

1911

Mh. Vet.-Med. 39 (1984): 665-667

Forschungszentrum für Tierproduktion Dummerstorf-Rostock der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR (Direktor: Ob.-Vet.-Rat Prof. Dr. sc. K. Rothe), Bereich Züchtungsforschung (Direktor: Dr. A. Baumung) und VEB Schlacht- und Verarbeitungsbetrieb Delicata Leipzig (Direktor: P. Kaluza), Direktionsbereich Forschung, Entwicklung und Rationalisierung (Bereichsdirektor: Dr. P. Richter)

## Eignung des Schußbioplates für morphometrische und histochemische Untersuchungen des Muskelgewebes

Von J. Wegner und Lore Schöberlein

Kode: Rind, Biopsie, Muskelgewebe, Morphometrie, Histochemie

Mit 4 Abbildungen (Eingegangen am 2. November 1983)

**Zusammenfassung:** Die Schußbiopsie weist gegenüber der chirurgischen Biopsie und der Biopsie mit anderen Geräten eindeutige Vorteile für morphometrische und histochemische Untersuchungen des Muskelgewebes auf. Die gewonnene Muskelprobe hat eine ausreichende Größe und die morphologischen Parameter sind gut meßbar. Für die Anwendung bei 150 d alten Kälbern wurde eine spezielle Kanüle entwickelt.

**Резюме:** Получение препаратов методом гарпунирования и их пригодность для морфометрических и гистохимических исследований мышечной ткани

Гарпунная биопсия по сравнению с хирургической биопсией и биопсией, проводимой с помощью других приборов, отличается четкими преимуществами для морфометрических и гистохимических исследований мышечной ткани. Полученная проба мышц имеет достаточную величину и морфологические параметры поддаются хорошему измерению. Для применения этого метода на 150-дневных телятах была разработана специальная полая игла.

**Summary:** Suitability of Shot Bioplate for Morphometric and Histochemical Examination of Muscular Tissue

Shot biopsy has proved to be of unambiguous superiority to biopsy by surgical or other means, whenever it comes to morphometric and histochemical testing of muscular tissue. Muscle specimens thus obtained are of sufficient size, and morphological parameters are properly measurable. A specific type of syringe has been developed for application to calves aged 150 days.

Die morphometrische und histochemische Untersuchung des Muskelgewebes hat in den letzten zehn Jahren zunehmend Bedeutung erlangt. Es werden Beziehungen zwischen der Muskelstruktur und der Fleischbeschaffenheit und dem Fleischansatz untersucht sowie mit Hilfe von Stufenschlachten Wachstumsvorgänge im Muskel quantifiziert. Für die Nutzung der Muskelstrukturparameter zur Leistungsfrüherkennung und ihre Anwendung in der Züchtung leistungsfähigerer Tiere ist die Entnahme von Muskelproben am lebenden, juvenilen Tier notwendig. An die Biopsietechnik werden dabei hohe Forderungen gestellt, die sich einerseits aus der morphometrischen und histochemischen Auswertung der Proben ergeben und andererseits aus der möglichst schnellen und unkomplizierten Entnahme von Biopsieproben.

In Auswertung der zahlreichen Literatur und Patentrecherchen zur Biopsie von Muskelgewebe bei Nutztieren hat sich gezeigt, daß bei fast allen dafür entwickelten Geräten sowie auch bei der chirurgischen Biopsie die

Probenentnahme zu lange dauert (Harris u. Bennett, 1970; Schöberlein, 1976; Hennebach, 1977; Bradley, 1978; Bulla u. Mitarb., 1979; Morhart, 1980; Hennebach u. Mitarb., 1983). Die Tiere müssen fixiert und lokalanästhesiert werden. Ein weiterer Nachteil ist die Veränderung der Struktur durch Ziehen, Quetschen und durch die Kontraktion des Muskels beim Heraustrennen, die zu Artefakten führt (Abb. 1).

In den letzten Jahren hat sich das Biopsie-Schußgerät (Schöberlein, 1976) für die Entnahme von Muskelproben für biophysikalische, biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen bewährt (Hennebach, 1977; Bergmann, pers. Mitt. 1980; Lahucky u. Mitarb., 1982; Johannsen u. Mitarb., 1982). Das Gerät besteht aus einem umgebauten Schlachtviehbetäubungsapparat, an dessen Schußbolzen eine Kanüle befestigt ist. Beim Zurückschnellen des Bolzens wird die ausgestanzte Probe mit Hilfe von Abtrenn-Elementen herausgezogen. Das Biopsie-Schußgerät erfüllt alle Forderungen hinsichtlich einer schnellen und unkomplizierten Probenentnahme im Stall. Es ist keine Fixierung der Tiere und keine Narkose bzw. Lokalanästhesie notwendig. Die Wundheilung erfolgt nach entsprechender Wundversorgung mit Berlicetin- und Ankerplaster komplikationslos. Von 2 Personen können etwa 30 Tiere je Stunde biopiert werden.

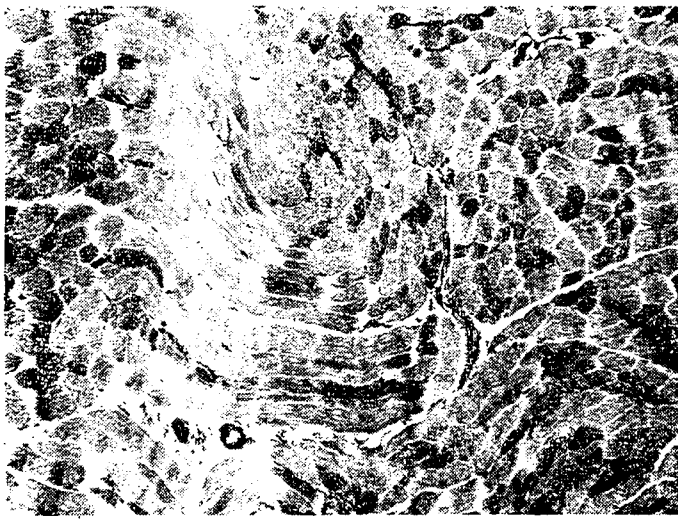


Abb. 1 Muskelgewebe Rind, Veränderungen der Struktur bei chirurgischer Biopsie

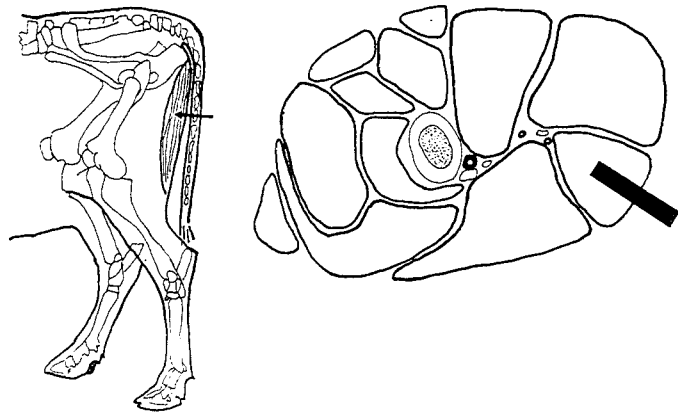


Abb. 2 Lage des M. semitendinosus beim Rind mit Ort der Biopsieprobenentnahme (Pfeil)

#### Material und Methoden

Für die morphometrischen und histochemischen Untersuchungen wurden an 150 Rindern verschiedenen Alters Proben mit dem Schußgerät entnommen. 50 Tiere wurden für die Leistungsfrüherkennung im relevanten Alter von 150 Tagen biopsiert. Für die Probenentnahme beim Rind wurde der M. semitendinosus ausgewählt, der auf Grund seiner Lage und Größe günstige Voraussetzungen bietet (Abb. 2). Die Handhabung des Biopsie-Schußgerätes, die Vorbereitung des Tieres und die Wundbehandlung wurden von Schöberlein (1976) beschrieben. Die Bearbeitung der Proben erfolgte nach den für histochemische Untersuchungen üblichen Arbeitsverfahren: Tiefgefrieren der Proben in flüssigem Stickstoff sofort nach der Entnahme, Anfertigen von 11 bis 16  $\mu\text{m}$  Gefrierschnitten mit dem Cryostat-Mikrotom, Inkubation der Schnitte zur histochemischen Differenzierung der Muskelfasertypen mit Hilfe der NADH-Dehydrogenase-Reaktion (Fiedler u. Weber, 1981). Die Messung der Muskelfaserdurchmesser und die Bestimmung des Muskelfasertypenverhältnisses wurde mit einem halbautomatischen Mikroskopbildanalysator (Eigenbau Forschungszentrum für Tierproduktion [FZT] Dummerstorf-Rostock) durchgeführt.

#### Ergebnisse und Diskussion

Das Biopsie-Schußgerät nach Schöberlein erbrachte eine nutzbare Probenmasse von 0,5 bis 1 g. Daraus können maximal 6 Proben angefertigt werden. In jeder Probe sind etwa 4000 Muskelfasern auswertbar. 1000 Muskelfasern werden für einen repräsentativen Mittelwert benötigt. Ihre Auswahl erfolgt zufällig aus einem größeren Verband (etwa 5 bis 15 Primärbündel je Präparat). Der Gewebeverband der Biopsieprobe wird beim Abtrennen etwas auseinandergezogen, deshalb ist die Probe länger als der Schuß tief ist. Diese Verlängerung erfolgt durch Verschiebung der Tertiärbündel. Damit erfolgt jedoch keine Beeinträchtigung der Muskelfasern innerhalb von Primärbündeln. Der Zustand der Einzelfasern ist sehr gut. Es treten keinerlei Deformationen auf.

Die Kontraktionseigenschaft der Muskelfaser ist ein Fakt, der die morphometrische Auswertung von Biopsieproben kompliziert. Die Schußbiopsie als definierter Eingriff schafft günstige Voraussetzungen für die Standardisierung des Kontraktionszustandes. Ein weiterer Vorteil der Schußbiopsie gegenüber der chirurgischen ist die gute Erkennbarkeit der Faserrichtung, die für die Anfertigung exakter Quer- und Längsschnitte unbedingt erforderlich ist.

Im Vergleich zu Schlachtkörperproben 24 h p. m. sind die Muskelfasern bei Biopsieproben etwa um 10  $\mu\text{m}$  dicker. Dies ist eine Folge der Kontraktion der Fasern beim Schuß, d. h. bei Unterbrechung des normalen Muskeltonus. Die Muskelfasern am Schlachtkörper sind u. a. durch das Hängen am Haken gestreckt. Der Schuß erfolgt beim M. semitendinosus rechtwinklig zur Faserrichtung (Abb. 2). Damit ist die Kontraktion der Fasern bei Unterbrechung des Muskeltonus als weitgehend einheitlich für jede Probe zu betrachten, während bei der chirurgischen Biopsie ohne Anwendung von Klammern dies nicht gegeben ist. Clancy (1977) gibt eine Empfehlung, wie über die Sarkomerenlänge die Muskelfaserquerschnittsfläche von biopsierten und damit unterschiedlich kontrahierten Muskelfasern korrigiert werden kann. Diese Methode erfordert zusätzlich Längsschnitte und ist somit zu aufwendig für die praktische Anwendung beim Nutztier. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist, entstehen nach dem Auftauen der Schnitte auf dem warmen Objektträger Kontraktionsartefakte. Die von Dämrich (1981) empfohlene Aufbewahrung von biopsisch gewonnenen Muskelproben für 30 bis 45 min in einer feuchten Kammer zwecks Beseitigung von Kontraktionsartefakten brachte bei unseren Untersuchungen keinen Erfolg.

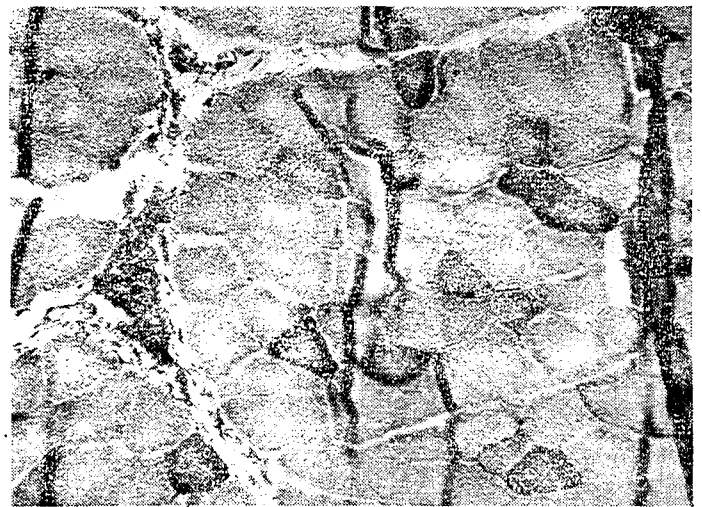


Abb. 3 Muskelgewebe Rind, Kontraktionsartefakte

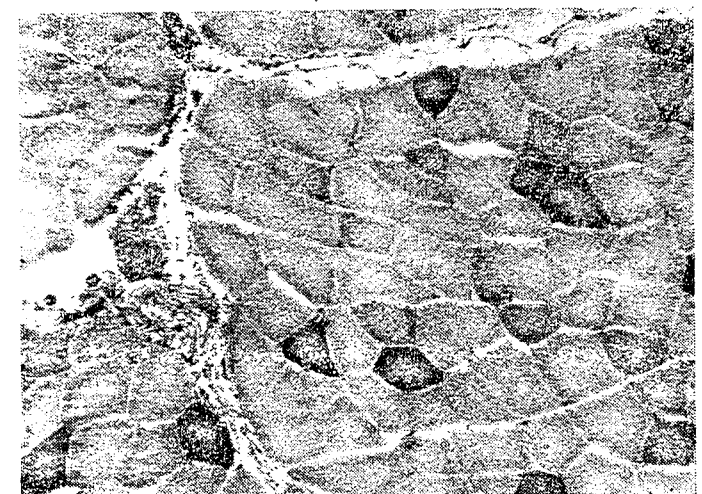


Abb. 4 Serienschnitt (siehe Abb. 3), Objektträger beschichtet

Diese Artefakte konnten jedoch nach der Methode von Pearson u. Sabarra (1974) durch Beschichten der Objektträger mit Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), 3prozentige Lösung, beseitigt werden (Abb. 4).

Ein ähnlicher Effekt läßt sich durch etwa 30 s Fixierung der Schnitte in Formolkalzium erreichen. Diese Fixierung ist jedoch nicht für alle histochemischen Reaktionen anwendbar. Das Biopsie-Schußgerät nach Schöberlein ist zur Probenentnahme für morphometrische und histochemische Untersuchungen bei Rindern ab 16 Monate gut geeignet.

Für junge Tiere wurde im FZT Dummerstorf-Rostock eine kleinere Kanüle entwickelt, die eine geringere Wandstärke und damit einen geringeren Außendurchmesser sowie neue Abtrennelemente besitzt. Eine derartige Kanüle muß für die Biopstatentnahme von 150 d alten Kälbern wegen der geringeren Muskelmasse des M. semitendinosus gefordert werden.

#### Literatur

1. Bradley, R. (1978): Skeletal muscle biopsy techniques in animals for histochemical and ultrastructural examination and especially for the diagnosis of myodegeneration in cattle. *Brit. veter. J.* 134, 434. - 2. Bulla, J., Zelnik, J., Poltarsky, J., Granat, J., u. Chrastina, J. (1979): Biopsia svalstva a tuku u osipanych (Muskel- und Fettbiopsie bei Schweinen). *Zivocisna Vyroba* 24, 47. - 3. Clancy, M. J., u. Herlihy, P. D.

(1977): Assessment of changes in myofibre size in muscle in: Pattern of growth and development in cattle. Symposium in Ghent Oktober 1977, 204. - 4. Dämmrich, K. (1983): Bewegungsapparat, in: Sandersleben, J. von, Dämmrich, K., Dahme, E., Pathologische Histologie der Haustiere, Jena 1981. - 5. Fiedler, Ilse, u. Weber, Charlotte (1981): Methodische Untersuchungen zur Auswahl einer histochemischen Routine-methode für die Differenzierung von Muskelfasertypen. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* 95, 1027. - 6. Harris, R. M., u. Benett, J. A. (1970): Mechanism for biopsy sampling. *J. Anim. Sci.* 31, 451. - 7. Hennebach, H. (1977): Untersuchungen zur Voraussage der Fleischbeschaffenheit mit Hilfe der Muskelbiopsie am lebenden Schwein. Promotion A, KMU Leipzig. - 8. Hennebach, H., v. Lengerken, G., Pfeiffer, H., u. Schöberlein, Lore (1983): Methoden der Muskelprobenentnahme am lebenden Schwein und Aussagefähigkeit biopischer Kennwerte zur Frühinformation der Fleischbeschaffenheit (Übersichtsreferat). *Mh. Vet.-Med.* 38, 339. - 9. Johannsen, U., Menger, Solveig, u. von Lengerken, G. (1982): Vergleichende Untersuchungen zur Ultrastruktur der Skelettmuskulatur (M. longissimus dorsi) unterschiedlich belastungsempfindlicher Schweinerassen - Vergleich Duroc : Pietrain. *Arch. exper. Vet.-Med.* 36, 357. - 10. Lahucky, R., Fischer, K., u. Augustini, Ch. (1982): Zur Vorhersage der Fleischbeschaffenheit am lebenden Schwein mit Hilfe der Schußbiopsie. *Fleischwirtschaft* 62, 1. - 11. Morhart, H. (1980): Ein neues Biopsiegerät. *Arch. Lebensmittelhygiene* 31, 26. - 12. Pearson, J., u. Sabarra, A. (1974): A method for obtaining longitudinal cryostat sections of living muscle. *Stain Technology* 49, 143. - 13. Schöberlein, Lore (1976): Die Schußbiopsie - eine neue Methode zur Entnahme von Muskelproben. *Mh. Vet.-Med.* 31, 457.

Verfasser: Dr. agr. J. Wegner, 2551 Dummerstorf, und Dr. Lore Schöberlein, 7030 Leipzig, Kantstraße 71