

10 EMBRYOLOGIE

EINFÜHRUNG

In dem Kurs "Säugeranatomie" wurde bereits darauf hingewiesen, daß ein echtes Verständnis von Aufbau und Funktion des menschlichen Körpers nur unter Berücksichtigung der stammesgeschichtlichen Herkunft möglich ist. Dies gilt in gleicher Weise auch für die Embryonalentwicklung. Bereits im Jahre 1866 formulierte Ernst Haeckel die "biogenetische Grundregel", wonach die Ontogenese (Individualentwicklung) eine kurze und schnelle Rekapitulation der Phylogenese (Stammesentwicklung) darstellt.

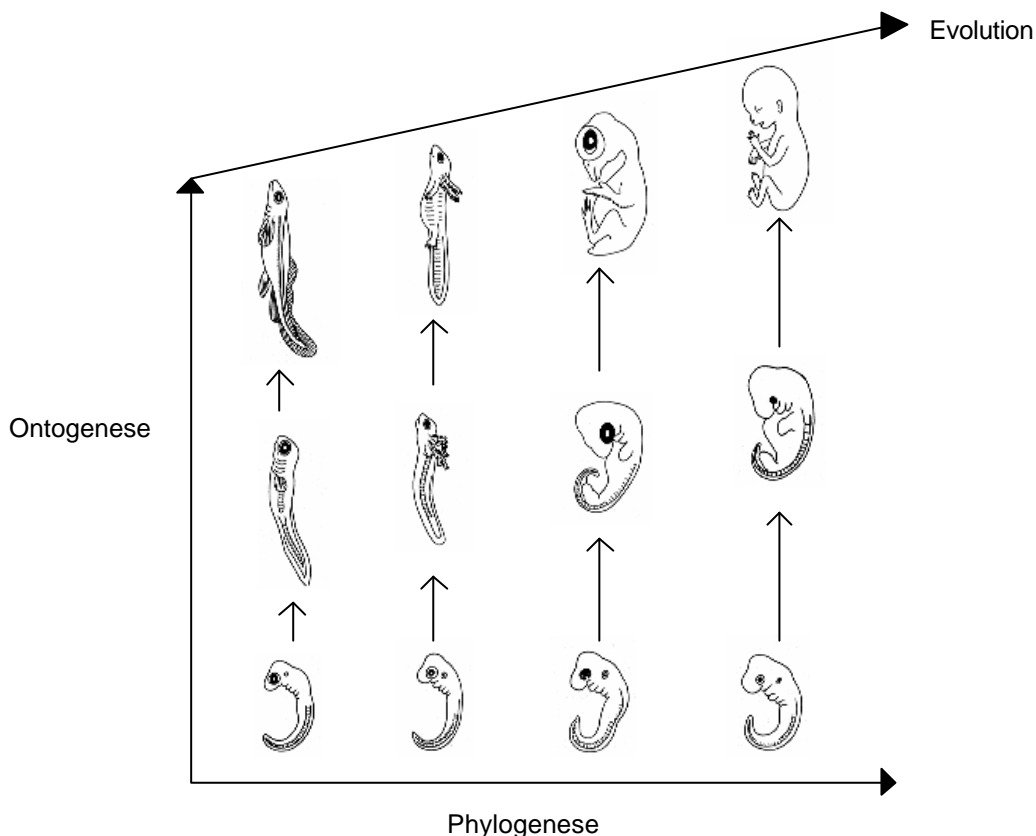


Abb. 10-1: Darstellung von Embryonalstadien verschiedener Tierspezies und des Menschen unter evolutiver, onto- und phylogenetischer Sicht (von links nach rechts: Knochenfisch, Molch, Vogel und Mensch)

Wie aus Abb. 10-1 hervorgeht, ähneln sich die Embryonalstadien aller Vertebraten (Wirbeltiere). So kann man z. B. in entsprechenden Entwicklungsstadien große Übereinstimmungen zwischen Embryonen von Maus und Mensch feststellen. Beispielhaft zeigt sich dieser Sachverhalt auch in der Entwicklung des Herzens. Hier wird bei sämtlichen Vertebraten zunächst ein schlauchförmiges Herz mit 6 Arterienbögen angelegt, das erst später, z. B. bei Vögeln und Säugern, zu einem Herzen aus zwei Arterien und zwei Herzkammern führt und damit zu einer vollständigen Trennung von Körper- und Lungenkreislauf. Während der Embryonalentwicklung beim Säuger erfolgt die Versorgung

des Feten über die Placenta, die jedoch innerhalb der Säuger erhebliche Unterschiede aufweist. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede sind es, die es zu bedenken gilt, wenn die Ergebnisse tierexperimenteller Studien auf den Menschen übertragen werden sollen.

In diesem Kurs sollen folgende Themen behandelt werden:

1. Vergleich eines 30 Tage alten menschlichen Embryos mit einem 10 Tage alten Mausembryo
2. Die ersten Differenzierungsprozesse (und ihre Relevanz für die pränatale Diagnostik)
3. Gegenüberstellung verschiedener Säugerembryonen (z. T. mit Placenta) an Demonstrationspräparaten
4. Untersuchung lebender Hühnerembryonen

1. Vergleich von Mensch- und Mausembryo

AUFGABEN:

1. Fertigen Sie eine Skizze eines 10 Tage alten Mäuse-Embryos (unter Lupenvergrößerung) und beschriften Sie diese.
2. Vergleichen Sie diese Skizze mit der vorgegebenen Abb. 10-2 eines 30 Tage alten menschlichen Embryos und geben Sie an, welche Übereinstimmungen und Unterschiede Sie feststellen können.

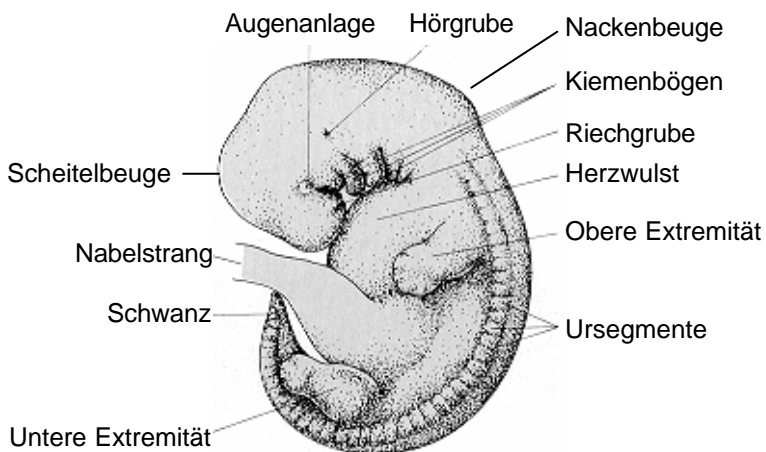


Abb. 10-2: menschlicher Embryo
(8mm lang, 30 Tage alt)

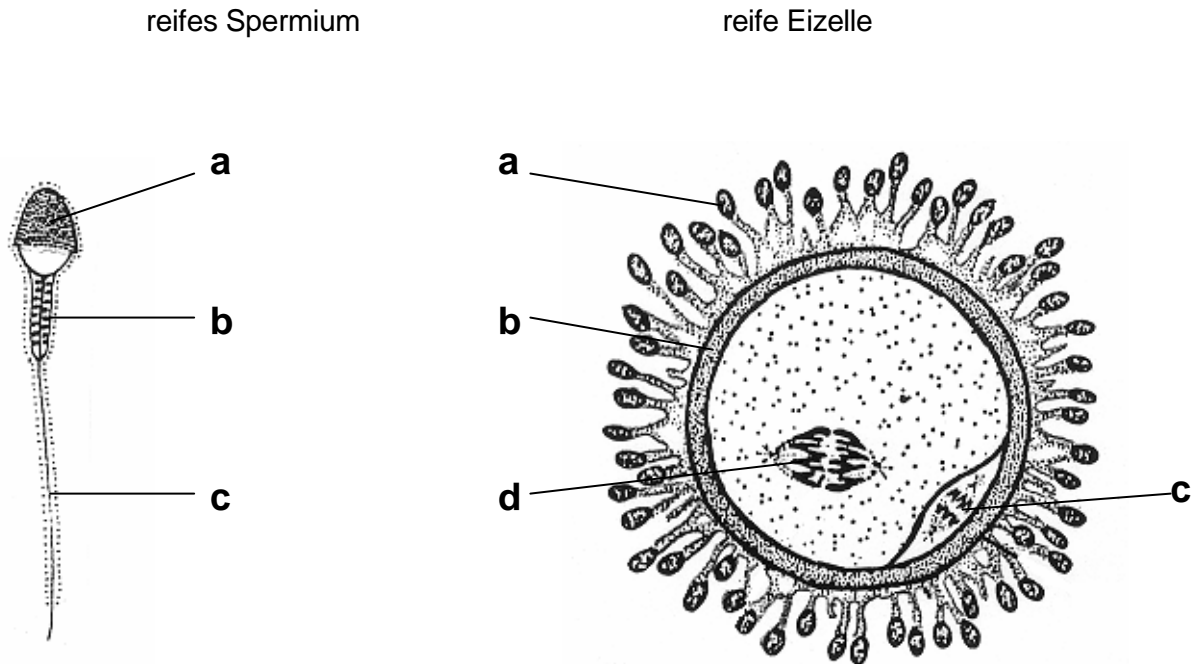
Skizze:
Mäuse-Embryo
(10 Tage alt)

2. Die ersten Differenzierungsprozesse (und ihre Relevanz für die pränatale Diagnostik)

1. Aufbau der Gameten

AUFGABE:

Beschriften Sie die Abbildung



- a.
- b.
- c.

- a.
- b.
- c.
- d.

Die Oogenese und die Spermiogenese führen zur Entstehung von haploiden Gameten, den Spermien und den Oozyten, so daß bei der Befruchtung wiederum eine Zelle mit diploidem Chromosomensatz entsteht. Wie die schematische Darstellung in Abb. 10-3 zeigt, beginnt die Meiose im weiblichen Geschlecht bereits während der Embryonalentwicklung, es kommt zur Paarung der homologen Chromosomen und dem Eintritt in ein "Ruhestadium", dem Dictyotän. Mit den Menstruationszyklen kommt es in einigen Eizellen zur ersten Reifeteilung mit Abschnürung des ersten Polkörperchens und Ovulation. Nach Eindringen des Spermiums erfolgt die zweite Reifeteilung mit Abschnürung des zweiten Polkörperchens. Mit der Kernverschmelzung ist die eigentliche Befruchtung abgeschlossen. Die folgenden mitotischen Zellteilungen führen zur Entstehung der Blastozyste, bei der sich die ersten differenzierten Zellen unterscheiden lassen, die des Embryoblasten, aus denen sich später

u.a. der eigentliche Embryo entwickelt und die des Trophoblastes, der später wesentliche Teile der Plazenta ausbildet.

In Abb. 10-4 ist vereinfacht die embryonale Entwicklung vom 32-Zellstadium (Morula) an wiedergegeben und zwar mit Angabe derjenigen embryonalen und extraembryonalen Gewebe, wie sie zum Zeitpunkt der Geburt vorliegen. Zugleich wird daraus ersichtlich, daß bei der vorgeburtlichen Diagnostik ganz unterschiedliche Gewebe untersucht werden, je nachdem ob man Chorionzotten direkt oder nach Kultivierung analysiert bzw. die nach Amniozentese gewonnenen Fruchtwasserzellen oder die durch Punktion der Nabelschnurgefäße (Cordozentese) erhältlichen Blutzellen.

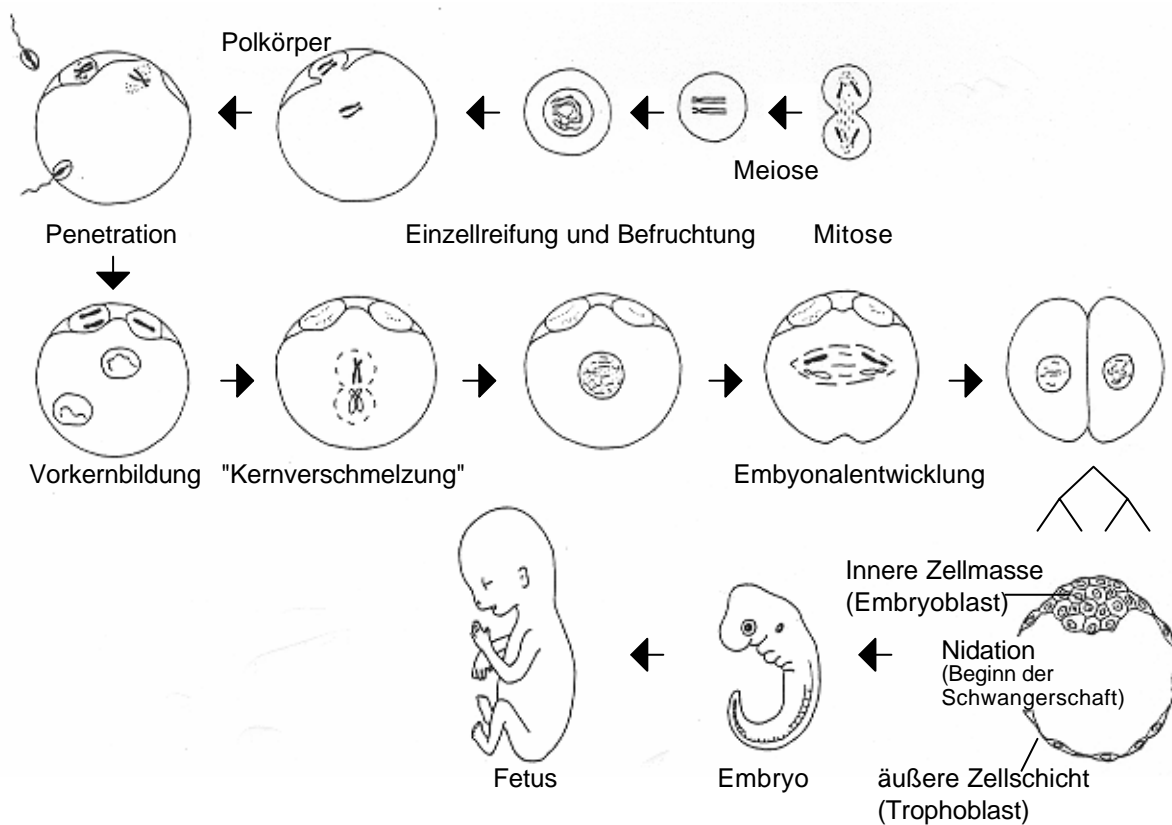


Abb. 10-3 Schematische Darstellung von Eizellreifung, Befruchtung und embryonaler Entwicklung beim Menschen. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabgerecht angegeben.

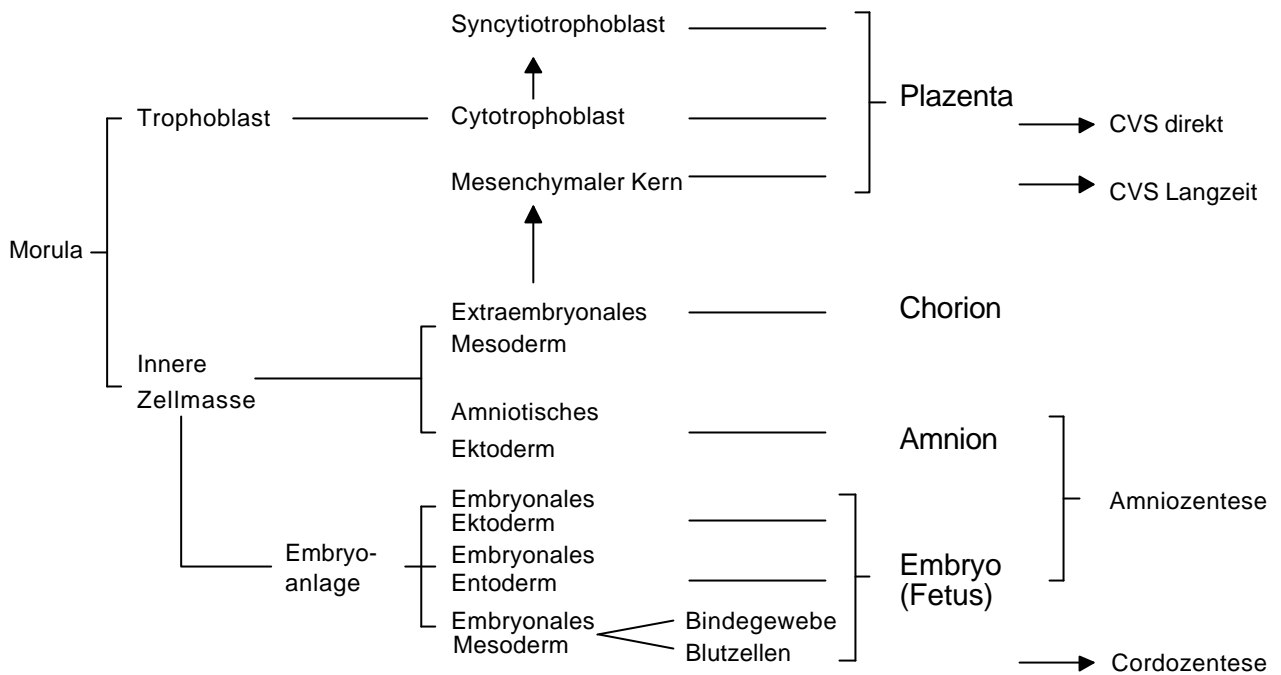


Abb. 10-4 Wichtige Differenzierungsschritte, die für die Interpretation chromosomaler Mosaikbefunde in der vorgeburtlichen Diagnostik von Bedeutung sind.

Beantworten Sie folgende Fragen:

1. Wie erklären Sie den folgenden vorgeburtlichen Befund: Die Direktaufarbeitung der Chorionzotten (CVS direkt) ergab ein Mosaik aus 46,XY und 47,XY,+7 Zellen, die Langzeitkultur der Zotten und die Analyse der Fruchtwasserzellen einen ausschließlich normalen männlichen Karyotyp.

2. Welcher vorgeburtliche Chromosomenbefund ist zu erwarten, wenn die Zygote einen trisomen Chromosomensatz 47,XX,+13 aufwies und bei einer Zellteilung der inneren Zellmasse das überzählige Chromosom verloren ging. Beachten Sie, daß mehrere richtige Antworten möglich sind:

- CVS direkt
- CVS Langzeit
- Amniozentese
- Cordozentese

3. Bei einer trisomen Zygote, 47,XY,+15, die ein zusätzliches väterliches (mütterliches) Chromosom 15 aufweist, kommt es in der ersten mitotischen Zellteilung zu dem Verlust des einen mütterlichen (väterlichen) Chromosoms 15. Sämtliche Zellen des Feten haben danach

einen diploiden Chromosomensatz, bei dem jedoch die beiden Chromosomen 15 von nur einem Elternteil stammen (uniparentale Disomie). Welcher phänotypische Befund ergibt sich bei

paternaler Isodisomie 15:

maternaler Isodisomie 15:

4. Das Kind eines gesunden Elternpaares ist an Cystischer Fibrose (Mukoviszidose) erkrankt, einem autosomal rezessiv vererbten Stoffwechseldefekt. Das CF Gen liegt auf dem Chromosom 7. Die molekulargenetische Analyse zeigt, daß das Kind homozygot für ein bestimmtes CF Allel ist, die Mutter heterozygot hierfür. Der Vater hat zwei normale Allele, die Vaterschaft ist bewiesen. Welche Erklärung haben Sie für diesen ungewöhnlichen Befund (eine Neumutation am CF Gen kann ausgeschlossen werden) ? Geben Sie in schematischer Darstellung die Entstehungsweise an.

3. Gegenüberstellung verschiedener Säugerembryonen (z. T. mit Placenta)

Die Präparate von folgenden Embryonen werden im Praktikum ausgestellt:

Objekt	Tragezeit (Tage)	Alter der Embryonen (Tage)	Placenta
Rind	280	90	nicht vorh.
Schaf	154	63, 100	vorh.
Ziege	150	77, 90	nicht vorh.
Schwein	114	110, 77, 56	nicht vorh.
Katze	60	42	vorh.

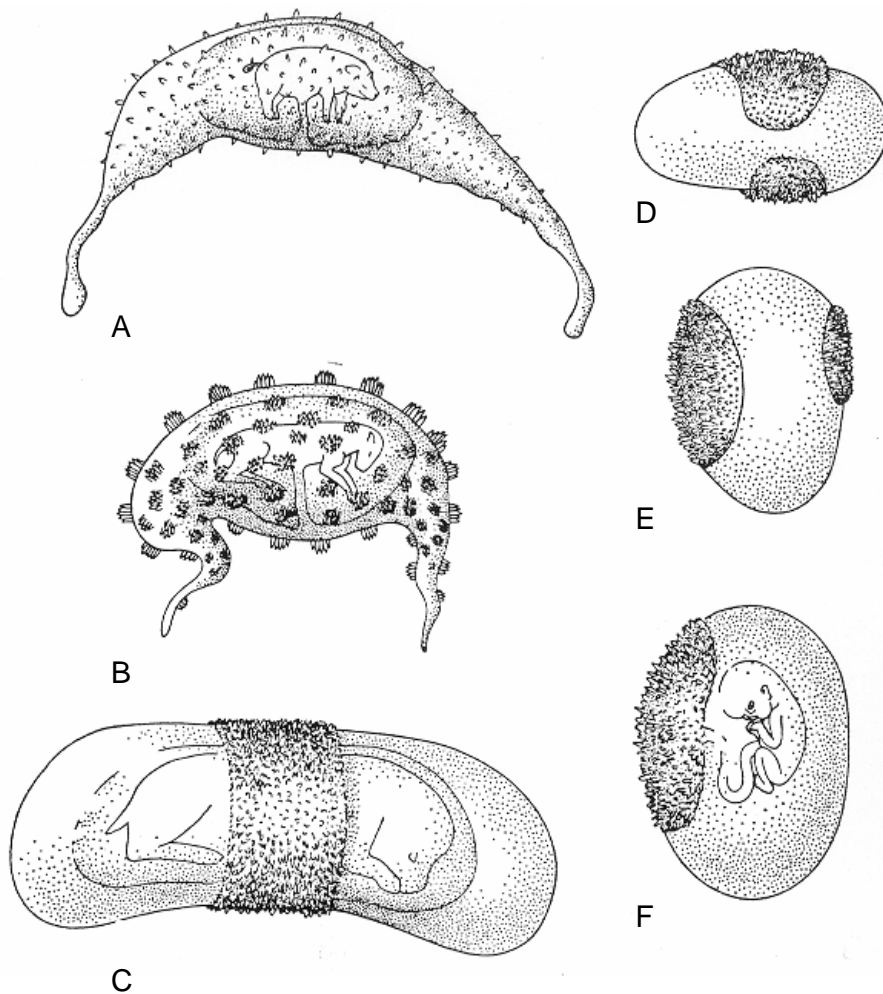


Abb. 10-5 Äußere Form der Placenta bei verschiedenen Placentaliern. Bei A und B sind die mütterlichen und embryonalen Teile locker verbunden und trennen sich unbeschädigt. Bei C bis F sind beide Teile verwachsen und bilden bei der Trennung (Geburt) Wundflächen.

A. Placenta diffusa (z.B. Schwein); B. Placenta cotyledonia (z.B. Rind); C. Placenta zonaria (z. B. Hund, Katze); D. unvollständige P. zonaria (z. B. Waschbär); E. Placenta bidiscoidalis (z.B. Affen); F. Placenta discoidalis (Mensch).

4. Untersuchung lebender Hühnerembryonen (Alter 3 und 4 Tage)

THEORETISCHE EINFÜHRUNG:

Nachdem Sie in einem vorhergehenden Kurs einen Säuger (Maus/Ratte) präpariert haben und heute von einem Mäuse-Embryo eine Skizze angefertigt und diese mit dem menschlichen Embryo verglichen haben, wenden wir uns einem anderen biologischen Präparat zu, das gewisse Rückschlüsse auf die Embryonalentwicklung der Wirbeltiere, also auch auf die des Menschen gestattet, **dem bebrüteten Hühnerei**.

An diesem, leicht zugänglichen Objekt kann man Vorgänge und Strukturen studieren, die für die embryonale Entwicklung aller Amniota charakteristisch sind, also nicht nur bei Reptilien und Vögeln, sondern in abgewandelter Form auch bei den Säugern, einschließlich dem Menschen vorkommen. Amniota sind Tiere, deren Embryonen mit einer inneren Hülle - Amnion - und einer äußeren Hülle - Serosa - geschützt sind, sowie einen embryonalen Harnsack - Allantois - besitzen .

Ein Blick auf die Keimscheibe am Ende des 3. Bebrütungstages:

Die Eizelle des Vogels teilt sich nach der Befruchtung in der Weise, daß zunächst nur der oberflächennahe Bereich des "leichten" Dotterpoles in Zellen zerlegt wird. Da dieser Prozeß beim Huhn im Eileiter beginnt, sitzt dem Dotter des frisch abgelegten, befruchteten Hühnereies bereits eine vielzellige, weißliche Keimscheibe auf, die sich in den folgenden Tagen über den Dotter ausbreitet und der Nährstoffversorgung des Embryos dient. Aus der Mitte der Keimscheibe geht durch komplizierte Zellwanderungen und Faltungsprozesse der "Grundbauplan" des Wirbeltierkörpers hervor. In diesem Stadium ist der isolierte Hühnerembryo anderen Wirbeltierembryonen, also auch dem menschlichen Embryo, so ähnlich, daß nur der Fachmann ihn von diesen unterscheiden kann. Zuvor sind schon, verstreut über die peripheren Bezirke der Keimscheibe, kleine Inseln mit roten Blutkörperchen entstanden, die als Blutlakunen bezeichnet werden. Sie verschmelzen miteinander zu Blutgefäßen, die bald Anschluß an das im Embryo angelegte und schon pulsierende, schlauchförmige Herz erlangen. Nach kurzer Zeit hat sich in diesem Gefäßhof ein Dotterkreislauf etabliert, der dem Embryo die Nährstoffe aus dem Dotter zuführt.

Bereits mit bloßem Auge kann man den gesamten Randsinus erkennen, der den etwa pfenniggroßen Gefäßhof als roter Ring umgrenzt. Besonders auffällig ist ein roter Punkt, der nahe dem Zentrum der Scheibe in schnellem Rhythmus erscheint und verschwindet . Hierbei handelt es sich um den gebogenen Herzschnlauch, der nahezu unsichtbar wird, wenn er das Blut herauspumpt. Ein verzweigtes Arteriensystem verteilt das Blut über die Keimscheibe. Zum Randsinus kehrt es, über ein Netz von Dottervenen, wieder zum Herzen zurück. Mit der Lupe können einige dieser Gefäße erkannt werden.

Im Durchlicht läßt sich der Dotterkreislauf im Detail studieren, aber auch Herz und Körper des Embryos sind gut zu erkennen.

Keimscheibe am Ende des 4. Bebrütungstages:

Zwischen Amnion (innen) und Serosa (außen), die den Embryo vom Eiklar trennen, entwickelt sich etwa am 4. Bebrütungstag ein weiteres "extraembryonales Organ", die Allantois. Diese sich rasch vergrößernde Ausstülpung des embryonalen Darmrohres dient der Exkretion während der Brutdauer und wird intensiv mit Blutgefäßen versorgt. Wie in der Keimscheibe, so entwickelt sich auch in der Wand der Allantois ein Kreislauf:

Zwei Arterien aus der hinteren Körperregion führen ihr Blut zu, zwei Venen leiten es zum Herzen zurück. Bereits zwei bis drei Tage später erreicht die Allantois die innere

Schalenhaut und breitet sich dort so stark aus, daß sie schließlich fast die gesamte Innenfläche der Schale bedeckt.

Am 4. Bebrütungstag sind beim Embryo bereits Extremitätenanlagen, sowie eine pigmentierte Iris erkennbar. Besonders auffällig sind die vergleichsweise enorme Größe von Gehirnanlage und Auge. Die Lebensfunktionen eines solchen Präparates können stundenlang erhalten bleiben, wenn man ein zu starkes Absinken der Temperatur verhindert.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Beobachtung an der lebenden Hühnerkeimscheibe nach drei- und viertägiger Bebrütungsdauer.

OBJEKT: bebrütete Hühnereier

MATERIAL:

1. bebrütete Hühnereier
2. Petrischalen
3. Scheren
4. Pasteurpipetten
5. Gummihütchen
6. Filterpapier
7. Pinzetten
8. Lupen
9. **warme** physiologische Kochsalzlösung

PRÄPARATIONSANLEITUNG:

1. Die bebrüteten Eier vor dem Öffnen einige Minuten **waagrecht** liegen lassen. Dabei gelangt die Keimscheibe nach oben.
2. Öffnen des Eies: Vorsichtig hochnehmen, dabei waagrecht halten. An der Schüsselkante aufschlagen, die Bruchstelle zeigt immer nach unten. Das angeschlagene Ei

mit der Bruchstelle nach unten, dicht über dem Boden einer Petrischale, durch eine rasche Bewegung nach oben aufbrechen lassen. In dem Eiweiß schwimmt das gelbe Dotter, die Keimscheibe sollte oben zu sehen sein.

3. Abtrennen der Keimscheibe: Anfertigen eines Ringes aus Filterpapier. Der Durchmesser des Ringes sollte geringfügig größer sein als der Gefäßhof, der auf der Keimscheibe zu sehen ist. Randbreite des Ringes soll etwa 0,5 cm sein. Der Ring soll so auf die Keimscheibe gelegt werden, daß der Gefäßhof ganz im Inneren des Ringes liegt. Ring leicht andrücken. Die Dottermembran am Außenrand des Ringes mit der Schere abschneiden. Ring vorsichtig abheben. Die Keimscheibe bleibt zwischen dem Ringrand gespannt haften und muß sofort in eine Petrischale, deren Boden mit warmer physiologischer Kochsalzlösung bedeckt ist, überführt werden. Wenn notwendig das "Präparat" mit warmer Kochsalzlösung abspülen. Zur Konstanzhaltung der Temperatur die Petrischale auf die Tischbeleuchtung stellen.

Das so gefertigte Präparat kann nun mit einer Lupe oder der Lupenvergrößerung des Mikroskopes betrachtet werden.

AUFGABEN:

1. Fertigen Sie eine Zeichnung Ihres Präparates an und beschriften Sie diese.

Achten Sie insbesondere auf:

- a) das Blutgefäßsystem (Dottersackgefäße, Randsinus, Herz)
- b) die Embryonalanlage (der Kopf ist leicht ventral geneigt, die Segmentierung ist gut zu erkennen)
- c) die Größenverhältnisse und Differenzierungsgrade (Kopf-, Körper-, Embryo - Kreislaufsystem).

Zeichnung :

11 SÄUGERANATOMIE

THEORETISCHE EINFÜHRUNG:

Die Säuger werden als die am höchsten entwickelten Vertebraten (Wirbeltiere) betrachtet. Die Entstehung der ersten Formen reicht etwa 130 Millionen Jahre zurück, in das Mesozoikum. Sie stammen - ebenso wie die Vögel - von reptilienähnlichen Vorfahren ab. Die urtümlichsten Vertreter der Säuger, die Kloakentiere Australiens, legen noch Eier, säugen aber bereits die Jungen. Die Beuteltiere, die eine weitere Unterklasse der Säuger darstellen, haben noch keine echte Plazenta ausgebildet und bringen unfertige Junge zur Welt. Erst bei den Vertretern der Unterklasse Placentalia (placentabildende Säugetiere), zu denen auch der Mensch gehört, verläuft die Keimesentwicklung vollständig geschützt im Mutterleib.

Als den Tetrapoden (Amphibien, Reptilien, Vögel und Säuger) zugehörig, verfügen die Säuger über **2 primär fünfzehige Extremitätenpaare**, ein **verknöchertes Skelett** und eine **paarige Lunge (Luftatmung!)**. Mit den Amnioten (Reptilien, Vögel, Säuger) treten als weitere Merkmale die Ausbildung von Embryonalhüllen (**Amnion, Serosa**) und einer embryonalen Harnblase (**Allantois**) hinzu. Für die Säuger kennzeichnend sind folgende Eigenmerkmale:

1. **Drüsenreiche Haut** (Schweißdrüsen, Talgdrüsen usw.); spezialisierter Drüsentyp: **Milchdrüsen** (bei Monotrematen Drüsenfeld; bei allen übrigen Säugern sind Zitzen = **Mammae** ausgebildet).
2. **Behaarung** (Haare nicht homolog mit Federn oder Reptilienschuppen).
3. **Vollständige Trennung des Herzens in 2 Vorkammern und 2 Hauptkammern** und damit Trennung von **arteriellem** und **venösem** Blutkreislauf.
4. **Homoiothermie** (konstante Körpertemperatur), konvergente Entstehung zur Warmblütigkeit der Vögel.
5. **Diphyodonte Bezahnung** (Milch- und Dauergebiss)
6. **Vollständiges Zwerchfell** (Diaphragma trennt Brust - und Bauchhöhle voneinander)

Mit dem Aussterben der Saurier vor etwa 60 bis 70 Millionen Jahren erfolgt die enorme Verbreitung und Aufspaltung der Placentaler, u.a. auch in die Nagetiere und die Primaten. Die getrennte Entwicklung von Mensch und den rezenten Menschenaffen liegt etwa 6 bis 10

Millionen Jahre zurück. Den modernen Menschen , Homo sapiens sapiens, gibt es seit etwa 40.000 Jahren.

Die Stellung des Menschen innerhalb der Säugetiere macht auch die besonders große Übereinstimmung mit diesen tierischen Vertretern in morphologisch-anatomischer, aber auch physiologischer Hinsicht verständlich. Dies ist die entscheidende Begründung, weshalb so viele, wesentliche medizinischen Erkenntnisse durch entsprechende Tierexperimente gewonnen werden konnten. Daraus folgert aber zugleich, daß diese Tiere körperliche Schmerzen und psychischen Stress erleiden können und schon deshalb an die Durchführung derartiger Experimente strengste Kriterien gelegt werden müssen.

Die Tiere für unseren Kurs zur Anatomie der Nager stammen als Kontrollen aus solchen genehmigten Experimenten. Sie wurden schmerzlos getötet und tiefgefroren aufbewahrt.

MATERIAL :

1. Maus bzw. Ratte
2. Präparierbesteck
3. Nadeln
4. Styroporplatten mit Zellstoffauflage
5. Einmalhandschuhe

AUFGABEN:

1. Äußere Inspektion des zu untersuchenden Tieres und Beurteilung nach Art (Maus, Ratte), Geschlecht (♀, ♂) und Alter (juvenil , adult) .

Behaarung: Wollhaare, Grannenhaare, Spürhaare

Extremitäten: Hinterpfoten 5 Zehen, Vorderpfoten 4 Zehen (1. Zehe reduziert)

Nagezähne:

Beim ♀ Zitzen (Mammae):

Feststellen der Art :

Maus: 3 Paar Thorakal- und 2 Paar Abdominalzitzen

Ratte: 3 Paar Thorakal- und 3 Paar Abdominalzitzen

Feststellen des Geschlechtes:

männl.: Penis mit Urogenitalöffnung, Skrotum

weibl.: Klitoris, Vaginalöffnung (kein Sinus urogenitalis, Harnröhre mündet getrennt von der Geschlechtsöffnung an der Basis der Klitoris)

Feststellen des Alters :

2. Sectio einer Maus bzw. Ratte

Präparationsschritt 1:

Tier in Rückenlage mit Nadeln an den Extremitäten spreizen und festnadeln; Bauchhaut anheben und median nach vorne und nach hinten (seitlich an Klitoris bzw. Penis vorbei) aufschneiden; Bauchhaut mit dem Skalpell von der Unterseite ablösen, ausbreiten und mit Nadeln feststecken.

Beim ♀ unter der Haut flach ausgebreitete Milchdrüsen.

Präparationsschritt 2:

Bauchdecke mit einer Pinzette leicht anheben, mit der Schere anschneiden und Bauchhöhle entlang der sehnigen Linea alba eröffnen; vom Sternum aus beiderseits Schnitt entlang des hintersten Rippenbogens legen; Bauchdecke ausklappen und feststecken.

Zu erkennen ist eine vollständige Trennung von Brust- und Bauchhöhle durch das **Diaphragma** (durch das Diaphragma hindurch treten: Ösophagus, Vena cava posterior und Aorta descendens).

Wir untersuchen zuerst die Bauchhöhle .

Organe der Bauchhöhle:

Leber Maus: Gallenblase

Ratte: Gallenblase fehlt

Magen (größtenteils von Leber bedeckt)

Cardia: Einmündungsstelle des Ösophagus

Fundus: Magengrund

Pylorus: Pförtner, Übergang in den Darm

Zwölffingerdarm Duodenum

Dünndarm Jejunum (magennaher Abschnitt)

Ileum (magenferner Abschnitt)

Blinddarm Coecum (groß, am Ende mit Wurmfortsatz)

Dickdarm Colon

Bauchspeicheldrüse Pankreas (hellrot, verzweigt)

Milz

Präparationsschritt 3:

Um das Urogenitalsystem besser zu untersuchen, heben wir den Blinddarm vorsichtig (ohne die Mesenterien zu verletzen) an und legen ihn mit großen Abschnitten des Dünndarms außerhalb der Bauchhöhle ab.

Urogenitalsystem:

Nieren	(paarig)
Nebennieren	(dem oberen Nierenrand aufsitzend)
Harnleiter	Ureter (paarig)
Harnblase	
Harnröhre	Urethra (beim ♀ kurz; beim ♂ lang in der Penisspitze mündend)
♀	
Ovar	mit Graaf'schen Follikeln
Ovidukt	(beginnt mit geöffnetem Trichter Ostium tubae und mündet im paarigen Uterus)
Uterus duplex	zwei Lumina (Uterus bicornis)
Fettkörper	
Vagina	einheitliches Lumen
♂	
Skrotum	
Hoden	
Nebenhoden	(gliedert sich in Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz)
Samenleiter	Ductus deferens (treten durch Leistenring in die Bauchhöhle, überbrücken Ureteren und münden am Blasengrund in den Urogenitalkanal)
Prostata	
Mastdarm - Rectum	

Präparationsschritt 4:

Geschlechtsorgane aus dem Tierkörper herausheben und genauer untersuchen, dabei wird auch die Aufspaltung der Aorta zu den Gefäßen der hinteren Extremitäten (**Aorta iliaca**) und der Schwanzarterie (A. caudalis) sichtbar.

Wer ein Männchen präpariert, kann versuchen aus dem Nebenhodenschwanz, die dort abgelagerten Spermien mit physiologischer Kochsalzlösung auf einen Objektträger herauszuspülen. Zum Teil werden einige Spermien unter dem Mikroskop sichtbar .

Präparationsschritt 5:

Eröffnung der Brusthöhle: Zwerchfell am Rippenbogen entlang aufschneiden, rechts und links vom Brustbein durchtrennen; Rippen tiefer abschneiden und Brustbein entfernen; Halsmuskeln durch Medianschnitt spalten und Trachea freilegen.

Organe der Brusthöhle :

Herz	vom Pericard (Herzbeutel) umgeben: linke Herzkammer entläßt Aorta descendens nach hinten; rechte Herzkammer entläßt Lungenarterie (A. pulmonalis); von der Lunge führt die Vena pulmonalis in die linke Vorkammer; die Körpervenen vereinigen sich zu zwei vorderen und einer hinteren Hohlvene, die in die rechte Vorkammer münden.
Lunge	frei aufgehängt, linker Lungenflügel ungeteilt, rechter Lungenflügel besteht aus drei Lappen
Trachea	Knorpelspange - gestütztes Rohr
Thymusdrüse	bei jungen Tieren groß, bei älteren klein
Speicheldrüse	zwei Paar
Schilddrüse	rotbraun, zweilappig

Präparationsschritt 6:

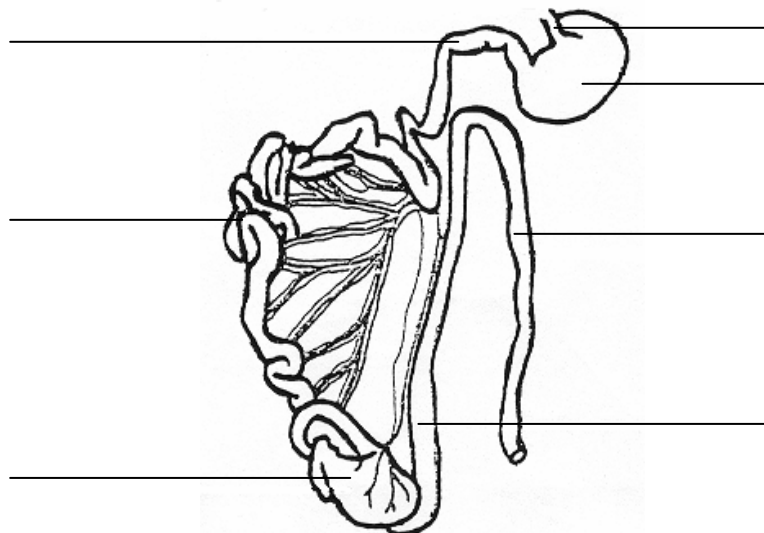
Soweit möglich, nach Anweisung des Tischassistenten(in) "Kopf und Gehirnuntersuchung" durchführen.

Präparationsschritt 7 :

Hier sollte von Ihnen der gesamte Speiseröhre - Magen - Darmtrakt bis zum Rectum herauspräpariert werden. Ösophagus in der Halsregion durchtrennen, das Rectum dicht vor der Mündung; Darmtrakt herausheben und nach Durchtrennung der Mesenterien auseinanderlegen.

AUFGABEN:

1. Bezeichnen Sie die einzelnen Darmabschnitte in Abb. 11-1.



2.. Bezeichnen Sie die einzelnen Organe in Abb. 11-2.

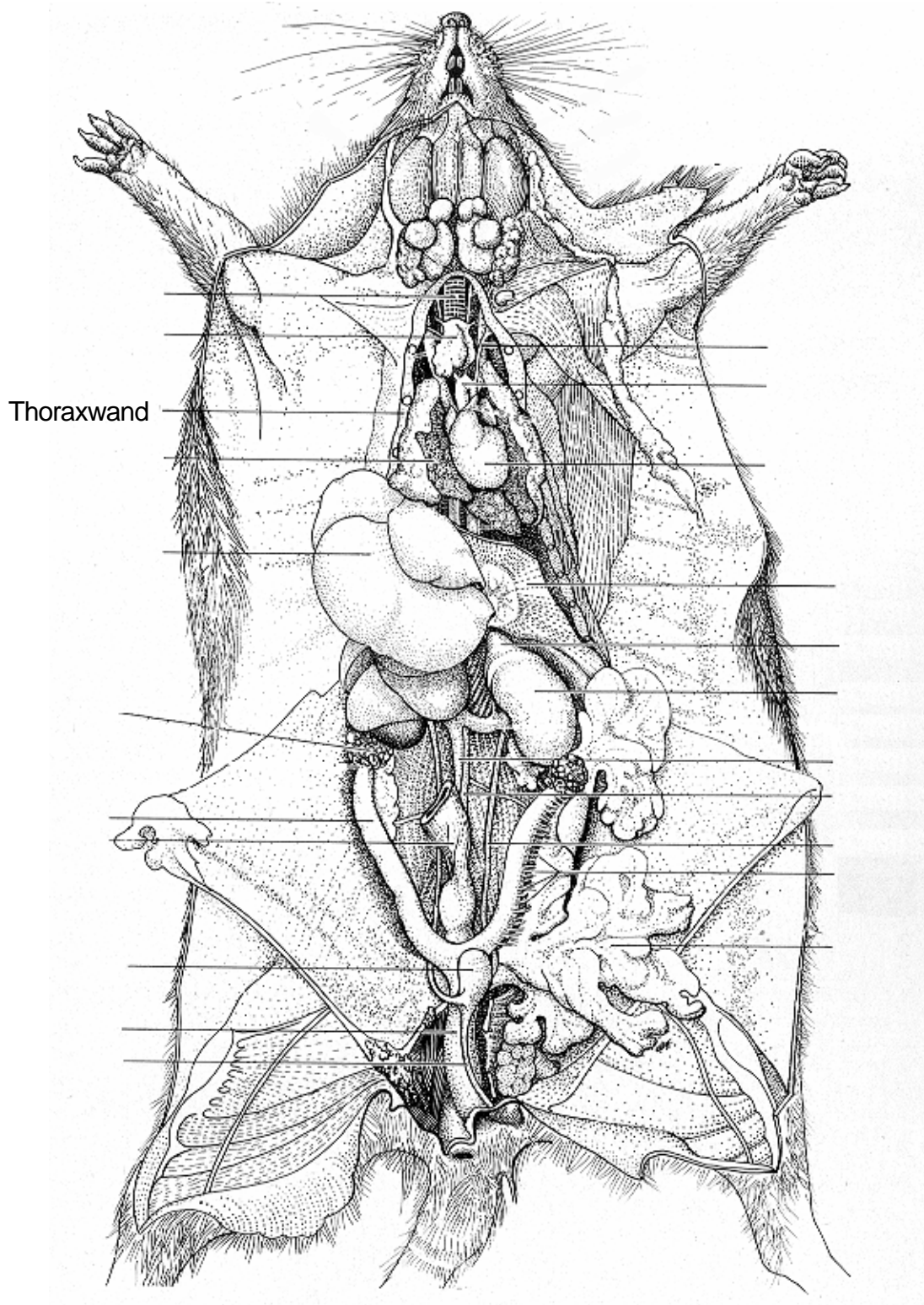


Abb. 11-2 Anatomie einer weiblichen Ratte (der Darm ist entfernt)

3. Bezeichnen Sie die einzelnen Organe in Abb. 11-3.

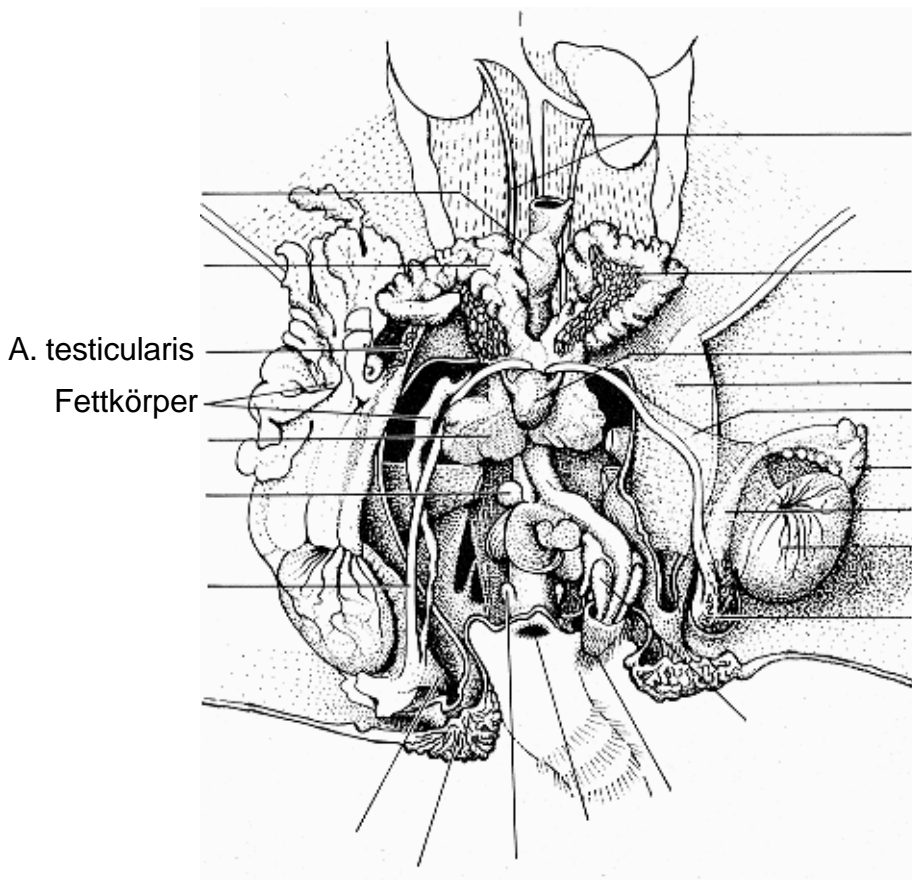


Abb. 11-3 Geschlechtsorgane einer männlichen Ratte

- | | |
|--|----------------------------------|
| A. Anus | C. Ductus deferens |
| B. Corpus epididymis | E. Glandula vesicularis |
| D. Glandula bulbo-urethralis | G. Harnblase |
| F. Gubernaculum testis | I. Leistenkanal |
| H. Hoden | K. Nebenhodenkopf |
| J. Mesorchium | M. Penisspitze |
| L. Nebenhodenschwanz | O. Prostata (li. vorderer Lobus) |
| N. Präputialdrüsen | Q. Rectaldrüsen |
| P. Prostata (dorsolaterale und ventrale Loben) | S. Scrotum |
| R. Rectum | |
| T. Ureteren | |

.

12 MIKROBIOLOGIE

THEORETISCHE EINFÜHRUNG:

Die Mikroorganismen werden aufgrund ihrer geringen Größe (nur licht- oder elektronenmikroskopisch sichtbar) und ihrer vergleichsweise geringen morphologischen Differenzierung vom Tier- und Pflanzenbereich abgegliedert und als **Protisten** (Heckel, 1866) bezeichnet. Systematisch unterscheidbar sind 3 Gruppen:

1. die **eukaryontischen Mikroorganismen** (Protozoen und Pilze)
2. die **Prokaryonten** (Bakterien und Blaualgen)
3. die **Viren**, die, da sie keine zelluläre Organisation aufweisen, als infektiöse biochemische Einheiten bezeichnet werden. (Übersicht über die Unterschiede in der Organisation der einzelnen Gruppen in **Tabelle 1**).

Das überwiegende Interesse des Mediziners gilt den pathogenen Mikroorganismen, die im menschlichen Körper parasitieren und durch ihre chemische Konstitution, durch ihre Stoffwechselprodukte oder durch genetische Umregulierung der Zellen des Wirtes (Viren) eine Gegenreaktion des Wirtsorganismus erzeugen (= Infektionskrankheit). Da die Anzahl der humanpathogenen Mikroorganismen, gemessen an der Gesamtzahl der in der Natur vorkommenden Arten, gering ist, muß der Mediziner in der Lage sein, pathogene von apathogenen Arten zu unterscheiden. Vielen apathogenen Arten kommt zudem eine große medizinische Bedeutung als Antibiotikaproduzenten zu.

Im Rahmen des Praktikums soll vor allem näher auf die Gruppe der Bakterien eingegangen werden.

Die Differenzierung der einzelnen Bakterienarten erfolgt durch:

- a) ihr Verhalten in der Kultur (Kolonieform und -farbe, Hämolyseverhalten)
- b) ihre Morphologie
- c) die Gram-Färbung
- d) ihre biochemischen Leistungen (biochemische Reihe)
- e) Antigen-Antikörperreaktion (serologisch)

zu a) Bakterien lassen sich mit Ausnahme weniger obligat parasitärer Formen auf einfachen, mit Bouillon, Serum oder Blut angereicherten Nährböden züchten. Die im Kurs verwendeten Blutagarplatten ermöglichen auch das Anzüchten von anspruchsvollen Keimen und bieten zusätzlich die Möglichkeit, sowohl α - als auch β -Hämolyse nachzuweisen, wodurch eine nähere Charakterisierung der Bakteriengruppe ermöglicht wird. Die Hämolyse

wird durch Toxine (α - oder β -Hämolysin) verursacht, die neben anderen Enzymen von bestimmten Bakterienarten gebildet werden und die am Invasionsvermögen und an der gesamten Pathogenese beteiligt sind. Hämolysierende Bakterien müssen immer als potentiell pathogen angesehen werden.

zu c): Die Gram-Färbung (GRAM, 1884) ist ein wichtiges taxonomisches Merkmal und basiert auf der Anfärbbarkeit der Mureinzellwand der Bakterien mit Kristallviolett. Die grampositiven Bakterien besitzen eine mehrschichtige Mureinzellwand, die nach der Färbung einen Kristallviolett-Jod-Komplex zurückbehält. Hingegen wird dieser Farbstoffkomplex von Bakterien mit einschichtiger Mureinzellwand nicht zurückgehalten, sie sind gramnegativ.

zu d): Eine weitere Charakterisierung bestimmter Bakterienstämme ist durch die Prüfung ihrer biochemischen Aktivitäten möglich. Die Erkennung von spezifischen Stoffwechselvorgängen einzelner Bakterienarten oder -gattungen ist für ihre Identifizierung und Unterteilung und damit für die gesamte bakteriologische Diagnostik von größter Bedeutung. Dies trifft speziell für Gruppen zu, die morphologisch nicht unterscheidbar sind, wie z.B. die Enterobakterien.

In der biochemischen ("bunten") Reihe werden Veränderungen verschiedener Zuckerarten oder bestimmter Proteine nach erfolgter Inkubation geprüft.

Im Rahmen des Praktikums sollen Bakterien auf die Fähigkeit zur Lactose-Spaltung getestet werden. Hierzu wird ein Nährboden verwendet, der insbesondere in der Diagnostik von Enterobakterien Verwendung findet und dem neben Lactose der Indikator Bromthymolblau zugesetzt ist (Brolac-Agar = Bromthymolblau-Lactose-Agar). Der Abbau von Lactose zu Lactat durch sogenannte Lactose-positive Bakterienstämme bewirkt einen Umschlag des pH-Indikators zu gelb, während Alkalisierung einen Umschlag zu blau erzeugt. Derartige Nährböden werden als Indikatornährböden bezeichnet und ermöglichen eine schnelle makroskopische Beurteilung der spezifischen Stoffwechselaktivitäten eines Bakterienstammes.

OBJEKT:

Verschiedene aerobe und fakultativ anaerobe Bakterienspezies

Tabelle 1

	Protozoa	Pilze	Bakterien	Viren
<i>Zelluläre Organisation</i>	Eukaryonten Mitochondrien vorhanden Chloroplasten fehlen 80S-Ribosomen	Eukaryonten Mitochondrien vorhanden Chloroplasten fehlen 80S-Ribosomen Zellwand: Chitin oder Zellulose	Prokaryonten Mitochondrien fehlen, Äquivalent: Mesosom Chloroplasten fehlen 70S-Ribosomen Mureinzellwand	keine zelluläre Organisation, werden als infektiöse biochemische Einheiten bezeichnet, bestehend aus NS-Kapsid (Protein) und (fakultativ) Envelope (Bestandteil der Wirtszellmembran)
<i>Größe</i>	10 - 100 µm lichtmikroskopisch sichtbar	10 - 100 µm lichtmikroskopisch sichtbar	0,2 - 0,5 µm lichtmikroskopisch sichtbar	20 - 250 nm lichtmikroskopisch nicht sichtbar
<i>Nukleinsäure</i>	DNA und RNA	DNA und RNA	DNA und RNA	DNA oder RNA; DNA meist doppelsträngig, RNA meist einsträngig
<i>Vermehrung</i>	asexuelle Fortpflanzung durch Querteilung; sexuelle Prozesse mit Generationswechsel	hefeartige Vermehrung durch Sprossung; Hyphenwachstum (Mitose unabhängig von der Zellteilung)	Querteilung (daher die frühere Bezeichnung "Spaltpilze")	intrazelluläre Virusreplikation
<i>Kultivierung</i>	der pathogenen Arten: meist zellfrei, auf mit Blut oder Serum angereicherten Nährböden	auf einfachen Nährböden mit Glucose	auf einfachen Nährböden, mit Serum oder Blut angereichert	in Hühnereiern, Babymäusen oder in Gewebekulturzellen; nicht auf leblosen Nährsubstraten
<i>Therapie</i>	Alkaloide, Antimonverbindungen	fungizide Antibiotika wie z.B. Nystatin	Antibiotika: Streptomycin, Penicilline, Chloramphenicol, u.a.	symptomatisch

MATERIAL:

1. Blutagarplatten
2. Brolac-Platten
3. Ausstrichösen

4. Bunsenbrenner
5. Pinzetten
6. Carbolgentianaviolett-Lösung
7. Lugol'sche Lösung
8. 96 %iger Alkohol
9. Carbofuchsin-Lösung
10. 70 %iger Alkohol (zur Desinfektion)

AUFGABEN:

- A.** Ansetzen der Bakterienkulturen
- B.** Analyse von 5 unterschiedlichen auf den Blutagarplatten gewachsenen Einzelkolonien nach folgenden Kriterien:
 - a)** Verhalten in der Kultur (Kolonieform, Koloniefarbe, Hämolyse)
 - b)** Morphologie (Bakterienform, Begeißelung)
 - c)** Gram-Färbung
- C.** Beurteilung der Fähigkeit von Bakterien zur Lactose-Spaltung mit Hilfe von Brolac-Platten.

A. Ansetzen der Bakterienkulturen:

1. Fraktioniertes Ausspateln von flüssigem Untersuchungsmaterial:

Oberflächenkulturen werden angelegt, um Größe, Form und Farbe von Einzelkolonien zu beurteilen. Zur Erzeugung von Einzelkolonien ist es notwendig, das Material zu fraktionieren, d.h. im Sinne einer zunehmenden Verdünnung auszuspätern .

Ausstrichösen in der Bunsenbrennerflamme **kurz** ausglühen und erkalten lassen.

Eintauchen der Öse in die zu untersuchende Flüssigkeit (Wasser, Sputum, etc.) und Ausspateln der Probe auf einer Blutagarplatte, dabei Ausstrichöse nur leicht über die Oberfläche des Agars führen und zwischen den 3 Ausstrichfeldern absetzen.

2. Fingerabdruck: Finger (ungewaschen - gewaschen) vorsichtig auf der Oberfläche des Agars abrollen (auf Blutagar- oder Brolacplatten).

3. Luftplatten:

Aufstellen von jeweils 3 Luftplatten (Blutagarplatten) pro Tisch.

Alle angelegten Agarplatten werden für 24 Std. bei 37° C unter aeroben Bedingungen (anschließend Lagerung bei +4° C) inkubiert.

B. Analyse von 3 unterschiedlichen auf den Blutagarplatten gewachsenen Einzelkolonien nach folgenden Kriterien:

a) Verhalten in der Kultur:

Bestimmen Sie Form, Größe und Farbe der Kolonien; zeigt die Kolonie Hämolyse?

α-Hämolyse oder Vergrünung: grüne bis braungrüne, unscharf begrenzte Höfe von 1 - 2 mm Breite.

β-Hämolyse: farblose, durchsichtige Höfe von unterschiedlicher Intensität.

Eintragen der Ergebnisse für die auszuwertenden Kolonien in die Auswertungstabelle.

b) Morphologie:

Beurteilung des morphologischen Kriteriums "Begeißelung" durch die Beobachtung, ob es sich um bewegliche Formen handelt (Verwechslung mit Brown'scher Molekularbewegung möglich!)

Ausstreichen der entsprechenden Kolonie wie folgt:

auf einen Objektträger einen Tropfen aqua dest. geben

Ausstrichöse **kurz** ausglühen und danach wieder **erkalten** lassen

Probe von der entsprechenden Kolonie mit Ausstrichöse entnehmen und auf dem Objektträger in aqua dest. suspendieren (je geringer die Keimzahl ist, die überführt wird, desto besser das Färbeergebnis in der folgenden Gram-Färbung)

Kontrollieren Sie im Mikroskop (10er oder 40er Objektiv), ob es sich um bewegliche oder unbewegliche Formen handelt.

c) Gram-Färbung:

Objektträger trocknen lassen

Fixieren des Bakterienausstriches: Objektträger kurz durch Brennerflamme ziehen

Färben mit Carbolgentianaviolettlösung für 2 min.: wenige Tropfen Farblösung auf den Objektträger geben; **bitte auf der Färbebank arbeiten!**

Abgießen der Farblösung (nicht abspülen!)

Übertragen in Lugol'sche Lösung für 2 min.

Abgießen der Lösung

Differenzieren in 96 %igem Alkohol bis sich keine Farbwolken mehr bilden

Färben mit Carbofuchsin für 20 sec

kurz in Wasser spülen und danach trocknen

Auswerten im Mikroskop (100er Objektiv/Öl)

Färbeergebnis:

gram-positive Bakterien: schwarzblau

gram-negative Bakterien: rötlich, hell

Tabelle 2a

Kolonieform und -farbe	groß, glatt, glänzend, weiß oder gelb	klein, glatt, unpigmentiert	mittelgroß, feucht, grünlich mit "zentraler Delle"	groß, feucht, glänzend, vielfach gelb oder orange pigmentiert, rau
Hämolyse	α, β oder ohne	α, β oder ohne	ohne	ohne
Beweglichkeit	negativ	negativ	negativ	negativ
Sporen	keine	keine	keine	keine
Form	kugelig, in Haufen gelagert	kugelig bis oval in Ketten von 6 - 8 Einheiten	ovalär, immer paarig, Diplokokken	Stäbchen, schlank, pleomorph
Größe (µm)	0,8 - 1,0	0,8 - 1,2	0,6 - 1,0	3,0 - 4,0 lang
Gramverhalten	positiv	positiv	positiv	positiv
Verhalten gegenüber O₂	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob oder aerob	aerob	fakultativ anaerob
Bakteriengruppe	<i>Staphylokokken</i>	<i>Streptokokken</i>	<i>Pneumokokken</i>	<i>Mykobakterien</i>
Anmerkungen	kommen stets auf der Haut oder Schleimhaut vor; <i>S. aureus</i> : pathogen durch Toxine und Exoenzyme, häufiger Eitererreger, 20 - 50% penicillinresistent; Nahrungsmittelvergiftung durch Enterotoxine (thermostabil)	in großer Zahl apathogen auf den Schleimhäuten; Beurteilung der Pathogenität u.a. durch Hämolyse; meist lokalisierte Infektionen wie Angina, Otitis, jedoch auch generalisierte; Scharlach (<i>b-hämolysierende Streptokokken</i>)	Infektionen des Respirationstrakts: Pneumonie, Otitis media, Nebenhöhlen-Infektionen	zahlreiche apathogene Arten (Bodenmikroflora) Saprophyten; pathogen: <i>M. tuberculosis</i> , hier nicht nachweisbar, da lange Generationszeit (18 - 24 h)

Tabelle 2 b

Kolonieform und -farbe	klein, unpigmentiert, mit kleinem hämolytischen Hof	groß, rauh, teilweise wurzelförmige Ausläufer, mit kleinem hämolytischen Hof	glatt, bläulich	groß, glatt, mattglänzend, schleimig, unpigmentiert
Hämolyse	β	β	ohne	ohne
Beweglichkeit	positiv	positiv oder negativ	positiv oder negativ	positiv ----- negativ
Sporen	keine	vorhanden	keine	keine ----- keine
Form	Stäbchen	Stäbchen, bilden häufig Zellketten	Stäbchen mit endständigen, keulenartigen Verdickungen, pleomorph	Stäbchen ----- Stäbchen
Größe (µm)	1,0 - 3,0	2,0 - 4,0 lang	2,0 - 6,0	2,0 - 4,0 lang
Gramverhalten	positiv	positiv	positiv	negativ ----- negativ
Verhalten gegenüber O₂	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob oder aerob	fakultativ anaerob oder aerob	fakultativ anaerob ----- fakultativ anaerob
Bakteriengruppe	<i>Listerien</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Coryneforme Bakterien: Arthrobacter</i>	<i>Salmonella, Proteus, Escherichia, Arizona</i> ----- <i>Shigella, Klebsiella</i>
Anmerkungen	septische Krankheitsbilder	Bodenmikroflora, nur eine menschenpathogene Art: <i>B. anthracis</i> (Milzbrand)	Bodenmikroflora; apathogen	<i>Enterobakterien</i> im menschlichen und tierischen Darm, pathogene und apathogene Arten; nur durch biochemische ("bunte") Reihe zu unterscheiden

Tabelle 2c

Kolonieform und -farbe	klein, glasig, durchsichtig	groß, uneinheitliche Form, gelb, gelbgrün, grünblau, häufig Rauhformen
Hämolyse	ohne	ohne
Beweglichkeit	negativ	positiv
Sporen	keine	keine
Form	kugelig bis kaffeebohnenförmig, immer paarig	Stäbchen, pleomorph
Größe (µm)	0,6 - 1,0	2,0 - 4,0 lang
Gramverhalten	negativ	negativ
Verhalten gegenüber O₂	aerob	aerob
Bakteriengruppe	<i>Neisserien</i>	<i>Pseudomonas</i>
Anmerkungen	zahlreiche apathogene Arten; Wachstum der humanpathogenen nur auf mit menschlichem Eiweiß angereicherten Nährböden (<i>N.</i> <i>gonorrhoeae</i> und <i>N.</i> <i>meningitidis</i>)	Auftreten ubiquitär, die meisten Arten apathogen, nur eine humanpathogene Art (Wundinfektionen), verursacht lokale Eiterungen

Ordnen Sie die von Ihnen untersuchten Kolonien anhand des Bestimmungsschlüssels (Tabelle 2 a - c) der entsprechenden Bakteriengruppe zu.

Tabelle 3

	I	II	III
Kolonienform und -farbe			
Hämolyse			
Morphologie			
Form			
Beweglichkeit			
Gramverhalten			
Bakteriengruppe			

C. Beurteilung der Fähigkeit von Bakterien zur Lactose-Spaltung mit Hilfe von Brolac-Platten (vgl. auch Tab. 4)

Tabelle 4

Kolonien	Mikroorganismen
grün bis blau, manchmal mit blauem Hof	Lactose-negativ: - Salmonellen - Shigellen - Serratia - Providencia - Proteus
goldgelb mit gelbem Hof	Lactose-positiv: - Escherichia coli - Coliforme u.a.

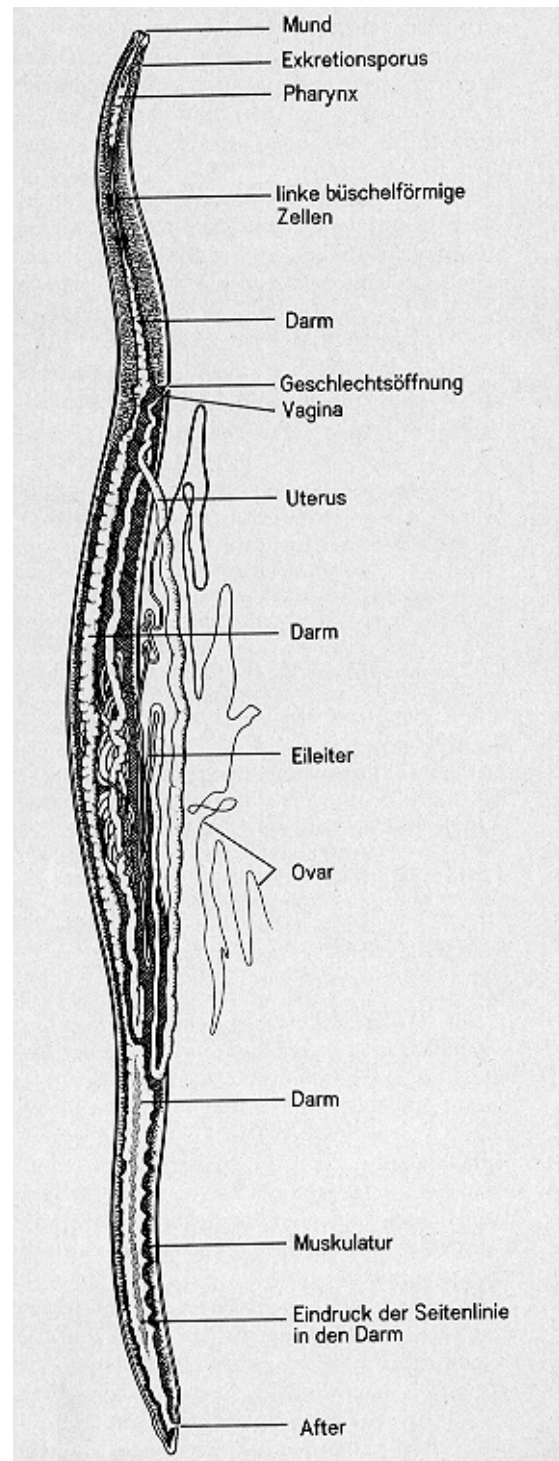
In welchem Verhältnis treten Lactose-positive zu Lactose-negativen Kolonien auf?

Parasiten

Zahlreiche Erkrankungen des Menschen werden durch Parasiten hervorgerufen. Als ein Beispiel dafür soll im Kurs ein Vertreter der Fadenwürmer (Nematoden) untersucht werden.

Nematoden

Die Nematoden sind eine artenreiche, weitverbreitete Tierklasse. Es ist ihnen gelungen, fast sämtliche Lebensräume, darunter auch extreme, zu erobern und in großer Individuenzahl zu besiedeln. Viele von ihnen sind Parasiten von Pflanzen, Tieren und Menschen. Ihr Körperbau ist relativ einheitlich. Als ein beim Menschen vorkommender Parasit soll *Ascaris lumbricoides* im Kurs präpariert werden. Er lebt im Dünndarm seines Wirtes und ernährt sich vom Darminhalt. Die Tiere erreichen ein Alter von etwa 1 bis 1,5 Jahren. Während dieser Zeit legen die Weibchen täglich etwa 200.000 Eier. Die abgelegten und ungeführten Eier gelangen zusammen mit dem Kot des Wirtes ins Freie. Erst dort, unter dem Einfluß von Sauerstoff, beginnt ihre Entwicklung. Es entsteht zunächst eine kleine etwa 200 µm lange Larve. Diese wird erst dann frei, wenn das Ei mit verunreinigter Nahrung in den Darm eines neuen Wirtes gelangt. Sie durchbohrt das Darmepithel und wandert in das Blutgefäßsystem ein, in dem sie zur Leber transportiert wird. Dort wächst sie in etwa 10 Tagen auf 2 mm heran und wird dann vom Blutstrom weiterbefördert. In der Lunge verläßt sie das Blutgefäß, indem sie aus einer Kapillare in eine Alveole (Lungenbläschen) durchbricht. Vom Flimmerepithel der Trachea wird sie weiter in den Rachen befördert und entweder ausgehustet oder mit dem Speichel verschluckt. Zum zweitenmal im Dünndarm angekommen wächst sie zum geschlechtsreifen Tier heran, wobei sie eine Länge von 40 cm erreicht.



Anatomie eines weiblichen *Parascaris equorum*

Beginnen Sie die Präparation etwas seitlich von der Rückenlinie und schneiden den Wurm bei sehr flacher Scherenführung der Länge nach auf. Der Darm durchzieht geradlinig den Körper; er bildet vorne einen muskulösen Pharynx. Der darauf folgende flache Mitteldarm ist größtenteils von weißen Gonadenschläuchen umspinnen. Der letzte Darmabschnitt ist der muskulöse Enddarm.

Die Geschlechtsorgane sind am besten vom Geschlechtsporus aus zu verfolgen, der sich als ringförmige Einschnürung ventral in der vorderen Körperregion findet. Sie beginnen beim Weibchen mit einer kurzen Vagina, die sich zu zwei dicken Röhren, den Uteri, aufgabelt. Die beiden Uteri ziehen nebeneinander weit nach hinten, biegen dann um, ziehen nach vorn, wenden sich darauf immer feiner und feiner werdend, wieder nach hinten, und so fort, bis schließlich jeder dieser langen Schläuche als zarter Faden blind endet. Diese fandendünnen Endabschnitte sind die Ovarien, in denen die Eier gebildet werden und heranwachsen. Machen Sie sich die Leistung dieser Organe klar, indem Sie die Tagesproduktion jedes Eierstocks (100.000 Eier) in Eier pro Minute umrechnen.

_____Eier/Minute

Die auf die Ovarien folgenden Abschnitte sind die Eileiter, und die zur unpaaren Vagina hinführenden dickeren Schläuche sind die beiden Uteri, in denen die Eier befruchtet und beschalt werden.

Schneiden Sie aus dem Uterus dicht vor der Vagina ein kleines Stück heraus, eröffnen es mit einem Längsschnitt und zerpupfen es auf dem Objektträger in einem Tropfen Glycerin. Legen Sie ein Deckglas auf.

Der Uterus ist normalerweise dicht angefüllt mit befruchteten aber noch ungefurchten Eiern. Bei fixierten Tieren, wie sie im Kurs verwendet werden, findet man häufig Eier in verschiedenen Stadien der Furchung, bisweilen auch bereits mit wurmförmigen Embryonen innerhalb der Eischale. Durch die Fixation wird die Entwicklung der Eier, die sonst erst nach der Ablage beginnt, induziert. Durch das langsame Eindringen des Fixierungsmittels werden die unterschiedlichen Entwicklungsstadien abgetötet und fixiert.

Entnehmen Sie dem Uterus ein zweites Stück weiter kaudal, dort wo er wieder nach vorn umbiegt. In den Furchen zwischen den die Uteruswand bildenden Zellen finden sich zahlreiche, relativ große, keilförmige, schwanzlose Spermatozoen. Die Eier haben in diesem Bereich noch keine Schale. Es handelt sich um die Zone, in der die Befruchtung stattfindet.

Besprechen Sie in der Gruppe die unterschiedlichen Fortpflanzungsstrategien von Säugern (an den Beispielen Mensch und Maus) und von Parasiten (am Beispiel von Ascaris). Wo liegen die entscheidenden Unterschiede?