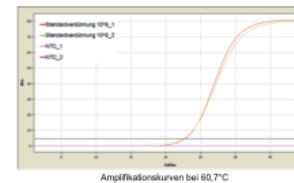
Primersequenz:

Konstruktion und Kombination neuer Primervarianten, die im Vergleich zu den ursprünglichen um +2 oder -2 Nukleotide im CCL5-Gen verschoben sind

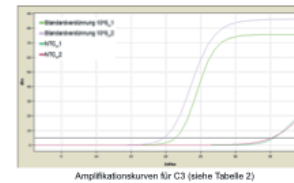
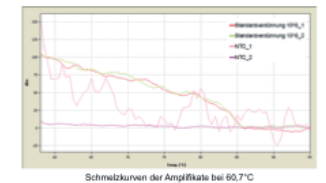
	Primer for. +2	Primer for.	Primer for. -2
Primer rev. +2	S1	S2	S3
Primer rev.	S4	S5	S6
Primer rev. -2	S7	S8	S9

Tabelle 3: Kombination neuer Primervarianten

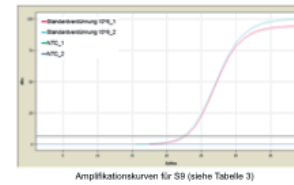
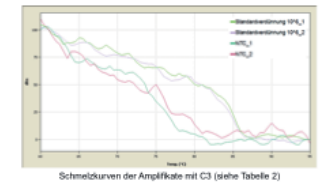
Ergebnisse:



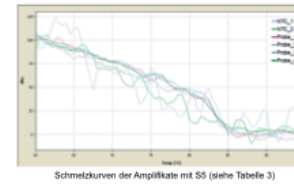
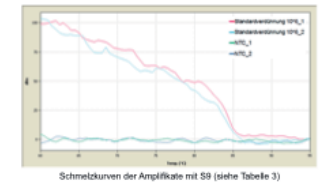
- Temperatur:**
- Optimale Werte für 60,7°C
 - beide NTC negativ
 - gute Doppelwerte
 - $C_t = 22,6$
 - Schmelzkurven der Standards mit deutlichem Fluoreszenzabfall bei 84°C
 - Verlauf der Schmelzkurve für NTC_1 unregelmäßig



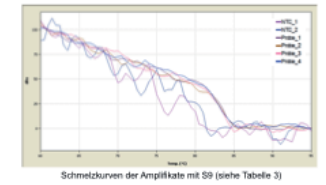
- Primerkonzentrationen:**
- Keinerlei Verbesserung gegenüber dem ursprünglich verwendeten Verhältnis
 - NTC positiv
 - schlechte Doppelwerte
 - $C_t = 20,5$
 - Schmelzkurven regelmäßig, aber auch NTC enthält Dimere



- Primersequenz:**
- Optimale Werte für S9 (siehe Tabelle 3)
 - beide NTC negativ
 - gute Doppelwerte
 - $C_t = 22,4$
 - Schmelzkurven der Standards mit deutlichem Fluoreszenzabfall bei 84°C
 - Schmelzkurven der NTCs zeigen keine Fluoreszenz



- Kontrolle:**
- Direktvergleich von ursprünglicher Primersequenz (S5 aus Tabelle 3) und S9 an isolierten Endometriumseithelzellen:
- Schmelzkurven der Proben mit deutlichem Fluoreszenzabfall bei 84°C
 - Bekannte Unregelmäßigkeiten in den Schmelzkurven der NTCs beider Ansätze**



Fazit:

- Der unregelmäßige Verlauf der Schmelzkurven der Negativkontrollen entsteht durch Auflösung unspezifischer, doppelsträngiger DNA-Produkte und anschließende Zusammenlagerung spezifischer Sequenzen zu Doppelsträngen. Ursächlich hierfür ist die Bildung von Primerdimeren.
- Da diese Primerdimere auch in unbekanntem Proben entstehen, sind die Ergebnisse der PCR nicht brauchbar.
- Die verwendeten Primer lassen keine effiziente Optimierung der PCR-Ergebnisse zu. Das Design völlig neuer Primer ist erforderlich.

Dreidimensionale (3D-)Rekonstruktionen als Ergänzung im anatomischen Unterricht am Beispiel des Skelettes der Schultergliedmaße von Hund und Katze

Johanna Helmke
Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie
Betreuer: Frau Prof. Dr. Poulsen Nautrup

Dreidimensionale (3D-)Rekonstruktionen als Ergänzung im anatomischen Unterricht am Beispiel des Skelettes der Schultergliedmaße von Hund und Katze

Johanna Helmke, Matthias Kästner, Cordula Poulsen Nautrup
Anatomie, Histologie und Embryologie, Veterinärwissenschaftliches Department, Ludwig-Maximilians-Universität München

Einleitung

Seit fast 20 Jahren werden digitale virtuelle 3D-Skelette von Menschen und von verschiedenen Tierarten meist kommerziell offeriert; inzwischen gibt es zahlreiche Anbieter derartiger Modelle insbesondere von Pferd und Hund sowie seltener von der Katze auf der Basis sowohl von Computertomografien (CT) als auch Fotografien^{1, 2}. Allerdings wurden bisher grundsätzlich die Skelette von adulten Tieren vorgestellt und als Beispiel für kranken nur langbeinige Hunde³ rekonstruiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Knochen der Schultergliedmaße von Hund und Katze vergleichend, anatomisch korrekt dargestellt werden. Zudem wurde dem langbeinigen Hund der kurze, chondrotyrophe Dackel gegenübergestellt und das Skelet von Welpen mit dem von erwachsenen Hunden und Katzen verglichen.

¹ www.the3dstudio.com/
² www.biotrains.com/de/veterinary-dog-anatomy.asp
³ www.fur3d.com/

Material und Methoden

Als Grundlage dienten isolierte Knochen von vier adulten, lang- und kurzbeinigen Hunden, acht adulten Katzen, drei Knochen-Knoepel-Präparate von Hundewelpen sowie tieferen Gliedmaßen von vier Hunde- und Katzenwelpen unterschiedlichen Alters. Von den Knochen wurden Fotografien und CT's, von den intakten Gliedmaßen ausschließlich CT's erstellt, (Alle CT's wurden von Dr. A. Brühshwein, Dipl. ECVDI, und TA C. Neudecker in der **Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik** angefertigt.)

Digitale Darstellungen:

- **Autostereografien** (angefertigt von den Studentinnen L. Büntjen, V. Kleininger und S. Schabmayer) aus kontrastreichen Graustufenaufnahmen oder echten Tiefenbildern nach 3D-Oberflächenrekonstruktion
- **3D-Darstellungen** in Form von Volumen- und Oberflächenrekonstruktionen sowohl nach 360°-Fotografien als auch CT's
- **Stereografien** aus mit Doppelinstrumenten aufgenommenen Fotos und nach Oberflächenrekonstruktion aus CT's

Ergebnisse

Autostereografien (Abb. 1 und 2)

Das Betrachten von Autostereografien (Magic Eye®-Illusionen) macht Spaß und motiviert so die Studierende, sich weiter mit der Anatomie auseinanderzusetzen wie hier mit den tierischen Unterschieden der kaninen und felinen Scapula.

Autostereografien können aus zweidimensionalen Graustufenbildern mit starken Kontrasten angefertigt werden. Dies ist mit mäßigem Zeitaufwand und mit geringen Grafikkennnissen möglich. Die Nutzung von zweidimensionalen Fotos oder Grafiken als Grundlage für Autostereografien ergibt gute Resultate bei Texten (Abb. 1 und 2), führt aber bei der Wiedergabe von Knochen zu verwirrenden Artefakten. Das heißt, für Autostereografien vom Skelett mussten echte Tiefenbilder (Abb. 1¹ und 2¹) erzeugt werden. Dies gelang nur mit einer professionellen 3D-Animations-Software (Maya von Autodesk) und setzt Grafikerfahrungen voraus. Die Grundlage für die Berechnung der Tiefenbilder bildeten digitale 3D-Dateien aus CT's.

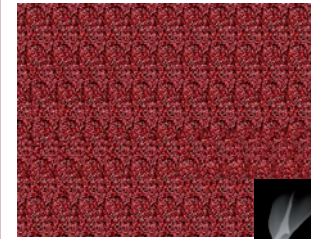


Abb. 1: Autostereografie einer Scapula nach dem Tiefenbild rechts. Identifizieren Sie bitte die Tierart! (Die richtige Antwort finden Sie im Magic Eye®-Bild.)

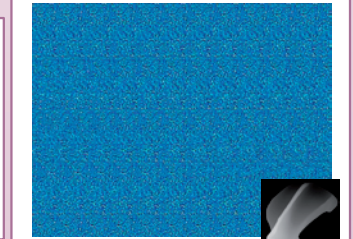


Abb. 2: Autostereografie einer Scapula nach dem Tiefenbild rechts. Identifizieren Sie bitte die Tierart! (Die richtige Antwort finden Sie im Magic Eye®-Bild.)

3D-Darstellungen (Abb. 3 bis 6)

Im Vergleich zu konventionellen Fotos und zweidimensionalen Grafiken verbessern bereits bildliche 3D-Darstellungen die anatomische Vorstellung von den Knochen, inklusive ihrer Details. Der Informationsgewinn steigt weiter, wenn die dreidimensional rekonstruierten Strukturen in der Bewegung betrachtet werden. Dies kann in Form von Filmen oder Animationen erfolgen. Während die Anfertigung von Filmen aus CT's mit einem entsprechenden Programm (DaxiX imaging Software) einfach und schnell gelingt, ist die Erstellung von Animationen mit Interaktivität frei zu bewegen, digitalen 3D-Objekten äußerst zeitaufwendig und setzt spezielles grafisches Können voraus. Allerdings ist bereits bei den relativ einfach zu produzierenden 3D-Videos eine deutliche Verbesserung des anatomischen Verständnisses zu erwarten. (Zum Betrachten der Videos von den dreidimensional rekonstruierten Humeri scannen Sie bitte die QR-Codes von Abb. 3 bis 6 mit Ihrem Smartphone oder Tablet.)

Eine wichtige Bedingung für einen ausreichenden Lerneffekt ist die exakte Kennzeichnung der dargestellten Strukturen und ihre Beschriftung mit Fachtermini und eventuell deutschen Begriffen (Abb. 3b, 4b, 5b, 6b).

Als Basis für die Erstellung der digitalen Knochen wurden zahlreiche, sich überlappende Fotos von den Präparaten angefertigt und anschließend ihre Rekonstruktion mit einem dafür geeigneten Programm (123D Catch von Autodesk*) versucht. Diese Methode war extrem zeitaufwendig, und die Resultate unbefriedigend, bedingt unter anderem durch die weiße bis hellgelbe Farbe der Knochen. Hier konnten mit CT-Aufnahmen deutlich schneller bessere Ergebnisse erzielt werden.



Abb. 3a: 3D-Darstellung nach CT vom linken Humerus eines adulten langbeinigen Hundes



Abb. 3b: 3D-Darstellung mit Legende vom distalen Ende eines linken Humerus eines adulten langbeinigen Hundes



Abb. 4a: 3D-Darstellung nach CT vom linken Humerus eines adulten kurzbeinigen Hundes



Abb. 4b: 3D-Darstellung mit Legende vom proximalen Ende eines linken Humerus beim adulten kurzbeinigen Hund



Abb. 5b: 3D-Darstellung mit Legende vom distalen Ende eines linken Humerus einer adulten Katze



Abb. 5a: 3D-Darstellung nach CT vom linken Humerus einer adulten Katze



Abb. 6b: 3D-Darstellung mit Legende vom linken Humerus eines Katzenwelpen



Abb. 6a: 3D-Darstellung nach CT vom linken Humerus eines Katzenwelpen

Stereografien (Abb. 7 und 8)

Stereografien wie die hier beispielhaft angefertigten Rot-Cyan-Analygphen vom Ellbogen von Hund und Katze, ergeben einen faszinierenden, räumlichen Eindruck von anatomischen Strukturen. Eine weitere Verbesserung des räumlichen Vorstellungsvermögens von den Präparaten erreichen Slideshows von 360°-Stereografien (Nutzen Sie bitte die QR-Codes in Abb. 7, falls Sie sich die stereografischen Filme von der Ulna mit Ihrem Smartphone oder Tablet anschauen möchten.)

Um diese beeindruckenden Stereografien herzustellen, bedarf es nur geringer fotografischer Erfahrung, und der benötigte Zeitaufwand ist minimal. Die Nachteile liegen in der Schwierigkeit, die Stereografien sinnvoll zu beschriften, und in der Notwendigkeit, die stereografischen Bilder und Filme mit entsprechenden Brillen betrachten zu müssen.

Schlussfolgerungen

Digitale 3D-Rekonstruktionen von anatomischen Strukturen wie hier von Knochen der Schultergliedmaße, besitzen zwar eine lange Tradition in der Tiermedizin, sind aber erst jetzt aufgrund der modernen radiologischen Verfahren und der aktuellen Hard- und Software routinemäßig, mit geringem Zeitaufwand anzufertigen. Grundsätzlich verbessern in erster Linie Videos und Animationen von 3D-Rekonstruktionen die räumliche Vorstellung und topografische Zuordnung der Details. Rasse- und altersbedingte Unterschiede können augenfällig herausgearbeitet werden. Somit bilden 3D-Rekonstruktionen ein ergänzendes und seriöses Lehrmedium in der Anatomie.

Autostereografie und die Stereografie sind einfach herzustellen, und lustige, aber trotzdem begeisternde Zugaben.

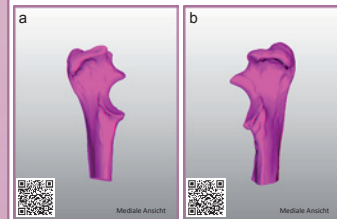


Abb. 7: Stereografen vom linken und rechten Olecranon eines langbeinigen (a) bzw. kurzbeinigen (b) Hundes anhand von Oberflächenrekonstruktionen aus CT's. (Bitte betrachten Sie die Analygphen mit einer Rot-Cyan-Brille. Über die QR-Codes kommen Sie zu den Videos.)

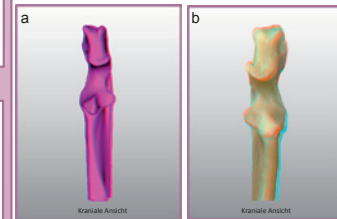


Abb. 8: Stereografen vom linken und rechten Olecranon zweier adulten Katzen anhand einer Oberflächenrekonstruktion aus CT (a) und einer Fotografie mit Doppelinstrumenten (b). (Bitte betrachten Sie die Analygphen mit der entsprechenden Rot-Cyan-Brille.)

Immunhistochemische und histologische Untersuchungen zum Einfluss einer anti-inflammatorischen Strategie auf die zellulären Konsequenzen eines Status epilepticus

Anna Katharina Kistler
 Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
 Betreuer: Frau Prof. Dr. Potschka, Frau Dr. Russmann



Immunhistochemische und histologische Untersuchungen zum Einfluss einer antiinflammatorischen Strategie auf die zellulären Konsequenzen eines Status epilepticus

Anna Katharina Kistler¹, Vera Russmann¹, Katharina Boes¹ und Heidrun Potschka¹
¹Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

EINLEITUNG

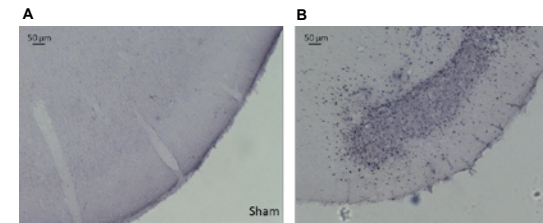
Epilepsien stellen bei Haustieren (Hund und Katze), sowie beim Menschen die häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen dar. Bei mehr als 30% der Epilepsiepatienten kann jedoch durch eine medikamentöse Therapie keine zufriedenstellende Anfallskontrolle erreicht werden. Es wäre daher vorteilhaft, bereits die Entstehung von Epilepsien (Epileptogenese) nach einer initialen Gehirnschädigung verhindern zu können. Die Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden wird als wesentlicher pathophysiologischer Mechanismus der Epileptogenese angesehen. PPAR γ -Agonisten werden als hocheffiziente Modulatoren der Mikrogliafunktion diskutiert. Es konnte bereits wiederholt dargestellt werden, dass diese Substanzgruppe den mikroglialen Funktionszustand derart beeinflusst, dass ein antiinflammatorischer und neuroprotektiver Phänotyp begünstigt wird. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf mögliche zelluläre Konsequenzen eines Status epilepticus evaluiert.

MATERIAL UND METHODEN

Immunhistochemische Färbemethoden
 Die immunhistochemischen Färbungen wurden anhand von Standardprotokollen durchgeführt. Die ED1-Färbung diente dazu, das Ausmaß der Mikroglia-Aktivierung bestimmen zu können. Durch die BrdU-Färbung wurde die Zellproliferation in der frühen Phase nach dem Status epilepticus dargestellt. Unter dieser Zellpopulation wurden die neugebildeten Neurone durch eine BrdU/NeuN-Doppelmarkierung identifiziert.
Auswertung
 Die Mikroglia-Aktivierung wurde mithilfe eines Score-Systems im Hilus, der CA3c/4-Region der hippocampalen Formation sowie im piriformen Cortex beurteilt (score 0: keine offensichtliche Mikroglia-Aktivierung; score 1: geringgradige Mikroglia-Aktivierung; score 2: mittelgradige Mikroglia-Aktivierung; score 3: hochgradige Mikroglia-Aktivierung). Die Quantifizierung der BrdU/NeuN-positiven Zellen steht derzeit noch aus.
Statistik
 Für alle statistischen Berechnungen wurde das Programm GraphPad Prism 5 für Windows verwendet. Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean, Standardfehler).

ERGEBNISSE

Einfluss des Status epilepticus auf die Mikroglia-Aktivierung



Abbildungen A-B:
 Im Rahmen der ED1-Färbung konnte bei den Status epilepticus (SE)-Tieren eine signifikante Erhöhung der Mikroglia-Aktivierung in der CA1- und CA2-Region, im Gyrus dentatus und im piriformen Cortex nachgewiesen werden.

Abbildung A zeigt den piriformen Cortex eines Kontrolltieres (Sham). In Abbildung B ist der piriforme Cortex eines Status epilepticus (SE)-Tieres abgebildet.

Einfluss von Rosiglitazon auf die Mikroglia-Aktivierung

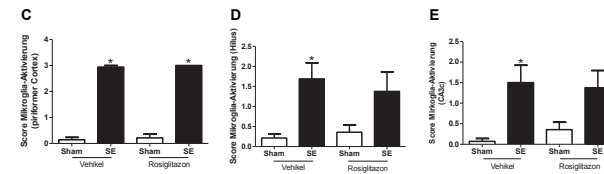


Abbildung C:
 Im Rahmen der ED1-Färbung konnte sowohl bei den Vehikel-behandelten SE-Tieren als auch bei den Rosiglitazon-behandelten SE-Tieren eine signifikante Erhöhung der Mikroglia-Aktivierung im piriformen Cortex nachgewiesen werden.

Abbildungen D-E:
 Sowohl im Bereich des Hilus als auch in der CA3c-Region der hippocampalen Formation konnte in Bezug auf die Mikroglia-Aktivierung lediglich bei den Vehikel-behandelten SE-Tieren ein signifikanter Unterschied zur entsprechenden Kontrollgruppe festgestellt werden.

Ergebnisse

BrdU/NeuN-Färbung

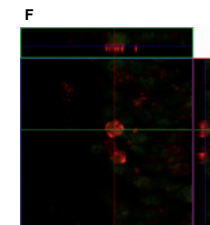


Abbildung F:
 BrdU/NeuN-Doppelmarkierung zweier Zellen eines SE-Tieres innerhalb des Gyrus Dentatus. Maßstabballen = 10 μ m

Zusammenfassung

In einer früheren Studie konnte bereits nachgewiesen werden, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon die Entzündungsreaktion nach einem Status epilepticus unter anderem durch Unterdrückung der Mikroglia-Aktivierung entscheidend abschwächt (Sun et al., 2008). In der vorliegenden Studie, hatte die Rosiglitazon-Behandlung jedoch keinen durchgreifigen Effekt auf das Ausmaß der Mikroglia-Aktivierung. Dies könnte unter anderem auf den Zeitpunkt der Analyse zurückzuführen sein. Um zudem den Einfluss des Rosiglitazon auf die Neubildung von Nervenzellen nach Induktion des Status epilepticus beurteilen zu können, wird derzeit die bereits angefertigte BrdU/NeuN-Färbung ausgewertet.

Wir danken Marion Fisch, Sieglinde Fischlein, Claudia Siegl und Angela Vicidomini für ihre exzellente technische Unterstützung. Die Autoren sind dankbar für die Unterstützung durch das Förderprogramm VETResearch.

Email: k.kistler@gmx.de

MR morphometrische und volumetrische Charakterisierung einer Dandy-Walker-ähnlichen Missbildung beim Eurasier

Alexander Lauda
 Medizinische Kleintierklinik
 Betreuer: Frau Prof. Dr. Fischer

MR morphometrische Charakterisierung einer Dandy-Walker-ähnlichen Missbildung beim Eurasier

Alexander Lauda
 Betreuer: Prof. Andrea Fischer (Medizinisch Kleintierklinik, LMU München, Abteilung Neurologie), Dr. Andreas Brühshwein (Chirurgische Kleintierklinik, LMU München, Abteilung Radiologie)

Ziel/Aufgabenstellung

Das Dandy-Walker-Syndrom ist eine Kleinhirnmisbildung des Menschen. In den letzten Jahren wurde eine ähnliche Symptomatik bei Eurasiern beobachtet. Klinisch verdächtige Tiere wurden mittels Bildgebung (MRT/CT) weitergehend untersucht. Hierbei fiel eine subjektive Vergrößerung der hinteren Schädelgrube bei einigen auf, während bei anderen diese nicht vorlag. Dies sollte objektiv beurteilt werden.

Beschreibung der Methode

Zur Messung der Flächen wurden 15 midsagittale MRT-Aufnahmen und vier CT-Aufnahmen von Hunden herangezogen. Vier Hunde wurden subjektiv als Dandy-Walker-ähnliches Syndroms klassifiziert, sechs als Kleinhirnhypoplasie mit partieller Vermisagenese und neun gesunde Tiere dienten als Kontrollgruppe. Als Referenz wurde die Studie "Use of magnetic resonance imaging for morphometric analysis of the caudal cranial fossa in Cavalier King Charles Spaniels" von Carrera et al. herangezogen. Mittels Osirix Dicom Viewer wurden zuerst die Messpunkte ermittelt, anhand derer die hintere Schädelgrube abgegrenzt wurde. Rostral waren dies der rostralste Anteil des Tentorium cerebelli und das Dorsum sella turcica. Als kaudale Begrenzung wurde die vordere knöcherne Begrenzung des Foramen magnum festgelegt. Danach wurde die knöcherne Begrenzung um die hintere

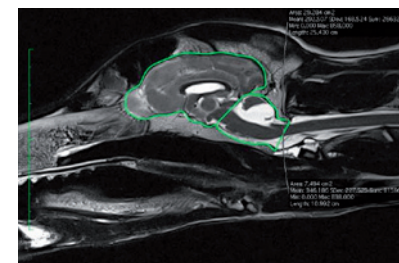


Fig. 1

Schädelgrube bis zu den Messpunkten umfahren und die Messpunkte verbunden, bis die gesamte hintere Schädelgrube ganz umfahren war. Im Anschluss wurde die knöcherne Begrenzung des gesamten Gehirns ausgemessen, auch hier diente die innere Begrenzung des Foramen magnum als kaudale Begrenzung (Fig. 1). Die Software berechnete die jeweiligen Flächen und wies diese entsprechend

aus. Zum Schluss wurde noch der relative Anteil der hinteren Schädelgrube am Gesamtgehirn berechnet (hintere Schädelgrube : gesamtes Gehirn = %) bezogen auf die midsagittale Fläche. Die Messungen wurden jeweils zweimalig durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

Ergebnisse

Bei den gesunden Tieren betrug der Anteil der hinteren Schädelgrube im Vergleich zum Gesamtgehirn 26,5 bis 33,0%. Bei den Hunden mit subjektiv klassischem Dandy-Walker-Syndrom 34,4 bis 44,1 %, und mit Kleinhirnhypoplasie und partieller Vermisagenese 20,9 bis 29,2% (Tab. 1). Der Mittelwert bei den gesunden Tiere beträgt 30,5%, die Standardabweichung 2,1% (Tab. 2)

Tab. 1 Midsagittale Fläche der hinteren Schädelgrube im Verhältnis zum Gesamtgehirn

	Sex	Alter	Quotient	
1	w	8 Wo	19,1 %	MRT
2	w	5 Wo	44,1 %	CT
3	w	6 Wo	29,2 %	MRT
4	w	6 Wo	34,4 %	CT
5	w	6 Wo	24,9 %	MRT
6	w	8 Wo	23,2 %	MRT
7	m	8 Wo	21,0 %	MRT
8	w	8 Wo	20,9 %	MRT
9	m	4,5 J	25,8 %	MRT
10	w	9 Wo	35,4 %	CT
11	w	> 1 J	26,5 %	MRT
12	w	> 1 J	32,0 %	MRT
13	m	> 1 J	32,1 %	MRT
14	m	> 1 J	33,0 %	MRT
15	m	> 1 J	30,5 %	MRT
16	w	> 1 J	27,6 %	CT
17	m	> 1 J	31,9 %	MRT
18	m	> 1 J	29,3 %	MRT
19	m	> 1 J	31,7 %	MRT

blau = Dandy-Walker-ähnlich; rot = Kleinhirnhypoplasie und partielle Vermisagenese; grün = gesund

Tab. 2 Deskriptive Statistik: Anteil der hinteren Schädelgrube am Gesamtgehirn (midsagittale Fläche)

Minimum	26,5 %
Maximum	33,0 %
Mittelwert	30,5 %
Standardabweichung	2,1 %
MW - 2 SD	26,3 %
MW + 2 SD	34,7 %

Charakterisierung von Endothelaktivierung durch einen Calcium-Sensor im transgenen Schweinmodell

Andreas Lange

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Betreuer: Frau Dr. Wünsch, Herr Dr. Klymiuk

Ziel/Aufgabenstellung:

In diesem Projekt sollte gezeigt werden, dass in transgenen Endothelzellen, die einen Calcium Sensor exprimieren, ein Calciumeinstrom mittels einer Fluoreszenzzunahme nachgewiesen werden kann. Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle bei vielen pathologischen Vorgängen, wie z.B. Arteriosklerose, Herzversagen und Transplantationsabstoßung. Bei diesen Vorgängen ist Calcium eine wichtige Signalsubstanz, da die Endothelzellaktivierung immer mit einem intrazellulären Anstieg in der Calciumkonzentration einhergeht. Um diese zu messen, kann ein Calcium-sensitives Fluorophor, z.B. CASE 12, verwendet werden.

Das GFP CASE 12 zeigt bei einer Bindung von Calcium einen 12-fachen Anstieg der Fluoreszenz. Die Struktur des Proteins beinhaltet Calmodulin und M13, die in das „circularly permuted fluorescent protein“ integriert wurden. Calmodulin hat vier Ca²⁺ Bindungsstellen, zwei auf der C-terminalen Seite, die bereits bei geringer Calcium-Konzentration von unter 500nM gefüllt werden und zwei auf der N-terminalen Seite, die erst bei einer höheren Konzentration gefüllt werden. Durch diese initiale Strukturänderung kann das Calmodulin das M13 Molekül binden, was durch die Calonen vermittelt wird. Diese Bindung bewirkt eine strukturelle Änderung in der Chromophor Gruppe, was die Fluoreszenz bei einer Excitation von 488 nm, in einem Bereich von 500-540 nm drastisch erhöhte. Dies kann mittels eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt werden.

Methode:

Als Vorarbeit zu diesem Projekt wurde mittels somatischem Zellkerntransfers 9 CASE-12 transgene Founder-Schweine erzeugt. Dafür wurden primäre Schweinezellen mit einem CASE12-Expresissonsvektor transfiziert, Zellklone gemischt, die Zellkerne in entkernte Eizellen injiziert und auf die Empfänger transferiert. Da bei diesem Verfahren gemischte Zellklone verwendet werden, kann in den resultierenden Schweinen das CASE-12 Gen unterschiedlich stark exprimiert werden. Für die Untersuchung der Endothelaktivierung wurden Endothelzellen der Aorta von 5 Tieren isoliert und kultiviert.

Um die Endothelzellaktivierung zu simulieren, muss die Calcium Konzentration im Zytoplasma der Zelle erhöht werden, was z.B. durch ein Ca-Ionophor (4-Bromo-Calcium Ionophor A23187) erreicht werden kann. Ionophore sind lipophile Moleküle, die Ionen durch Zellmembranen schleusen. Sie kommen in der Natur in einigen Bakterien vor und sind in diesem Fall meistens Proteine, die entweder selber durch die Membran diffundieren oder einen Kanal bilden. Das hier verwendete Ca-Ionophor ist ein synthetisches Ionophor, das eine hohe Selektivität für Calcium



Ionen hat und mit diesen einen Komplex bildet. Dieser kann durch die Membran diffundieren und somit die intrazelluläre Calcium Konzentration erhöhen. Da das Ionophor stark an Serumproteine bindet, was die Effektivität dieses Stoffes einschränkt, kann für die Inkubation der Zellen mit diesem Reagenz kein „normales“ Zellkulturmedium verwendet werden. In diesem Versuch wurde 4-Bromo-Calcium Ionophor verwendet, da es keine Eigenfluoreszenz besitzt.

In einer Reihe von Vorversuchen im Rahmen dieses Projektes wurden die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt. Als Alternative zum Zellkulturmedium wurde für die Dokumentation der Fluoreszenz und die Ionophor-Behandlung der Zellen eine gepufferte Salzlösung (HBSS- Hanks buffered salt solution) verwendet. Die Zellen wurden auf speziellen Slides (μ -Slides V10,4 von Ibidi) kultiviert um optimale optische Eigenschaften für die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 22 M, Zeiss) zu erhalten. Um die Zellkerne darstellen zu können, wurde eine Höchst-Färbung (Hoechst 33342) verwendet, welche die Fluoreszenzdetektion von CASE-12 nicht beeinflusst. Weiterhin kann diese Färbung in lebenden Zellen verwendet werden. Eine Fixierbarkeit der Zellen mittels Paraformaldehyd mit und ohne Ca-Ionophor wurde ebenfalls untersucht, jedoch stellte sich diese Methode als ungeeignet heraus.

Aus den 5 vorhandenen Endothelzellkulturen sollte die Kultur mit der besten CASE-12 Expression ausgewählt werden. Dafür wurden zum einen die Basisfluoreszenz der Zelle ohne spezielle Behandlung am Fluoreszenzmikroskop (Filterset 09: Em BP 450-490, LP 515) beurteilt und verglichen. Zum anderen wurde RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben, um die Genexpression auf RNA-Ebene mittels PCR zu untersuchen.

Die Linie mit der besten Basisfluoreszenz wurde mit dem Ca-Ionophor in verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten auf μ -Slides behandelt und die Fluoreszenz und Morphologie der Zellen wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop beurteilt und dokumentiert.

Ergebnisse:

Der Vergleich der Basisfluoreszenz (Abbildung 1) ergab, dass bei allen Linien Fluoreszenz detektiert war mit der stärksten Intensität bei 9822 und 9829. Daraufhin wurde die Linie 9822 für weitere Analysen verwendet. Die Untersuchung der Expressionshöhe auf RNA-Ebene konnte ich im Rahmen dieses Projektes nicht vollenden.



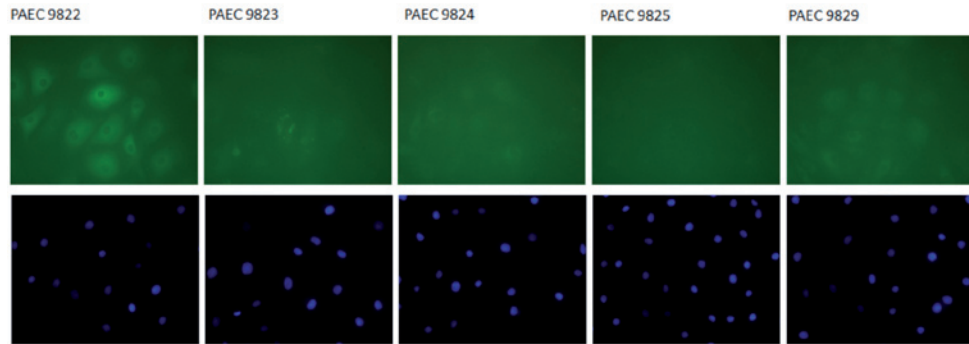


Abbildung 1: Detektion der Basisfluoreszenz verschiedener Zelllinien

Für die Ionophor-Behandlung wurden verschiedene Konzentrationen der Komponenten Ionophor und Ca²⁺, sowie die nötige Inkubationszeit verwendet. Es stellte sich heraus, dass eine zu hohe Konzentration an Ionophor morphologische Veränderungen an den Zellen hervorriefen, die zum Teil mit Zelltod einherging. Eine Konzentration von 6,5µM für das Ionophor und 1,7mM Calcium stellte sich als Ideal heraus, da eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz beobachtet werden konnte (Abbildung 2), ohne dass alle Zellen bei dem Experiment zu stark geschädigt wurden. Die Erhöhung des Calcium Spiegels innerhalb der Zelle ist der initiale Prozess der Apoptose. Durch diesen werden Enzyme aktiviert, welche die Zelle abbauen und somit töten (vgl. Physiologie, Klinka, Silbernagel). Weiterführende Untersuchungen mittels verschiedener Kombinationen an Calcium- und Ionophorkonzentration zeigte, dass das intrazelluläre Calcium für diese Veränderungen verantwortlich war, das Ionophor alleine aber keine Veränderung hervorrief. Erst durch die Erhöhung der Calcium-Konzentration wurde der Tod der Zellen verursacht. Morphologische Veränderungen konnten bereits nach 1 min beobachtet werden und verstärkten sich über den Verlauf der Behandlung. Abhängig von der Konzentration der Komponenten Calcium und Ionophor konnte eine Änderung der Fluoreszenzintensität bereits nach 1-3 min. beobachtet werden (Abbildung 2).

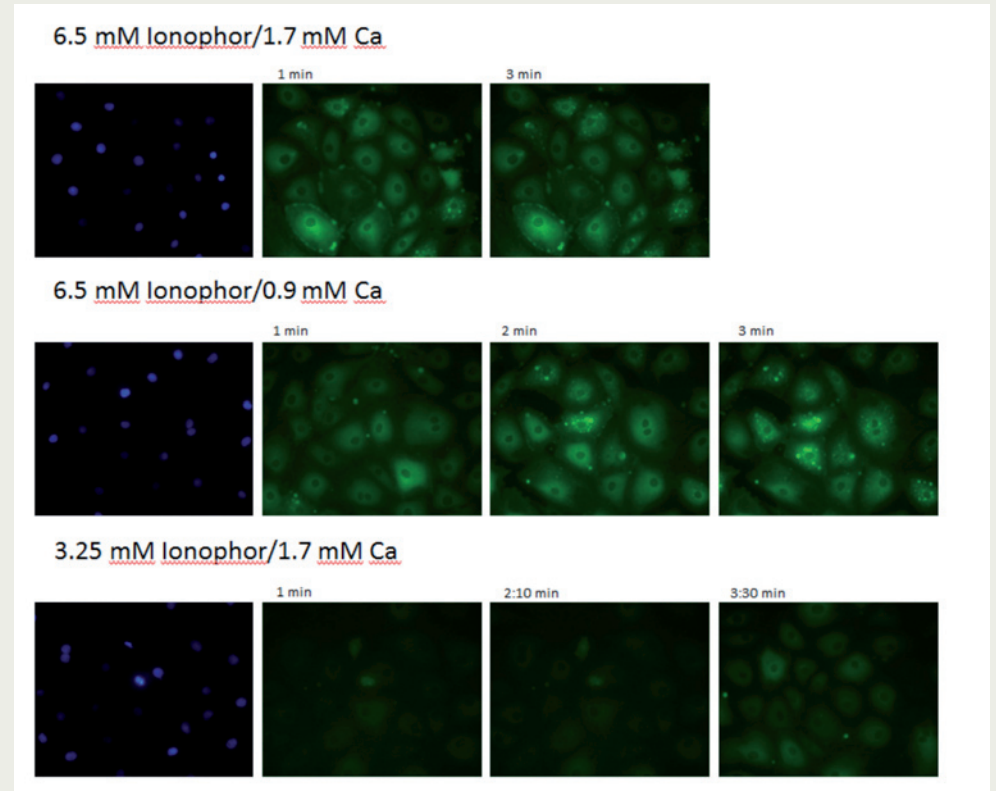


Abbildung 2: Detektion der Fluoreszenzintensität in CASE-12-transgenen Endothelzellen nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Ca und Ca-Ionophor

Zusammenfassung/Ausblick:

Wir konnten zeigen, dass in CASE-12 transgenen Endothelzellen der Anstieg des intrazellulären Calciums, hervorgerufen durch ein Ca-Ionophor, mittels des Calcium-Sensors CASE-12 detektiert werden kann. Die künstlich erhöhte Calcium Konzentration hat eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz bewirkt, was zuverlässig mit dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt und dokumentiert werden konnte. Die Fluoreszenzzunahme ist abhängig von der Calciumkonzentration und der Inkubationsdauer.



Wenn mittels weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden kann, dass der Ca-Sensor auch auf vasoaktive Substanzen, die endogen eine Rolle spielen, wie z.B. ATP und Histamin, adäquat die intrazelluläre Erhöhung des Calciumspiegels anzeigt, stellt dieses System ein geeignetes Werkzeug dar, um verschiedene pathologische Prozesse zu untersuchen. Wegen der ubiquitären Expression des CASE-12, können auch andere Zelltypen aus CASE-12-transgenen Schweinen mit dieser Methode untersucht werden, da Calcium in fast allen Zellen eine wichtige Signalsubstanz darstellt.

Persönliche Meinung:

Ich fand das Forschungsprojekt sehr interessant und ich denke, es hat mir einen guten Einblick in die wissenschaftliche Arbeit gewährt. Ich habe schon länger über die Möglichkeit einer wissenschaftlichen Karriere nachgedacht und denke, dass mir das Praktikum hier die Möglichkeit gegeben hat, dieses Tätigkeitsfeld besser kennen zu lernen. Meine Erwartungen wurden vollstens erfüllt, da ich sehr gut betreut wurde, aber auf der anderen Seite auch genug eigene Erfahrungen sammeln konnte, die mir bei der Festlegung meines zukünftigen Arbeitsbereiches helfen. ■

Evaluierung des Anästhesiestandards in deutschen Tierarztpraxen bzw. Tierkliniken (Kleintier)

Maria Lange
Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik
Betreuer: Herr Dr. Pieper



Projektbericht über die Evaluation des Anästhesiestandards

Ich habe in Zusammenarbeit mit den Anästhesisten der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU einen Fragebogen entwickelt, um den Narkosestandard in Tierkliniken und Praxen in ganz Deutschland zu ermitteln. Der Ausgangspunkt für diese Studie waren immer mal wieder Anrufe in der Anästhesie von Praxis- / Klinikinhabern, die Probleme mit Ihrer Narkose hatten.

Der Fragebogen enthält 35 Fragen aus verschiedenen Bereichen der Anästhesie beim Kleintier. Ich habe insgesamt 100 Bögen in ganz Deutschland verschickt, davon 50 an Praxen und 50 an Kliniken. Es antworteten über 60 %.

In der Auswertung haben wir sowohl den Unterschied zwischen Klinik und Praxis gegenüber gestellt, als auch regionale Unterschiede festgestellt.

Es kamen folgende Ergebnisse heraus:

- Die Narkose wird in der Praxis vorwiegend von dem Inhaber gemacht, während in den Kliniken diese meist von Fachangestellten übernommen wird.
- In der Praxis wird sowohl mit Injektionsnarkose als auch mit Inhalationsnarkose gearbeitet. In den Kliniken wird die Narkose mittels Inhalation durchgeführt.
- Während die Klinik verschiedene Narkosemittel verwendet, kommt in den Praxen vorwiegend $\alpha 2$ - Agonist und Ketamin zum Einsatz.
- Es zeigte sich das in den Praxen, teilweise aber auch in den Kliniken, kein bzw. nur bei Risikopatienten ein Venenzugang gelegt oder eine Intubation vorgenommen wird.
- In den Praxen wird vorwiegend die Narkose mit den klinischen Parametern überwacht. In den Kliniken werden zusätzlich verschiedene Geräte eingesetzt. Generell wird der Blutdruck jedoch selten überwacht.
- Im Süden wurde kein Alphaxalon verwendet, während im Osten keine Baboratsäure- Derivate zum Einsatz kamen.
- Im Norden wurden in einigen Kliniken die Narkosen von Anästhesisten durchgeführt.
- Im Süden fiel auf, dass es keine Klinik oder Praxis gab in der immer eine Intubation vorgenommen wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Narkosestandard in Praxen und Kliniken aber auch regional sehr unterschiedlich ist. Viele Kolleginnen/ Kollegen gaben uns die Anmerkung, dass sie sich die Weiterbildungen im Bereich der Anästhesie mehr Fall bezogen wünschen.

Haltung von Ebern – Einfluss auf Tiergesundheit und Wohlbefinden

Regina Wagner
 Klinik für Schweine
 Betreuer: Frau Dr. Zöls, Herr Prof. Dr. Ritzman



Vergleich der Cortisolkonzentration in Sammelspeichelproben und Einzelspeichelproben bei Mastschweinen

R. Wagner, M. Isernhagen, S. Zöls, M. Ritzmann
 Klinik für Schweine
 Ludwig-Maximilians-Universität München



Cortisol

als Stressparameter

- **Anpassungsreaktion des Körpers („General Adaption Syndrome“)**
- Maß der Stressbelastung eines Individuums
- **Vorteile:**
 - keine Beeinflussung durch subjektive Einschätzung des Beobachters
- **Nachteil:**
 - durch Stress beim Handling evtl. Verfälschung des Testergebnisses
 - auch durch andere Faktoren beeinflusst (Tagesrhythmus, Stimmung)

psychische Belastung
 Trauma
 Schmerz
 STRESS
 starke Anstrengung
 neuronal
 Hypothalamus
 CRH
 Hypophysenhinterlappen
 GHRH
 Nebennierenrinde
 Cortisol
 Adrenalin
 Serotonin, etc.
 Versch. Körperfunktionen „General Adaption Syndrome“ (modifiziert nach Tursid 9)

Cortisol im Speichel

- **Vorteile:**
 - keine Manipulation durch Blutentnahme, somit kein Stress durch Fixation
 - häufige Probenentnahmen mit geringer Belastung möglich
- **Nachteil:**
 - Speichelgewinnung bei zu jungen Tieren wegen fehlender bzw. geringer Speichelproduktion nicht möglich
 - variierende Probenmenge durch unterschiedlich starken Speichelfluss und unterschiedlich langes Kauen der Tiere am Strick

Versuchsaufbau

Fragestellung

- Ist die Entnahme von Sammelspeichel zur Cortisolmessung innerhalb einer Bucht repräsentativ für die individuellen Speichelcortisolwerte dieser Population?
- In der Untersuchung wurde bei 60-80% der Tiere pro Bucht Einzelspeichelproben zeitnah zum Sammelspeichel entnommen.
- **bisherige Probenanzahl:**
 - 87 Einzelspeichelproben (ES)
 - 6 Sammelspeichelproben (SS)

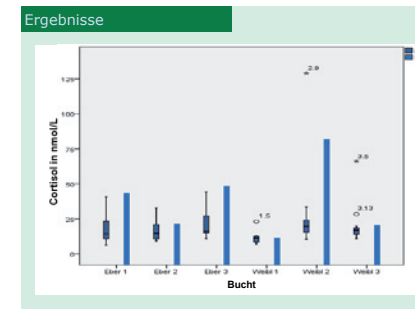
Versuchsaufbau

Speichelgewinnung

Sammelspeichel: 1 Kautstrick pro Bucht wurde für 10min innen an der Buchtenwand fixiert

Einzelspeichel: 1 Baumwolltupfer wurde jedem Tier mit Hilfe einer Klemme vorgehalten

Bei beiden Methoden kauten die Schweine freiwillig sowohl am Kautstrick als auch am Baumwolltupfer.



Diskussion vorl. Ergebnisse

Bei 3 von 6 Buchten liegen die Mittelwerte der Einzelspeichelproben und der Wert der Sammelspeichelprobe im selben Zehnerbereich (Eber 2, Weib 1 & Weib 3).

In Buchten mit sehr hohen Cortisolwerten in den Einzelspeichelproben der Tiere scheint der Sammelspeichel in Richtung der Ausreißer zu tendieren.

mögliche Ursache:
 Die Menge der Speichelprobe im Sammelkautstrick variiert je nach abgegebener Menge des Tieres. Daher kommt es zur Verschiebung des Testergebnisses in Richtung des Tieres mit der größten Probenmenge.

Insgesamt geplante Probenanzahl: 250

Klinik für Schweine
 Tierärztliche Fakultät
 LMU München

Wir danken der LMU für die Möglichkeit zur Untersuchung der Speichelcortisolproben und Evaluierung ihrer Relevanz auch im Hinblick auf weitere Studien.

Außerdem danken wir dem Betriebsleiter für die freundliche Zusammenarbeit.

Erstellung einer Rohtranskription einer lateinischen Handschrift der sogenannten Albertus-Vorlage

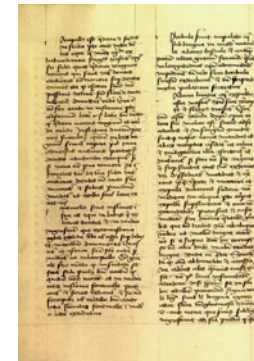
Lisa Marr

Institut für Paläoanatomie, Domestikationsforschung und Geschichte der Tiermedizin
Betreuer: Frau PD Dr. Goebel, Herr Prof. Dr. Peter



Studentisches Forschungsprojekt von Lisa Marr im Sommersemester 2013 zum Thema:

Transkription einer mittelalterlichen, lateinischen, hippiatrischen Handschrift



Die Grazer Handschrift

Sie stammt aus der zweiten Hälfte des 15. Jahrhundert. Die Folien 109v-119r der Handschrift zählen zu den Texten, die die sogenannte „Albertus-Vorlage“ überliefern. Der Text ist in Rotunda geschrieben und auf jeder Seite in zwei Spalten mit rund 40 Zeilen angeordnet.

Projektbeschreibung

Die Aufgabe war es, eine Rohtranskription eines 21 Folia umfassenden hippiatrischen Textes der Handschrift (Graz, Universitätsbibliothek, Cod. 594, fol. 109v-119r) zu erstellen.

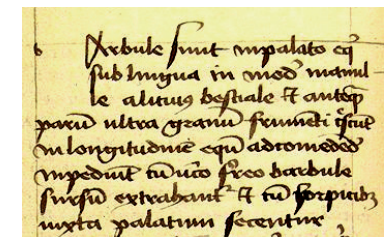
Zunächst wurde versucht mit den wenigen für mich auf Anhieb entzifferbaren Wörtern ein Gerüst für den Text zu erstellen. Anschließend konnten viele weitere Lücken mit Hilfe der von Hermann Stadler herausgegebenen Edition des Werkes von Albertus Magnus „De animalibus Libri XXVI“ geschlossen werden. Dazu wurden Textpassagen aus der Grazer Handschrift mit den entsprechenden Stellen in der Edition der Kölner Urschrift von Stadler verglichen und bei thematischen Übereinstimmungen diese Edition zur Hilfe genommen, um weitere Wörter zu entziffern. So entstand aus dem ursprünglich sehr lückenhaften Textgerüst langsam ein erster Vorschlag für eine mögliche Transkription. Der Skribent verwendete für zahlreiche Begriffe bestimmte, damals übliche Abkürzungszeichen.

Erschwerend kam jedoch bei dieser Handschrift hinzu, dass teilweise gleiche Termini mit unterschiedlichen Kürzeln wiedergegeben wurden. Zur Auflösung der Kürzel benutzte ich das Werk „Lexicon Abbraviatarum“ von Adriano Capelli. Außerdem konnten einige Termini wie z.B. das Wort cathapleur (fol. 111vb), das vermutlich auf griechische Quellen zurückgeht, anhand der genannten Lexika nicht identifiziert werden. In einem weiteren Schritt könnten diese Begriffe mit Hilfe des Mittellateinischen Wörterbuchs (Bayerische Akademie der Wissenschaften) nachgeschlagen werden. Unterstützt wurde dieses Forschungsprojekt von Frau Dr. Goebel, Frau Dr. Schwarzenberger, Frau Dr. Knödler und Herrn Prof. Dr. Peters, die unter anderem bei der Transkription besonders schwieriger Textpassagen geholfen haben.

Textbeispiel

Rohfassung der Transkription:

Barbul<a>e sunt in palato equi
sub lingua in modum mamil-
l<a>e alicuius bestiale et antequam
parum ultra granum frumenti crescunt
in longitudinem equum ad comedendum
impediunt cum unco X barbul<a>e
sursum extrahantur et cum forcipibus
iuxta palatum ferentur



Textauszug (Fol. 110vb) der Handschrift Graz, Universitätsbibliothek, Cod. 594.

Entwicklung von neuen Virusimpfstoffen in der Tiermedizin – Studien mit rekombinanten Modifizierten Vacciniaviren Ankara zur Produktion von Antigenen neu auftretender Zoonoseerreger

Lisa Marr

Lehrstuhl für Virologie, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen
Betreuer: Herr Prof. Dr. Sutter, Frau Dr. Volz

Im Rahmen meines Projektes habe ich eine am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät laufende Forschungsarbeit, die sich mit der Herstellung eines neuartigen Impfstoffes gegen das West Nil Virus befasst, unterstützt. Das West Nil Virus wurde erstmalig 1937 im West Nil District in Uganda isoliert. Es wird der Familie der Flaviviridae zugeordnet und gehört zur Gruppe der Arboviren, die durch Insekten (v.a. Culicoides-Mücken) übertragen werden. Verbreitet ist das Virus besonders in Afrika, Asien, Indien, Israel und Nordamerika. Als Reservoirwirte dienen Wildvögel. Über Insektenstiche ist das Virus auf die Endwirte Pferd und Mensch übertragbar.

Die Inkubationszeit beträgt 3-14 Tage. Bei Vögeln verläuft die Infektion häufig subklinisch. Typische Symptome sind Fieber, generalisierte Schwäche, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Durchfall. Beim Pferd kann es auch zu einer schweren neurologischen Verlaufsform mit Nachhandlähmung und Ataxien kommen. Da keine kausale Therapie möglich ist und eine weitere Verbreitung des Vektors aufgrund des Klimawandels zu erwarten ist, besteht ein besonderes Interesse an der Entwicklung neuer Impfstoffe gegen das West Nil Virus. Eine vielversprechende Strategie ist es das Modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) als Grundlage für den Impfstoff zu nutzen. Ursprünglich wurde MVA als Impfstoff zur Eradikation von Pocken eingesetzt. Das Vaccinia Virus, ein Orthopoxvirus, wurde durch 575 Zellkulturpassagen in Hühnerembryofibroblasten modifiziert. So kam es zum Verlust von ungefähr 15% des ursprünglichen Genoms. Dadurch ist das modifizierte Virus nicht mehr kontagiös für Mensch und Tier und enthält 6 Deletionsstellen, die für die Insertion von Fremd-DNA nutzbar sind. Zur Herstellung des rekombinanten Impfstoffes wird zunächst das entsprechende West Nil Virus Gen in ein Trägerplasmid eingebaut. Im Fall des West Nil Virus eignen sich besonders die Strukturproteine M und E als Zielantigene.



Das M und E Gen kodieren für membranassoziierte Hüllproteine, die unter anderem die Adsorption des Virus an die Wirtszelle vermitteln. Das Zielgen wird im Transferplasmid von zwei zur DNA des Vaccinia Virus homologen Sequenzen flankiert. Diese lenken die Rekombination an die gewünschte, nicht essentielle Stelle des MVA-Genoms. Zusätzlich werden in das Plasmid sogenannte Markergene eingebaut, die bei der späteren Isolierung von rekombinantem Virus helfen sollen. Das fertige Transferplasmid wird in eine mit MVA infizierte Zellkultur überführt. Während der Virusreplikation kommt es dann zur Rekombination homologer DNA-Sequenzen. Im Anschluss erfolgt mit Hilfe der fluoreszierenden Markergene die Selektion der rekombinanten Viren. Die erfolgte Rekombination und die Genexpressionsrate des rekombinanten MVA ist danach mit PCR und Western Blot überprüfbar. Angeleitet und unterstützt wurde ich bei diesem Projekt von Herrn Prof. Dr. Sutter, Frau Dr. Asisa Volz, Frau Astrid Freudenstein und Frau Sylvia Jany. ■

Machbarkeitsstudie zur Teleradiologie in der Tiermedizin in Deutschland

Ina Schmaußer, Simon Reiter

Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik

Betreuer: Herr Dr. Brühlschwein

Ein detaillierter Bericht wird im Frühjahr 2014 publiziert werden!

Begriffserklärung „Teleradiologie“:

Der Begriff Teleradiologie bezeichnet jenen Vorgang, bei dem vom Tierarzt aufgenommene radiologische Bilddateien via Telekommunikationseinrichtung zu einem Fachtierarzt für Radiologie an einen ganz anderen Ort gesendet werden, der dann auch die Befundung der Bilder übernimmt. (Nach dem Prinzip: Move the data, not the patient)

Ziel des Projektes:

Ziel dieses Projekts ist es zu evaluieren, ob praktische Tierärzte ihre Röntgenbilder von radiologischen Fachärzten beurteilen lassen wollen und was sie dafür zahlen würden. Dazu bieten wir allen Teilnehmern des Projektes während der Testphase eine kostenlose Befundung der Röntgen- oder CT-Bilder an, um von ihnen einen ersten Eindruck von der Projektidee und diesem Angebot zu gewinnen.

Dadurch soll es in Zukunft möglich sein ein Netzwerk zu generieren, in welchem zu jeder Zeit und von jedem Ort Bilder versendet werden und zeitnah befundet zurückgesendet werden können, sodass es in jeder Praxis und jeder Klinik, auch ohne radiologisches Fachpersonal, zu exakten radiologischen Diagnosen und Arbeiten auf höchstem Niveau kommen kann.

Unsere Aufgaben:

- Einarbeiten in die Materie (DICOM, PACS, Funktionsprinzipien Röntgen und CT, Test der Uploadmöglichkeiten, etc...)
- Verfassen einer Beschreibung zu den Uploadmöglichkeiten
- Ansprechpartner für Projektteilnehmer
- Ausarbeitung eines Fragenkataloges
- Fertigstellen der Projektergebnisse

Projektdetails/Ergebnisse:

Das Projekt umfasst 12 Teilnehmer, darunter drei Tierkliniken und acht Praxen (davon ca. 80% im Kleintierbereich). Das durchschnittliche Alter der Teilnehmer beträgt Ø 41 Jahre.

Uns wurden sowohl analoge, digitale als auch CT-Bilder gesendet (18 % analoge/konventionelle Röntgen-Bilder, 46 % digital Röntgen-Bilder, 36% CT-Bilder).



Alle drei Upload-Möglichkeiten wurden von den Teilnehmern genutzt:

- Upload von JPEG-Dateien per Webformular
 - bevorzugt für analoge Röntgenbilder, aber prinzipiell auch für digitale Röntgenbilder möglich
- Upload von DICOM-Dateien per Webformular
 - für digitale Röntgenbilder
- Konfiguration des VETMED PACS Servers als AE in Ihrem DICOM-Netzwerk
 - bevorzugt für CT-Serien

75% der Teilnehmer wünschen eine spezielle Ausbildung des Radiologen (zumindest FTA, 12,5% Diplomate)

Interessanterweise würden 100% der Teilnehmer das Angebot auch kostenpflichtig weiter nutzen wollen. Für ein Röntgenbild Ø 27,78 € (Preisspanne 10-60 €), für eine CT-Studie Ø 65 € (Preisspanne 30-90 €).

Als wichtiges Detail dieser Studie soll nun erwähnt werden, dass die Auswahl der Teilnehmer nicht repräsentativ für alle Tierärzte ist, da die Teilnehmer bereits vorher Kontakt mit der radiologischen Abteilung der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik aufgenommen haben.

Funktionelle Charakterisierung von IL-21 in der B-Zellentwicklung und der Marek-Virus Infektion beim Huhn

Birke Elisabeth Schwarz

Institut für Tierphysiologie

Betreuer: Frau Schermuly, Herr Prof. Dr. Kaspers

Beschreibung des Projekts:

B-Lymphozyten sind ein essentieller Bestandteil des adaptiven Immunsystems des Huhns. Ihre Aufgabe ist es, Antikörpermoleküle als Effektormoleküle zu produzieren. Dabei erhalten sie zum Teil Hilfe von spezialisierten T-Zellen.

Zur B-Zellaktivierung sind 2 Signale, die B-Zellrezeptor-Verknüpfung durch gebundenes Antigen sowie die Kostimulation über die CD40-CD40L-Interaktion zwischen B- und T-Zelle notwendig. Von der aktivierten T-Zelle wird unter andern das Zytokin Interleukin 21 ausgeschüttet das einen Einfluss auf die B-Zelle hat. Eine erste Reaktion auf diese Stimuli ist die Proliferation der Zellen, in deren Folge es zur Bildung germinaler Zentren kommt. Im germinalen Zentrum durchlaufen die B-Zellen mehrere Zyklen der Mutation ihres Antigenrezeptors und der nachfolgenden Selektion um letztendlich zur Gedächtnis-B-Zelle oder langlebigen Plasmazelle zu differenzieren, die das germinale Zentrum verlässt. Auf Grundlage vorangegangener Projekte war es möglich B-Zellen des Huhns längerfristig zu kultivieren und die Effekte von IL-21 genauer zu untersuchen.

Methoden:

1. Dichtegradientenzentrifugation:

Die Lymphozyten wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll® aus Bursa, Milz und Blut eines Huhns gewonnen.

2. Langzeitkultivierung (Zeitraum 14 Tage):

In jeweils vier unabhängigen Ansätzen jedes Organs wurden die Lymphozyten mit IL-21, CD40L, CD40L+IL21 oder ohne Zytokine bei 40°C und 5% CO2 kultiviert.

3. Durchflusszytometrie

An Tag 2,4,8 und 14 wurde jeweils eine Probe eines Ansatzes entnommen, Lebend-/Tod(Fixable Viability De e Fluor 780) gefärbt und mit einem Marker für B-Zellen (AV 20 Alexa Fluor 647) markiert.



Ergebnisse:

Lebende Leukozyten in Absoluten Zahlen

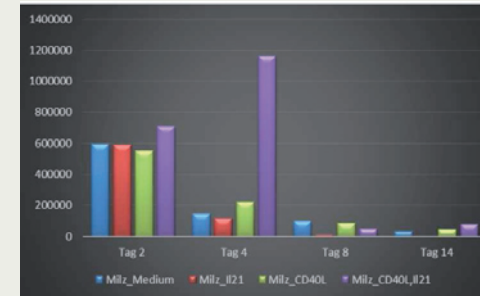


Abbildung 1: Milz

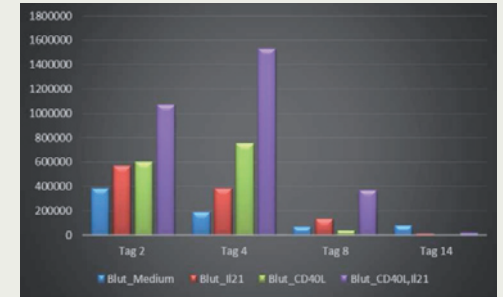


Abbildung 2: Blut

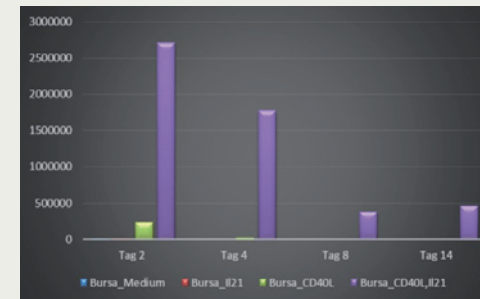


Abbildung 3: Bursa

Bursa: Bei den kultivierten Lymphozyten konnte der Zelltod durch Apoptose unter gemeinsamer Stimulation mit CD40L und IL21 nicht verhindert werden jedoch eine deutliche Steigerung der Überlebensrate der Leukozyten gegenüber den Kontrollansätzen beobachtet werden.

Milz: Bei Stimulation mit CD40L+IL21 kam es von Tag 2 auf Tag 8 zu einer Zunahme der Zahl der Lymphozyten in der Kultur. Ab Tag 8 konnte der Zelltod durch Apoptose auch hier nicht durch gemeinsame Stimulation mit CD40L+IL21 verhindert werden.

Blut: Bei gemeinsamer Stimulation mit CD40L+IL21 kam es auch hier zu einer Zunahme der Zahl lebender Lymphozyten. Über Tag 8 hinaus konnte jedoch auch hier vermehrt Zelltod durch Apoptose festgestellt werden.

Weiterführende Fragestellung:

Aufbauend auf diesen Ergebnissen kann nun untersucht werden, ob die Kostimulation mit CD40L und IL21 zur Differenzierung der Zellen in Richtung Gedächtniszelle bzw. Plasmazelle führt und ob hierdurch ein Immunglobulin Klassenwechsel induziert wird. ■

Organdatenbank immunologischer Organe des Huhns

Lisa Segeritz

Institut für Tierphysiologie, Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Betreuer: Herr PD Dr. Reese, Herr Prof. Dr. Kaspers, Frau Lettmann

Das Ziel des Projekts war ein für alle Studenten und Doktoranden der Fakultät frei zugänglicher digitaler „Atlas der Histologie der lymphatischen Organe des Huhns“ zu erstellen.

Dazu mussten bereits vorhandene histologische Präparate der verschiedenen lymphatischen Organe des Huhns mit dem Virtual Slide System digitalisiert und in einer Datenbank archiviert werden.

Da, wo geeignete Präparate fehlten, wurden entsprechende histologische Schnitte angefertigt und gefärbt.

Außerdem wurde diskutiert, die digitalisierten Präparate zur Entwicklung eines Lernprogramms, mit der Möglichkeit zur virtuellen Mikroskopie, für Studenten zu verwenden.

Zum Einlesen in die Thematik Immunsystem Vogel bekam ich das Buch „Avian Immunology“ von Fred Davison, Bernd Kaspers und Karel A. Schat ausgehändigt.

Anschließend erhielt ich eine Einführung in das Mikroskop mit dem Virtual Slide System durch Herrn PD Dr. Reese. Nachdem ich mit damit vertraut war, konnte ich die Präparate mit der 40er Vergrößerung einscannen. Dies dauerte je nach Größe bis zu drei Stunden pro Präparat.

Nach dem Scannen habe ich einzelne Bilder aus den virtuellen Präparaten ausgeschnitten.

Diese sollten möglichst gut die charakteristischen Strukturen der einzelnen Organe erkennen lassen (zum Beispiel den Aufbau eines einzelnen Follikels in der Bursa).

Um diese Bilder in die Datenbank zu integrieren, war es von zentraler Bedeutung, diese gut zu verschlagworten. Deshalb musste ein Schlagwortkatalog erstellt und jedem Bild Schlüsselwörter mithilfe des Lightroomprogramms zugeordnet werden.

Zum Herstellen fehlender immunhistologischer Präparate wurde ein sechs Wochen altes Huhn getötet, die Zäkaltonsillen herauspräpariert und diese in flüssigem Stickstoff gefroren.

Diese Organproben durfte ich nach der Anleitung von Fr. Lettmann selbstständig an dem Mikrotom schneiden und einfärben. Dazu wurden elf verschiedene Antikörper benötigt. Mit dieser immunhistologischen Färbung ist es zum Beispiel möglich T-Zellen von B-Zellen zu unterscheiden und somit verschiedenen Zonen im Präparat zuzuordnen.

Alle eingescannten und verschlagworteten Bilder habe ich in die Datenbank hochgeladen.

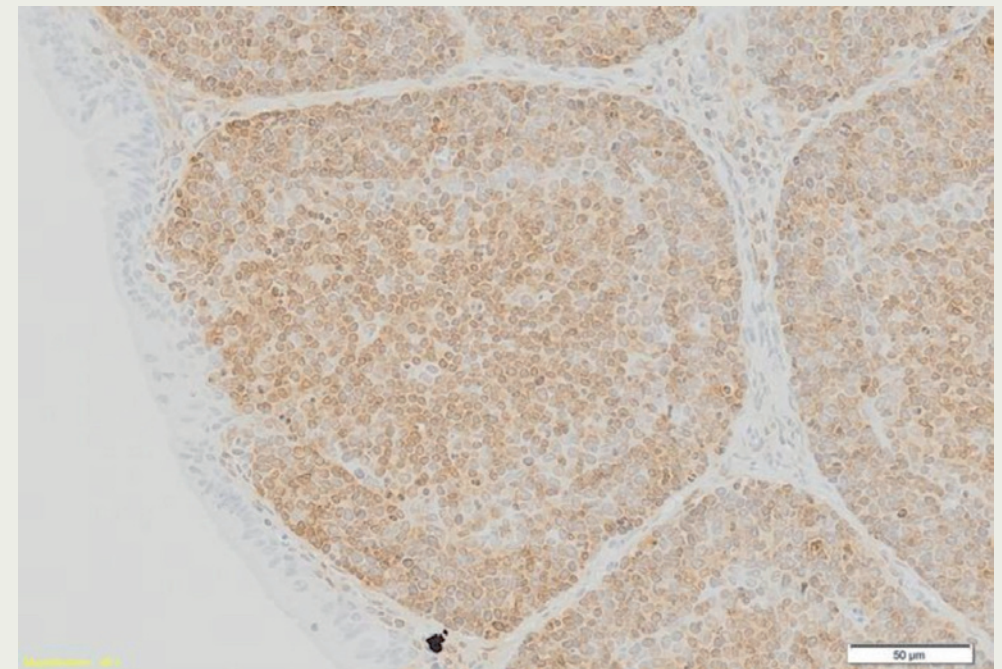
Sie sind unter https://gallery2.vetmed.uni-muenchen.de/main.php/v/l_segeritz/ einsehbar.

Da dies das erste Projekt dieser Art war, ist noch sehr viel Platz für weitere Bilder in der Daten-



bank. Die Weiterführung ist aber schon in Planung und so kann ich hoffen, dass die Datenbank in Zukunft gut von Dozenten, Doktoranden oder auch Studenten genutzt wird.

Abschließend möchte ich mich bei allen Betreuern für die gute Zusammenarbeit bedanken. Das Forschungsprojekt hat mir viel Spaß gemacht. Sehr gut war, dass ich die Möglichkeit bekam, mit vielen Doktoranden über ihre Doktorarbeit zu sprechen.



Immunhistologisches Bild aus der Datenbank: Follikel aus der Bursa eines 28 Tage alten Huhns mit Bu 1-Antikörperfärbung

Antibakterielle Wirksamkeit von PYOspot® in vitro und in vivo

Diana Seidel
Medizinische Kleintierklinik, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen –
Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie
Betreuer: Herr Prof. Dr. Müller, Herr Prof. Dr. Straubinger





LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

D.Seidel, R.S.Mueller¹, R.K.Straubinger²

¹Medizinische Kleintierklinik
Zentrum für Klinische Tiermedizin
²Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen
Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

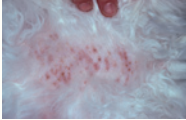
LEHRE@VET
Research



Antibakterielle Wirksamkeit von PYOspot® in vitro

Zielsetzung

- Problem: rezidivierende Infektionen mit gegen Antibiotika resistenten Bakterien bei kaninen Pyodermien
- In-vitro-Test von Spot-on-Präparat PYOspot® des Laboratoire Dermatologique Cosmetique d'Animaux (LDCA) als alternatives Präparat zu Antibiotika



Zusammenfassung

- unverdünntes PYOspot® (1:1) zeigt deutliche Wachstumshemmung der Bakterien
- in Verdünnungsreihen ist eine stetige Abnahme der Wachstumshemmung zu sehen
- Wachstumshemmung auch bei multiresistenten *Staphylococcus pseudintermedius*-Stämmen vorhanden
- ätherisches Öl („Eukawohl Duftmischung“, Primavera®) zeigt eine ähnliche Hemmung des Wachstums

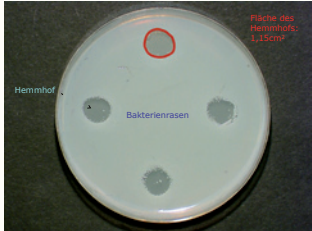
Materialien & Methoden

- Bakterium (Bak.): *Staphylococcus pseudintermedius* (sowohl multiresistent als auch nicht resistent)
- Wirkstoffe: PYOspot® Spot-on von LDCA (Pyo), „Eukawohl Duftmischung“ von Primavera (äÖ)
- Hilfsstoffe: Bio-Diffusing-Agent (BDA), Standard-1-Bouillon (Boui)
- Nährplatten: Standard-1-Agarplatten

Versuchsablauf


1. Erstellen einer Bakterienlösung in physiologischer NaCl-Lösung > McFarland 1
2. Aufbringen und Ausspateln von 200 µl Bakterienlösung auf Agarplatten
3. Erstellen der verschiedenen Verdünnungen
4. Aufbringen der verschiedenen Verdünnungsstufen
5. Inkubieren über Nacht bei 37°C
6. Fotografische Auswertung der Platten

Fotografische Auswertung



Agarplatte mit Bakterienrasen und Hemmhöfen

Diana Seidel
Tiermedizinstudent
Ludwig-Maximilians-Universität München
Veterinärstr. 13
D-80539 München



Ergebnisse

Tabelle 1: Vergleiche der ausgewerteten Hemmhoflächen

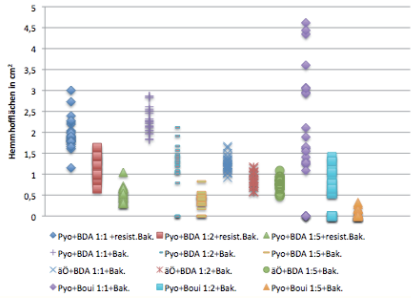


Tabelle 2: Vergleiche der Hemmhöfe der unterschiedlichen Substanzen (Kruskal-Wallis Test, Dunn's post hoc Test)

	Ätherisches Öl+BDA	PYOspot®+ BDA	PYOspot®+BDA + res. Bak.
1:1			
PYOspot®/Bouillon	p<0,001	n.d.	n.d.
Äther. Öl/BDA		p<0,001	p<0,001
PYOspot®/BDA			n.d.
1:2			
PYOspot®/Bouillon	n.d.	p<0,001	p<0,01
Äther. Öl/BDA		p<0,001	p<0,001
PYOspot®+BDA			n.d.
1:5			
PYOspot®/Bouillon	p<0,001	p<0,01	p<0,001
Äther. Öl/BDA		p<0,001	p<0,01
PYOspot®/BDA			n.d.

Vergleich des NucleoCounter und des Hypoosmotischen Schwelltest (HOS) zur Beurteilung der Vitalität von tiefgefrorenen Rüden- und Hengstpermien nach dem Auftauen

Tanja Sonnewald-Daum

Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik

Betreuer: Frau Dr. Otzdorff

Der hypoosmotische Schwelltest (HOS-Test) wurde von Jeyendran *et al.* (1984) entwickelt und ist mittlerweile auch in der Tiermedizin ein routinemäßig durchgeführter Test zur Beurteilung der Spermaqualität. Mittels des HOS-Tests ist es möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob die Transportmechanismen der Plasmazellmembran der Spermien noch funktionsfähig sind (Jeyendran *et al* 1984, Van der Ven *et al* 1986). Dieses kann wichtige Hinweise für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien liefern.

Beim HOS-Test werden die Spermien in eine hypoosmotische Lösung gegeben – ist die Zellmembran noch intakt, kommt es so lange zum Wassereinstrom bis sich ein Gleichgewicht zwischen extra- und intrazellulären Raum eingestellt hat. Der Flüssigkeitseinstrom bedingt eine Volumenzunahme und somit ein Anschwellen der Zelle, was ein Aufrollen des Spermischwanzes zur Folge hat. Ist die Zellmembran bereits geschädigt kann kein Flüssigkeitseinstrom mehr stattfinden und die Spermien bleiben unverändert (HOS_{neg}).

In dem Projekt sollte die Frage geklärt werden, ob der HOS-Test, unter den Gegebenheiten des Andrologischen Labors in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU, als Test zur Qualitätskontrolle von tiefgefrorenen Spermaproben ausreicht und als Qualitätsmarker herangezogen werden kann. Die Werte des HOS-Testes sollen hierbei mit dem Anteil toter Spermien verglichen werden, die mit Hilfe des NucleoCounter (Chemometec, Dänemark) ermittelt werden. Es wurden insgesamt 31 tiefgefrorene Spermaproben (20 Hengste und 11 Rüden) ausgewertet.

Zunächst wurde eine Spermaprobe für 20 sec. in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Danach wurde das HOS-Präparat angefertigt, indem man beim Hengst 100µl, beim Rüden 25µl Sperma in die HOS-Lsg. pipettiert, und das ganze bei 37°C für 30 Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Die HOS-Lsg. (150mosmol) setzt sich aus 0,735g Natriumcitrat, 1,351 g Fructose (Rüde) bzw. Lactose (Hengst) gelöst in 100ml Aqua dest. zusammen. Während der Inkubationszeit des



HOS-Tests wurden mit der jeweiligen Spermaprobe Messungen im NucleoCounter durchgeführt. Zunächst wurde die Spermienkonzentration ermittelt, anschließend der Anteil toter Spermien in der Probe.

Bei jeder Probe wurde die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien beurteilt. Für die Auswertung des HOS-Tests wurden von jedem Präparat jeweils zwei Ansätze, A und B, ausgewertet. Hierfür wurden dem HOS-Präparat jeweils 10 µl entnommen, ein Deckglaspräparat angefertigt und in den beiden Ansätzen jeweils 200 Spermien mit Hilfe eines 2-Phasenmikroskops, bei 400er Vergrößerung und Ph2 ausgezählt. Beurteilt wurden die Spermien nach dem Schema von Jeyendran *et al* 1984.

Bei den Hengstproben waren die Werte von HOS-Test und NucleoCounter besser korreliert als beim Rüden. Der HOS-Test ergab jedes Mal einen höheren Anteil HOS_{neg}-Spermien verglichen mit dem Anteil toter Spermien. Dies weist darauf hin, dass der Anteil toter Spermien in den aufgetauten Hengstpermaproben geringer ist, als der Anteil an avitalen Spermien. Hier wäre eine Überprüfung der Befruchtungsraten der jeweiligen Hengste interessant, um eine Aussage über die Korrelation von HOS-Test und Fertilität treffen zu können. Diese Daten lagen für die verwendeten Proben leider nicht vor. Die Auswertung der Rüdenproben zeigte deutliche Abweichungen zwischen den untersuchten Parametern. Hier ist die Untersuchung weiterer Proben notwendig, um eine endgültige Aussage treffen zu können.

Im Anschluss an diese Studie wird der HOS-Test als Parameter in die routinemäßige Untersuchung von aufgetauten Spermaproben von Hengst und Rüde mit aufgenommen. Hierbei sollen dann auch die Befruchtungsraten der einzelnen Patienten bzw. Proben berücksichtigt werden. ■

Molekulare Klonierung der caninen und equinen Opioidrezeptoren

Christian Zenner

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Betreuer: Herr Prof. Dr. Ammer



Ludwig-Maximilians-Universität München

Klonierung von Opioidrezeptoren des Hundes

Nadine Fritzenschaft, Christian Zenner

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie (AG Ammer)

Einleitung

Opiode werden in der Tiermedizin zur Sedation, Narkoseprämedikation und Behandlung starker Schmerzzustände eingesetzt. Sie vermitteln ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die aufgrund ihrer molekularen und pharmakologischen Eigenschaften in δ -, κ - und μ -Rezeptoren eingeteilt werden. Die klinische Wirkung von Opioiden ist komplex und weist teils starke tierartliche Unterschiede auf. Neben möglichen Unterschieden in der Lokalisation und Dichte der einzelnen Rezeptoren wurden bisher vor allem pharmakokinetische Besonderheiten als Erklärung für die individuellen Wirkprofile herangezogen. Darüber hinaus scheinen aber auch pharmakodynamische Unterschiede zu bestehen, da z.B. Buprenorphin beim Menschen als partieller Agonist an μ - und Antagonist an κ -Rezeptoren klassifiziert wird, der hinsichtlich seiner analgetischen Wirkung einen Ceiling-Effekt besitzt. Beim Hund dagegen fehlt dieser Ceiling-Effekt. Es besitzt dagegen eine atemstimulierende Komponente, wodurch Buprenorphin beim Hund als sicheres Analgetikum zur Behandlung mittelstarker postoperativer Schmerzen propagiert wird. Butorphanol dagegen wird beim Menschen als partieller Agonist/Antagonist an μ - und Agonist an κ -Opioidrezeptoren klassifiziert, der aufgrund seiner dysphorischen und emetischen Wirkung klinisch unbedeutend ist. Beim Hund jedoch fehlt die durch κ -Opioidrezeptoren vermittelte dysphorische Komponente, auch ist es bei viszeralen Schmerzen kaum wirksam. Dagegen besitzt Butorphanol beim Hund eine beim Menschen nicht beobachtete stark ausgeprägte antitussive Wirkung, die üblicherweise durch μ 2-Rezeptoren vermittelt wird. Diese Beispiele weisen auf die Existenz speziesspezifischer Unterschiede in der Selektivität und Aktivität der beiden Substanzen gegenüber κ - und μ -Opioidrezeptoren hin. Um die molekularen Ursachen für diese unterschiedlichen Wirkprofile aufzuklären sollen in einem ersten Schritt die drei Opioidrezeptoren vom Hund kloniert werden. Mit ihrer Hilfe können in einem zweiten Schritt die einzelnen, in der Tiermedizin gebräuchlichen Opioidanalgetika einer systematischen pharmakologischen Charakterisierung unterzogen werden.

Experimenteller Ablauf und Ergebnisse

1. Isolation von mRNA und Umschreibung in cDNA:

Idealerweise wäre für die Isolation von mRNA ein leicht zugängliches, nicht neuronales Gewebe geeignet, indem alle drei Opioidrezeptoren gleichzeitig exprimiert werden. Dies sollte bei mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und der Leber der Fall sein (1).

Mittels Feinnadelbiopsie wurde aus einem operativ entfernten Leberlappen ein Stück Lebergewebe entnommen und sofort in RNAlater (Fa. Life Technologies, Darmstadt) überführt. Die Isolation von mRNA erfolgte mit *pegGOLD Trifast*[®] (Fa. PeqLab, Erlangen) entsprechend der Herstellerangaben.

Die Isolation von mRNA aus EDTA-Blut erfolgte mithilfe des *GeneJet Whole blood Purification Mini Kits* (Fa. Thermo Scientific, Schwerte).

In beiden Fällen wurde die Reinheit der mRNA zunächst spektrophotometrisch bestimmt (260 nm vs. 280 nm) und anschließend durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (*Maxima H Minus First Strand cDNA Kit*, Fa. Thermo Scientific, Schwerte).

2. Überprüfung der cDNA auf Expression von Opioidrezeptoren:

Um die Qualität der cDNA zu überprüfen, wurde das Haushaltsgen *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)* amplifiziert.

Die Expression von Opioidrezeptoren wurde mithilfe von PCR-Primern untersucht, die anhand der hypothetischen mRNA Sequenzen mit dem Programm *PrimerBlas*[®] (2) abgeleitet wurden. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass die Primer auf zwei benachbarten Exons liegen (Abbildung 1).

3. Durchführung der PCR und Sequenzierung der Produkte:

Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklus
Initiale Denaturierung	5 Min.	94°C	1
Denaturierung	30 Sek.	94°C	30
Anlagerung	30 Sek.	55°C	30
Verlängerung	30 Sek.	72°C	30
Terminale Verlängerung	5 Min.	72°C	1

Ein Teil der PCR-Produkte wurde über ein 2%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit *Redi-Load[®] DNA-Stain* angefärbt (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und unter UV-Licht sichtbar gemacht (Abbildung 2).

Die restlichen PCR-Produkte wurden sequenziert (Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

4. Ergebnisse und weiteres Vorgehen:

In der Leber und PBMC konnten sowohl Transkripte für den δ -, κ - und μ -Opioidrezeptor in der erwarteten Länge nachgewiesen werden. Durch Sequenzvergleich (BLASTn; 3) stellte sich jedoch heraus, dass nur die beiden für den μ -Opioidrezeptor isolierten Fragmente mit der hypothetischen mRNA Sequenz übereinstimmen (Abbildung 3).

Um auch Transkripte für den δ - und κ -Opioidrezeptor aus PBMC isolieren zu können, werden diese in einem nächsten Schritt über Nacht mit IL-6 stimuliert. Dadurch soll die Expression aller Opioidrezeptoren in Immunzellen gewährleistet werden (4).

Liegen cDNAs mit Transkripten für alle drei Opioidrezeptoren vor, so werden diese mit spezifischen Primern vom 5'- und 3'-Ende der hypothetischen mRNA Sequenzen vervielfältigt und anschließend in das Plasmid *CloneJET*[®] der Fa. Thermo Scientific, Schwerte, kloniert.

Abbildung 1: Auswahl von Primerpaaren zur Bestimmung der cDNA Qualität und zum Nachweis der Expression von Opioidrezeptoren

Rezeptortyp	Rezeptor	Sequenz (5' → 3')	Position (bp)	FW (bp)	RN (bp)	NCBI Accession
δ -OR	Fwd1	GGG CMT CMT CMT CMT CMT CMT CMT	492	61	59	GI:545492516 (235 - 697)
	Rev1	AGC ACA CCG TGA TGA TGA GG				
κ -OR	Fwd1	GGT CMT CMT CMT CMT CMT CMT CMT	441	59	59	GI:545484607 (176 - 637)
	Rev1	TTC ACA TCT TCT CCG ACT TTS G				
μ -OR1	Fwd1	GGT CMT CMT CMT CMT CMT CMT CMT	213	61	59	GI:545484603 (918 - 1391)
	Rev1	GGT CMT CMT CMT CMT CMT CMT CMT				
μ -OR2	Fwd1	GGT CMT CMT CMT CMT CMT CMT CMT	341	61	61	GI:545484602 (978 - 1315)
	Rev1	GGA GGA GGA GGA GGA GGA GGA				
GAPDH	Fwd1	GGC ACA GTC AAC GCT GAG AAC	101	63	63	GI:545550304 (165 - 264)
	Rev1	GGA TGA TCA CCA CAT TTC ATC				

Abbildung 2: Expression von Opioidrezeptoren in cDNA Präparationen der Leber und Immunzellen des Hundes mittels RT-PCR

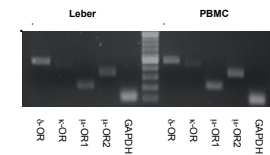
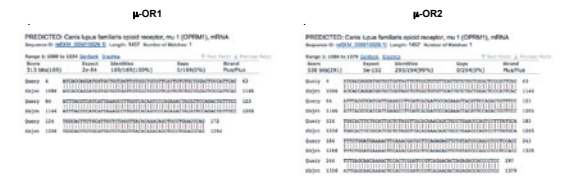


Abbildung 3: Abgleich der beiden sequenzierten PCR Fragmente des μ -Opioidrezeptors mit der hypothetischen mRNA Sequenz des Hundes



Quellennachweis

1. Rezeptordatenbank der International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR). <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ReceptorFamilies.cfm?Type=GPCR>
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>
3. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=BlastPage
4. In HJ, Kang SW, Luh H4 (1999) Opioid receptor gene: cytokine response element and the effect of cytokines. Brain Res. 829(1-2):174-9.

Danksagung

Wir danken Frau Sarah Kozmlik für die technische Unterstützung und Fortführung des Projekts sowie dem Förderprogramm *Lehre@VET* Research für die finanzielle Unterstützung.