

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Geschäftsführender Vorstand:  
Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. W. A. Rambeck

**Untersuchungen zum Haut-Sekret des Flusspferdes  
(*Hippopotamus amphibius*)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Anne Karen Dinah Lankisch  
aus  
Göttingen

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

|                   |                             |
|-------------------|-----------------------------|
| Dekan:            | Univ.-Prof. Dr. Braun       |
| Berichterstatter: | Univ.-Prof. Dr. Rambeck     |
| Korreferent:      | Univ.-Prof. Dr. El-Matbouli |

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Meinen Eltern  
und Goofy

## Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b><u>EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG</u></b>                     | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b><u>LITERATURÜBERSICHT</u></b>                                  | <b>3</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>DAS FLUSSPFERD</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1.1      | FLUSSPFERD - TAXONOMIE  | 3         |
| 2.1.2      | FLUSSPFERD - ALLGEMEIN  | 4         |
| <b>2.2</b> | <b>HAUT</b>   | <b>6</b>  |
| 2.2.1      | EPIDERMIS - ALLGEMEIN   | 7         |
| 2.2.2      | EPIDERMIS DES FLUSSPFERDES  | 10        |
| 2.2.3      | CORIUM - ALLGEMEIN  | 12        |
| 2.2.4      | CORIUM DES FLUSSPFERDES   | 15        |
| 2.2.5      | SUBCUTIS - ALLGEMEIN  | 17        |
| 2.2.6      | SUBCUTIS DES FLUSSPFERDES   | 17        |
| <b>2.3</b> | <b>HAUTFARBE DES FLUSSPFERDES</b>                                 | <b>18</b> |
| <b>2.4</b> | <b>HAARKLEID</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.5</b> | <b>HAARE DES FLUSSPFERDES</b>                                     | <b>20</b> |
| <b>2.6</b> | <b>HAUTDRÜSEN - ALLGEMEIN</b>                                     | <b>20</b> |
| <b>2.7</b> | <b>HAUT-DRÜSEN DES FLUSSPFERDES</b>                               | <b>21</b> |
| <b>2.8</b> | <b>HAUT-SEKRET DES FLUSSPFERDES</b>                               | <b>27</b> |
| <b>2.9</b> | <b>HOMOGENTISINSÄURE - 2,5 DIHYDROXYPHENYLESSIGSÄURE</b>          | <b>32</b> |
| <b>3</b>   | <b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>                               | <b>37</b> |
| <b>3.1</b> | <b>UNTERSUCHUNGEN DER FLUSSPFERDE</b>                             | <b>37</b> |
| <b>3.2</b> | <b>PROBENNAHME</b>  | <b>37</b> |
| 3.2.1      | PROBENNAHME – WILHELMA-DER ZOOLOGISCH-BOTANISCHE GARTEN STUTTGART | 38        |
| 3.2.2      | PROBENNAHME - ERLEBNIS-ZOO HANNOVER                               | 40        |
| <b>3.3</b> | <b>UNTERSUCHUNGEN DER ZELLVITALITÄT</b>                           | <b>41</b> |
| 3.3.1      | ZELLMATERIAL  | 41        |
| 3.3.2      | TIERISCHES MATERIAL   | 41        |
| 3.3.3      | DURCHFÜHRUNG DER ZELLKULTUR-METHODEN                              | 42        |
| 3.3.4      | UNTERSUCHUNG MIT THIAZOLBLAU (MTT)                                | 43        |

---

|             |  |                  |
|-------------|--|------------------|
| 3.3.5       | DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNGEN MIT DEM HAUT-SEKRET DER FLUSSPFERDE                                  | 46               |
| <b>3.4</b>  | <b>UNTERSUCHUNGEN UV-PROTEKTIVER EFFEKTE</b>   | <b>46</b>        |
| <b>3.5</b>  | <b>UNTERSUCHUNGEN DER ZELLVITALITÄT MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE</b>                                 | <b>48</b>        |
| <b>3.6</b>  | <b>UNTERSUCHUNGEN AM MONOLAYER-HAUTMODELL</b>  | <b>50</b>        |
| <b>3.7</b>  | <b>UNTERSUCHUNGEN DER ENZYMAKTIVITÄT</b>   | <b>50</b>        |
| <b>3.8</b>  | <b>UNTERSUCHUNGEN VON MENGEN- UND SPURENELEMENTEN</b>  | <b>54</b>        |
| <b>3.9</b>  | <b>UNTERSUCHUNGEN AUF ANTIMIKROBIELLE EIGENSCHAFTEN</b>  | <b>55</b>        |
| <b>3.10</b> | <b>UNTERSUCHUNGEN MITTELS HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</b>                                 | <b>58</b>        |
| 3.10.1      | CHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG MITTELS HPLC   | 58               |
| 3.10.2      | CHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN MITTELS ELEKTROCHEMISCHEN<br>DETEKTOREN                            | 59               |
| <b>3.11</b> | <b>UNTERSUCHUNGEN MITTELS MASSENSPEKTROSKOPIE</b>  | <b>60</b>        |
| <b>3.12</b> | <b>UNTERSUCHUNGEN MITTELS HPLC-, NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE - UND<br/>NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE</b> | <b>60</b>        |
| <b>3.13</b> | <b>UNTERSUCHUNGEN AUF PHENYLALANIN- UND TYROSIN-GEHALTE</b>  | <b>61</b>        |
| <b>4</b>    | <b><u>ERGEBNISSE</u></b>   | <b><u>62</u></b> |
| <b>4.1</b>  | <b>BEOBACHTUNGEN DER ZOOTIERE</b>  | <b>62</b>        |
| <b>4.2</b>  | <b>GEWINNUNG DES HAUT-SEKRETES</b>   | <b>62</b>        |
| <b>4.3</b>  | <b>BESTIMMUNG DER ZELLVITALITÄT</b>  | <b>62</b>        |
| <b>4.4</b>  | <b>BESTIMMUNG VON UV-PROTEKTIVEN EFFEKTEN</b>  | <b>66</b>        |
| <b>4.5</b>  | <b>BESTIMMUNG DER ZELLVITALITÄT MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE</b>                                     | <b>70</b>        |
| <b>4.6</b>  | <b>BESTIMMUNG DES FIBROBLASTEN-WACHSTUMS AM HAUT-MONOLAYER-<br/>MODELL</b>                           | <b>71</b>        |
| <b>4.7</b>  | <b>BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT</b>   | <b>72</b>        |
| <b>4.8</b>  | <b>BESTIMMUNG VON MENGEN- UND SPURENELEMENTEN</b>  | <b>74</b>        |
| <b>4.9</b>  | <b>BESTIMMUNG VON ANTIMIKROBIELLEN EIGENSCHAFTEN</b>   | <b>76</b>        |
| <b>4.10</b> | <b>BESTIMMUNGEN MIT HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</b>                                       | <b>84</b>        |
| <b>4.11</b> | <b>CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON CAROTINOIDEN LUTEIN UND<br/>ZEAXANTHIN</b>                      | <b>84</b>        |
| <b>4.12</b> | <b>CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON PHENOLE, POLYPHENOLE UND<br/>VITAMINEN</b>                      | <b>87</b>        |
| <b>4.13</b> | <b>BESTIMMUNG DER MESSUNG AM NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE</b>  | <b>87</b>        |

---

|             |   |                   |
|-------------|---|-------------------|
| <b>4.14</b> | <b>BESTIMMUNG VON PHENYLALANIN UND TYROSIN.....</b> | <b>89</b>         |
| <b>5</b>    | <b><u>DISKUSSION.....</u></b>                       | <b><u>91</u></b>  |
| <b>5.1</b>  | <b>BEOBSACHTUNG DER FLUSSPFERDE .....</b>           | <b>91</b>         |
| <b>5.2</b>  | <b>TECHNIK DER SEKRETGEWINNUNG .....</b>            | <b>93</b>         |
| <b>5.3</b>  | <b>ZELLVITALITÄT.....</b>                           | <b>94</b>         |
| <b>5.4</b>  | <b>UV-BESTRAHLUNG .....</b>                         | <b>98</b>         |
| <b>5.5</b>  | <b>DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....</b>                   | <b>101</b>        |
| <b>5.6</b>  | <b>MONOLAYER-MODELL .....</b>                       | <b>103</b>        |
| <b>5.7</b>  | <b>ENZYMAKTIVITÄT.....</b>                          | <b>104</b>        |
| <b>5.8</b>  | <b>MENGEN- UND SPURENELEMENTE .....</b>             | <b>104</b>        |
| <b>5.9</b>  | <b>ANTIMIKROBIELLE EIGENSCHAFTEN.....</b>           | <b>106</b>        |
| <b>5.10</b> | <b>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.....</b>  | <b>107</b>        |
| 5.10.1      | LUTEIN/ZEAXANTHIN.....                              | 107               |
| 5.10.2      | VITAMINE, PHENOLE UND POLYPHENOLE .....             | 107               |
| <b>5.11</b> | <b>NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE .....</b>             | <b>108</b>        |
| <b>5.12</b> | <b>PHENYLALANIN UND TYROSIN .....</b>               | <b>110</b>        |
| <b>6</b>    | <b><u>AUSBLICK.....</u></b>                         | <b><u>111</u></b> |
| <b>7</b>    | <b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>                 | <b><u>113</u></b> |
| <b>8</b>    | <b><u>SUMMARY.....</u></b>                          | <b><u>115</u></b> |
| <b>9</b>    | <b><u>LITERATURVERZEICHNIS .....</u></b>            | <b><u>117</u></b> |
|             | <b><u>ANHANG .....</u></b>                          | <b><u>124</u></b> |
|             | <b>MATERIALIENLISTE FÜR 3.2 .....</b>               | <b>124</b>        |
|             | <b>MATERIALIENLISTE FÜR 3.3 .....</b>               | <b>124</b>        |
|             | <b>MATERIALIENLISTE FÜR 3.4 .....</b>               | <b>126</b>        |
|             | <b>MATERIALIENLISTE FÜR 3.5 .....</b>               | <b>126</b>        |
|             | <b>MATERIALIENLISTE FÜR 3.9 .....</b>               | <b>126</b>        |
|             | <b>MATERIALIENLISTE FÜR 3.10.1 .....</b>            | <b>128</b>        |

**MATERIALIENLISTE FÜR 3.10.2 ..... 129**

**A LEBENSLAUF ..... 131**

**B DANKSAGUNG ..... 132**

## Tabellenverzeichnis

|        |   |    |
|--------|---|----|
| Tab.1  | Übersicht über die Morphologie und das Vorkommen der fünf verbreitetsten Kollagenfasertypen (modifiziert nach Hees, Sinowatz , 2000)  | 14 |
| Tab.2  | Dicke der Flusspferdhaut, gemessen von der Rücken-Medianen bis zur Mitte des Abdomens (nach Luck und Wright, 1964)  | 17 |
| Tab.3  | Zusammensetzung des Haut-Sekretes des Flusspferdes (modifiziert nach Luck und Wright, 1964)   | 30 |
| Tab.4  | Zusammensetzung des Haut-Sekretes des Flusspferdes (modifiziert nach Wright, 1987)  | 30 |
| Tab.5  | Übersicht über alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere   | 37 |
| Tab.6  | Pipettierschema für die Untersuchungsreihen der UV-Bestrahlung mit und ohne Haut-Sekret der Flusspferde (drei Farben des Haut-Sekretes pro Tier)  | 48 |
| Tab.7  | Apizym-Test - 20 Enzymaktivitäten   | 52 |
| Tab.8  | Pipettierschema - Oxygenase-Assay   | 52 |
| Tab.9  | Pipettierschema - $\beta$ Galactosidase-Assay   | 53 |
| Tab.10 | Pipettierschema - Protease-Assay  | 54 |
| Tab.11 | HFP-1-Zell-Linien-Modell für alle Haut-Sekretproben der Farbe „hell“:<br>Durchschnittswerte der Zellvitalität in % lebenden Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h<br>(n = 5)                          | 63 |
| Tab.12 | Übersicht über die Mittelwerte aller Sekrete für die Farbe „hell“ zu den ausgewählten Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h in % lebenden Zellen mit einer Verdünnung von 1:5<br>(n = 5) (s. Abb. 38) | 63 |
| Tab.13 | HFP-1-Zell-Linien-Modell für alle Haut-Sekretproben der Farbe „mittel“<br>Durchschnittswerte der Zellvitalität in % lebenden Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h<br>(n = 5)                         | 64 |



|        |  |    |
|--------|--|----|
| Tab.14 | Übersicht über die Mittelwerte aller Sekrete für die Farbe „mittel“ zu den ausgewählten Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h in % lebenden Zellen mit einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Abb. 39) | 64 |
| Tab.15 | HFP-1-Zell-Linien-Modell für alle Haut-Sekretproben der Farbe „dunkel“: Durchschnittswerte der Zellvitalität in % lebenden Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h (n = 5)                             | 65 |
| Tab.16 | Übersicht über die Mittelwerte aller Sekrete für die Farbe „dunkel“ zu den ausgewählten Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h in % lebenden Zellen mit einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Abb. 40) | 65 |
| Tab.17 | Effekte der Sekret-Farbe „hell“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung (s. Abb. 42)   | 66 |
| Tab.18 | Effekte der Sekret-Farbe „mittel“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung (s. Abb. 43)   | 67 |
| Tab.19 | Effekte der Sekret-Farbe „dunkel“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung (s. Abb. 44)   | 68 |
| Tab.20 | Effekte von unterschiedlich gefärbten Sekreten verschiedener Tiere auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung   | 69 |
| Tab.21 | Durchflusszytometrie: Analysierte Durchschnittswerte % lebender Zellen mit unterschiedlichen HGS-Konzentrationen ohne UV-Bestrahlung (s. Abb. 46)  | 71 |
| Tab.22 | Durchflusszytometrie: Analysierte Durchschnittswerte % lebender Zellen mit unterschiedlichen HGS-Konzentrationen nach UV-Bestrahlung (s. Abb. 47)  | 71 |
| Tab.23 | Beeinflussung des Fibroblastenwachstums unter Stimulus von hellem und dunklem Haut-Sekret (Zellzahl/ml)  | 72 |
| Tab.24 | Umsetzung von p-NPG mit Flusspferd-Sekret zum Nachweis einer $\beta$ -Galactosidase-Aktivität  | 74 |
| Tab.25 | Analysierte Durchschnittswerte in mg/l von Mengen- und Spurenelementen in Haut-Sekret-Proben von Flusspferden (pro Tier n = 3)   | 75 |
| Tab.26 | Lebendkeimzahl-Bestimmung von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Klebsiella oxytoca</i> unter   | 78 |

Anwendung unterschiedlicher Haut-Sekret-Konzentrationen

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| Tab.27 | Tab. 27: Bestimmung der Optischen Dichte der Bakterien-Suspensionen von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Klebsiella oxytoca</i> nach Einwirkung von unterschiedlichen HGS-Konzentrationen | 81  |
| Tab.28 | Bestimmung der Optischen Dichte von <i>Staphylococcus aureus</i> mit 4,41mg/ml HGS in einem Zeitraum von 0-6h  | 83  |
| Tab.29 | Häufigkeit und prozentualer Anteil der Peaks 1 bis 3 in $n \geq 18$ der unterschiedlich gefärbten Haut-Sekret-Proben   | 89  |
| Tab.30 | Vorkommen von Phenylalanin und Tyrosin c[ $\mu$ M] in hell und dunkel gefärbtem Haut-Sekret  | 90  |
| Tab.31 | Übersicht über die Konzentrationen verschiedener Mengen- und Spurenelemente im Haut-Sekret des Flusspferdes, Angaben in mg/l   | 105 |

**Abbildungsverzeichnis**

|        |   |    |
|--------|---|----|
| Abb.1  | Überblick über beide rezenten Flusspferdarten: <i>Hippopotamus amphibius</i> und <i>Choeropsis liberiensis</i> (aus Eltringham, 1999) | 4  |
| Abb.2  | Nahaufnahme der medianen Rückenhaut eines 22-jährigen männlichen Flusspferdes   | 10 |
| Abb.3  | Nahaufnahme der lateralen Rückenhaut eines 39-jährigen weiblichen Flusspferdes  | 10 |
| Abb.4  | Nahaufnahme der Rückenhaut im Bereich der Schulter eines 46-jährigen weiblichen Flusspferdes  | 10 |
| Abb.5  | Tubulöse Drüse von <i>Hippopotamus amphibius neonatus</i> (nach Weber, 1886)  | 23 |
| Abb.6  | Schnitt durch eine tubulöse Hautdrüse eines erwachsenen Exemplares <i>Hippopotamus amphibius</i> (nach Weber, 1886)                   | 23 |
| Abb.7  | Beginn der Sekretion der Haut-Drüsen; Nahaufnahme der lateralen Rückenhaut eines weiblichen 9-jährigen Flusspferdes                   | 27 |
| Abb.8  | Beginn der Sekretion der Haut-Drüsen; Nahaufnahme der Rückenhaut eines weiblichen 14-jährigen Flusspferdes                            | 27 |
| Abb.9  | Beginn der Sekretion der Haut-Drüsen; Nahaufnahme der Rückenhaut eines männlichen 22-jährigen Flusspferdes                            | 27 |
| Abb.10 | Übersicht über die fortgeschrittene Sekretion mit Nachdunklung des Haut-Sekretes eines weiblichen 24-jährigen Flusspferdes            | 28 |
| Abb.11 | Übersicht über die fortgeschrittene Sekretion mit Nachdunklung des Haut-Sekretes eines weiblichen 9-jährigen Flusspferdes             | 28 |
| Abb.12 | Übersicht über die fortgeschrittene Sekretion mit Nachdunklung des Haut-Sekretes eines weiblichen 46-jährigen Flusspferdes            | 28 |
| Abb.13 | Strukturformel der Homogentisinsäure als Abbauprodukt der essentiellen Aminosäure alpha-L-Phenylalanin                                | 32 |

---

|        |  |    |
|--------|--|----|
| Abb.14 | Übersicht über den energetischen Abbau von alpha-L-Phenylalanin (modifiziert nach Löffler, Petrides, 1998)   | 34 |
| Abb.15 | Erkrankungen durch Störungen in verschiedenen Abschnitten des Phenylalanin-Stoffwechselweges   | 35 |
| Abb.16 | Darstellung der Probennahme am Kopf eines Flusspferdes mit der Teigschaber-Technik   | 38 |
| Abb.17 | Haut-Sekret eines Flusspferdes der Qualitäten „hell“, „mittel“ und „dunkel“  | 39 |
| Abb.18 | Darstellung des Haut-Sekretes mit zunehmendem Verschmutzungsgrad (oben: Flusspferd wurde vor Probennahme gewaschen; mitte, unten: Probennahme am ungewaschenen Flusspferd) | 40 |
| Abb.19 | Arbeitsschritte zur Kultivierung einer HFP-1-Zelllinie in der Zellkultur nach Francz, 1998   | 43 |
| Abb.20 | Arbeitsvorschrift zur Durchführung eines Zellvitalitätstests (MTT) nach Francz, 1998   | 44 |
| Abb.21 | Unicam UV/VIS Spectrometer: Scantypisierung einer 25 mM HGS-Stammlösung  | 45 |
| Abb.22 | Unicam UV/VIS Spectrometer: Scantypisierung von MTT (0,33 MTT mg/ml)   | 45 |
| Abb.23 | Graphische Darstellung der Effekte von der Sekret-Farbe „hell“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung                                     | 67 |
| Abb.24 | Graphische Darstellung der Effekte von der Sekret-Farbe „mittel“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung                                   | 68 |
| Abb.25 | Graphische Darstellung der Effekte von der Sekret-Farbe „dunkel“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung                                   | 69 |
| Abb.26 | Zusammenfassung der Effekte von unterschiedlich gefärbten Sekreten verschiedener Tiere auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung             | 70 |
| Abb.27 | HPLC-Analyse im Rahmen des Oxygenase-Assay der Umsatzproben  | 73 |
| Abb.28 | Übersicht über das Kolonie-Wachstum auf mit Haut-Sekret geimpften LB-Agar-Platten  | 76 |

---

|        |   |    |
|--------|---|----|
| Abb.29 | Mikroskopie einzelner Kolonien des Verdünnungsausstriches von Sekret geimpften Agarplatten  | 77 |
| Abb.30 | Lebendkeimzahlbestimmung (KbE/ml) einer Staphylococcus aureus-Suspension unter Anwendung unterschiedlicher Haut-Sekret-Konzentrationen  | 79 |
| Abb.31 | Lebendkeimzahlbestimmung (KbE/ml) von Klebsiella oxytoca-Suspension unter Anwendung unterschiedlicher Haut-Sekret-Konzentrationen   | 79 |
| Abb.32 | Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von HGS (mg/ml) auf Staphylococcus aureus   | 82 |
| Abb.33 | Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von HGS (mg/ml) auf Klebsiella oxytoca  | 82 |
| Abb.34 | Agardiffusions-Test mit Staphylococcus aureus und HGS in den Konzentrationen 10 mg/ml und 4,41 mg/ml  | 84 |
| Abb.35 | HPLC-Chromatogramm einer Haut-Sekret-Probe eines vor der Probennahme nicht gewaschenen Tieres   | 86 |
| Abb.36 | HPLC-Chromatogramm einer Haut-Sekret-Probe eines vor der Probennahme gewaschenen Tieres   | 86 |
| Abb.37 | Chromatogramme von Peak 1-3   | 88 |
| Abb.38 | HFP-1-Zell-Modell: Durchschnittswerte aller Haut-Sekrete für die Farbe „hell“ zu den ausgewählten Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) in % lebenden Zellen in einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Tab. 12)   | 95 |
| Abb.39 | HFP-1-Zell-Modell: Durchschnittswerte aller Haut-Sekrete für die Farbe „mittel“ zu den ausgewählten Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) in % lebenden Zellen in einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Tab. 14) | 95 |
| Abb.40 | HFP-1-Zell-Modell: Durchschnittswerte aller Haut-Sekrete für die Farbe „dunkel“ zu den ausgewählten Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) in % lebenden Zellen in einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Tab. 16) | 96 |

---

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| Abb.41 | Darstellung der zytotoxischen Effekte des Haut-Sekretes auf die HFP-1-Zellen im Zellkultur-Modell  | 97  |
| Abb.42 | Durchschnittswerte der Sekrete der Farbe „hell“ in % lebenden HFP-1-Zellen nach 24 h mit UV-Bestrahlung (pro Tier n = 3) (s. Tab. 17)                              | 99  |
| Abb.43 | Durchschnittswerte der Haut-Sekrete der Farbe „mittel“ in % lebenden Zellen nach 24 h mit UV-Bestrahlung (pro Tier n = 3) (s. Tab. 18)                             | 99  |
| Abb.44 | Durchschnittswerte der Haut-Sekrete der Farbe „dunkel“ in % lebenden Zellen nach 24 h mit UV-Bestrahlung (pro Tier n = 3) (s. Tab. 19)                             | 100 |
| Abb.45 | Durchschnittswerte aller Haut-Sekrete und Farben in % lebenden Zellen nach 24 h mit UV-Bestrahlung   | 100 |
| Abb.46 | Durchflusszytometrie: Vorkommen und Vitalität von HFP-1-Zellen unter Behandlung mit unterschiedlichen HGS-Konzentrationen (s. Tab. 21)                             | 102 |
| Abb.47 | Durchflusszytometrie: Vorkommen und Vitalität von HFP-1-Zellen unter Behandlung mit unterschiedlichen HGS-Konzentrationen mit und ohne UV-Bestrahlung (s. Tab. 22) | 102 |
| Abb.48 | Monolayer-Zellkultur-Modell: Wachstumsanalyse von Hautfibroblasten unter Stimulus von hellem und dunklem Flusspferd-Haut-Sekret (Zellzahl/ml)                      | 103 |
| Abb.49 | Vorkommen von Phenylalanin und Tyrosin in hell und dunkel gefärbtem Haut-Sekret unter Berücksichtigung der Standardabweichung                                      | 110 |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                    |   |
|--------------------|---|
| A                  | Absorption  |
| Abb.               | Abbildung   |
| ABB                | Annexin V-Bindepuffer   |
| $\alpha$           | Alpha   |
| Blanc              | Blindwert   |
| $\beta$            | Beta  |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celcius  |
| DMEM               | Dulbeccos' Modified Eagle Medium  |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid  |
| EDTA               | Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure   |
| ELISA              | Enzyme Linked Immunsorbent Assay  |
| et al.             | et alii   |
| FACS               | Fluorescence Activated Cell Sorting   |
| FCS                | Foetales Kälberserum  |
| FTC-Casein-Assay   | Fluorescein Thio-Carbamoyl-Kappa-Casein Assay   |
| g                  | Gramm   |
| GPC                | Gel-Permeations-Chromatographie   |
| HFP-1-Zellen       | Humane Fibroblasten (Zelllinie 1)   |
| HGS                | Homogentisinsäure<br>2,5-Dihydroxyphenyllessigsäure   |
| HPLC               | High Performance/Pressure Liquid Chromatography   |
| HPLC-DAD-System    | High Performance/Pressure Liquid Chromatography with<br>Photodiode Array Detection (HPLC-DAD) |
| $^1\text{H-NMR}$   | Protonen-Kernspinresonanzspektroskop  |
| ICP-MS             | Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy  |
| ICP-OES            | Inductively Coupled Plasma-Optical Emission<br>Spectroscopy                                   |
| J                  | Joule   |
| KbE                | Kolonie bildende Einheiten  |
| l                  | Liter   |
| LB-Agar            | Luria-Bertani-Agar nach Miller  |
| M                  | Mol   |

---

|                      |   |
|----------------------|---|
| mg                   | Miligramm   |
| MHB                  | Mueller-Hinton-Bouillon   |
| MHK                  | Minimale Hemmstoffkonzentration   |
| MHz                  | Megahertz   |
| min.                 | Minute  |
| ml                   | Mililiter   |
| Mm.                  | Musculi   |
| mm                   | Milimeter   |
| mM                   | Milimol   |
| MS                   | Massenspektrometer  |
| MTP                  | Micro-Titer-Platte  |
| MTT                  | [3-(4,5-dimethylthiazol-2-)-2,5-diphenyl] tetrazoliumbromid;<br>Thiazolblau |
| n                    | Anzahl  |
| NaCl                 | Natrium-Chlorid   |
| NADPH/H <sup>+</sup> | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat                                |
| NMR                  | Nuclear Magnetic Resonance<br>(Kernspinresonanzspektroskopie)               |
| nm                   | Nanometer   |
| OD                   | Optische Dichte   |
| OPA                  | ortho-Phtaldialdehyd  |
| PBS                  | Phosphate Buffered Saline   |
| pH                   | pondus Hydrogenii/potentia Hydrogen   |
| p-NPG                | p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid  |
| PP                   | Polypropylen  |
| ppm                  | parts per million   |
| PS                   | Phosphatidylserin   |
| Ref.1                | Referenzwert 1  |
| Ref.2                | Referenzwert 2  |
| RP-HPLC              | Reversed-Phase hochauflösender Flüssigkeits-<br>Chromatographie             |
| rpm                  | rounds per minute   |
| RT                   | Raumtemperatur  |



|        |  |
|--------|--|
| SD     | Standardabweichung (standard derivation)   |
| sec.   | Sekunde  |
| Tab.   | Tabelle  |
| TCA    | Tri-Chlor-Essigsäure   |
| TCEP   | Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin x HCL   |
| TPP    | Petrischalen der Firma TPP   |
| U      | Umdrehung  |
| UV     | Ultraviolettes Licht   |
| UV-A   | Ultraviolettes Licht 380 - 315 nm  |
| UV-B   | Ultraviolettes Licht 315 - 280 nm  |
| UV/Vis | Spektroskopie, die elektromagnetische Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren Lichts ("visible") nutzt |
| ♀      | Weiblich   |
| ♂      | Männlich   |
| µl     | Mikroliter   |
| 7-AAD  | 7-aminoactinomycin D   |
| 3-MPA  | 3-Mercaptopropionsäure   |

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Tomes beschreibt 1850 das rötliche Sekret auf der Haut des Rückens eines von ihm beobachteten Flusspferdes. Die Vermutung, es handele sich dabei um blutigen Schweiß, sorgte für großes Aufsehen. Dennoch blieben Ursachen und Bedeutung dieses Phänomens lange unklar. Die erste anatomische Beschreibung der sekretproduzierenden Hautdrüse erfolgte durch Crisp (1867), der die mit bloßem Auge sichtbaren Hautdrüsen beschrieb und über das sonderbare Produkt der Haut der Flusspferde berichtete. Eingehende histologische Untersuchungen der fetalen Flusspferd-Haut wurden von Weber (1886) und Toldt (1916) durchgeführt. Im Jahre 1918 veröffentlichte die Kaiserliche Akademie der Wissenschaften in Wien von Schumacher den wohl umfassendsten Bericht über die Zytologie der Flusspferd-Drüsen. 1962 folgte von Allbrook eine Zusammenfassung über die Morphologie der subdermalen Drüse der Flusspferde. Ausführliche Arbeiten über die Anatomie und Physiologie der Drüsen publizierten 1963 Luck und Wright. 1987 folgte ein weiterführender Bericht von Wright. 1999 wurde von Eltringham das einzige bisher verfasste Buch über Flusspferde und Zwergflusspferde herausgegeben.

Saikawa et al. beschreiben 2004 in der Zeitschrift „Nature“ das zähflüssige, alkalische Haut-Sekret der Flusspferde, das nach seiner Sekretion in kurzer Zeit unterschiedliche Farben annimmt. Das farbige Sekret soll den Flusspferden – so vermuten Saikawa und Mitarbeiter - wirksamen Schutz vor UV-Bestrahlung bieten, bakteriellen Infektionen der Haut vorbeugen, gleichzeitig soll es, obwohl es nachweislich nicht von histologisch-regulären Schweißdrüsen gebildet wird, auch der Thermoregulation dienen.

Das ungeklärte Phänomen des „blutigen Schweißes“ der Flusspferde, die bisher zahlenmäßig geringen Untersuchungen, die wenigen Kenntnisse über die Inhaltsstoffe sowie die Bedeutung des Sekretes für die Flusspferdhaut waren Anlass zur vorliegenden Promotionsarbeit.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Beobachtung der Bildung von Haut-Sekret an Zoo-Flusspferden und die Klärung der Frage, ob augenscheinliche Unterschiede in

der alters-, geschlechts-, Tageszeiten- oder Jahreszeiten-abhängigen Produktion des Haut-Sekretes zu erkennen sind.

Die Gewinnung von Haut-Sekret an lebenden Flusspferden sollte dabei ohne Restriktion und Störung des Wohlbefindens der Tiere in zwei verschiedenen Zoos erfolgen.

Weiter sollte versucht werden Inhaltsstoffe des Haut-Sekretes zu identifizieren.

Das Haut-Sekret sollte weiterhin gezielt auf bestimmte mögliche antioxidative Inhaltsstoffe wie Carotinoide, Vitamine und Enzyme getestet werden. Es sollte zusätzlich auf einen möglichen Zusammenhang mit den unterschiedlich gefärbten Sekreten untersucht werden.

Weiterhin sollte eine mögliche antibakterielle Wirkung, die UV-protectiven Effekte und wundheilenden Eigenschaften des Haut-Sekretes überprüft werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Flusspferd

Die vorliegende Promotionsarbeit konnte nur mit Hilfe des Flusspferdpaares „Mike“ und „Rosi“ in Stuttgart und den sechs Flusspferdkühen „Zora“, „Kiboko“, „Habari“, „Cherry“, „Himba“, „Victoria“ und schließlich dem Flusspferd - Jungbullen „Fridolin“ aus dem Erlebnis-Zoo Hannover entstehen.

#### 2.1.1 Flusspferd - Taxonomie

In Verwendung der Zoologischen systematischen Taxonomie

|                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| <u>Stamm:</u>        | Chordata               |
| <u>Unterstamm:</u>   | Vertebrata             |
| <u>Klasse:</u>       | Mammalia               |
| <u>Unterklasse:</u>  | Eutheria               |
| <u>Überordnung:</u>  | Laurasiatheria         |
| <u>Ordnung:</u>      | Artiodactyla           |
| <u>Unterordnung:</u> | Nonruminantia          |
| <u>Familie:</u>      | Hippotamidae           |
| <u>Gattung:</u>      | Hippopotamus           |
| <u>Art:</u>          | Hippopotamus amphibius |



Abb. 1: Überblick über beide rezenten Flusspferdarten: *Hippopotamus amphibius* und *Choeropsis liberiensis* (aus Eltringham, 1999)

### 2.1.2 Flusspferd - Allgemein

Die sehr artenarme Familie der Flusspferde besteht aus nur zwei rezenten Flusspferd - Arten: das Flusspferd *Hippopotamus amphibius* und das Zwergflusspferd *Choeropsis liberiensis* (siehe Abbildung 1), beide werden in der gültigen Taxonomie der Zoologie zu zwei eigenen Gattungsgruppen zugeordnet.

Eine Unterscheidung beider Arten ist phänotypisch leicht möglich: die Parameter somatische Morphologie und Körpergröße variieren zum Teil stark.

Die Abstammung der rezenten Flusspferde wird in der Literatur der einzelnen Autoren diskutiert. Es wird im Allgemeinen angenommen, dass eine Verwandtschaft besteht zwischen Flusspferd und Schwein (Petzsch, 1992). Eine andere - jüngere - Theorie gibt dagegen auch eine mögliche Verwandtschaft mit den Walartigen, Familie Cetaceae an (Boisserie et al., 2005; Eltringham, 1999; Hasegawa, Adachi, 1996).

Die heute im Allgemeinen noch verwendete Bezeichnung „Nilpferd“ ist auf eine historisch erste Sichtung der Tiere im Nil zurückzuführen, obwohl sie bis etwa vor 3500 Jahren noch auf dem gesamten afrikanischen Kontinent verbreitet waren. Der Begriff „Nilpferd“ ist irreführend, weil die Flusspferde zoologisch näher mit den

Schweineartigen, Familie Suidae, verwandt sind als mit den Pferdeartigen, Familie Equidae. Heute kommen die Tiere nur noch südlich der Sahara, besonders in den dort lokalen Naturschutzgebieten, vor.

Die Ausrottung der Spezies Flusspferd wie etwa in der Region Westafrika ist bedenklich vorangeschritten (Stuart, 2000).

Die Gründe für die drohende Ausrottung der Flusspferde sind vielfältig. Die Tiere werden besonders zur Nutzung ihrer Eckzähne, deren Matrix aus Elfenbein besteht, und ihres Fleisches gejagt (Eltringham, 1999, Klingel, 1988). Vor dreißig Jahren bestand zum Beispiel im Nationalpark von Kongo die größte Flusspferdpopulation, die jedoch durch Wilderei zu 95 % reduziert wurde (Homes, 2003). Aber auch die durch Fraß verursachten Schäden, die durch nächtliche Futteraufnahme an Land entstehen, gaben in Gebieten mit dichtem Flusspferd-Vorkommen lange Zeit Anlass zur Jagd und zum Töten der Flusspferde (Eltringham, 1999). In Afrika werden mehr Menschen durch Flusspferde getötet als durch Löwen, Elefanten und Büffel zusammen (Klingel, 1988). Diese vermeintliche Bedrohung stellt einen weiteren Grund der Verfolgung der Flusspferde durch den Menschen dar.

Im Jahre 2006 wurde das Flusspferd zum ersten Mal von der International Union for Conservation Nature and Natural Resources (IUCN) auf die Rote Liste (Stand: 4.05.2006) gesetzt.

Die 2006 veröffentlichte Ausgabe der IUCN umfasst 16 119 Arten, 530 mehr als zwei Jahre zuvor. Die Gefährdung von Arten wird durch die Einstufung in Rote-Liste-Kategorien (0: ausgestorben oder verschollen, 1: vom Aussterben bedroht, 2: stark gefährdet, 3: gefährdet, 4: potenziell gefährdet) wiedergegeben.

Das Flusspferd wird seitdem als „gefährdet“ (Kategorie 3) eingestuft.

Natürliche Feinde der Flusspferde kommen nicht vor. Flusspferde leben in Gruppen von bis zu 20 Tieren, aber auch Großgruppen mit bis zu 100 Tieren können regelmäßig angetroffen werden (Nowak, 1999). Auseinandersetzungen in der Gruppe sind häufig, die meisten verlaufen allerdings harmlos und bestehen vielmehr aus Drohungen. Handelt es sich dabei aber um Revierkämpfe zwischen zwei Bullen, können sie für eines der Tiere den Tod bedeuten (Jauch, 2006). Die Flusspferde weisen eine amphibische Lebensart auf, daher die lateinische Bezeichnung *Hippopotamus amphibius*. Den Tag verbringen die Flusspferde hauptsächlich ruhend, stehend oder liegend im Wasser beziehungsweise auch in Schlammsohlen.

Das günstige Kopfprofil erlaubt dem Flusspferd sehr lange in einer Position im Wasser zu verharren, da sich die Ohren, Augen und Nüstern über der Wasseroberfläche befinden und somit die Umgebung mit allen Sinnen wahrnehmbar ist. Trotz der amphibischen Lebensweise können die Flusspferde, die größten Süßwassersäugetiere der Welt, nicht schwimmen (Dietrich et al., 2006). Sie benötigen zur Fortbewegung den Bodenkontakt, um entweder auf dem Grund des Wassers zu laufen oder sich von ihm immer wieder abzustoßen. Während des Tages wird meist keine Nahrung aufgenommen. Erst in der Abenddämmerung oder in der Nacht verlassen die Tiere das Wasser, um an Land zu weiden. Die nächtlichen Wanderungen zur Futteraufnahme können einige Kilometer in Anspruch nehmen (Dietrich et al.; 2006). In dieser Zeit wird pro Tier eine Menge von insgesamt 25 – 40 kg an Gräsern und Früchten aufgenommen (Klingel, 1988). Noch ist ungeklärt, warum die Tiere nur bei Dunkelheit das Wasser verlassen und sich an Land aufhalten. Entweder resultiert dieses Verhalten aus der Furcht vor dem Menschen oder weil es einen zu hohen Energieaufwand für die Tiere bedeutete, wenn sie während der afrikanischen Hitze auf Nahrungssuche gingen. Trotz ihres gedrungenen, walzenförmigen Körpers, mit 1,5 bis 3 Tonnen Körpergewicht und den disproportional kurzen Beinen erreichen sie an Land Geschwindigkeiten von bis zu 50 km/h (Dietrich et al., 2006).

Im Vordergrund dieser Arbeit steht die Untersuchung des Sekretes der Drüsen der Flusspferdhaut und seiner besonderen Inhaltsstoffe. Beim amphibisch lebenden Flusspferd wird die Haut zum Beispiel durch Mikroorganismen im Lebensraum Wasser oder durch UV-Bestrahlung außerhalb des Wassers stark beansprucht.

## **2.2 Haut**

Der anatomische Begriff Integumentum commune umfasst die Haut allgemein gemeinsam mit den Hautanhangsorganen wie das die Haut bedeckende Haarkleid, verschiedenen Hautdrüsen und alle Sonderbildungen wie etwa das stark verhornte Organon digitale (Dyce et al., 1991). Das Integumentum commune ist das größte Sinnesorgan des Körpers der Säugetiere. Die zu erfüllenden Funktionen und Aufgaben des Integumentum commune sind vielfältig. Der Haut kommt insbesondere eine ausgeprägte Schutzfunktion zu, sie umfasst einen eigenen zellulären Immunapparat, die Regulation des Wasserhaushaltes, die Thermoregulation, die

Kommunikation und die Sinnesfunktion (Hees, Sinowatz, 2000). Bei einem Flusspferd mit einem Gewicht von 1500 kg umfasst das Integumentum commune eine Gesamtmasse von etwa 270 kg (Vergleich Mensch: 6,7 %; Montagna, 1956). Ein adultes Tier von 1,5 Tonnen besitzt folglich eine Oberfläche von 10 m<sup>2</sup> (Luck, 1964).

Anatomisch-histologisch wird das Integumentum commune in drei Schichten unterteilt:

1. die Oberhaut (Epidermis), die epitheliale Zone, 2. die Lederhaut (Corium), die bindegewebige Zone und 3. die Unterhaut (Subcutis) als fettreiche Isolationsschicht (Panniculus adiposus).

### **2.2.1 Epidermis - Allgemein**

Die Epidermis, die einer fortwährenden, schnellen Regeneration unterliegt, wird von einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel abgedeckt, das sich an den verschiedenen Körperstellen von innen nach außen aus einem *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum*, *Stratum lucidum*, *Stratum corneum* zusammensetzt. Die Schichten der Epidermis sind am dicksten und deutlichsten in den Bereichen der stärksten Belastung ausgeprägt. In weniger stark mechanisch belasteten Bereichen des Körpers ist die Epidermis wesentlich dünner aufgebaut und lässt weder das *Stratum granulosum* noch das *Stratum lucidum* deutlich in Erscheinung treten (Dyce, 1991).

Die Epidermis vereint verschiedene Zellen. Der Hauptanteil der Epidermis wird von den Keratinozyten, verhornenden Epithelzellen, gebildet. Das für die Pigmentierung der Epidermis notwendige Melanin wird von den Melanozyten produziert. Langhans- und Granstein-Zellen haben Bedeutung als Antigen-präsentierende Zellen und sind damit stationäre Makrophagen der Oberhaut. Die Merkel-Zellen sind als freie Nervenendigungen verantwortlich für die Mechanorezeption durch die Epidermis.

Das *Stratum basale*, Basalzellschicht, setzt sich aus basophilen, iso- bis hochprismatischen Zellen zusammen, die über Halbdesmosomen mit der Basalmembran fest in Verbindung stehen. Dadurch ist eine stabile Verankerung des Epithels mit dem Bindegewebe gewährleistet. In unterschiedlicher Anzahl können Melaningranula in den basal gelegenen Melanozyten auftreten, die zur



Pigmentierung des Epithels beitragen. Das Stratum basale weist Langhans-Zellen und Merkel-Zellen auf (Liebich, 1999). Die Dicke der Gesamtepidermis wird von der Mitoserate des Stratum basale bestimmt (Dyce, 1991).

Das nach außen folgende Stratum spinosum, die Stachelzellschicht, wird aufgebaut aus einer mehrschichtigen Lage isoprismatischer, polygonaler Zellen, die durch zahlreiche Zytoplasma-Ausläufer untereinander eng in Verbindung stehen. An den Enden der Zytoplasma-Ausläufer sind benachbarte Zellen durch Desmosomen, den Maculae adhaerentes, fest verbunden. In der lichtmikroskopischen Untersuchung laufen die Fortsätze der Zellen des Stratum spinosum spitzstachelig aus. Die Zellfortsätze werden dabei von Tonofilamenten als einem besonderen Anteil des Cytoskelettes gestützt, die scherengitterartig nach Zug- und Drucklinien angeordnet sind (Liebich, 1999).

Die Epithelzellen stellen sich im Stratum granulosum stark abgeflacht dar und treten je nach Verhornungsgrad in 3 bis 5 Lagen auf. Die Einlagerung besonders alpha-L-Histidin-reicher, basophiler Keratohyalin granula geben diesem Abschnitt den Namen. In dieser Zone beginnen die Verhornungsprozesse, eine erneut hohe Dichte von Tonofilamenten. Die in dieser Schicht einsetzende Kernpyknose unterstützen diesen intrazellulären Prozess (Liebich, 1999).

Im Bereich des Stratum lucidum, der sogenannten Glanzzellschicht, sind die Kerne und Zellorganellen kaum noch anfärbbar, das Zytoplasma schließt verdichtete Filamentbündel und eine homogene, eosinophile Matrix mit ein. Diese stark lichtbrechende Schicht kommt insbesondere an verdickten Epidermisstellen, den sogenannten „Leistenhäuten“ der Sohlenballen und des Nasenspiegels vor. Die Hauptaufgabe des Stratum lucidum ist das Abdichten der tieferen Epithellagen gegenüber äußeren Einflüssen und stellt einen Schutzmechanismus gegen Austrocknung und den Verlust von Körperflüssigkeiten dar. Die letzte und nach außen abschließende Schicht ist das Stratum corneum, die Hornzellschicht. Die Verdickung der Zellmembranen, die Auflösung der Zellkerne und Zellorganellen und die Bildung von Keratin, einem Skleroprotein aus Keratohyalin und Tonofilamentbündeln, sind die mikroskopisch augenscheinlichsten Merkmale dieser Haut-Zone (Liebich, 1999).

Eine weitere Einteilung der fünf Strata in Stratum profundum und –superficiale ist möglich. Das Stratum profundum setzt sich aus Stratum basale, Stratum spinosum

und Stratum granulosum zusammen. Auch freie Nervenendigungen durchziehen das Stratum profundum. Die Ernährung erfolgt über Diffusion aus dem angrenzenden Corium. Das Stratum superficiale wird aus den oberflächlichen Schichten, Stratum lucidum und Stratum corneum gebildet.

## 2.2.2 Epidermis des Flusspferdes



Abb. 2: Nahaufnahme der medianen Rückenhaut eines 22-jährigen männlichen Flusspferdes



Abb. 3: Nahaufnahme der lateralen Rückenhaut eines 39-jährigen weiblichen Flusspferdes

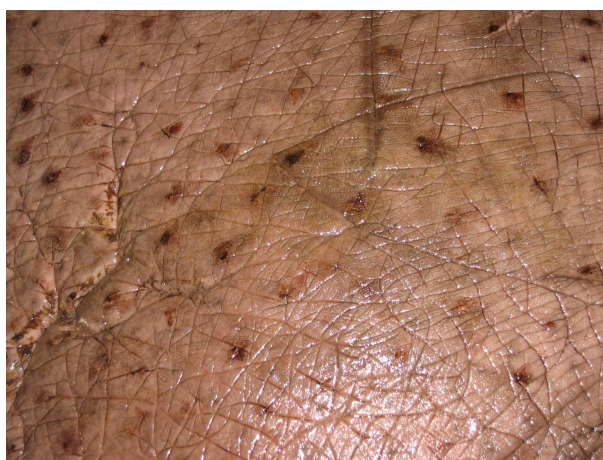


Abb. 4: Nahaufnahme der Rückenhaut im Bereich der Schulter eines 46-jährigen weiblichen Flusspferdes

Luck und Wright dokumentieren 1964 eine Untersuchung des Integumentum commune eines Flusspferdes. Dabei zeigte sich, dass der Abstand von der Oberfläche des Stratum corneum bis zu den Spitzen der Papillen am Abdomen 0,5 bis 0,9 mm und am Rücken 0,7 bis 1,0 mm beträgt. Die Epidermisoberfläche wurde als fein und frei von flockigen Keratineinlagerungen beschrieben. Seichte Einsenkungen auf der Epidermisoberfläche wiederholen sich in regelmäßigen Abständen von 3 - 5 mm. Das Stratum corneum der Flusspferdhaut stellt sich kompakt dar und wird von 10 bis 20 klar erkennbaren Schichten geformt. Die beschriebenen Schichten erreichen am Abdomen 85 bis 130  $\mu\text{m}$ , am Rücken 65 bis 100  $\mu\text{m}$  Dicke. Weiterhin beschreiben Luck und Wright, dass es - im Gegensatz zu anderen Säugetierspezies - kein deutliches Stratum corneum disjunction gibt, eine starke PAS-positive Schicht ist kennzeichnend (Luck, 1964). Ein Stratum lucidum kommt beim Flusspferd nicht vor. Auch das Stratum granulosum kann nur schlecht bestimmt werden, obwohl einige seiner Zellen angefüllt sind mit typischen Granula, die in manchen Zellarealen sehr dicht gepackt erscheinen. Innerhalb der Zone der Malpighi-Zellen sind die zellulären Brücken stark PAS-Positiv anfärbbar. Die beschriebenen Knoten von Bizzozero reagieren in der gleichen histologischen Färbung ebenso stark positiv. Laut Luck und Wright (1964) befinden sich keine Fetttropfen in den epidermalen Zellen. Das Stratum germinativum weist augenscheinlich keine spezifischen Kennzeichen auf. Das Vorkommen des Hautpigments Melanin variiert außerordentlich: auf Höhe des Abdomens fehlt es annähernd gänzlich, am Rücken erscheint die Haut stark Melanin-angereichert. Im Bereich der Rückenhaut bilden die Pigmentkörper typische Kappen über den Zellen oberhalb der Basalschicht. Die Melanin-Granula sind dichter gepackt (Luck, 1964).

Schumacher beschreibt 1918 die Flusspferd-Haut als reichlich pigmentiert. Das Pigment verteilt sich dabei über alle Schichten der Epidermis. An zahlreichen Hautstellen kommen gut ausgebildete Chromatophoren vor, diese können an anderen Hautstellen aber auch gänzlich fehlen. Eine weitere Möglichkeit ist das Vorkommen von Chromatophoren bei vollständigem Fehlen des epidermalen Pigmentes. Das Epidermispigment liegt im Stratum cylindrium, einem besonderen Merkmal der Dickhäuter-Haut, gewöhnlich im basalen, in den Zellen der übrigen Schichten ausnahmslos im distalen Zellabschnitt kappenförmig dem Kern aufsitzend. Weiterhin berichtet Schumacher, dass die Pigmentkörnchen keine gesetzmäßige

Lagerung - sowohl in den Zellen der äußeren Wurzelscheide der Haare, als auch im geschichteten Epithel der Drüsenausführungsgänge aufweisen - und dass die Ansammlung der Pigmentkörnchen in der distalen Zellhälfte für einen Phototropismus der Zellsysteme kennzeichnend sei. Schumacher stellte in seinen Untersuchungen ein Fehlen des interzellulären Pigmentes in den oberflächlichen Schichten der Epidermis fest. Das in den tiefen Schichten vorkommende interzelluläre Pigment rechnet Schumacher zu Ausläufern von Chromatophoren. Die Chromatophoren sind mit verzweigten Ausläufern versehene Zellen, die an der Corium-Epidermis-Grenze liegen. Die Verbindung zwischen Chromatophoren und den Epidermiszellen erfolgt nicht durch die Protoplasmafasern, sondern die Ausläufer der Chromatophoren dringen tief in die Interzellulärräume der Epidermiszellen ein. Schumacher vermutet, dass die Chromatophoren weder als modifizierte Epithelzellen noch als Leukozyten oder gewöhnliche Bindegewebszellen, sondern dass sie als Zellen eigener Art aufzufassen sind. Weiterhin geht er davon aus, dass das gelegentliche Vorkommen von freien Pigmentkörnchen und pigmentierten Leukozyten im Blut und in pigmentierten Endothelzellen nicht als Beweis für den hämatogenen Ursprung des Pigments gedeutet werden darf.

Die epidermal-coriale Verbindung ist charakterisiert durch eine tiefe Hautleiste mit dazugehörigen dermalen Papillen, 7 - 9 Papillen pro mm (Luck, 1964).

### **2.2.3 Corium - Allgemein**

Das Corium bildet die stützende, bindegewebige und ernährende Unterlage für die Epidermis und setzt sich aus Kollagenfasern des Types I zusammen, zwischen denen vereinzelt elastische Fasern vorkommen.

Kollagen ist ein  $\alpha$ -L-Prolin- und  $\alpha$ -L-Lysin- reiches Glycoprotein, an dessen Aufbau des Weiteren die Aminosäuren,  $\alpha$ -L-Glycin,  $\alpha$ -L-Alanin und  $\alpha$ -L-Asparaginsäure beteiligt sind (Hees, Sinowatz, 2000). Kollagen ist das wichtigste Strukturprotein des tierischen Organismus und kommt in nahezu allen Binde- und Stützgeweben vor. Sein Gesamtproteinanteil beträgt etwa 25 - 30 Prozent. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wird biochemisch zwischen 18 Kollagentypen unterschieden, deren Struktur nicht immer vollständig bekannt ist (Hees, Sinowatz, 2000) und von denen nur etwa fünf für den Aufbau des tierischen Organismus morphologisch von Bedeutung sind (Liebich, 1999). Die verschiedenen Kollagen-Typen unterscheiden sich in der

Aminosäuresequenz der Pro- $\alpha$ -Ketten und in der Quantität und Qualität ihrer sekundären Glycosylierung.

Das Typ-I-Kollagen tritt als häufigster Kollagentyp des Körpers (30 – 35 %) in der Haut, in Sehnen, Faszien, Knochen, Gefäßen, inneren Organen und im Dentin auf. Dieser Fasertyp besteht aus zwei gleichartigen Peptidketten ( $\alpha_1$ ) und zusätzlich einer anderen Kettenvariante ( $\alpha_2$ ).

Die Kollagentypen II-V setzen sich einheitlich aus 3  $\alpha_1$  - Ketten zusammen. Sie unterscheiden sich jedoch im Gehalt an Aminosäuren (zum Beispiel an Hydroxyprolin, Hydroxylysin oder Zysteinylresten). Typ-II-Kollagen ist das Strukturprotein des hyalinen Knorpelgewebes. Typ-III-Kollagen tritt in Gefäßwänden, in inneren Organen (zum Beispiel Leber, Niere, Milz), in der Haut, im embryonalen Bindegewebe und in der Hornhaut des Auges auf. Typ-IV- und Typ-V-Kollagen sind Bestandteile der Basallamina, sie sind reich an Hydroxyprolin.

Weitere Faserbestandteile des Corium sind reticuläre (Fibrae reticulares) und elastische Fasern (Fibrae elasticae). Die retikulären Fasern, die in ihrer biochemischen Zusammensetzung den Kollagenfasern nur wenig ähneln (Liebich, 1999), sind kaum dehnbar. Sie bilden gitterartige, feinverzweigte, dreidimensionale Maschenwerke in den Kapseln der meisten Organen (Leber, Niere, Drüsen, Gefäße). Retikulinfasern kommen weiterhin in engen Verbindungen mit der Basal-Lamina der Epithelien vor und überziehen netzartig Sehnen, Bänder und Muskelfasern. Besonders in lympho- und hämoretikulären Geweben (Milz, Lymphknoten, Knochenmark) dienen Retikulinfasern als formgebende, biegsame Strukturelemente. Im Gegensatz zu Kollagen- und Retikulin-Fasern sind elastische Fasern bis zu 150 Prozent der Ausgangslänge reversibel dehnbar. Durch starke Verzweigungen bildet diese Fasersorte netzartige Verbindungen und offenen Membranen insbesondere innerhalb der Wandung von Blutgefäßen. Auch Organkapseln, der elastische Knorpel und elastische Bänder enthalten vereinzelt diese Fasersorte (Hees, Sinowatz, 2000).

Tab. 1: Übersicht über die Morphologie und das Vorkommen der fünf verbreitetsten Kollagenfasertypen (modifiziert nach Hees, Sinowatz, 2000)

| Kollagentyp | Länge der Helix | Chemische Zusammensetzung  | Vorkommen  |
|-------------|-----------------|--|--|
| I           | 300             | Zwei gleichartige Peptid-ketten( $\alpha 1$ ) und zusätzlich eine andere Kettenvariante ( $\alpha 2$ ) | Häufigster Kollagentyp; bes. Haut, Sehnen, Faszien, Knochen, Gefäßen, inneren Organen u. im Dentin |
| II          | 300             | 3- $\alpha 1$ -Ketten; Unterschied im Gehalt der Aminosäuren   | Hyaliner Knorpel   |
| III         | 300             | 3- $\alpha 1$ -Ketten; Unterschied im Gehalt der Aminosäuren   | Gefäßwände; innere Organe, Haut, embryonales Bindegewebe, Hornhaut des Auges                       |
| IV          | 390             | 3- $\alpha 1$ -Ketten; Unterschied im Gehalt der Aminosäuren   | Basallamina  |
| V           | 300             | 3- $\alpha 1$ -Ketten; Unterschied im Gehalt der Aminosäuren   | Basallamina  |

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte und Anordnung des kollagen-elastischen Grundgerüsts lassen sich zwei Schichten des Coriums, das Stratum papillare und Stratum reticulare, unterscheiden (Liebich, 1999).

### Stratum papillare

Das Stratum papillare, die Papillarschicht, grenzt direkt an die Epidermis und ist mit dieser durch fingerförmige, papillenartige Vorstülpungen, den sogenannten Papillarkörper, verzahnt (Hees, Sinowatz, 2000). Je nach mechanischer Beanspruchung des jeweiligen Hautareals variiert die Anzahl und Form der Bindegewebspapillen. Durch die Vorstülpungen der Papillen bildet sich ein Faltsystem, das nicht nur für den mechanischen Zusammenhang von Bedeutung ist, sondern auch wesentlich zur Oberflächenvergrößerung der beiden Schichten beiträgt (Hees, Sinowatz, 2000). Eine wesentliche Aufgabe des Stratum papillare besteht in der Ernährung des darüber befindlichen epidermalen Stratum germinativum per diffusionem, denn die Epidermis ist typischerweise frei von Gefäßen. Das Stratum papillare setzt sich aus lockerem, relativ zellreichem Bindegewebe mit einem Netzwerk aus retikulären, kollagenen und elastischen Fasern zusammen. Die Papillarschicht erfüllt mechanische, nutritive,

immunologische, kreislaufregulatorische und sensorisch-sensible Aufgaben (Liebich, 1999). Daher sind die Mikrovaskularisation und die vegetative Innervation stark ausgeprägt, auch in Hinblick auf den Stoffaustausch, der zwischen Corium und Epidermis besteht. Weiterhin sind im Stratum papillare vorzugsweise Haare-, Talg- und Schweißdrüsen als Abkömmlinge der Epidermis, die sogenannte Epidermis-Trias, eingelagert (König, Liebich, 1999). Zusätzlich befinden sich in den Corium-Papillen Nervenfasern und Nervenendkörperchen, Meißner-Tastkörperchen.

### Stratum reticulare

Das Stratum reticulare, die Geflechschicht, breitet sich unterhalb der Papillarschicht aus und stellt die locker-bindegewebige Verbindung zur Subcutis dar. Im Gegensatz zum Stratum papillare ist diese Schicht zellarm und bildet ein eng verflochtenes Bündel aus kollagenen Fasern (Kollagen Typ I). Die Faserbündel sind scherengitterartig angeordnet und in ihnen sind die Gefäße, Nerven und Anhangsgebilde des Integumentum commune systemgerecht eingeordnet (Liebich, 1999). Die Anordnung der kollagenen Fasern variiert mit den verschiedenen Körperregionen, da sie jeweils unterschiedliche Vorzugsrichtungen entwickelt haben, die mit den Spannungsunterschieden des Integumentum commune übereinstimmen.

### **2.2.4 Corium des Flusspferdes**

Luck und Wright (1964) beschreiben das Corium des Flusspferdes als viel dicker im Vergleich zur Flusspferd-Epidermis. Das Corium macht den Hauptteil des Gewichtes der Gesamthaut aus (Eltringham, 1999). Die Dicke des Coriums variiert - analog zur Epidermis (siehe Tabelle 2) –zum Teil sehr. Es besteht aus einem dichten Gewebe von Kollagenfasern, die miteinander verflochten und auffällig regelmäßig angeordnet sind. Diese Art von Muster verleiht der Haut eine hohe Festigkeit. Die Faserzwischenräume sind durch ein homogenes Grundgewebe ausgefüllt, dass sich positiv durch die Periodic acid Schiff-Reagenz (PAS) anfärben lässt. Dies beweist eine große Präsenz von spezifischen Kohlenhydraten. Das Corium wird in seinen tiefen Abschnitten von einem groben Netzwerk aus Blutgefäßen, von denen aus besonders auffällige Collateralen zu den subdermalen Drüsen abzuziehen scheinen. Schumacher beschreibt 1918 ebenfalls das Corium der Flusspferde. Im Rahmen seiner Untersuchungen stellte er fest, dass oberflächliche Papillen des Integumentum commune an allen Körperstellen mächtig entwickelt, außergewöhnlich



hoch und stets einfach fingerförmig sind. Die Papillen stehen im Allgemeinen senkrecht zur Hautoberfläche, nur in Regionen der Zehen- und Sohlenhaut sind sie schräg ausgerichtet.

Das Corium lässt sich nach der Anordnung der Bindegewebsbündel in vier Schichten aufteilen, die nicht scharf voneinander abgrenzbar sind, sondern regelmäßig untrennbar ineinander übergehen. Bei den Schichten handelt es sich um das Stratum papillare, das Stratum subpapillare, das Stratum reticulare und das Stratum profundum (Schumacher, 1918).

Das Stratum papillare umfasst nicht nur Hautoberflächen-Papillen sondern auch noch einen kleineren Abschnitt des darunterliegenden Gewebes. Es ist ausgezeichnet durch feine stark wellig verlaufende Faserzüge, die hauptsächlich parallel zur Papillenachse verlaufen.

Das Stratum subpapillare besteht aus schon bedeutend gröberen, wellig verlaufenden Faserbündeln, die sich nach den verschiedensten Richtungen unregelmäßig durchkreuzen.

Das Stratum reticulare unterliegt in seiner Ausbildung den größten Schwankungen. Von ihm hängt im Wesentlichen die verschiedene Hautdicke an den einzelnen Körperstellen ab. Es besteht an Stellen mit beträchtlicher Hautdicke aus groben, meist gerade gestreckten, sich sehr regelmäßig durchflochtenen Faserbündeln, die sich, schräg aufsteigend, unter konstantem Winkel überkreuzen. Ein aus sich überkreuzenden Faserbündeln bestehendes System liegt annähernd in der Frontalebene, ein zweites in der Sagittalebene (Schumacher, 1918).

Das Stratum profundum besteht vorwiegend aus sehr groben, nur leicht gewellten Faserbündeln, die zum größten Teil tangential, insbesondere aber frontal und sagittal verlaufen (Schumacher, 1918).

Diesen in den verschiedenen Raumrichtungen angeordneten Zügen verdankt die Flusspferdhaut vermutlich ihre außerordentliche, sprichwörtliche Festigkeit.

Im Gegensatz zum Stratum papillare und subpapillare, kommen Blutgefäße im Stratum profundum und im Stratum reticulare nur in geringer Anzahl vor.

Freie, modifizierte Nervenendigungen sind in dieser Schicht die Vater-Paccini-Lamellenkörperchen die nur an bestimmten Körperstellen vorkommen und sich nahezu ausschließlich im Stratum subpapillare und nur ausnahmsweise im Stratum

papillare befinden und an anderer Stelle in verschiedenen Organkapseln vorkommen.

Schumacher (1918) beschreibt das Corium-Pigment als außerordentlich spärlich über das Corium verbreitet und es sei abschließend insgesamt, wenn überhaupt, nur an wenigen Hautstellen nachweisbar.

Tab. 2: Dicke der Flusspferdhaut, gemessen von der Rücken-Medianen bis zur Mitte des Abdomens (nach Luck und Wright, 1964)

| Distanz von der Mittellinie des Rückens [cm] | Dicke der Haut [mm] |
|--|---------------------|
| 0  | 22                  |
| 20   | 35                  |
| 80   | 35                  |
| 90   | 12                  |
| 150  | 12                  |

### 2.2.5 Subcutis - Allgemein

Die Subcutis besteht aus lockerem, unregelmäßig angeordnetem Bindegewebe mit mehr oder weniger reichlich eingelagertem Fettgewebe, dem Panniculus adiposus (König, Liebig, 1999). Sie stellt die Verbindung zwischen Haut und der oberflächlichen Körperfazie her und ermöglicht somit die Verschieblichkeit der Haut. In der Subcutis verlaufen größere Blut- und Nervenbahnen, die Endstücke von verschiedenen Drüsen des Integumentum commune, sowie Nervenendkörperchen, die Vater-Paccini-Lamellenkörperchen. Die Subcutis stellt einen wichtigen Fettspeicher dar, der unter anderem für die Wasserspeicherung und Wärmeregulation nützlich ist. Es handelt sich ferner um eine Isolierschicht für die darunter liegende Muskulatur (Hees, Sinowatz, 2000). Der Grad der Fettansammlung in der Subcutis ist tierartlich, geschlechtsspezifisch und regional unterschiedlich ausgeprägt (Liebich, 1999). Mit Hilfe ihres Fettpolsters bildet die Subcutis insbesondere im Bereich der Ballen einen Stoßpuffer.

### 2.2.6 Subcutis des Flusspferdes

Schumacher untersucht 1918 die Subcutis eines neugeborenen Flusspferdes. Er beschreibt die Ausprägung des subcutanen Binde- oder Fettgewebes dieses Individuums als besonders schwach entwickelt in Relation zum gesamten Integumentum commune. Das Fettgewebe überwiegt dagegen subcutan gegenüber

dem Bindegewebe. Die univakuolären Fettzellen sind im Allgemeinen – im Gegensatz zu anderen Säugetier-Spezies - auffallend klein. Nach Schumacher besteht keine scharf zu ziehende Grenze zwischen Subcutis und Corium

### Subcutanes Fettgewebe

Im Vergleich zu anderen Warmblüter besitzen die Flusspferde wenig subcutanes Fett (Klingel, 1988). Auf 64 % Wasseranteil kommt nach Luck and Wright nur 1 % Lipidmaterial. Bei anderen Säugetieren kommen subcutane Fettzellen, Lipozyten oder Adipozyten in Relation zum Flusspferd in höherer Konzentration vor. Besonders beim Schwein, dem das Flusspferd verwandtschaftlich nahe stehen soll, spricht man aufgrund der hohen Dichte subcutaner Lipozyten von der sogenannten subcutanen Schwarte (Nickel et al., 1996).

### **2.3 Hautfarbe des Flusspferdes**

Die Hautfarbe der Flusspferde variiert von Tier zu Tier zwischen hellbraun und dunkelgrau, aber auch schwarz (Luck, 1964). Die Farbintensität nimmt von dorsal nach ventral ab, so dass die ventrale Seite in ihrer Farbe um einiges heller in Erscheinung tritt (Luck, 1964). Charles Pitman (1962) berichtet aber auch über unterschiedliche Formen des Albinismus in freier Natur. Diese Mutationen entstehen entweder durch einen angeborenen totalen (Albinismus universalis) oder durch einen partiellen Pigmentmangel (Albinismus partialis) in der Haut. Laut Pitman wurden nach eigenen Beobachtungen und gesammelten Berichten von anderen, einige wenige Tiere gesichtet, bei denen entweder dieser Albinismus vollständig oder teilweise ausgeprägt war. Weiterhin beobachtete Pitman, dass die Albino-Tiere ausnahmslos in einer Herde integriert und anscheinend nur vom Verhalten etwas scheuer und zurückhaltender waren. Pitman beschreibt, dass das größte Problem für ein Albino-Tier vermutlich der Sonnenbrand wäre.

### **2.4 Haarkleid**

Haare, Pili, sind zugfeste, dünne Hornfäden, die epidermaler Herkunft sind (König, Liebich, 1999). Umschlossen werden die Haarwurzeln von einer Wurzelscheide, Vagina radicularis, die sich wie ein Hohlzylinder um die Wurzel legt. Die Haarwurzel gliedert sich in eine epitheliale und in eine bindegewebige Wurzelscheide. Die epitheliale Wurzelscheide wird in einen äußeren Anteil, äußere epitheliale

Wurzelscheide, der dem Stratum germinativum der Epidermis entspricht, und in einen inneren Anteil, innere epitheliale Wurzelscheide, der mit dem Stratum granulosum beziehungsweise lucidum vergleichbar ist, unterteilt (Hees, Sinowatz, 2000). Von außen wird die epitheliale Wurzelscheide von der bindegewebigen Wurzelscheide umhüllt, in dem sie sich um das differenzierte Haar als bindegewebiger Haarbalg manschettenartig anlegt. Des Weiteren werden die Haare von glatten Muskelzellen, Mm. erectores pili, feinen Kapillarnetzen und einer ausgeprägten, sensiblen Innervation begleitet (König, Liebich, 1999). Aus der epidermalen Anlage gehen gemeinsam mit den Haaren Talg- und Schweißdrüsen hervor und verlagern sich in der Tiefe. Das Haar, die Talg- und Schweißdrüsen bilden die Epidermis-Trias.

Eine besondere Bedeutung haben die Sinushaare, Pili tactiles, die auch als Tasthaare, eine Sonderform der Borstenhaare, bezeichnet werden. Die Sinushaare besitzen eine größere Wandstärke, sind durch ihre Länge gekennzeichnet, liegen tief in der Dermis und erreichen meist die Subcutis. Die Bewegungsmöglichkeit der Sinushaare wird durch das Vorkommen quergestreifter Hautmuskulatur gewährleistet. Bei dieser Art von Haar spaltet sich der Haarbalg in ein inneres und in ein äußeres Blatt ab. Zwischen diesen beiden Blättern befindet sich ein Blutsinus mit einer endothelialen Auskleidung. Es werden ein kavernöser Typ und ein sinusoider Typ des Blutsinus unterschieden. Bei dem kavernösen Typ sind beide Blätter durch feine Bindegewebstrabekel verbunden und der Blutsinus ist durchgehend unregelmäßig gekammert. Bei dem sinusoiden Typ ist der distale, der der Epidermisoberfläche nahe Bereich des Blutsinus durch die Ausbildung eines Ringsinus gekennzeichnet (König, Liebich, 1999). Ein feines Geflecht sensibler Nervenfasern durchzieht die bindegewebigen Wände und das Trabekelsystem des Blutsinus. Die freien Nervenendigungen der sensiblen Nervenfasern reichen bis in die Wurzelscheide der Sinushaare und zweigen sich dort auf. Die Nervenfortsätze, Haarfollikelzellen, stellen spezifische Druckrezeptoren dar, die jede Änderung der Sinneshaare und der Impulswelle des Blutsinus aufnehmen und verstärkt afferent weiterleiten (Liebich, 1999).

## 2.5 Haare des Flusspferdes

Die Literatur über die Haare des Flusspferdes ist stark begrenzt. Luck und Wright (1964) äußern sich ausschließlich über die Verteilung der Haare. Sie beschreiben, dass die Hautoberfläche der Flusspferde nahezu haarlos ist. Wenige feine Härchen verteilen sich über den gesamten Körper. Am Rücken besitzen sie eine Dichte von etwa 20 bis 30 Härchen pro 100 cm<sup>2</sup>, die Hälfte davon befindet sich an den Flanken und noch weniger sind über das Abdomen verteilt (Luck, 1964). Im Vergleich dazu kommen beim Merino-Landschaf etwa 7500 Haare pro cm<sup>2</sup> vor. Sichtbare Haare beziehungsweise Borsten befinden sich am Maul, an den Ohren und am Schwanz.

Laut Schumacher (1918) treten schon beim neugeborenen Flusspferd gut ausgebildete Sinushaare an der Oberlippe auf. Der Haar-Sinus wird von Trabekeln durchzogen - ein Ringsinus sowie ein Sinuskissen, die bei anderen Paarhufern vorkommen, fehlen beim Flusspferd gänzlich. Weniger weit entwickelt sind die Sinushaare am glatten Kinnpolster. Letztere fand Schumacher nur in der Ohrmuschel. Er bezeichnet sie als „Übergangsformen“, die sich wenigstens – wie er schreibt - zum großen Teil noch zu voll ausgebildeten Sinushaaren entwickeln dürften. Sie sind durch einen mächtigen bindegewebigen Haarbalg ausgezeichnet, der von sehr reichlichen und dünnwandigen Blutgefäßen durchzogen wird, in den asinuösen Haaren am nächsten stehenden Formen aber ziemlich gefäßarm sein kann. Die innere Faserlage des bindegewebigen Haarbalgs zeigt gewöhnlich eine Längsrichtung, die äußere einen zirkulären Verlauf. Haarmuskeln fehlen allen Haaren vollkommen. Die Haarpapillen sind in ihrer Form sehr verschieden und häufig mit sekundären zusammengesetzten Papillen versehen. Rudimentäre Cilien sind schon beim neugeborenen Tier nachweisbar; auch sie werden zu den „Übergangsformen“ zwischen sinuösen und asinuösen Haaren gerechnet und zeigen Zeichen des Haarwechsels (Schumacher, 1918).

## 2.6 Hautdrüsen - Allgemein

Zu den Hautdrüsen, Glandulae cutis, gehören unter anderem die Schweiß- und Talgdrüsen. Beide Hautdrüsen sind Teil der sogenannten Epidermis-Trias und reichen nach Hees und Sinowatz (2000) unterschiedlich weit in die Mittel- und Unterhaut. Beide Drüsen sondern ein mehr oder weniger lipidreiches Sekret ab, das die Haut mit einem dünnen Oberflächenfilm bedeckt (Liebich, 1999).

Die Talgdrüsen, *Glandulae sebaceae*, sind exoepitheliale, exokrine, alveoläre und holokrin sezernierende Drüsen. Sie können als einfache oder zusammengesetzte alveoläre Drüsen entwickelt sein (Liebich, 1999). Der von den Drüsen produzierte Talg, Sebum, gelangt über einen meist kurzen Ausführungsgang über die Haarfollikel an die Oberfläche der Epidermis (Liebich, 1999). Das Sebum entsteht durch eine Reihe von intrazellulären Prozessen, wobei es letztendlich durch den Zellverfall in den Ausführungsgang freigegeben wird (Hees, Sinowatz, 2000). An der Hautoberfläche angelangt, bildet das Sebum einen dünnen Fettfilm auf der Epidermis. Der Fettfilm vermindert die Durchlässigkeit für Wasser und andere wässrige Flüssigkeiten und hält das Stratum corneum der Epidermis und die Oberfläche der Haare geschmeidig (König, Liebich, 1999).

Die Schweißdrüsen, *Glandulae sudoriferae merocrinae*, sind exoepitheliale, exokrine, tubuläre und apokrin oder merokrin, ekkrin sezernierende Drüsen (Liebich, 1999). Die Mehrzahl der Schweißdrüsen bei Haussäugetieren sind apokrine Drüsen und sind an Haarfollikeln gebunden. Seltener besitzen die Haussäugetiere merokrine Drüsen, da diese nur an unbehaarten Hautarealen, also unabhängig von Haaren, auftreten. Die Sekretion des Schweißes erfolgt durch Kontraktion der Drüsenalveolen über Myoepithelzellen, den sogenannten Korbzellen.

Eine der wichtigsten Aufgaben der Schweißsekretion ist die Thermoregulation des Organismus. Weiterhin werden durch den Schweiß Stoffwechselprodukte abgegeben. Es entwickelt sich ein „Säureschutzmantel“, da der saure pH-Wert des Schweißes, pH 4,5, das Keimwachstum auf der Haut hemmt (Hees, Sinowatz, 2000). Liebich (1999) macht für die antimikrobielle Wirkung des Hautoberflächenfilms freiwerdende Fettsäuren verantwortlich, die bei fermentativer Spaltung von Hautlipiden entstehen.

Eine Kombination von modifizierten Talg- und Schweißdrüsen tritt in großer Anzahl bei den Haussäugetieren auf (König, Liebich, 1999).

## **2.7 Haut-Drüsen des Flusspferdes**

Luck und Wright (Eltringham, 1999) stellen fest, dass beim Flusspferd weder Schweißdrüsen noch Talgdrüsen im anatomischen Sinne vorkommen. Luck und Wright beschreiben allerdings eine Substanz, die dem Talg, Sebum ähnlich ist. Sie wird – wie beide beschreiben - von einer nicht näher qualifizierten Drüsenart

produziert (Luck, 1964). Weber beschreibt bereits im Jahre 1886 fehlende Talgdrüsen an der Basis von Borstenhaaren der Flusspferde. Dagegen kommen Talgdrüsen an den langen Haaren der neugeborenen Flusspferde regelmäßig vor, sind aber nur schwach differenziert (Weber, 1886).

Schumacher (1918), der Untersuchungen an einem verstorbenen, neugeborenen Flusspferd durchführte, fand Talgdrüsen ausschließlich an den asinuösen Haaren der Ohrmuscheln. An den Haaren anderer Hautareale untersuchte Schumacher unregelmäßige Vorwölbungen der äußeren Wurzelscheide, die seiner Meinung nach Bedeutung als Talgdrüsen haben könnten. Nach weiteren Untersuchungen der vermeintlichen Talgdrüsenanlage ist Schumacher davon überzeugt ist, dass es sich hierbei um unregelmäßig verteilte wulstförmige Verdickungen der äußeren Wurzelscheide handelt. Seine Schlussfolgerung basiert vor allem auf dem nicht einmal in Spuren Vorhandensein von Fetttröpfchen. Schumacher ist davon überzeugt, dass, obwohl er an den asinuösen Haaren der Ohrmuscheln des Neugeborenen Talgdrüsen gefunden hat, diese während der späteren Ontogenese des Individuums rudimentär bleiben werden. Meibom-Drüsen des Lidrandes – wie sie bei den übrigen Säugetieren vorkommen - fehlten bei allen untersuchten Flusspferden gänzlich.

#### Subdermale Haut-Drüsen des Flusspferdes

Als hervorstechendes Drüsen-Merkmal der Flusspferde beschreiben Weber (1886), Toldt (1916), Schumacher (1918), Allbrook (1962) und Luck und Wright (1964) die großen subdermalen Drüsen, die sie auch als Schleimdrüsen bezeichnen (siehe Abbildungen 5 und 6).

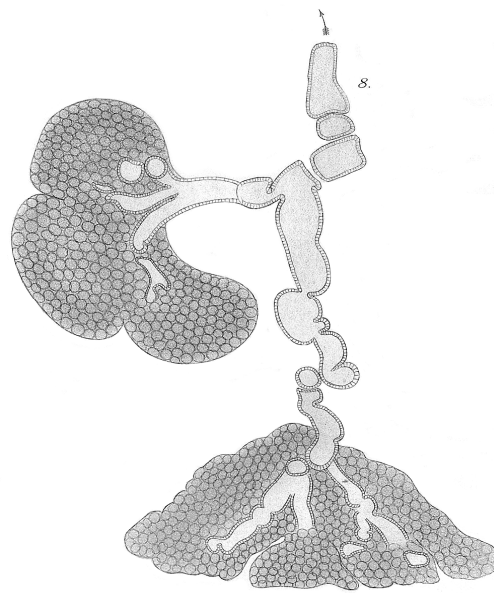


Abb. 5: Tubulöse Drüse von *Hippopotamus amphibius* neonatus (nach Weber, 1886); die Richtung des Pfeiles weist auf die Öffnung des Ausführungsganges der Drüse in Epidermis-Richtung. Die Drüsenkörper sind angefüllt mit querdurchschnittenen Drüsenschläuchen.



Abb. 6: Schnitt durch eine tubulöse Hautdrüse eines erwachsenen Exemplares *Hippopotamus amphibius* (nach Weber, 1886)  
 a. Ausführungsgänge mit Zylinderepithelium, das von außen von glatten Muskeln bedeckt ist; auf Querschnitten der Gänge sieht man die Kerne der Muskelzellen  
 s. Sezernierende Drüsenschläuche



Die Dichte der Verteilung der subdermalen Drüsen ist spärlich; es kommt eine Drüse pro  $\text{cm}^2$  vor (Wright, 1987). Die Ausführungsgänge der subdermalen Drüsen sind mit bloßem Auge sichtbar (Wright, 1987), da die Zellen des Ausführungsganges einer starken Pigmentierung unterliegen (Schumacher, 1918) und in keiner Verbindung zum begrenzten Haarkleid der Flusspferde stehen (Wright, 1987).

Weber (1886) beschreibt, dass die Mündungen der Ausführungsgänge der subdermalen Drüsen am zahlreichsten auf dem Rücken bis zur Schwanzspitze, ferner auf der dorsalen Fläche des Kopfes, an der Ober- und Unterlippe und sparsam an der Vorderfläche der Beine vorkommen. Die Palmar- und Plantarfläche der Gliedmaßen, die Flanken, die ventrale Fläche am Kopf und am Hals dagegen sind nach Weber (1886) frei von Ausführungsgängen und Drüsen.

Dahingegen konnte Toldt (1915), der während seiner Untersuchungen auch Drüsen dieser Art an der ganzen Unterseite des Körpers - wenn auch spärlicher - sowie vereinzelt an den Nasenflügeln, am oberen Augenlid, am Kinnpolster und am Schwanz aufweisen. Auch an den Zehen der Tiere beschreibt Toldt Ausführungsgänge. Nach Schumacher und Toldt kommen keine Drüsen an der Sohlenhaut und an der Außenfläche der Ohrmuscheln vor. Dies konnte auch in eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Weiterhin ist es auffällig (Toldt, 1915), dass Drüsenausführungsgänge im Gegensatz zu den Haaraustritten, immer innerhalb einer durch seichte Rinnen gefelderten Hautstelle austreten, unabhängig von ihrer Lokalisation. An der relativ glatten, aber dennoch auch gefelderten Haut des Kopfes treten kleine warzenartige Formen auf, an deren Spitze mitunter gleich zwei Gänge münden. Toldt beschreibt weiterhin vereinzelt Drüsenhöckerchen auf der Dorsalfläche der Zehen des Flusspferdes.

Nicht nur die Verteilung der Drüsen über den kompletten Flusspferdkörper variiert stark, sondern auch deren Größe und Form. Schumacher (1918) unterscheidet eine besonders große Drüsenform auf Höhe des Oberschenkels mit einem Durchmesser von 4 mm; die kleinste Drüse an der Oberlippe hat einen Durchmesser von 1 mm. Laut Schumacher kann man die Form der Drüse nicht einheitlich festlegen, da diese extrem variiert. Er beschreibt Drüsen, die kugelrund, dreieckig, flach oder leicht erhaben sind (Schumacher, 1918). Weber und Schumacher legen beide die Lokalisation des Drüsenkörpers an der Grenze zwischen der Subcutis und den tiefsten Schichten des Coriums fest. Aufgrund der außerordentlich unterschiedlichen

Dicken des Coriums liegen die Drüsen auch verschieden tief. Je dünner das Corium und somit das Stratum reticulare, das im Wesentlichen die Dicke des Coriums ausmacht, je eher kann durch die verhältnismäßig oberflächliche Lage des Drüsenkörpers eine Vorwölbung der Hautoberfläche entstehen (Schumacher, 1918). Diese sogenannten Vorwölbungen oder Drüsenhöckerchen sind zum Beispiel auf der Stirnseite und an den Zehen der Tiere zu erkennen. Durch die Lage der Drüsen kommt es sowohl beim Corium als auch bei der Subcutis zu keiner nennenswerten Veränderung der Verlaufsrichtung der Bindegewebsbündel (Schumacher, 1918). Laut Toldt und Schumacher liegen die Drüsen - im Unterschied zu anderen Säugetier-Gruppen - nie in unmittelbarer Nähe der Haare.

1962 untersucht Allbrook erneut diese für das Flusspferd markanten Drüsen. Er fasst zusammen, dass die Größe der Drüsen, die er ebenso zwischen dem Corium und der Subcutis lokalisiert, variiert. Die untersuchten Drüsen liegen im Mittel circa einen Zoll (2,54 cm), unter der Oberfläche der Haut (Crisp, 1962). Große Drüsen mit einem Durchmesser von circa 2,5 cm sind linsenförmig und kommen vermehrt am Rücken und an den Flanken vor. Jede größere Drüse besitzt in der Regel zwei Ausführungsgänge, Allbrook beschreibt 1962 aber auch mehrere Drüsen-Ausführungsgänge. Die kleineren Drüsen mit einem Durchmesser von 0,25 cm sind tiefer in der Dermis eingebettet und befinden sich nach Allbrook besonders im Halsbereich und im Gesicht.

Histologisch wurden die subdermalen Drüsen schon 1886 von Weber und 1918 von Schumacher untersucht. 1962 befasste sich Allbrook erneut mit der Histologie, der von ihm als komplexer als Schweißdrüsen beschriebenen Drüsen-Anlagen. Nach Allbrook handelt es sich um eine zusammengesetzte tubulo-azinäre Drüse. Die Azini, englumige, traubenförmige Endstücke, bestehen aus mukösen und granulären, sekretorischen Drüsen. Das tubuläre System von den sekretorischen Zellen mündet in ein Sammelsystem von größeren Gängen, die wiederum einen Sekret-Hauptgang bilden, der sich spiralförmig durch das mächtige Corium windet und am Ende als Punkt makroskopisch auf der Epidermis sichtbar ist (Allbrook, 1962).

Im Gegensatz dazu vermutet Schumacher (1918), dass es sich phylogenetisch um eine zusammengesetzte tubulo-alveoläre Speicheldrüse handelt, da er unter anderem beim Vergleich der Sekretauführungssysteme exakte Übereinstimmungen finden kann. Er vermutet, dass die subdermalen Drüsen des

Flusspferdes während der Phylogenese an die Stelle von Schweißdrüsen getreten sind. Weber (1886) zieht Vergleiche zu anderen Säugetieren und erwähnt die Auffälligkeiten der Flotzmauldrüse des Rindes, die eine modifizierte Talg- und Schweißdrüse darstellt (Liebich, 1999). Weber beschreibt (1918) als einen der wenigen Unterschiede zwischen den Flotzmauldrüsen der Rinderartigen und den Hautdrüsen der Flusspferde das rein muköse Sekret der Flusspferd-Hautdrüsen. Er rechnet sie daher nicht den Speicheldrüsen zu. Schumacher (1918) warnt vor dem Vergleich mit Schweißdrüsen anderer Säugetiere, da das Ausführungsgangsystem, die Sekretröhrchen und die Schaltstücke und der Bau der Endstücke beim Flusspferd nicht mit einer modifizierten Schweißdrüse übereinstimmt.

Kränzle (1912) beschreibt, dass das Schwein neben anderen Hautdrüsenorganen, auch freie Schweißdrüsen besonders auf dem Rücken und an der Kruppe aufweist. Bei diesen frei angelegten Schweißdrüsen kann die Entstehung nicht auf Haaranlagen zurückgeführt werden, da die eine freie Schweißdrüse umgebenden Haarbälge mit je einer schon dazugehörigen Schweißdrüsenmündung ausgestattet sind. Da beim Flusspferd die subdermalen Drüsen immer in einiger Entfernung von den Haaren vorkommen, meint Schumacher (1918), dass es wahrscheinlich ist, dass die Vorfahren des Flusspferdes ebenfalls freie Schweißdrüsen besessen haben, an deren Stelle dann die Schleimdrüsen getreten sind, während die zu den Haaren gehörigen Schweißdrüsen mit der Reduktion des Haarkleides vollständig geschwunden sind. Laut Schumacher sind nur noch an der Ohrmuschel beide Drüsenarten, die zu den Haaren gehörigen Schweißdrüsen und die wahrscheinlich phylogenetisch an die Stelle der freien Schweißdrüsen getretenen Schleimdrüsen, welche unabhängig von den Haaren ausmünden, erhalten.

## 2.8 Haut-Sekret des Flusspferdes



Abb. 7: Beginn der Sekretion der Haut-Drüsen; Nahaufnahme der lateralen Rückenhaut eines weiblichen 9-jährigen Flusspferdes



Abb. 8: Beginn der Sekretion der Haut-Drüsen; Nahaufnahme der Rückenhaut eines weiblichen 14-jährigen Flusspferdes



Abb. 9: Beginn der Sekretion der Haut-Drüsen; Nahaufnahme der Rückenhaut eines männlichen 22-jährigen Flusspferdes



Abb. 10: Übersicht über die fortgeschrittene Sekretion mit Nachdunklung des Haut-Sekretes eines weiblichen 24-jährigen Flusspferdes



Abb. 11: Übersicht über die fortgeschrittene Sekretion mit Nachdunklung des Haut-Sekretes eines weiblichen 9-jährigen Flusspferdes



Abb. 12: Übersicht über die fortgeschrittene Sekretion mit Nachdunklung des Haut-Sekretes eines weiblichen 46-jährigen Flusspferdes

Die tubulo-azinäre Hautdrüse der Flusspferde ist ungewöhnlich groß und ihr Gewicht beträgt etwa 1 g (Wright, 1987). Dementsprechend ist das Volumen der Sekretion sehr hoch. Laut Allbrook sollen drei verschiedene Typen von sezernierenden Zellen für das Sekret zuständig sein. Es handelt sich hierbei nach Allbrook um tubulo-azinäre, rein seröse und rein muköse Zellen. Der zytologische Charakter dieser Zellen deutet an, dass sie an den drei Phasen der aktiven Sekretion der subdermalen Drüsen beteiligt sind. John Tomes (1850) war der erste, der das Phänomen der Sekretion schriftlich festhielt. Zunächst war unklar, ob dies ein Zeichen von Krankheit ist. Nachdem die Sekretion aber regelmäßig auftrat, wurde sie als nicht pathologisch festgehalten.

Das von den subdermalen Drüsen produzierte Sekret ist eine schleimige, fadenziehende, durchsichtige, alkalische Flüssigkeit (Luck, Wright, 1959). Es handelt sich hierbei um ein Sekret, das in der älteren Literatur oft aus diagnostischer Unsicherheit als „blutiger Schweiß“ bezeichnet wurde. Auch im jüngsten Artikel von Saikawa et al. 2004 bezeichnen die Autoren das Sekret als „Schweiß“.

Gelangt das Sekret durch den Ausführungsgang frisch auf die Haut, ist es zunächst von nur leicht muköser Konsistenz und durchsichtig (siehe Abbildungen 7 – 9). Nach kurzer Zeit folgen die Farbabstufungen rosa, hellrot, rot, dunkelrot, hellbraun, braun, bis das Sekret schließlich vollständig dunkelbraun (siehe Abbildungen 10 – 12) eingefärbt ist. Die farblichen Veränderungen des Sekretes sind schon seit 1850 durch Tomes bekannt. Wright (1987) vermutet, dass sich die Sekretfarbe verändert, wenn das Sekret mit der Umgebungsluft in Berührung kommt. Auch zur Viskosität des Sekretes äußern sich Luck und Wright (1959). Sie beschreiben, dass die Viskosität mit der dunkler werdenden Farbe zunimmt.

In der Literatur erscheinen unterschiedliche Ansichten über den Zeitpunkt des Sekretflusses. Tomes beschreibt, dass die Flusspferde das Sekret nur im Wasser verlieren, da es - nach Tomes - eine spezielle Anpassung an das Wasserleben der Tiere darstellt (Tomes, 1850). Andererseits sezernieren die Tiere nur unmittelbar nach Verlassen des Wassers, das Sekret trocknet an Land schnell wieder ein (Allbrook, 1962). An anderer Stelle wird beschrieben (Allbrook, 1962), dass die gefangenen Tiere nur unter heißen klimatischen Bedingungen oder im Zusammenhang mit adrenerger Aufregung sezernieren. Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten das Sekret bei wildlebenden Tieren nur, wenn sie in

Bewegung und demnach Anstrengungen ausgesetzt waren. Bei getöteten Flusspferden, konnte das beschriebene Sekret immer wieder beobachtet werden (Allbrook, 1962). Luck and Wright (1964) hingegen sind davon überzeugt, dass das Sekret sowohl an Land als auch im Wasser gebildet wird und dass dies auch ohne Stress und Aufregung passiert. Weiterhin wurden von Luck und Wright Versuche an narkotisierten Tieren durchgeführt. Wird den Tieren das periphere Muskelrelaxantium Succinylcholin verabreicht, steigert dies die Sekretion zudem um ein Vielfaches. Der dadurch entstandene Sekretfluss konnte mittels Atropin-Gabe anschließend wieder gehemmt werden (Luck, 1964).

Nach Luck and Wright ist das Sekret mit einem pH-Wert von pH 8,5 - 10,5 leicht bis stark alkalisch (Luck, 1964). Durchgeführte pH-Messungen während der Dissertation-Arbeit mit einem Ergebnis von pH 9 - 10 bestätigen die alkalische Eigenschaft.

1964 analysierten Luck und Wright die Zusammensetzung einer Mischprobe (siehe Tabelle 3):

Tab. 3: Zusammensetzung des Haut-Sekretes des Flusspferdes (modifiziert nach Luck und Wright, 1964)

| Substanz         | Konzentration [mg/l] |
|------------------|----------------------|
| Natrium          | 414                  |
| Kalium           | 11037                |
| Calcium          | 10                   |
| Chlorid          | 4550                 |
| Hydrogencarbonat | 12261                |

Wright findet 1987 unterschiedliche Sekret-Zusammensetzungen und beschreibt eine große Variabilität in den Zusammensetzungen (siehe Tabelle 4).

Tab. 4: Zusammensetzung des Haut-Sekretes des Flusspferdes (modifiziert nach Wright, 1987)

| Substanz | Konzentration [mg/l] |
|----------|----------------------|
| Natrium  | 28                   |
| Kalium   | 5460                 |
| Chlorid  | 644                  |
| Carbonat | 5970                 |

Saikawa et al. untersuchten das Sekret im Speziellen auf dessen charakteristischen Eigenschaften (2004, 2006). Die Arbeitsgruppe konnte mittels Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie erstmals zwei zuvor unbekannte saure Pigmente aus dem alkalischen Sekret isolieren. Es handelt sich hierbei - wie Saikawa et al. beschreiben - um ein rotes und um ein orangefarbenes Pigment. Diese Strukturen hat Tomes vermutlich schon 1850 in seinen mikroskopischen Untersuchungen beschrieben. Tomes (1850) beschreibt die Pigmente als Korpuskeln. Er unterscheidet zwei unterschiedliche Varianten: eine im Sekret der Flusspferde reichlich vorhandene, farblose und eine andere seltener vertretene Variante von roter Farbe. Weiterhin beschreibt Tomes die Pigmentkörper als instabil, sie verändern ihre Konfiguration, zerfallen nach kurzer Zeit, und bestimmen durch diese Umstrukturierungen die Farbe des Haut-Sekretes der Flusspferde.

Des Weiteren vermuten Saikawa et al. (2004), dass das Sekret unter anderem einen antibakteriellen, antiseptischen und einen Schutz vor UV-Strahlung bieten soll.

Luck und Wright (1964) beschreiben die schnell ablaufende und selten mit Vereiterungen einhergehende Wundheilung der Tiere in freier Wildbahn. Beide Autoren sind daher Ansicht, dass das Sekret für die schnelle Heilung verantwortlich sei. Wright (1987) schätzt, dass die antiseptische Wirkung des Haut-Sekretes vermutlich sehr potent ist, da sich die Tiere ständig in keimhaltiger Umgebung aufhalten und die Hautinfektionsrate dazu in Relation gering ist. Nach Saikawa et al. dient die Sekretion des Haut-Sekretes der Flusspferde der einfachen Thermoregulation. Luck und Wright (1964) stellen in ihren Untersuchungen fest, dass die Flusspferde zwar einen höheren transepidermalen Wasserverlust als andere Säugetiere haben, die Steuerung der beschriebenen Thermoregulation bleibt aber unklar.

Luck und Wright vermuten weiterhin, dass das Sekret eine reinigende und schützende Wirkung für die Haut entfaltet. Diese Aussage bezieht sich auf von Schlamm bedeckte Tiere, bei denen das Sekret wie ein Peeling wirken soll (1964).

Schumacher (1918) wertet das Vorkommen der subdermalen Drüsen beim Flusspferd anstelle von Schweißdrüsen als eine Anpassungsreaktion an die amphibische Lebensweise dieser Tiere. Weber (1886) beschreibt das Sekret während des Wasseraufenthaltes des Flusspferdes als „feuchtes Schutzschild“ für die Haut. Auch das eingetrocknete Sekret stellt eine Art Schutzfilm gegen



Austrocknung beim Aufenthalt an Land dar. Luck und Wright (1964) sind der Ansicht, dass es sich bei der Sekretion sowohl um einen Schutz der Haut als auch um eine Anpassung an das amphibische Leben der Tiere handelt.

## 2.9 Homogentisinsäure - 2,5-Dihydroxyphenylelessigsäure

Im Rahmen der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit konnte Homogentisinsäure (HGS) – 2,5-Dihydroxyphenylelessigsäure - als Inhaltsstoff des Haut-Sekretes der Flussperle isoliert werden. Homogentisinsäure ist Zwischenprodukt des Metabolismus der essentiellen Aminosäure alpha-L-Phenylalanin.

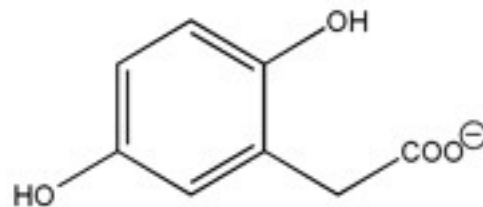


Abb. 13: Strukturformel der Homogentisinsäure als Abbauprodukt der essentiellen Aminosäure alpha-L-Phenylalanin

Für Aminosäure-Metaboliten wie Homogentisinsäure (siehe Abbildung 13) kommen im Zellstoffwechsel im Allgemeinen vier Funktionen in Frage: Sie wirken als Bausteine für die Biosynthese von körpereigenen Proteinen, als Stickstoffbeziehungswise Aminogruppendonatoren bei der Biosynthese anderer stickstoffhaltiger Verbindungen. Sie sind als glucogene Aminosäuren Substrate für die Gluconeogenese und wirken, gelegentlich erst nach Decarboxylierung zum entsprechenden Biogenen Amin, als Signalmoleküle (Löffler, 2001). Phenylalanin ist eine proteinogene chirale, aromatische Aminosäure mit hydrophober Seitenkette, die nur - wie andere Aminosäuren auch - in ihrer L-Form in der Natur als Proteinbestandteil Verwendung findet und für den Menschen essentiell ist. Das stark hydrophobe Phenylalanin leitet sich strukturell vom Alanin ab. Durch Hydroxylierung entsteht im Stoffwechsel aus Phenylalanin die proteinogene, nichtessentielle Aminosäure alpha-L-Tyrosin (siehe Abbildung 14). Tyrosin ist Ausgangssubstanz für die Biosynthese von Catecholaminen, dem Haut- und Fellfarbstoff Melanin, den Schilddrüsenhormonen Tetrajodthyronin (Thyroxin) und Trijodthyronin und dem

Biogenen Amin Dopamin (Löffler, 2001). Tyrosin verliert seine Aminogruppe über Transaminierung auf  $\alpha$ -Ketoglutarat oder Pyruvat. Das verantwortliche Enzym Tyrosin-Transaminase zeigt sowohl cytosolische als auch mitochondriale Aktivitäten (Löffler, Petrides, 1998).

Das entstandene p-Hydroxyphenylpyruvat wird durch die cytosolische p-Hydroxyphenylpyruvat-Hydroxylase, eine kupferhaltige mischfunktionelle Oxygenase in Leber und Nieren, in Homogentisinsäure (HGS) umgewandelt. Bei dieser Reaktion, die die Anwesenheit des Reduktionsmittels Ascorbinsäure erfordert, erfolgt gleichzeitig die Hydroxylierung des Benzolrings in Parastellung sowie ein sterischer Wechsel der Pyruvatseitenkette, aus der durch Dehydrierung und Decarboxylierung eine Acetatseitenkette entsteht (Löffler, Petrides, 1998). Die durch Hydroxylierung und Decarboxylierung entstandene Homogentisinsäure wird im regulären Metabolismus des alpha-L-Phenylalanin durch eine oxidative Ringspaltung und eine Isomerisierung zunächst zu Maleylacetacetat - in der Folge zu Fumarylacetacetat - umgewandelt, dessen Spaltung wiederum zur Bildung von Fumurat und Acetacetat führt.

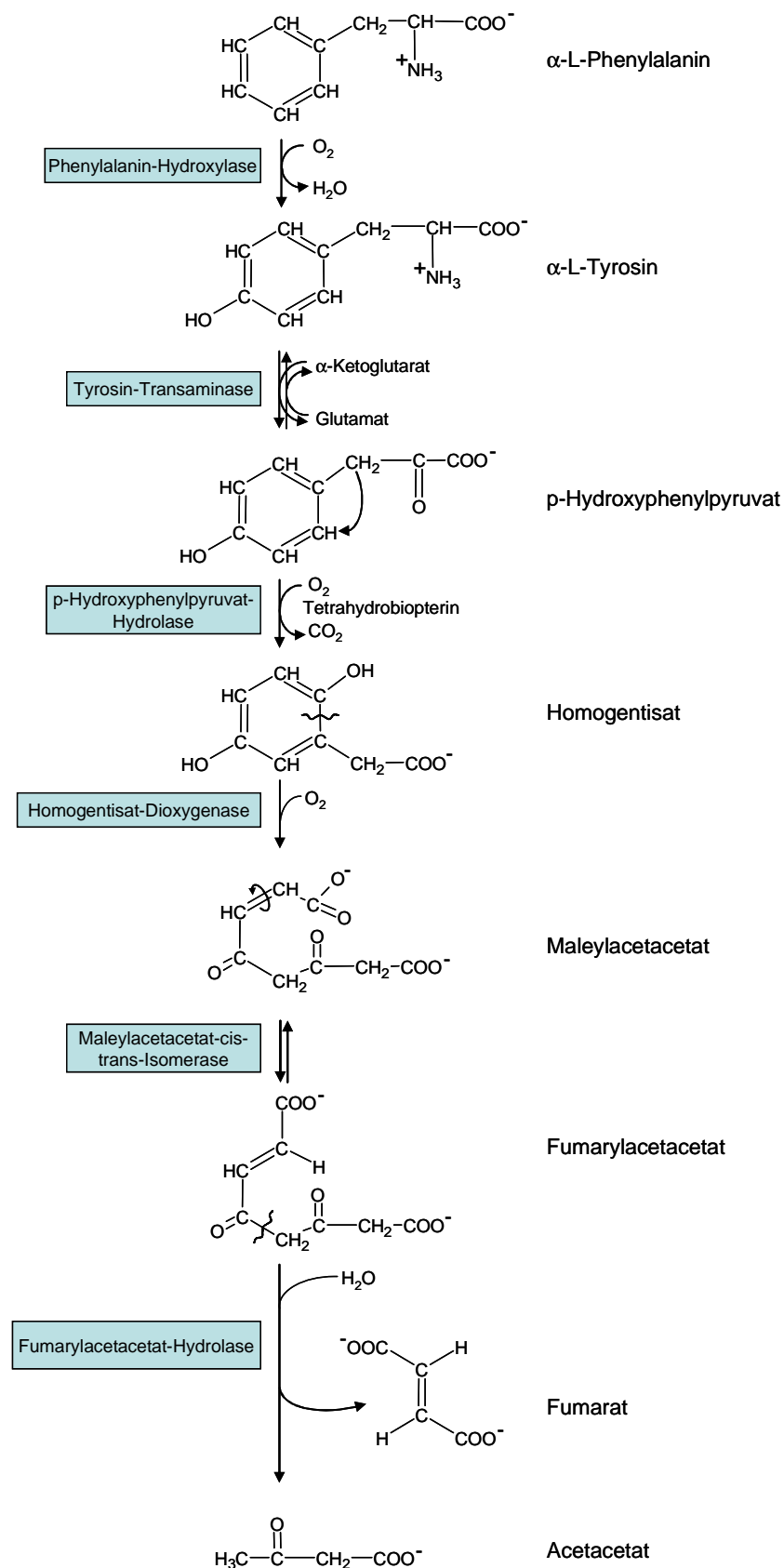


Abb. 14: Übersicht über den energetischen Abbau von  $\alpha$ -L-Phenylalanin (modifiziert nach Löffler, Petrides, 1998)

Störungen des Phenylalanin-Stoffwechselweges sind verantwortlich für unterschiedliche Erkrankungen von Tier und Mensch (siehe Abbildung 15).

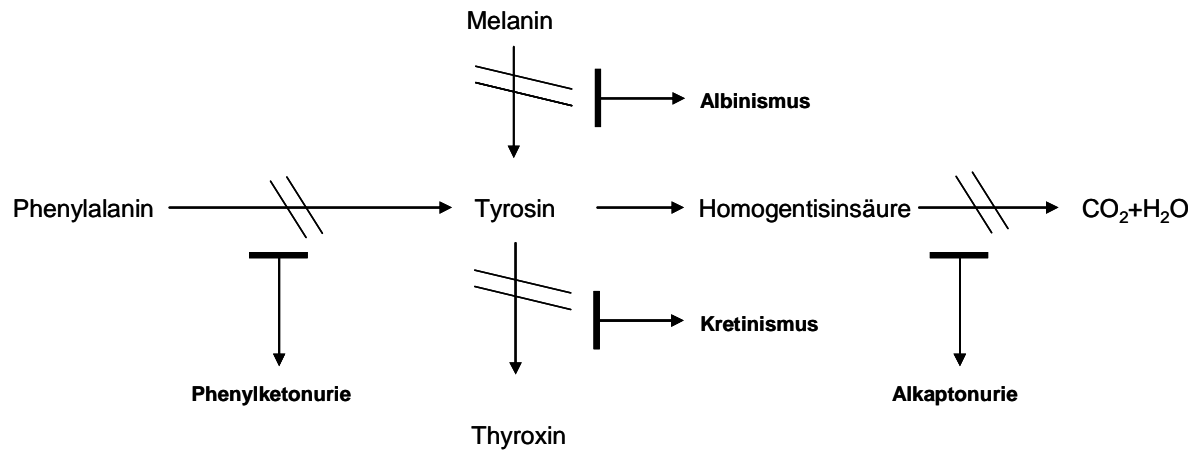


Abb. 15: Erkrankungen durch Störungen in verschiedenen Abschnitten des Phenylalanin-Stoffwechselweges

Eine durch Mutation ausgelöste Aktivitätsminderung des verantwortlichen Enzyms der Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin führt zum Krankheitsbild der autosomal-rezessiven Stoffwechselstörung Phenylketonurie. Bei einem fehlerhaften Abbau des Phenylalanins treten toxische Zwischenprodukte auf, die unter anderem die Myelin-Bildung toxisch inhibieren. Das wichtigste Krankheitssymptom stellt die gestörte geistige Entwicklung der Betroffenen dar (Greten, 2005).

Weitere angeborene Erkrankungen, die durch den Mangel, beziehungsweise durch das nicht Vorhandensein des Tyrosins entstehen, sind der Albinismus und Kretinismus.

Eine weitere autosomal rezessive erbliche Stoffwechselstörung des Phenylalanin-Tyrosin-Stoffwechsels ist die Alkaptonurie. Das Krankheitsbild ist selten, die Häufigkeit in der menschlichen Bevölkerung liegt bei etwa 1:200 000. Die Erkrankung wird durch einen Mangel oder das Fehlen der Homogentisat-Dioxygenase ausgelöst (Reinwein et al., 2000). Dadurch häuft sich das Intermediärprodukt Homogentisinsäure im gesamten Organismus an und wird in der Folge mit dem Urin (bis zu 8g/d) ausgeschieden, Alkaptonurie (Phornphutkul et al., 2002). Sobald der Urin mit Sauerstoff in Kontakt tritt, führt dies zu einem dunklen Farbumschlag des

zunächst normal gefärbten Urins. Die Farbe verändert sich umso schneller und intensiver, je alkalischer der Urin ist.

Durch die Kristallablagerungen der Homogentisinsäure in den unterschiedlichen Geweben, Ochronose, kommt es zu einer schwarzbraunen Pigmentierung von Skleren, Haut und einigen Körpersekreten, wie zum Beispiel Schweiß. Wohingegen aber die für die Schwarzbraun-Färbung von Geweben und die für Urin verantwortlichen Stoffe nicht identisch sind. Die Pigmentierung der Gewebe wird durch ein Polymerisierungsprodukt der HGS verursacht. Weiterhin können durch die HGS-Kristalle degenerative Gelenkserkrankungen, Osteo deformans alcaptonurica, und entzündliche Veränderungen der Herzklappen, Gefäße und Gelenke entstehen (Greten, 2005).

### 3 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Haut-Sekret-Proben von Flusspferden im Zeitraum von Mai 2006 bis Mai 2007 genommen. Das gewonnene Haut-Sekret der Flusspferde sollte auf dessen Zytotoxizität, UV-protective und antimikrobielle Eigenschaften untersucht werden. Weiterhin wurde die molekularchemische Zusammensetzung zum Teil analysiert.

#### 3.1 Untersuchungen der Flusspferde

Die Untersuchungen erfolgten an zwei Flusspferden der Wilhelma - dem Zoologisch-Botanischen Garten in Stuttgart – und an sieben Flusspferden aus dem Erlebnis-Zoo in Hannover (siehe Tabelle 5).

Tab. 5: Übersicht über alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere

| Name     | Zoo      | Geschlecht | Geburtsjahr/-ort |
|----------|----------|------------|------------------|
| Rosi     | Wilhelma | ♀          | 1968 Karlsruhe   |
| Mike     | Wilhelma | ♂          | 1985 Antwerpen   |
| Zora     | Hannover | ♀          | 1961 Karlsruhe   |
| Kiboko   | Hannover | ♀          | 1983 Wroclaw     |
| Habari   | Hannover | ♀          | 1993 Plock       |
| Cherry   | Hannover | ♀          | 1998 Leipzig     |
| Victoria | Hannover | ♀          | 1998 Basel       |
| Himba    | Hannover | ♀          | 2000 Leipzig     |
| Fridolin | Hannover | ♂          | 2006 Hannover    |

Die in-vivo-Beobachtungen zur Haut-Sekretproduktion erfolgten an allen neun Flusspferden. Die eigentliche Sekretgewinnung wurde dagegen aus organisatorischen Gründen nur bei fünf Tieren durchgeführt - die übrigen zeigten keine Kooperation bei der Sekretentnahme.

Im Laufe dieser Arbeit musste die Zahl zudem auf vier Tiere reduziert werden, da die Flusspferd-Kuh „Victoria“ im Herbst 2006 ein Kalb gebar und ihre Haltungsbedingungen daraufhin geändert werden mussten.

#### 3.2 Probennahme

Es sollte im Rahmen der Untersuchungen eine praktikable und wirkungsvolle Technik der Sekret-Gewinnung etabliert werden, die es ermöglicht, die

unterschiedlichen Farben des Sekretes ohne äußere Verunreinigungen und Beeinflussung durch abiotische und biotische Faktoren zu gewinnen. Ein besonderer Aspekt hierbei war, die Probennahme den Möglichkeiten artgerechter Tierhaltung (keine Fixation möglich) und den besucherfreien Zeiten im Zoo anzupassen.



Abb. 16: Darstellung der Probennahme am Kopf eines Flusspferdes mit der Teigschaber-Technik

### 3.2.1 Probennahme – Wilhelma-der Zoologisch-Botanische Garten Stuttgart

Damit die beiden Tiere der Stuttgarter Wilhelma das Futter nicht in ihrem Gehege verteilen, wird Ihnen während der Fütterung der Zugang zum Wasser und zum Außengehege versperrt. Diese Zeit, die noch um etwa 1,5 Stunden verlängert wurde, wurde zur Probennahme genutzt.

Die Vorbereitungen zur Probennahme begannen sofort nachdem die Tiere den Pool zur Fütterung verlassen hatten. Zunächst wurde das schon auf der Haut befindliche Sekret mittels Teigschaber abgeschabt (siehe Abbildung 16), um anschließend die Tiere gründlich mit Leitungswasser und unter Benutzung eines großporigen Schwammes zu reinigen. Nach der Waschung war die Haut zunächst für einige Zeit trocken. Von Tier zu Tier begann unterschiedlich schnell die erneute Sekretion. Das Haut-Sekret wurde am Kopf und am Rücken beziehungsweise fast bis zur

Ventralseite des Tierkörpers unter Verwendung des Teigschabers zusammengetragen und in Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die gewonnenen Haut-Sekret-Mengen am Kopf waren meist gering, so dass ein Reaktionsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 2 ml ausreichend war. Am Rücken der Tiere konnten im Allgemeinen etwa 2 ml bis 14 ml gesammelt werden. Um die unterschiedlich gefärbten Haut-Sekrete darstellen zu können (siehe Abbildung 17), wurden sie zu unterschiedlichen Zeiten gewonnen. Verblieb das Sekret wenige Minuten auf der Haut, dunkelte es nach. Jede gewonnene Probe wurde ihrer Farbe nach mit einem eigenen Bewertungssystem (1: „hell“, 4: „dunkel“) benotet.



Abb. 17: Haut-Sekret eines Flusspferdes der Qualitäten „hell“, „mittel“ und „dunkel“

Die auf diese Art und Weise gewonnenen Proben wurden schnellstmöglich auf Trockeneis in einer Styroporbox, unter Licht-Ausschluss gelagert.

Wenn durchsichtige Reaktionsgefäße verwendet wurden, wurden diese, bevor sie auf Trockeneis gelagert wurden, mit Aluminiumfolie ummantelt, um sie zusätzlich vor weiterem Lichteinfall zu schützen. Danach wurden die Proben auf direktem Weg zum Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim transportiert, wo sie schließlich bei - 80°C gelagert wurden.



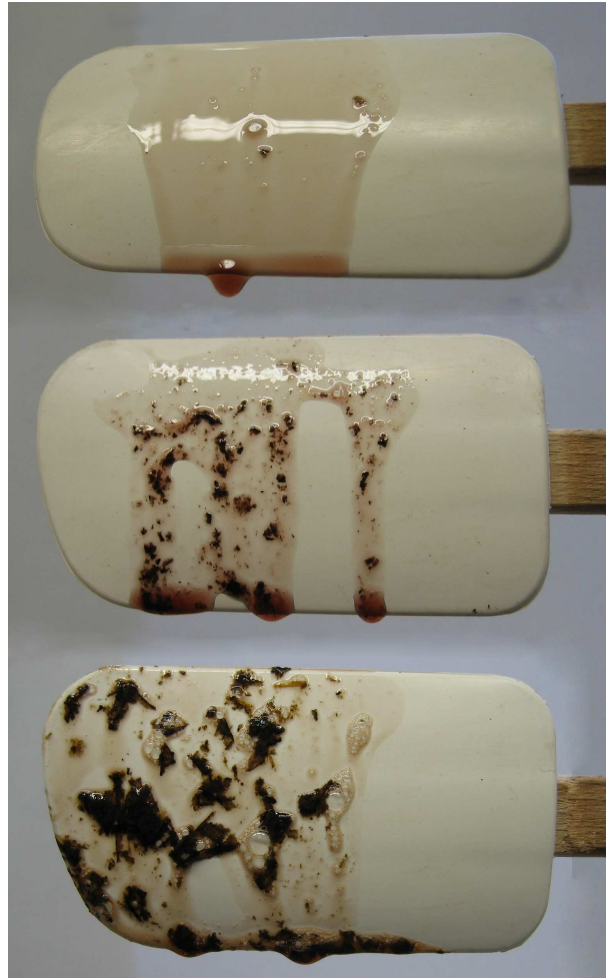


Abb. 18: Darstellung des Haut-Sekretes mit zunehmendem Verschmutzungsgrad (oben: Flusspferd wurde vor Probennahme gewaschen; mitte, unten: Probennahme am ungewaschenen Flusspferd)

### 3.2.2 Probennahme - Erlebnis-Zoo Hannover

Die Flusspferde im Zoo Hannover verbringen die gesamte Nachtruhe ohne Wasserzugang im Stall, so dass morgens zu Beginn der Probennahme das nächtlich abgesonderte Haut-Sekret über den gesamten Körper verteilt ist. Die Tiere wurden wie in der Wilhelma gewaschen. Aufgrund der verschiedenartigen Haltungsbedingungen und des unterschiedlichen Stallbaus, war es in Hannover meist nicht möglich, den gesamten Rücken zu waschen. Die Anordnung der Gitterstäbe war im Allgemeinen enger, die Tiere unruhiger und mit mehr Bewegungsfreiheit untergebracht. Diese Bedingungen erschwerten die Sekretgewinnung.

Die sorgfältige Verpackung der Proben mit Aluminiumfolie erfolgte analog zu den Proben im Zoologisch-Botanischen Garten Stuttgart. Die Proben wurden auf Kühllakkus gelagert und anschließend nach jedem Probennahmetag in eine

Kühltruhe bei - 25°C verbracht. Nach dem umgehenden Transport zur Universität Hohenheim auf Trockeneis, wurden die Proben ebenfalls am Institut bei - 80°C gelagert.

### **3.3 Untersuchungen der Zellvitalität**

Ein Forschungsschwerpunkt des Instituts für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim liegt zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit in den Untersuchungen von Effekten verschiedener Substrate auf humane Hautzellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten). Des Weiteren werden viele, dort etablierte Untersuchungen mit sichtbarem Licht, UVA- und UVB-Strahlung auf Zellen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden zunächst Untersuchungen mit der Kombination Haut-Sekret und HFP-1-Zellen, anschließend mit der Kombination Sekret, HFP-1-Zellen und UVA-Bestrahlung durchgeführt. Es sollte die Wirkung des Haut-Sekretes der Flusspferde auf die HFP-1-Zellvitalität getestet werden, um ein optimales Wirkungsspektrum für die anschließenden Bestrahlungen mit UVA zu bestimmen.

#### **3.3.1 Zellmaterial**

Die Ursprungszellen der HFP-1-Zell-Linie wurden einem dreieinhalb jährigen männlichen Spender während einer Hernienoperation mittels Hautbiopsie im unteren Abdomenbereich entnommen (Francz, 1998). Die routinemäßige Etablierung und die Erfahrung - insbesondere mit der Durchführung von UV-Bestrahlungen auf die beschriebenen Kulturen mit HFP-1-Zellen am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim - begründen schließlich die Verwendung dieser Zell-Linie in den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit.

#### **3.3.2 Tierisches Material**

Die jeweilige Flusspferd-Sekret-Probe musste vor jedem Versuch für 5 Minuten bei 5500 U/min. zentrifugiert (Laborzentrifuge 3K15) werden, da sich in jeder Probe, trotz intensiver Reinigung des jeweiligen Tieres, unterschiedliche Mengen Schmutz, Haare, Haut und Futterpartikel befanden. Da sich die Proben, bei Raumtemperatur, in der Farbe und Konsistenz ändern, wurde unter Ausschluss von Licht und auf Eis gearbeitet. Die Probengefäße wurden so kurz wie möglich geöffnet, um eine

Reaktion mit molekularchemischen Bestandteilen der Umgebungsluft so gering wie möglich zu halten. Eine oxidative Wirkung des Luftsauerstoffgemisches auf Inhaltsstoffe der Sekretprobe sollte auf diese Weise ausgeschlossen werden.

Die für den Versuch benötigten Mengen wurden - wie alle Untersuchungen - mit dem Haut-Sekret anschließend aus dem Überstand pipettiert.

### **3.3.3 Durchführung der Zellkultur-Methoden**

#### Auftauen und Ansetzen der HFP-1-Zellen

Die Zellen wurden in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

In einem Wasserbad von 37°C wurden die Zellen aufgetaut, um anschließend in eine mit 10 ml erwärmten Standardwachstumsmediums Dulbeccos' Modified Eagle Medium (DMEM) gefüllte T 75-Flasche überführt zu werden. Innerhalb von 24 Stunden wuchsen die HFP-1-Zellen auf dem Nährboden zu einem dichten Zellrasen heran. Nach dieser Zeit wurde ein Wechsel des Mediums durchgeführt, um das Dimethylsulfoxid (DMSO) und eventuell abgestorbene Zellen zu entfernen. Während der Wachstumsperiode wurde 2 x wöchentlich ein erneuter Mediumswechsel (DMEM) vorgenommen. Der mehrfache Wechsel des Mediums diente dabei der optimalen Nährstoff-Versorgung der HFP-1-Zellen. Nach 7 Tagen hatte sich eine lückenlose Monolayer-Schicht gebildet.

#### Kultivierung der HFP-1-Zelllinie

Die Zellen wurden anschließend in einem Begasungsbrutschrank BB16 von Heraeus Instruments bei 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein konstanter pH-Wert von 7,2 bis 7,3 des Kulturmediums konnte mit Hilfe eines im DMEM enthaltenen Hydrogencarbonatpuffersystems und einer Begasung mit einer kontrollierten Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> eingehalten werden. Als weiterer Indikator wurde das Medium mit Phenolrot versetzt.

Am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim hat sich folgender Ablauf zur Kultivierung der HFP-1-Zellen etabliert (Francz, 1998).

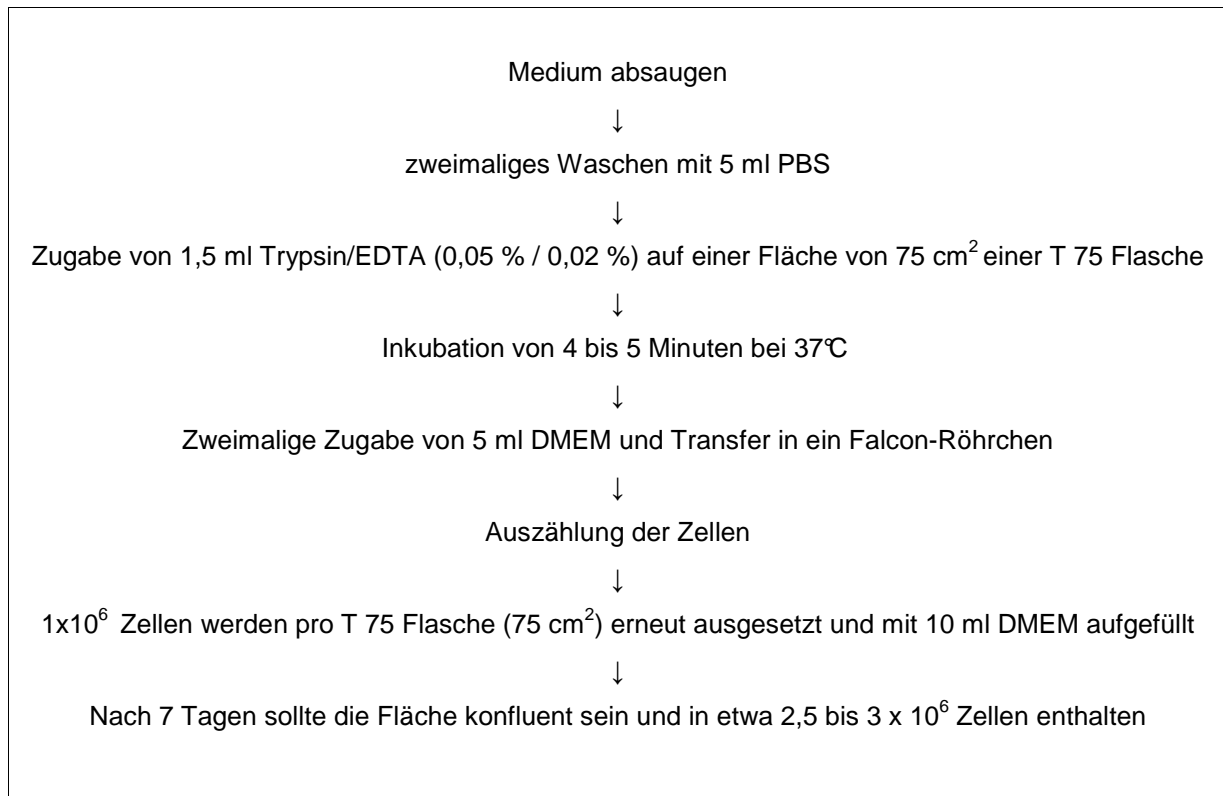


Abb. 19: Arbeitsschritte zur Kultivierung einer HFP-1-Zelllinie in der Zellkultur nach Francz, 1998

### 3.3.4 Untersuchung mit Thiazolblau (MTT)

Diese ebenfalls von Francz (1998) etablierte Methode dient dem Nachweis der metabolischen Aktivität der Zellen. Das verwendete Thiazolblau - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl]-tetrazoliumbromid - (MTT) wird in gelber Farbe von lebenden Zellen aufgenommen und mit Hilfe von mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff metabolisiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mittels Lysepuffer (Zusammensetzung: 10 g SDS, 99,4 ml DMSO, 0,6 ml Essigsäure) aufgeschlossen. Die in den Zellen gebildeten Formazankristalle werden in dem Lysepuffer gelöst und die „farbige“ Lösung im Photometer bei 590 nm gemessen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert jeweils mit der metabolischen Aktivität der Zellen.

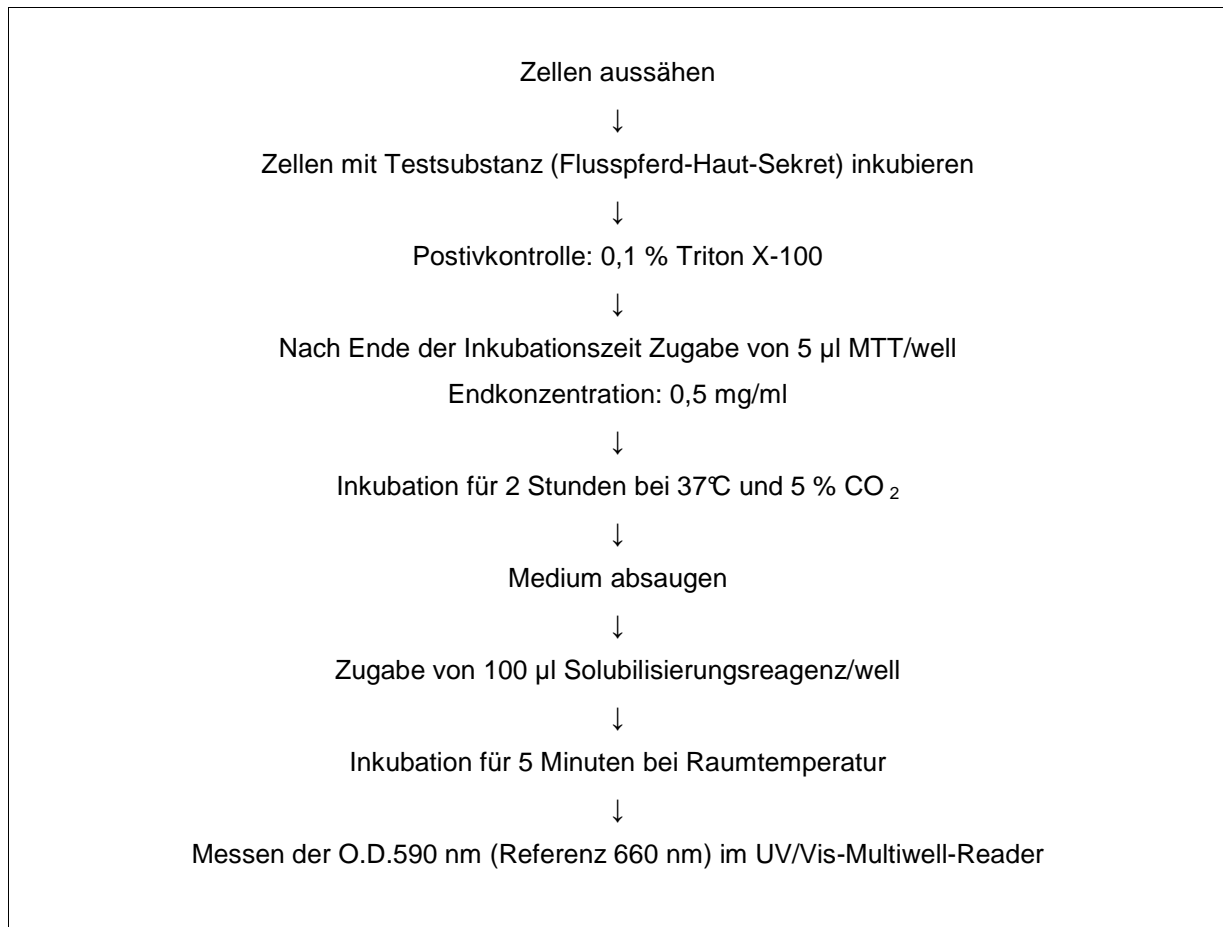


Abb. 20: Arbeitsvorschrift zur Durchführung eines Zellvitalitätstests (MTT) nach Francz, 1998

Die vom UV/Vis-Multiwell-Reader, ein EL 340 Microplate, angezeigten Daten wurden mittels MicroWin aufgenommen und mit GraphPrism ausgewertet.

### Scantypisierung von MTT und HGS

Bevor Untersuchungen mit der HGS zur Überprüfung ihrer zytotoxischen Eigenschaften durchgeführt wurden, wurde die minimale und maximale Absorption der HGS und des MTT mittels Scantypisierung am Unicam UV/VIS Spectrometer analysiert (siehe Abbildungen 21 und 22). Da das HGS-Molekül eine Absorption zwischen 190 nm und 340 nm aufweist, bleibt die MTT-Messung bei 590 nm auf diese Weise unbeeinflusst.

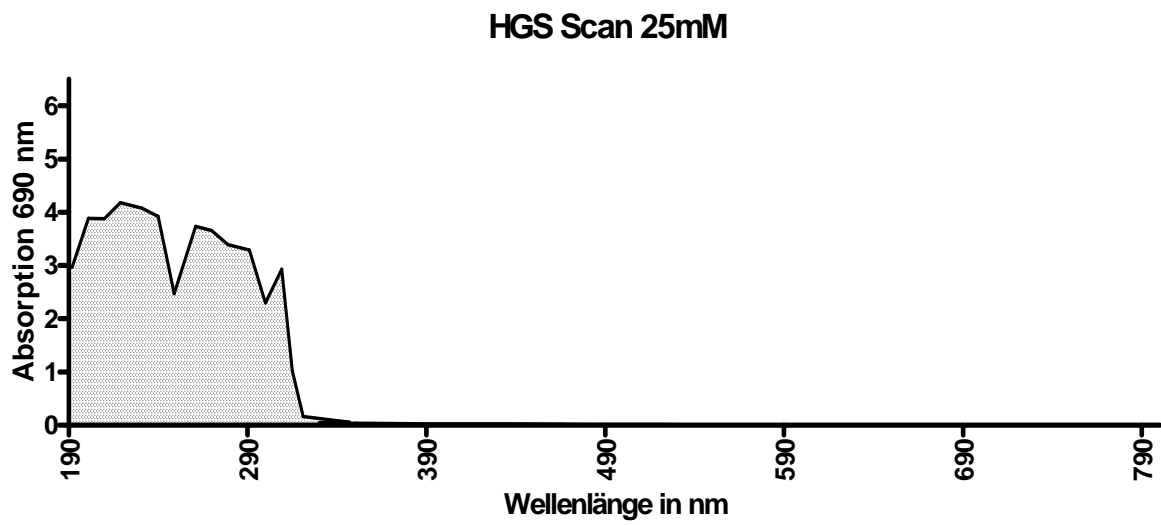


Abb. 21: Unicam UV/VIS Spectrometer: Scantypisierung einer 25 mM HGS-Stammlösung

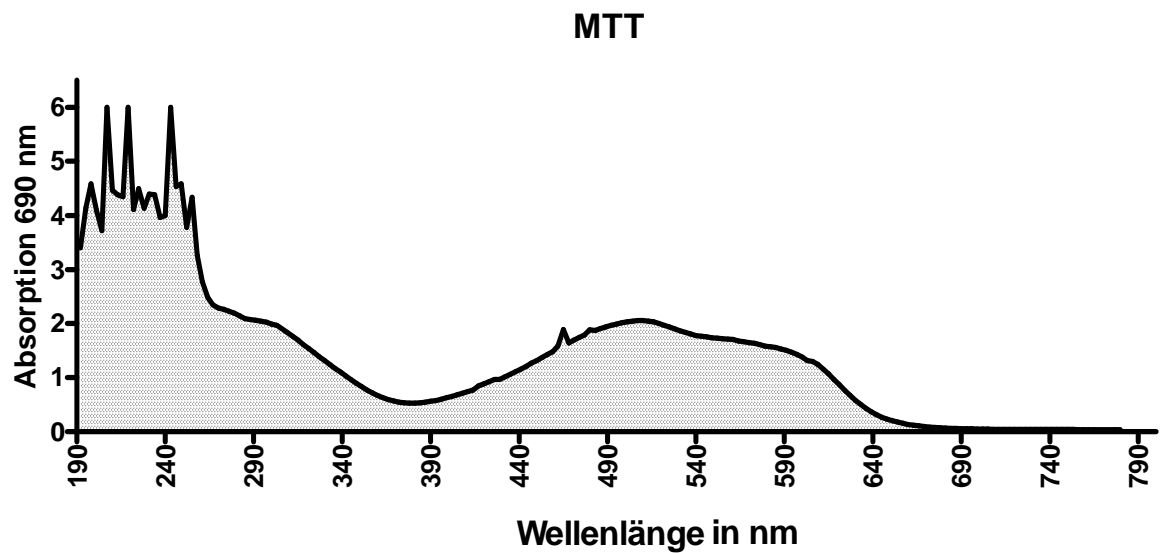


Abb. 22: Unicam UV/VIS Spectrometer: Scantypisierung von MTT (0,33 MTT mg/ml)

### pH-Wert-Messungen bei Anwendung von Homogentisinsäure

Zur zusätzlichen Überprüfung der Verschiebung des pH-Wertes bei Kontakt der HGS mit den verwendeten Medien, wurde eine Versuchsreihe mit folgenden Ergebnissen angelegt:

|   |                    |        |
|---|--------------------|--------|
| ➤ | Hanks              | pH 7,8 |
| ➤ | 0,1 mM HGS + Hanks | pH 7,7 |
| ➤ | 1 mM HGS + Hanks   | pH 7,0 |
| ➤ | 3 mM HGS + Hanks   | pH 6,2 |
| ➤ | 5 mM HGS + Hanks   | pH 4,5 |
| ➤ | 10 mM HGS + Hanks  | pH 4,0 |
| ➤ | 25 mM HGS + Hanks  | pH 3,5 |
| ➤ | 100 mM HGS + Hanks | pH 2,8 |

### **3.3.5 Durchführung der Untersuchungen mit dem Haut-Sekret der Flusspferde**

Das Haut-Sekret der Flusspferde wurde unter Lichtausschluss vor dem Beginn der Untersuchungen zunächst mit DMEM verdünnt. Die dazu gewählten Konzentrationen waren: 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150, 1:200, 1:500, 1:850. Die Verdünnungsreihe wurde so zügig wie möglich angesetzt, um die Flusspferd-Probe nicht länger als notwendig dem Luftsauerstoff und CO<sub>2</sub> auszusetzen. Um eine sichere Verteilung der Verdünnung zu gewährleisten, wurde in jeder Zeile der 96-Well-Platte jedes Well einzeln auspipettiert. Zwei Zeilen wurden nicht mit Sekret gefüllt, sondern es wurde in eine zur Positivkontrolle Triton X-100 (0,1 %) pipettiert, die andere blieb unbehandelt.

Für die drei Zeitmessungen wurden die Platten unterschiedlich lang inkubiert (24 h, 48 h, 72 h). Zum Ende der Inkubationszeit wurden die einzelnen Platten nach der Methode von Francz (1998) weiter behandelt (siehe Abbildung 20).

### **3.4 Untersuchungen UV-protektiver Effekte**

Saikawa et al. (2004) postulierten nach molekularchemischer Isolation zweier Hautpigmente einen durch sie vermittelten möglichen UV-Schutz für die Flusspferd-Haut. Zur Überprüfung der Postulate wurden verschiedene Zellkultur-

Untersuchungsreihen am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim angelegt. Abhängig von den ersten Ergebnissen sollten weitere Testreihen durchgeführt werden. Zur Untersuchung konnte nur das direkt gewonnene Sekret ohne weitere Aufreinigung verwendet werden, da isolierte Pigmente des Flusspferd-Haut-Sekretes zum Zeitpunkt des Erstellens dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht vorlagen.

Außer einigen zusätzlichen Chemikalien, Materialien und Geräten wurden die Vorbereitungen und die meisten Durchführungen für die Bestrahlung mit UV-Licht analog zu den Untersuchungen bei den Zellkulturen durchgeführt.

#### Untersuchungsablauf für die UV-Bestrahlung

Die Vorbereitung der HFP-1-Zellen erfolgte analog zu der in der Zellkultur. Ab der Passage 8 wurden die HFP-1-Zellen auf Zellkultur-Schalen (TPP) ausgesät, auf denen sie nach 7 Tagen konfluent und schließlich für die Untersuchung mit UVA-Bestrahlung genutzt werden konnten; anschließend wurde in diesem Schritt mit Hanks' Salt Solution (3 ml) gearbeitet. Es wurden 60 µl des Haut-Sekretes der Flusspferde auf die dafür vorgesehenen TPP aufgetragen (siehe Tabelle 6). Um alle Bedingungen der Testreihe erfassen zu können, wurden Negativ- und Positivkontrollen angelegt. Die Positivkontrollen stellen durch 0,1 % Triton X-100 (5 µl Triton/TPP) getötete Zellen und die Negativkontrollen stellen Zellen ohne Behandlung (ohne Flusspferd-Sekret) dar. Ein Teil der angefertigten TPPs wurde mit UVA bestrahlt und der andere Teil wurde zur Kontrolle im Begasungsbrutschrank BB16 aufbewahrt. Nach einer 1,5 Stunden langen UV-Bestrahlung bei 15 J/cm<sup>2</sup> wurden von allen TPPs (auch die im Begasungsbrutschrank) Hanks' Salt Solution entfernt und erneut mit 3 ml DMEM aufgefüllt. Nach 24 Stunden Aufenthalt im Begasungsbrutschrank wurden die TPPs mit 100 µl MTT/TPP angereichert. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation wurde das Medium komplett entfernt und 1 ml Solubilisierungslösung auf die Platten gegeben. Nach 5 Minuten wurde das Solubilisat auf mehrere Zellkultur-Mikroplatten (96-well-Format) überführt und mit Hilfe des EL 340 Microplate Daten gemessen. Zur Auswertung wurde die Software MikroWin genutzt.



Tab. 6: Pipettierschema für die Untersuchungsreihen der UV-Bestrahlung mit und ohne Haut-Sekret der Flusspferde (drei Farben des Haut-Sekretes pro Tier)

| UV-Pipettierschema         | Flusspferd |   |   |   |
|----------------------------|------------|---|---|---|
| Sekret                     | -          | + | - | + |
| UV (25 J/cm <sup>2</sup> ) | -          | - | + | + |

- = nicht verwendet; + = verwendet

Es wurden drei Flusspferde mit je drei unterschiedlich gefärbten Haut-Sekreten getestet.

### 3.5 Untersuchungen der Zellvitalität mittels Durchflusszytometrie

Mit der Methode der Durchflusszytometrie sollten die Ergebnisse der Untersuchungen der Zellkultur und die der UVA-Bestrahlung verifiziert beziehungsweise ergänzt werden.

Die 7-Aminoactinomycin (7-AAD)-Färbung ist eine am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim etablierte Methode nach Philpott et al. (1996).

Es wurden  $5 \times 10^5$  bis  $10^6$  Zellen in Annexin-V-Bindepuffer (ABB) gewaschen und abzentrifugiert (30 sec.-1 min. bei 8000 rpm in einer Tischzentrifuge). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 300 µl ABB resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl 7-AAD-Stammlösung (250 µg/ml) war eine Inkubation im Dunkeln bei 4°C von 20 Minuten erforderlich. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von 800 µl ABB. Nach einer Zentrifugation von 30 sec.-1 min. bei 8000 rpm in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut in 1 ml ABB resuspendiert. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen im Durchflusszytometer bei 675 nm gemessen.

#### Untersuchungsablauf der 7-AAD-Färbung

Für die Versuchsreihe der 7-AAD-Färbung wurden Zellen analog zu den UV-Untersuchungen behandelt. Der Assay dient zur Unterscheidung der lebenden von den nekrotischen und apoptotischen Zellen. Diese Unterscheidung diente zur Verdeutlichung der Zellschäden durch die Homogentisinsäure (HGS), beziehungsweise UV-Bestrahlung und HGS, da Ergebnisse aus dem MTT-Test nicht eindeutig zuzuordnen waren.

Die Durchflusszytometrie wird auch als Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) bezeichnet. Anhand der Durchflusszytometrie erfolgen die Detektion, die Messung und die Analyse von Zellsignalen. Die zu untersuchenden Zellen werden dabei in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geführt. An dieser Stelle des Durchflusszytometers erfolgen Licht-Intensitäts-, Licht-Absorptions- und Licht-Reflektions-Messungen. Weiterhin kann die Fluoreszenz, die die Zellen während der Transmission emittieren, gemessen werden. Durch die übermittelten Daten, die für jede einzelne Zelle festgehalten werden, können die relative Größe und die optische Dichte bestimmt werden. Mittels spezifischer Antikörper, die mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, lässt dieses Analyseverfahren den Nachweis der Expression von bestimmten Molekülen auf und in der Zelle zu. Durch den Gebrauch von nukleinsäurebindenden, fluoreszierenden Farbstoffen kann zusätzlich der DNA-Gehalt der transmissierten Zelle analysiert werden.

#### Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

In reiner Form ist 7-Aminoactinomycin ein orange-roter Feststoff. Die Löslichkeit des Stoffes beschränkt sich auf N, N-Dimethylformamid Dimethylsulfoxid und Chloroform. Die Stammverbindung des 7-AAD ist Actinomycin D, im Gegensatz zur Stammverbindung wird das 7-AAD jedoch nicht als Zytostatikum eingesetzt. 7-AAD besitzt jedoch prinzipiell die gleichen Eigenschaften wie die Stammverbindung.

Eine Besonderheit ist die Fähigkeit des 7-AAD zur Interkalation zwischen Nukleotid- und Basenbestandteile der DNA. Dieses Phänomen ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Benutzung von 7-AAD als Zellfarbstoff (Philpott et al., 1996).

Dabei interkaliert 7-AAD spezifisch zwischen die Pyrimidinbase Cytosin (C) und die Purinbase Guanin (G) und verändert dabei seine Fluoreszenzeigenschaften. Eine Besonderheit von 7-AAD ist, dass - ebenso wie bei Prodiimidid - ausschließlich die DNA von „toten“ Zellen angefärbt wird, da die Substanz nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann. Man bezeichnet 7-AAD daher auch als Avitalfarbstoff.

Diese Eigenschaft wird bei einem Assay verwendet, der Apoptose-Potenzien verschiedener Zellen untersucht. Bei der Apoptose kommt es zu einem Verlust des asymmetrischen Aufbaus der Zellmembran. Das bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Membran lokalisierte Phosphatidylserin (PS) tritt dann vermehrt auch innerhalb der nach außen gerichteten Membranseite auf.

Bei einer Fluoreszenzmethode zur Bestimmung des Apoptosestadiums wird eine Doppelfärbung der Zellen mit einem Phosphatidylserin-spezifischen Farbstoff, dem Protein Annexin V und mit 7-AAD durchgeführt. Intakte Zellen reagieren auf beide Färbungen negativ, frühapoptotische Zellen reagieren positiv auf die Färbung mit PS, jedoch negativ auf die mit 7-AAD, spätapoptotische Zellen reagieren auf beide Färbungen positiv. Auch vollkommen nekrotische Zellen reagieren positiv auf die Färbung mit 7-AAD, jedoch negativ auf die Färbung mit PS.

Die Untersuchungen selbst erfolgen im Durchflusszytometer. Bei beiden Verfahren wird die Fluoreszenz durch einen Laser (meist 488 nm) angeregt. Das Emissionsmaximum liegt bei 647 nm.

### **3.6 Untersuchungen am Monolayer-Hautmodell**

Am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) der Fraunhofer Gesellschaft in Stuttgart wurden Untersuchungsreihen (n=14) mit Haut-Sekreten von Flusspferden unterschiedlicher Sekret-Farben an einem Monolayer-Hautmodell durchgeführt.

Fibroblasten nehmen während des Wundheilungs-Prozesses eine zentrale Bedeutung ein. Dieser Zelltyp ist unter anderem als Produzent verschiedener Zytokine und unterschiedlicher Haut-Wachstumsfaktoren bekannt. Zytokine sind extrazelluläre Signalproteine für die interzelluläre Kommunikation. Auf diese Weise regulieren ortsständige Zellen des Reperationsgewebes im gegenseitigen Wechselspiel ihr eigenes Wachstum und schließlich ihre Differenzierung. Sie sind außerdem an vielen Wundheilungsprozessen beteiligt. Am Monolayer-Hautmodell für das primär isolierte humane Hautfibroblasten verwendet wurden, sollen die Wundheilungseigenschaften des Flusspferdsekretes untersucht werden. Anhand der Wachstumskurven der verwendeten Fibroblasten kann ein möglicher Einfluss des Sekretes genauer definiert werden.

### **3.7 Untersuchungen der Enzymaktivität**

Saikawa et al. (2004) isolierten im Haut-Sekret der Flusspferde rote und orange-farbene Pigmente und postulierten eine antioxidative Wirkung für diese. Diese Information veranlasste eine genauere Untersuchung von farbgebenden Antioxidantien, wie zum Beispiel Carotinoiden.

Anhand mehrerer HPLC-Trennungen im Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim konnten die Carotinoide Lutein und Zeaxanthin gemessen werden. Aufgrund der orange-rot-braunen Farbe und der ermittelten HPLC-Daten wurden am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie, der Universität Hohenheim weitere Untersuchungen auf das Carotinoid Lutein durchgeführt.

Eventuell im Flusspferd-Sekret vorhandene Oxygenasen könnten die Umsetzung von  $\alpha$ - beziehungsweise  $\beta$ -Carotin zu Lutein oder anderen Lipochromen im Sekret katalysieren.

Ziel der Enzymaktivitäts-Messungen war der Nachweis von Oxygenasen im Flusspferd-Sekret. Des Weiteren wurde gleichzeitig auf Protease- und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität geprüft. Zur Bestimmung dieser Enzyme wurden Standardanalysen verwendet.

HPLC-Methode des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie, der Universität Hohenheim zur Bestimmung von Lutein

|                 |  |
|-----------------|--|
| Säule:          | GromSil ODS-3 CP; 125 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m (Fa. Grom, Herrenberg) |
| Mobile Phase:   | Methanol   |
| Fluss:          | 1 ml/min. isokratisch  |
| Inj.vol.:       | 25 $\mu$ l   |
| Detektion:      | 453 nm   |
| $t_R$ (Lutein): | 2,3 min.   |

ApiZym-Test

Einen Überblick über die im Haut-Sekret des Flusspferdes enthaltenen Enzymaktivitäten sollte der ApiZym-Test (n = 4) geben. Es handelt sich dabei um ein Teststreifen-Verfahren, mit dem gleichzeitig bis zu 20 Enzymaktivitäten nachgewiesen werden können (siehe Tabelle 7).

Die Flusspferdproben wurden zunächst zentrifugiert und der ApiZym-Test anschließend nach Herstellervorschrift durchgeführt (Inkubation bei 37°C für 4 h).

Tab. 7: Apizym-Test – 20 Enzymaktivitäten

|                        |                                    |
|------------------------|------------------------------------|
| Alkalische Phosphotase | Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase     |
| Esterase (C 4)         | $\alpha$ -Galactosidase            |
| Esterase Lipase (C 8)  | $\beta$ -Galactosidase             |
| Lipase (C 14)          | $\beta$ -Glucuronidase             |
| Leucin Arylamidase     | $\alpha$ -Glucosidase              |
| Valin Arylamidase      | $\beta$ -Glucosidase               |
| Cystin Arylamidase     | N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase |
| Trypsin                | $\alpha$ -Mannosidase              |
| $\alpha$ -Chymotrypsin | $\alpha$ -Fucosidase               |
| Saure Phosphotase      | Kontrolle                          |

### Oxygenase-Assay

Zu einer Puffer-Lösung, die  $\beta$ -Carotin als Substrat enthält, wurde ein Aliquot des Haut-Sekretes gegeben (siehe Tabelle 8). Die Inkubation erfolgte zwischen 30°C und 37°C für mehrere Stunden unter Schütteln im Dunkeln. Die Umsetzung wurde anschließend durch Zugabe von Methanol gestoppt. Eventuell de novo-synthetisierte Carotinoid-Verbindungen wurden über RP-HPLC analysiert. Die Untersuchungen wurden mit mehreren Haut-Sekreten unterschiedlicher Tiere und verschieden gefärbten Haut-Sekreten durchgeführt.

Als Vergleichsansätze wurden Puffer mit Sekret und ohne Substrat beziehungsweise mit Substrat und ohne Sekret mitgeführt. Da der pH-Wert der Proben zwischen pH 8,8 und 9,3 lag, wurde ein 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,0 eingestellt. Der Puffer war O<sub>2</sub>-gesättigt und enthielt zusätzlich 2 mM NADPH/H<sup>+</sup>. Das Substrat  $\beta$ -Carotin wurde in DMSO gelöst (Chumpolkulwong et al., 1997)

Tab. 8: Pipettierschema - Oxygenase-Assay

| Volumen [ $\mu$ l]  | Reagenz   |
|---|---|
| 200   | 0,10 M Carbonat-Puffer + 2,00 mM NADPH/H <sup>+</sup> , pH 9,0; O <sub>2</sub> -gesättigt |
| 20  | 0,75 mM $\beta$ -Carotin in DMSO  |
| 50  | Sekret (zentrifugiert)  |
| <i>Inkubation bei 30°C beziehungsweise 37°C, 800 rpm,<br/>mehrere Stunden</i> |   |
| 1000  | Methanol zum Abstoppen der Reaktion   |

Nach Zentrifugation wurde die Probe direkt zur HPLC eingesetzt. Als Vergleichsansätze wurden Puffer mit Sekret und ohne Substrat beziehungsweise mit Substrat und ohne Sekret mitgeführt.

### β-Galactosidase-Assay

Zu einer 50 mM p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid-Lösung in 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,0 wird Flusspferd-Sekret (n = 4) zugegeben und bei 37°C inkubiert (siehe Tabelle 9). Nach mehreren Stunden Schütteln im Dunkeln wurde die Freisetzung von p-Nitrophenol bei einer Absorption von 405 nm gemessen. Als Vergleichsansätze wurden Puffer mit Sekret und ohne Substrat beziehungsweise mit Substrat und ohne Sekret mitgeführt.

Tab. 9: Pipettierschema - β Galactosidase-Assay

| Volumen [μl]   | Reagenz                                      |
|--|--|
| 600  | 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9.0 + 50,0 mM pNPG* |
| 600  | Sekret (zentrifugiert)                       |
| <i>Inkubation bei 37°C, 800 rpm,<br/>mehrere Stunden</i> |  |

\*p-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid

Die Messung von freigesetztem p-Nitrophenol erfolgte bei 405 nm. Als Vergleichsansätze wurden Puffer mit Sekret und ohne Substrat beziehungsweise mit Substrat und ohne Sekret mitgeführt.

### Protease-Assay

Die Protease-Aktivitätsbestimmung (n = 4) erfolgte in 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,0 und mit FTC-Casein als Substrat. Die Umsetzung wurde bei 37°C unter Schütteln im Dunkeln durchgeführt. Nach mehreren Stunden wurde mit TCA abgestoppt und die Fluoreszenz gemessen (siehe Tabelle 10).

Tab. 10: Pipettierschema - Protease-Assay

| Volumen [ $\mu$ l]  | Reagenz   |
|---|---|
| 20  | Puffer  |
| 20  | 0,5 % FTC-Casein in 5,0 mM Tris-Puffer pH 7,2 = 5,0 mg/ml |
| 10  | Sekret (zentrifugiert)                                    |
| <i>Inkubation bei 37°C, 800 rpm,<br/>mehrere Stunden</i>              |   |
| 120   | 5,0 % TCA   |
| <i>mindestens 1 h bei RT stehen lassen<br/>Zentrifugation (5 min)</i> |   |
| 50  | Überstand nach Zentrifugation                             |
| 200   | 500,0 mM Tris-Puffer pH 8,5                               |

*Messung der Fluoreszenz  $ex=485\text{ nm}$ ;  $em=538\text{ nm}$   
in weißen MTP*

Als Vergleichsansätze wurden Puffer mit Sekret und ohne Substrat beziehungsweise mit Substrat und ohne Sekret mitgeführt.

### 3.8 Untersuchungen von Mengen- und Spurenelementen

In der Literatur ergaben sich Hinweise auf einige von Luck und Wright (1962, 1987) gemessenen Elemente, die die Zusammensetzung des Haut-Sekretes der Flusspferde mitbestimmen.

In Folge dessen wurde an der Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie, Abteilung Boden- und Düngemitteluntersuchung, der Universität Hohenheim mit mehreren Haut-Sekretproben der Flusspferde eine Elementaranalyse mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy) und ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy) durchgeführt, um Mengen- und Spurenelemente zu analysieren.

Dazu wurden die Haut-Sekretproben zunächst aufgetaut und anschließend zentrifugiert. Ein Aliquot von 2 ml jeder zur Untersuchung vorbereiteten Probe wurde anschließend zur Untersuchung eingereicht.

### 3.9 Untersuchungen auf antimikrobielle Eigenschaften

Saikawa et al. (2004) postulierten für das isolierte rote Pigment im Haut-Sekret eine potentiell antibiotische Eigenschaft. Bereits in Konzentrationen, die niedriger sind als die im Haut-Sekret der Flusspferde vorkommende, ist eine Wachstumshemmung der von ihnen ausgewählten Testorganismen, *Pseudomonas aeruginosa* A3 und *Klebsiella pneumoniae* PC1602, zu verzeichnen. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten diese Eigenschaften reproduziert werden, jedoch wurde in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dabei nicht das isolierte Pigment, sondern das gewonnene und unveränderte Haut-Sekret getestet.

Für die am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, und am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie, der Universität Hohenheim durchgeführten Versuche wurde Haut-Sekret der Flusspferde von unterschiedlicher Farbe und unterschiedlichen Tieren verwendet.

#### Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatten (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie der Universität Hohenheim)

Am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie, wurden die Haut-Sekret-Proben auf Luria-Bertani-Agar nach Miller (LB-Medium) (Hefeextrakt 5 g/l, Trypton 10 g/l, NaCl 5 g/l, Agar 15 g/l, pH 7,6) ausgestrichen (n = 4) und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die erhaltenen Kolonien wurden als Mischkultur in die Stammsammlung des Instituts aufgenommen.

#### Mikrobiologische Untersuchungen (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie der Universität Hohenheim)

Die unterschiedlichen Ansätze wurden in sterilen Mikrotiterplatten inkubiert. Für die Serienverdünnungen wurde das Haut-Sekret zunächst bei 10.000 rpm für 10 sec. in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand für die 1. Verdünnung in Reaktionsgefäßen mit 2-fach konzentrierter Mueller-Hinton-II-Bouillon (MHB II) 1:1 verdünnt. Für die weiteren Verdünnungen wurde jeweils die Hälfte des Volumens entnommen und in das nächste Gefäß im Verhältnis 1:1 pipettiert. Das halbe Volumen der 4. Verdünnung wurde verworfen. Aus diesen Verdünnungen wurden je



75 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Die übrigen Vertiefungen wurden mit je 200 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> befüllt. Aus einer Übernacht-Kultur der Teststämme in Standard-I-Bouillon wurde die Optische Dichte (OD<sub>595</sub>) bestimmt und eine Suspension in MHB mit circa  $1 \times 10^7$  Zellen/ml hergestellt. Daraus wurden die Vertiefungen mit je 10 µl angeimpft beziehungsweise als Kontrolle wurde mit MHB angeimpft. Aus der Animpfsuspension wurde die Lebendkeimzahl auf Standard-I-Platten bestimmt (*Klebsiella oxytoca*:  $1,4 \times 10^7$ /ml, *Staphylococcus aureus*:  $5 \times 10^6$ /ml).

Die Mikrotiterplatte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen mit einer Pipette durchmischt und die Lebendkeimzahl auf Standard-I-Agar bestimmt (n = 3).

Antimikrobielle Wirkung der Homogentisinsäure (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie der Universität Hohenheim)

In Untersuchungen am Institut für Chemie, Fachgebiet Bioorganische Chemie, der Universität Hohenheim konnte ein Homogentisinsäure-Anteil im Haut-Sekret isoliert werden. In Folgeuntersuchungen sollte am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, der Universität Hohenheim eine etwaige antimikrobielle Eigenschaft der Homogentisinsäure Säure analysiert werden.

Daher wurden Versuche mit käuflich erworbener Homogentisinsäure<sub>reinst</sub> und den Krankheitserregern *Klebsiella oxytoca* und *Staphylococcus aureus* durchgeführt und dabei die Optische Dichte (OD<sub>595</sub>) und Lebendkeimzahl bestimmt.

Homogentisinsäure stellt eine klar definierte Substanz des Haut-Sekretes dar. Es konnte daher im Gegensatz zu den Haut-Sekret-Versuchen eine Bestimmung der MHK mittels Optischer Dichte erfolgen.

Die Stammlösung (100 mg/ml) besteht aus der Homogentisinsäure, die in einfachkonzentrierter Mueller-Hinton-II-Bouillon (MHB II) gelöst ist. Um eine Verdünnung (1:10) mit einem pH-Wert von circa 7,3 herzustellen, wurde eine Kontrolle mit Merck pH-Indikatorstäbchen durchgeführt. Für die Serienverdünnung (in

1,5 ml Reaktionsgefäßen von Eppendorf) wurden 10 mg/ml Homogentisinsäure mit dem gleichen Volumen 1 x MHB II 1:1 verdünnt, um eine Konzentration von 5 mg/ml herzustellen. Diese Lösung wurde erneut verdünnt, um eine Konzentration von 2,5 mg/ml zu erlangen. Aus diesen Verdünnungen wurden je 75 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Wie im vorherigen Abschnitt wurden die Wells aus der Übernacht-Kultur mit je 10 µl Bakteriensuspension, beziehungsweise einfach-konzentrierter MHB II beimpft (Blanc). Die endgültigen Konzentrationen der HGS betragen demnach 4,41 mg/ml und 2,21 mg/ml. Aus der Animpfsuspension wurde die Lebendkeimzahl auf Standard I-Platten bestimmt. In dem Versuch, in dem beide Keime verwendet wurden, betrug die Lebendkeimzahl der Animpfsuspension bei *Klebsiella oxytoca*  $1,56 \times 10^7$ /ml und bei *Staphylococcus aureus*  $1,13 \times 10^7$ /ml. Die Lebendkeimzahl im Ansatz mit dem Testbakterium *Staphylococcus aureus* und der HGS (4,41 mg/ml) betrug in der Animpfsuspension  $2,7 \times 10^6$ /ml.

Vor der Messung der Optischen Dichte wurden die Wells durchmischt und die OD<sub>595</sub> mit dem MICROPLATE READER bestimmt. Danach wurde in den Untersuchungen mit beiden Teststämmen nach 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, und 24 h und in den Ansätzen (n = 3) mit *Staphylococcus aureus* nach 0,3 h, 3 h und 6 h die Lebendkeimzahl (n = 3) bestimmt.

#### Agar-Diffusions-Test (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie der Universität Hohenheim)

Auf die Agarplatte wurden 150 µl einer Suspension von *Staphylococcus aureus*, LTH 1493, in Standard I-Medium mittels eines Spatels aufgebracht (n = 1). Aus der anfangs klaren Lösung entwickelte sich innerhalb von 60 Minuten eine rotbraune bis dunkelbraune Lösung.

*Staphylococcus aureus* (LTH 1493) in Standard I-Medium wurde auf Standard I-Agar ausplattiert. Danach wurden zwei sterile Antibiotikafilterplättchen mit 10 und 4,41 mg/ml Homogentisinsäure getränkt und mittels steriler Pinzette auf den Standard I-Agar aufgelegt. Anschließend erfolgte über Nacht eine Inkubation bei 37°C.

### 3.10 Untersuchungen mittels High Performance Liquid Chromatography

Verschiedene Autoren vermuten unter anderem die Anwesenheit von antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen im Haut-Sekret der Flusspferde. Am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim wurden deshalb mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) verschiedene Sekret-Proben auf darin befindliche antioxidative Wirkstoffe mit zwei verschiedenen Methoden untersucht.

#### 3.10.1 Chromatographische Untersuchung mittels HPLC

Die HPLC ist eine analytische Methode aus der Gruppe der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Bei dieser Art von Trennverfahren wird die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert.

Die Bestimmungen der Konzentrationen von Lutein, Zeaxanthin und die Vitamine E und A im Haut-Sekret der Flusspferde erfolgten über die HPLC nach einer Methode von Erhardt et al. (2002), die im Institut modifiziert und etabliert wurde. Mit dieser Methode können alle Konzentrationen der oben genannten Substanzen in einem Durchlauf bestimmt werden.

#### Chromatographiebedingungen für Carotinoide

|                    |   |
|--------------------|---|
| Stationäre Phase:  | Reprosil-Pur NE RP 18, 5 µm, 250 × 4,6 mm (Trentec, Gerlingen, Deutschland)                                 |
| Mobile Phase:      | 82 % Acetonitril, 15 % Methyl-tert-butyl-ether, 3 % Methanol, 0,02 % Triethylamin, 0,0084 % Eisessig, (v/v) |
| Flussrate:         | 1,0 ml/min., isokratisch  |
| Injektionsvolumen: | 20 µl   |
| Detektion:         | UV-VIS 450 nm, Umschaltung nach 14 min. auf 407 nm  |
| Säulentemperatur:  | 40°C  |
| Runtime:           | 23 min.   |

#### Aufarbeitung des Flusspferd-Sekretes

Es wurden 100 µl der Flusspferd-Probe mit 300 µl 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 6/Ethanol (50 : 50) versetzt und nach Zugabe von 100 mg Natriumchlorid, zweimal mit 700 µl n-Hexan unter Zusatz von 10 µl n-Butanol extrahiert.

Anschließend wurden die Hexanphasen in einem Reagenzglas vereinigt und bis zur Trocknung mit Stickstoff eingengt. Danach wurde der Extrakt in 100 µl Acetonitril aufgenommen und in ein HPLC-Kunststoffvial überführt.

Das Extraktionsmittel sorgt für die vollständige Überführung der Carotinoide und es dient gleichzeitig der Denaturierung der Proteine. Des Weiteren enthält es den internen Standard ( $\beta$ -Apocarotensäure-Ethylester).

Während der Untersuchungen wurde auf Eis und unter Ausschluss von Licht gearbeitet. Das Sekret wurde anschließend zunächst bei 5500 U / 5min. in der Laborzentrifuge 3K15 zentrifugiert.

Mit Reinsubstanzen wurde eine externe Kalibrierung durchgeführt.

### **3.10.2 Chromatographische Untersuchungen mittels elektrochemischen Detektoren**

Die Bestimmung der Konzentrationen von Phenolen beziehungsweise Polyphenolen erfolgte mittels HPLC nach einer Methode von Erhardt et al. (2002), die am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim durch Wurster (2006) modifiziert und etabliert wurde. Es wurde der Gesamtascorbinsäure-Gehalt (Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure) bestimmt, da das Reduktionsmittel Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin x HCL (TCEP) zugesetzt wird, um den Dehydroascorbinsäure-Anteil zu reduzieren und schließlich das Ascorbinsäure-Aliquot chemisch zu stabilisieren. Diese Methode eignete sich auch für die Bestimmung weiterer eventuell vorhandener wasserlöslicher Vitamine, wie etwa Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>).

#### HPLC-Bedingungen bei Messung von Polyphenolen und HGS mittels elektrochemischem Detektor

Säule: Reprosil- Pur 120 C18 AQ 5 µm, Fa. Trentec, Gerlingen, D  
Eluent: 0,1 M –Natriumphosphat-Puffer, pH 2,5  
Gradient: Isokratisch  
Fluss: 1,0 ml/min.  
Inj. Vol.: 20 µl  
Runtime: 40 min.  
Temperatur: 20°C

Detektion: UV 280 nm und elektrochemisch mit ESA Coulochem II Detektor

Einstellungen:

E1 = - 300 mV und E2 = + 300 mV

sowie R1 = 20  $\mu$ A und R2 = 20  $\mu$ A

Bei der Probenaufbereitung wurden 2  $\mu$ l Flusspferd-Haut-Sekret mit 1000  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (Verdünnung 1:500) verdünnt. Die starke Verdünnung der Probe wurde benötigt, um eine molekularchemische Überladung der Chromatographie-Säule zu vermeiden.

Für die Versuche wurde eine Stammlösung der HGS (2,27 mg/l) in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

### **3.11 Untersuchungen mittels Massenspektroskopie**

Zur Absicherung der mittels HPLC-Analyse erhaltenen Carotinoid-Daten wurde eine ausgewählte Probenmenge am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, der Universität Hohenheim ergänzend mittels Massenspektroskopie (MS) gemessen.

### **3.12 Untersuchungen mittels HPLC-, Nuclear Magnetic Resonance - und Nuclear Magnetic Resonance**

Zur weiteren Aufschlüsselung der in den HPLC-Analysen gewonnenen Daten wurden HPLC-, Nuclear Magnetic Resonance (NMR)- und MS-Analysen am Institut für Chemie, Fachgebiet Bioorganische Chemie der Universität Hohenheim durchgeführt.

#### Probenvorbereitung für die NMR-Untersuchungen

Für den ersten Aufreinigungsschritt wurden die Haut-Sekret-Proben der Flusspferde zentrifugiert, und der Überstand durch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) aufgetrennt. Dazu wurde 3 - 8 ml Überstand abgenommen und mit der dreifachen Menge Wasser<sub>bidest.</sub> verdünnt. Diese Lösung wurde mit Wasser<sub>bidest.</sub> über eine Sephadex LH 20-Säule (160 x 62 mm) chromatographiert. Nach circa  $\frac{1}{3}$  des Bettvolumens eluierten braungefärbte Makromoleküle, die nach circa einem weiteren  $\frac{1}{2}$  Bettvolumen vollständig eluiert waren. Die darauf folgenden niedermolekularen Verbindungen wurden in einer Fraktion gesammelt und lyophilisiert.

Für den zweiten Aufreinigungsschritt wurden die Einzelsubstanzen mittels semipräparativer HPLC isoliert. Hierfür wurde die gefriergetrocknete Probe in 1 ml

H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und mit Hilfe einer semipräparativen Chromatographie-Säule, Phenomenex-AQUA, 5 µm, 10 x 250 mm mit Vorsäule (Fa. Phenomenex) aufgetrennt. Insgesamt wurden 5 Fraktionen erhalten.

#### NMR-Bedingungen

Säule: AQUA C 18, 5 µm, 10 x 250 mm mit Vorsäule; Fa. Phenomenex  
Eluent: H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> mit Trifluoressigsäure auf pH 2,5 eingestellt  
Gradient: Isokratisch  
Fluss: 5,0 ml/min.  
Inj. Vol.: 1000 µl  
Runtime: 60 min.  
Temperatur: 20°C  
Detektion: UV 305 nm

### **3.13 Untersuchungen auf Phenylalanin- und Tyrosin-Gehalte**

Saikawa et al. (2004) vermuten einen Metaboliten (HGS) der essentiellen Aminosäuren alpha-L-Phenylalanin und der semiessentiellen alpha-L-Aminosäure Tyrosin im Haut-Sekret der Flusspferde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim durchgeführte Untersuchungen ein Vorkommen beider Aminosäuren und ihrer Metaboliten bestätigen oder widerlegen.

Die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin wurden mittels Reversed-Phase hochauflösender Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) bestimmt.

Freie Aminosäuren wurden nach einer Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phtaldialdehyd (OPA) und 3-Mercaptopropionsäure (3-MPA) auf einer pp-C18-Säule durch Gradientenelution aufgetrennt.

Die Detektion erfolgte fluorimetrisch. Die Aminosäurenkonzentrationen der Haut-Sekret-Proben wurden mit Hilfe eines Standard-Aminosäure-Mix als Referenz und Norvalin als internem Standard ermittelt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Beobachtungen der Zootiere**

Die Haut-Sekret-Produktion der Flusspferde in vivo ist unabhängig vom Alter und dem Geschlecht der Tiere. Es besteht außerdem kein Einfluss der Tages- oder Jahreszeit. Weiterhin gibt es bezüglich der Haut-Sekret-Produktion keinen augenscheinlichen Unterschied bei Tieren, die sich an Land oder bei Tieren, die sich im Wasser aufhalten. Die beobachteten Ergebnisse entsprechen damit nicht oder nur in geringem Maße den gefundenen Angaben in der zitierten Literatur.

### **4.2 Gewinnung des Haut-Sekretes**

Auf der Suche nach der allgemein besten Sekretgewinnungs-Technik wurden mehrere unterschiedliche Kunststoff-Spachtel und -Spatel in der praktischen Anwendung auf der Flusspferd-Haut ausprobiert. Um einer Verletzung der Haut vorzubeugen, wurde zu hartes und kantiges Material ausgeschlossen. Der Spatel durfte allerdings auch nicht aus zu weichem Kunststoff bestehen, da sich in diesem Fall die Überführung des Sekretes von der Haut in das Reaktionsgefäß als zu schwierig erwies. Schließlich wurde ein Teigschaber aus Kunststoff gewählt, mit dem in allen Untersuchungen die besten Ergebnisse erzielt werden konnten (siehe Abbildung 16).

### **4.3 Bestimmung der Zellvitalität**

#### Untersuchungsreihe zur Zytotoxizität des Haut-Sekretes

Die Ergebnisse basieren auf Einzelversuchen, die mit den Haut-Sekreten von den Flusspferden Mike, Zora und Habari an HFP-1-Zellen durchgeführt wurden. Ein Einzelversuch im Rahmen dieser Arbeit umfasst die Untersuchung von drei verschieden gefärbten Sekretten, jeweils hell, mittel und dunkel, von einem Flusspferd. Jede Sekret-Farbe wurde jeweils in einem Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h in unterschiedlichen Konzentrationen (1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150, 1:200, 1:500, 1:850) an den Zellkulturen getestet. Als Positivkontrolle wurde eine 0,1 % Triton X - 100-Lösung verwendet. Die Zellvitalität wurde anschließend mit Hilfe der Farbreaktion in einer ELISA-Messung unter Verwendung der dazugehörigen Software ermittelt.

Jede aufgeführte Untersuchung wurde unter gleichbleibenden Bedingungen bezüglich Konzentration und Zeit durchgeführt.

Die Ergebnisse der gleichen Haut-Sekret-Farben und der verschiedenen Zeitdimensionen (24 h, 48 h, 72 h) wurden zusammengefasst, da in den Einzelbetrachtungen keine auffälligen spezifischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Tieren ersichtlich wurden.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Untersuchungsreihen des zytotoxischen Effektes des Haut-Sekretes der Flusspferde.

Tab. 11: HFP-1-Zell-Linien-Modell für alle Haut-Sekretproben der Farbe „hell“: Durchschnittswerte der Zellvitalität in % lebenden Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h (n = 5)

|                   | MW 24h | SD 24h | MW 48h | SD 48h | MW 72h | SD 72h |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| unbehandelt       | 100,00 | 0,00   | 100,00 | 0,00   | 100,00 | 0,00   |
| 1:5               | 91,25  | 3,87   | 80,61  | 3,93   | 80,16  | 6,77   |
| 1:10              | 96,48  | 3,93   | 89,80  | 5,29   | 89,11  | 5,11   |
| 1:20              | 94,18  | 3,95   | 93,06  | 5,95   | 99,14  | 4,56   |
| 1:50              | 101,69 | 9,96   | 88,73  | 3,80   | 92,40  | 3,20   |
| 1:75              | 92,80  | 7,74   | 94,53  | 3,96   | 100,46 | 2,50   |
| 1:100             | 93,07  | 7,42   | 91,76  | 5,57   | 93,35  | 2,17   |
| 1:150             | 86,95  | 7,70   | 82,13  | 4,50   | 84,68  | 1,13   |
| 1:200             | 94,24  | 5,98   | 88,57  | 3,66   | 96,10  | 2,31   |
| 1:500             | 95,67  | 4,89   | 94,84  | 3,16   | 98,97  | 4,78   |
| 1:850             | 103,68 | 10,69  | 101,97 | 8,79   | 91,79  | 3,94   |
| 0,1% Triton X-100 | 3,97   | 0,70   | 3,62   | 0,70   | 3,05   | 0,21   |

Tab. 12: Übersicht über die Mittelwerte aller Sekrete für die Farbe „hell“ zu den ausgewählten Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h in % lebenden Zellen mit einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Abb. 38)

|             | MW    | SD   |
|-------------|-------|------|
| unbehandelt | 100   | 0    |
| Hell 24h    | 91,25 | 3,87 |
| Hell 48h    | 80,62 | 3,92 |
| Hell 72h    | 75,14 | 6,42 |

Die Tabellen 11 und 12 zeigen eine mit der Zeit ansteigende Zytotoxizität des hellen Haut-Sekretes. Nach 24 h nahm die Zellvitalität um 8,8 % nach 48 h um 19,4 % und



nach 72 h um 24,9 % ab. Das helle Sekret besitzt eine zytotoxische Wirkung, die zeitabhängig ist. Dies deutet auf eine gewisse Zytotoxizität des hellen Flusspferd-Sekretes hin: die zytotoxische Wirkung des hellen Haut-Sekretes verstärkt sich, je länger die im Versuch verwendeten HFP-1-Zellen dem Sekret ausgesetzt waren.

Tab. 13: HFP-1-Zell-Linien-Modell für alle Haut-Sekretproben der Farbe „mittel“ Durchschnittswerte der Zellvitalität in % lebenden Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h (n = 5)

|                   | MW 24h | SD 24h | MW 48h | SD 48h | MW 72h | SD 72h |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| unbehandelt       | 100,00 | 0,00   | 100,00 | 0,00   | 100,00 | 0,00   |
| 1:5               | 89,14  | 4,98   | 78,60  | 6,35   | 72,00  | 4,70   |
| 1:10              | 101,05 | 3,99   | 95,22  | 11,85  | 89,96  | 8,31   |
| 1:20              | 106,98 | 6,20   | 96,54  | 6,21   | 89,08  | 3,53   |
| 1:50              | 102,18 | 5,38   | 97,24  | 5,70   | 94,09  | 4,69   |
| 1:75              | 111,73 | 2,57   | 98,34  | 6,36   | 88,45  | 4,58   |
| 1:100             | 110,35 | 6,48   | 95,67  | 6,15   | 87,02  | 5,05   |
| 1:150             | 104,18 | 5,87   | 92,89  | 5,04   | 89,37  | 4,34   |
| 1:200             | 90,72  | 12,94  | 91,47  | 7,17   | 93,01  | 6,25   |
| 1:500             | 105,67 | 5,45   | 100,14 | 10,61  | 90,03  | 6,01   |
| 1:850             | 103,02 | 12,55  | 97,06  | 5,94   | 94,94  | 7,71   |
| 0,1% Triton X-100 | 2,83   | 0,21   | 2,96   | 0,84   | 2,49   | 0,41   |

Tab. 14: Übersicht über die Mittelwerte aller Sekrete für die Farbe „mittel“ zu den ausgewählten Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h in % lebenden Zellen mit einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Abb. 39)

|             | MW    | SD   |
|-------------|-------|------|
| unbehandelt | 100   | 0    |
| Mittel 24h  | 89,14 | 4,98 |
| Mittel 48h  | 78,59 | 6,35 |
| Mittel 72h  | 72,00 | 4,70 |

Das Haut-Sekret der Farbnuance „Mittel“ zeigte im zeitlichen Verlauf eine ähnliche Wirkung, wie das Haut-Sekret der Farbnuance „hell“ (siehe Tabelle 13 und 14). Zum Zeitpunkt 24 h konnte eine Verringerung der Zellvitalität um 10,9 %, beziehungsweise bei 48 h um 21,4 % und bei 72 h um 28,0 % gemessen werden.

Tab. 15: HFP-1-Zell-Linien-Modell für alle Haut-Sekretproben der Farbe „dunkel“: Durchschnittswerte der Zellvitalität in % lebenden Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h (n = 5)

|                   | MW 24h | SD 24h | MW 48h | SD 48h | MW 72h | SD 72h |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| unbehandelt       | 100,00 | 0,00   | 100,00 | 0,00   | 100,00 | 0,00   |
| 1:5               | 59,29  | 17,00  | 42,07  | 14,53  | 39,84  | 15,80  |
| 1:10              | 91,63  | 6,28   | 88,06  | 5,19   | 81,95  | 3,50   |
| 1:20              | 97,85  | 5,71   | 86,88  | 2,98   | 77,02  | 1,67   |
| 1:50              | 100,69 | 4,37   | 92,72  | 6,27   | 77,70  | 1,27   |
| 1:75              | 100,03 | 3,83   | 94,66  | 4,17   | 83,64  | 2,10   |
| 1:100             | 96,26  | 4,65   | 86,64  | 5,10   | 76,30  | 4,08   |
| 1:150             | 87,79  | 5,25   | 84,82  | 4,01   | 79,96  | 3,48   |
| 1:200             | 88,72  | 3,09   | 84,64  | 2,85   | 86,55  | 3,51   |
| 1:500             | 86,49  | 3,25   | 90,93  | 2,88   | 91,19  | 4,02   |
| 1:850             | 91,13  | 6,24   | 92,21  | 2,69   | 95,53  | 4,71   |
| 0,1% Triton X-100 | 3,91   | 1,51   | 2,63   | 0,45   | 2,98   | 0,24   |

Tab. 16: Übersicht über die Mittelwerte aller Sekrete für die Farbe „dunkel“ zu den ausgewählten Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h in % lebenden Zellen mit einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Abb. 40)

|             | MW    | SD    |
|-------------|-------|-------|
| unbehandelt | 100   | 0     |
| Dunkel 24h  | 59,29 | 17,00 |
| Dunkel 48h  | 42,07 | 14,53 |
| Dunkel 72h  | 39,84 | 15,80 |

Das dunkle Haut-Sekret der Flusspferde erwies sich als stärker zytotoxisch als die untersuchten hellen und mittelstark abgedunkelten Haut-Sekret-Proben (siehe Tabelle 15 und 16). Nach 24 h reduzierte sich die Zellvitalität um 40,7 % nach 48 h um 57,9 % und nach 72 h um 60,2 %.

Im direkten Vergleich mit den hellen und mittelstark abgedunkelten Haut-Sekret-Proben wiesen die dunklen damit schließlich eine über 30 prozentige stärkere Zytotoxizität auf.

Zusammenfassend konnte in allen Sekretproben im beobachteten Zeitraum von 0 h bis 72 h ein deutlicher Anstieg der zytotoxischen Eigenschaft des Haut-Sekretes gegenüber HPF-1-Zellen der Zellkultur verzeichnet werden.

### Versuche zur Überprüfung der zytotoxischen Eigenschaften der Homogentisinsäure (HGS)

Die Versuchsreihe mit unterschiedlichen Sekretfarbnuancen sollte mit der HGS<sub>reinst</sub> wiederholt werden. Dies war allerdings aus methodischen Gründen nicht realisierbar. Aufgrund des starken Säurecharakters der HGS wurde die Pufferkapazität des HFP-1-Mediums überschritten, dadurch kam es zu einem toxischen Effekt, der die Zellen umgehend abtötete. Aus diesem Grund konnten keine Ergebnisse mit der HGS<sub>reinst</sub> erzielt werden.

#### 4.4 Bestimmung von UV-protaktiven Effekten

### Untersuchungsreihe zur Wirkung des UV-Schutzes durch das Haut-Sekret der Flusspferde

Um die UV-protaktiven Eigenschaften des Haut-Sekretes der Flusspferde zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Analysen, in Hinblick auf die zuvor unternommenen Untersuchungen in der Zellkultur, eine schwach zytoxisch wirksame Sekret-Verdünnung von 1:50 gewählt. Alle Versuche verliefen anschließend mit gleich bleibender Verdünnung. Das Haut-Sekret wurde unmittelbar vor der UV-Bestrahlung direkt auf die Zellkultur aufgetragen, nach der Bestrahlung abpipettiert und die Zellvitalität nach Ablauf von 24 h bestimmt.

Tab. 17: Effekte der Sekret-Farbe „hell“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung (s. Abb. 42)

|                   | Mittelwert lebender Zellen [%] | Standardabweichung |
|-------------------|--------------------------------|--------------------|
| unbehandelt       | 100,00                         | 0,00               |
| unbehandelt+UV    | 63,37                          | 20,27              |
| <b>MH</b>         | 82,24                          | 11,80              |
| <b>MH+UV</b>      | 79,56                          | 19,30              |
| ZH                | 88,07                          | 8,24               |
| ZH+UV             | 99,54                          | 13,17              |
| HH                | 85,73                          | 4,06               |
| HH+UV             | 84,88                          | 24,87              |
| 0,1% Triton X-100 | 1,65                           | 0,23               |

R = Rosi; Z = Zora; M = Mike

H = hell; M = mittel; D = dunkel

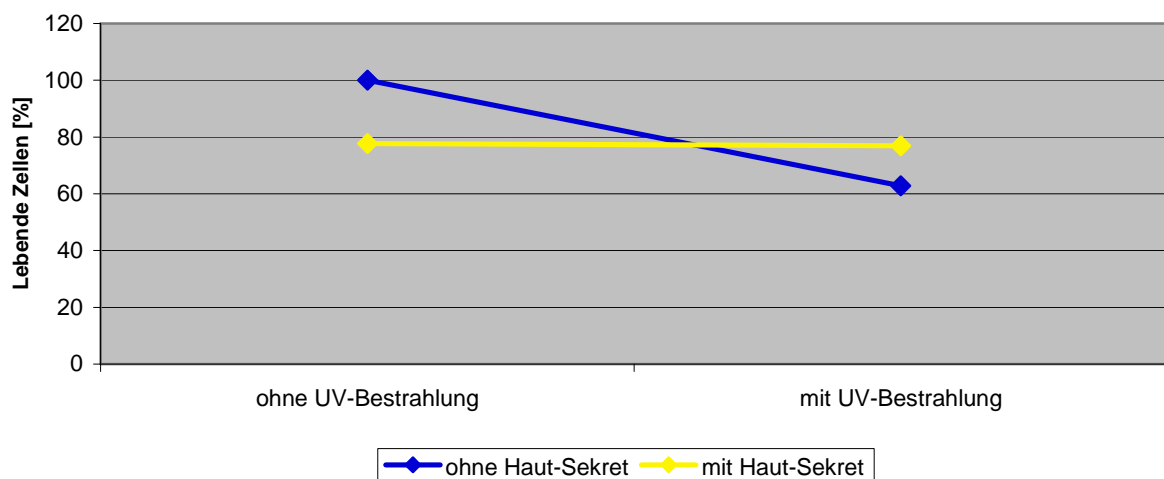


Abb. 23: Graphische Darstellung der Effekte von der Sekret-Farbe „hell“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung

Zusammenfassend dargestellt zeigten die Untersuchungsergebnisse aller Tiere mit der Haut-Sekret-Farbe „hell“, dass die Zellvitalität mit Sekret bei ausbleibender UV- und bei vorgenommener UV-Bestrahlung um 23,3 % abnahm. Die hier beobachtete Zytotoxizität, die unabhängig von jeder UV-Bestrahlung, augenscheinlich nur durch das reine Haut-Sekret verursacht wurde, bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse der MTT-Zelltests. Die Anwesenheit des hellen Sekretes konnte die Zellvitalität der UV-bestrahlten Zellen nicht weiter senken, wohingegen die Zellen ohne Haut-Sekreteinfluss durch die UV-Bestrahlung einen Verlust der Zellvitalität um 14,0 % zeigten (siehe Tabelle 17 und Abbildung 23).

Tab. 18: Effekte der Sekret-Farbe „mittel“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung (s. Abb. 43)

|                   | Mittelwert lebender Zellen [%] | Standardabweichung |
|-------------------|--------------------------------|--------------------|
| unbehandelt       | 100,00                         | 0,00               |
| unbehandelt+UV    | 63,37                          | 20,27              |
| <b>MM</b>         | 94,69                          | 1,04               |
| <b>MM+UV</b>      | 103,98                         | 7,46               |
| ZM                | 95,53                          | 4,67               |
| ZM+UV             | 105,33                         | 10,40              |
| HM                | 96,78                          | 1,63               |
| HM+UV             | 97,48                          | 15,31              |
| 0,1% Triton X-100 | 1,62                           | 0,14               |

R = Rosi; Z = Zora; **M** = Mike

H = hell; M = mittel; D = dunkel

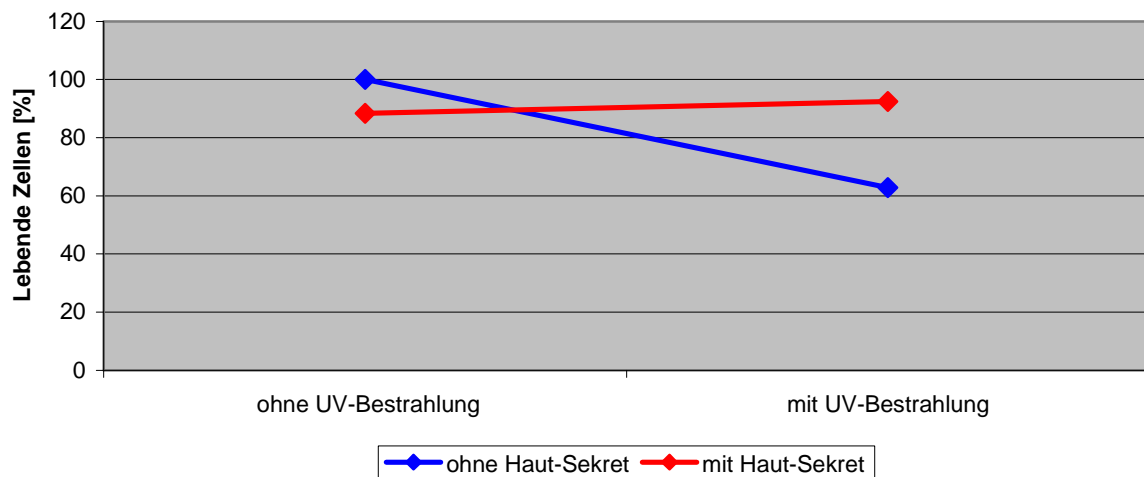


Abb. 24: Graphische Darstellung der Effekte von der Sekret-Farbe „mittel“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung

Bei Behandlung der HFP-1-Zellen der Farbe „mittel“ mit Sekret, sank die Zellvitalität bei ausbleibender UV-Bestrahlung um 11,6 %. Bei Behandlung der Zellen mit dem Haut-Sekret der Farbe „mittel“ und gleichzeitiger UV-Bestrahlung ergab sich ein Verlust der Zellvitalität von 7,6 %. Dahingegen wiesen die UV-bestrahlten Zellen ohne Sekretbehandlung einen Verlust von mehr als 35,0 % auf (siehe Tabelle 18 und Abbildung 24).

Tab. 19: Effekte der Sekret-Farbe „dunkel“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung (s. Abb. 44)

|                   | Mittelwert lebender Zellen [%] | Standardabweichung |
|-------------------|--------------------------------|--------------------|
| unbehandelt       | 100,00                         | 0,00               |
| unbehandelt+UV    | 63,37                          | 20,27              |
| <b>MD</b>         | 88,62                          | 4,45               |
| <b>MD+UV</b>      | 70,30                          | 16,28              |
| ZD                | 93,84                          | 2,82               |
| ZD+UV             | 84,02                          | 17,80              |
| HD                | 104,51                         | 4,02               |
| HD+UV             | 65,87                          | 55,85              |
| 0,1% Triton X-100 | 1,62                           | 0,14               |

R = Rosi; Z = Zora; **M** = Mike

H = hell; M = mittel; D = dunkel

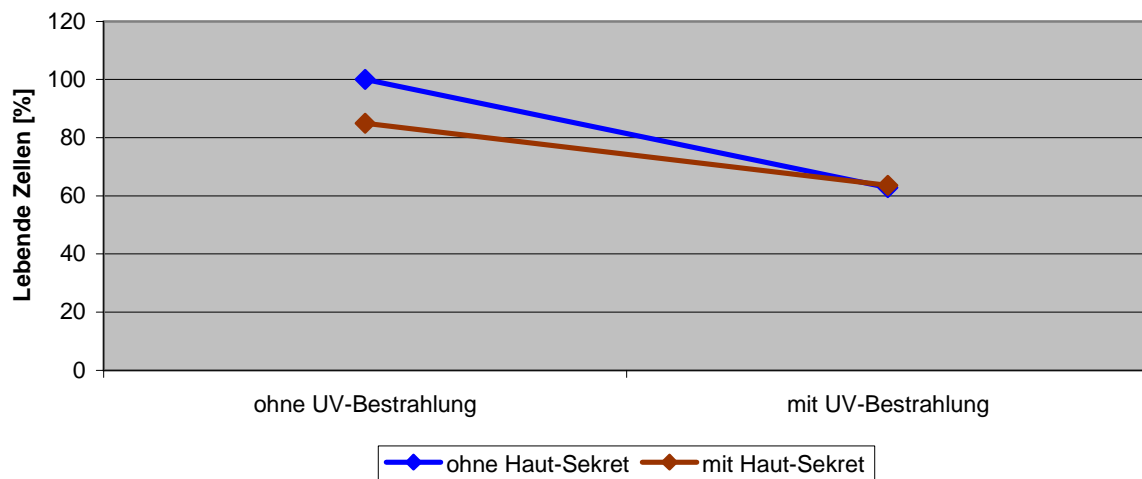


Abb. 25: Graphische Darstellung der Effekte von der Sekret-Farbe „dunkel“ auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung

Der Zusatz des Haut-Sekretes der Farbabstufung „dunkel“ zur Kultur der HFP-1-Zellen führte zu einem Verlust der Zellvitalität um circa 15,9 %. Bei gleichzeitiger UV-Bestrahlung ergab sich ein Verlust der Zellvitalität mit Sekretbehandlung von 36,4% und ohne Sekreteinfluss von 37,2% (siehe Tabelle 19 und Abbildung 25).

Tab. 20: Effekte von unterschiedlich gefärbten Sekreten verschiedener Tiere auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung

|                | Mittelwert lebender Zellen [%] | Standardabweichung |
|----------------|--------------------------------|--------------------|
| Unbehandelt    | 100,00                         | 0,00               |
| Unbehandelt+UV | 56,13                          | 11,70              |
| hell           | 84,90                          | 4,99               |
| hell+UV        | 86,79                          | 10,13              |
| mittel         | 95,53                          | 1,20               |
| mittel+UV      | 102,51                         | 5,10               |
| dunkel         | 94,65                          | 3,35               |
| dunkel+UV      | 72,97                          | 14,52              |

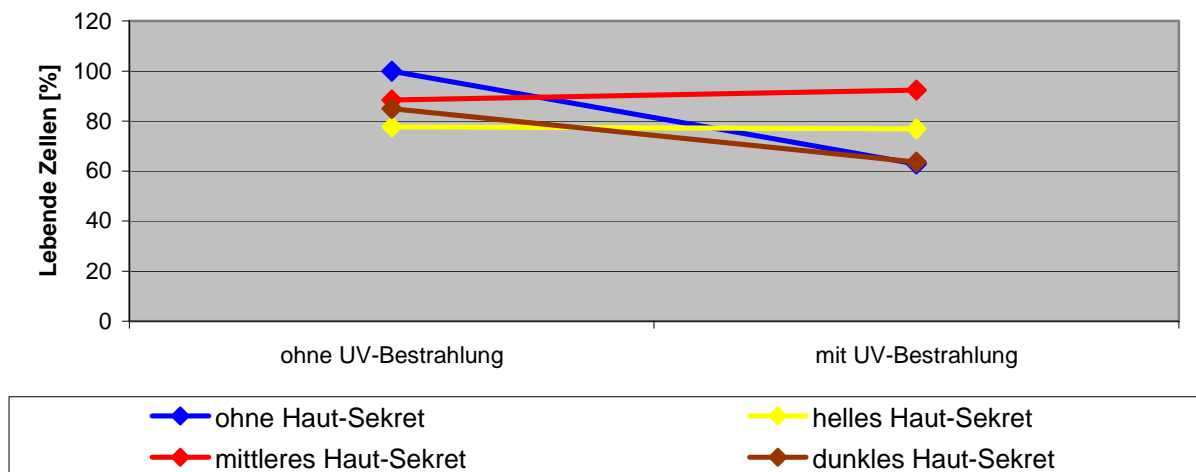


Abb. 26: Zusammenfassung der Effekte von unterschiedlich gefärbten Sekreten verschiedener Tiere auf die Zellvitalität (lebende Zellen in %) mit und ohne UV-Bestrahlung

Es konnte im Hinblick auf die einzelnen Tiere kein Unterschied der Zellvitalität nach UV-Exposition festgestellt werden. Die verschiedenen Sekret-Farben wirkten sich jedoch unterschiedlich auf den Schutz der Zellen aus. Das Sekret „hell“ bot während der UV-Bestrahlung eine geringe, das Sekret „mittel“ eine ersichtliche und das Sekret „dunkel“ keine Schutzwirkung mehr (siehe Tabelle 20 und Abbildung 26).

#### 4.5 Bestimmung der Zellvitalität mittels Durchflusszytometrie

Am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim wurden im Durchflusszytometer Signale lebender und toter Zellen gemessen. Die zu untersuchenden Zellen werden dazu durch ein Laserstrahl-Detektionssystem geführt. An dieser Stelle des Durchflusszytometers erfolgen Licht-Intensitäts-, Licht-Absorptions- und Licht-Reflektions-Messungen der vorbeiströmenden Zellpartikel.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie das Vorkommen und die Vitalität von HFP-1-Zellen, die mit unterschiedlichen Homogentisinsäure-Konzentrationen versetzt wurden, überprüft. Diese Analyse sollte die Ergebnisse der Untersuchungen in der Zellkultur ergänzen.

Tab. 21: Durchflusszytometrie: Analytierte Durchschnittswerte % lebender Zellen mit unterschiedlichen HGS-Konzentrationen ohne UV-Bestrahlung (s. Abb. 46)

| HGS [mM] | Anteil lebender Zellen [%] |
|----------|----------------------------|
| 0,1      | 91,46                      |
| 0,5      | 91,75                      |
| 1,0      | 93,05                      |
| 5,0      | 91,51                      |
| 10,0     | 13,75                      |
| 25,0     | 9,89                       |

Beim Kontakt der HFP-1-Zellen mit einer HGS-Konzentration von 0,1 bis 5 mM wird die Zellvitalität ohne UV-Behandlung im Durchschnitt um etwa 8 % eingeschränkt. In einem Konzentrations-Bereich von 10 bis 25 mM zeichnete sich eine starke Reduktion der Zellvitalität von bis zu 90 % ab (siehe Tabelle 21).

Tab. 22: Durchflusszytometrie: Analytierte Durchschnittswerte % lebender Zellen mit unterschiedlichen HGS-Konzentrationen nach UV-Bestrahlung (s. Abb. 47)

| HGS [mM]<br>+ UV | Anteil lebender Zellen [%] |
|------------------|----------------------------|
| 0,1              | 5,69                       |
| 0,5              | 8,21                       |
| 1,0              | 8,39                       |
| 5,0              | 6,38                       |
| 10,0             | 10,79                      |
| 25,0             | 6,83                       |

Nach UV-Bestrahlung der HFP-1-Zellen wurde die Zellvitalität in einem HGS-Konzentrations-Bereich von 0,1 bis 25 mM im Durchschnitt um fast 93 % gesenkt (siehe Tabelle 22).

#### 4.6 Bestimmung des Fibroblasten-Wachstums am Haut-Monolayer-Modell

Am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) der Fraunhofer Gesellschaft in Stuttgart, wurden Untersuchungen (n = 14) zum Haut-Sekret der Flusspferde an einem Haut-Monolayer-Modell durchgeführt. Es wurden primär isolierte humane Haut-Fibroblasten und die Sekret-Farben hell (n = 7) und dunkel (n = 7) verwendet.

Die Messungen im Anschluss an eine 5-tägige Inkubation der Zellen konnten zeigen, dass das helle Haut-Sekret im Vergleich zur Kontrolle das Wachstum der Fibroblasten um 18,7 % begünstigt. Im Gegensatz dazu zeigt das dunkle Haut-



Sekret gegenüber der Kontrolle eine Wachstumsminderung der Fibroblasten um 36 % (siehe Tabelle 23).

Tab. 23: Beeinflussung des Fibroblastenwachstums unter Stimulus von hellem und dunklem Haut-Sekret (Zellzahl/ml)

|       | Kontrolle | dunkles Haut-Sekret | helles Haut-Sekret |
|-------|-----------|---------------------|--------------------|
| Tag 1 | 100       | 100                 | 100                |
| Tag 5 | 394,4     | 252,2               | 468,0              |

#### 4.7 Bestimmung der Enzymaktivität

Um die in den HPLC-Trennverfahren am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim gefundenen Lutein- und Zeaxanthin-Anteile im Haut-Sekret der Flusspferde weiter zu analysieren und eventuelle im Sekret vorkommende Enzymaktivitäten zu bestimmen, wurden am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie, der Universität Hohenheim verschiedene Enzymaktivitäts-Messungen durchgeführt.

Nach Aufbewahrung der Haut-Sekret-Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  beziehungsweise  $+4^{\circ}\text{C}$  betrug der pH-Wert des Flusspferd-Sekretes zwischen pH 8,8 und pH 9,3. In der Gesamtproteinbestimmung nach Bradford konnte im Sekret-Überstand nach Zentrifugation ein Proteingehalt von 0,8 bis 1,7 g/l bestimmt werden.

Die Enzymaktivitäts-Messungen, insbesondere mit Hilfe des ApiZym-Tests konnten in allen untersuchten Sekret-Proben keine Enzymaktivitäten nachweisen.

Bei den Umsetzungen von  $\beta$ -Carotin mit dem Haut-Sekret wurde auch nach 24-stündiger Inkubation keine Bildung von Lutein beobachtet.

In sich anschließenden Untersuchungen wurde auf die Anwesenheit von  $\beta$ -Galactosidase und verschiedenen Proteasen im Haut-Sekret geprüft.

Mit dem p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid-Assay konnte in allen Sekretproben keine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Die mit Hilfe des FTC-Casein-Assay vorgenommene Protease-Aktivitätsmessung konnte in allen Untersuchungen aufgrund der stark gefärbten Proben nur sehr ungenau oder nicht ausgewertet werden.

### Oxygenase-Assay

Im Rahmen des Oxygenase-Assay wurde das Haut-Sekret auf Vorkommen des Lipochroms Lutein getestet. In einer dazu durchgeführten HPLC-Analyse konnte zum Vorkommen von Lutein im Flusspferd-Haut-Sekret das folgende Diagramm gewonnen werden:

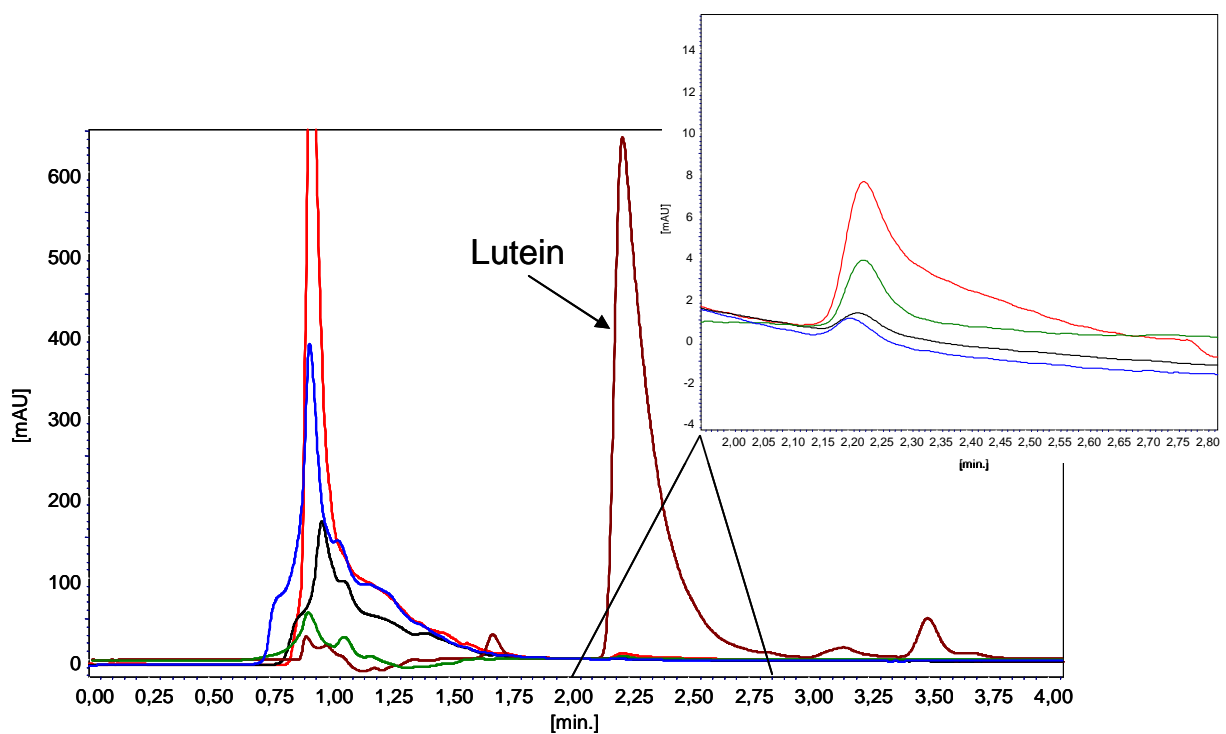


Abb. 27: HPLC-Analyse im Rahmen des Oxygenase-Assay der Umsatzproben

*rot*: Nullprobe

*schwarz*: 24h Umsatz 24h

*grün*: Referenz mit Sekret ohne Substrat

*blau*: Referenz ohne Sekret mit Substrat

*dunkelrot*: Lutein-Standard in Umsatzpuffer

*Bedingungen*: 0,1 M Carbonat-Puffer+2 mM NADPH pH 9,0, O<sub>2</sub>-gesättigt, 37°C, dunkel

In der Nullprobe (*rot*) und im Referenzansatz mit Sekret und ohne Substrat ( $\beta$ -Carotin) (*grün*) ist Lutein aus dem Haut-Sekret der Flusspferde enthalten.

Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die in der Nullprobe vorhandene Lutein-Konzentration ab. Im Referenzansatz mit Sekret und ohne Substrat konnte dies ebenfalls beobachtet werden.

Auch nach 24 stündiger Inkubation (*schwarz*) wurde keine Lutein-Bildung gemessen. Die Anwesenheit einer spezifischen Monooxygenase im Flusspferd-Sekret, die die Bildung von Lutein aus  $\beta$ -Carotin katalysiert, konnte unter den gegebenen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

$\beta$ -Galactosidase-AssayTab. 24: Umsetzung von p-NPG mit Haut-Sekret zum Nachweis einer  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

| Umsatz-<br>zeit<br>[h] | Umsatz<br>$A_{405nm}$ | Ref. 1 | Ref. 2 | Umsatz<br>$\Delta A_{405nm}$ | Ref. 1 | Ref. 2 | Umsatz<br>-Ref. 1<br>-Ref. 2<br>$\Delta A_{405nm}$ |
|------------------------|-----------------------|--------|--------|------------------------------|--------|--------|--|
| 0                      | 0,654                 | 0,613  | 0,123  |                              |        |        |  |
| 3                      | 1,04                  | 0,981  | 0,143  | 0,386                        | 0,368  | 0,020  | <b>-0,002</b>                                      |
| 24                     | 1,111                 | 1,043  | 0,193  | 0,457                        | 0,430  | 0,070  | <b>-0,043</b>                                      |

Umsatz            Ansatz mit Haut-Sekret und Substrat

Referenz 1 (Ref. 1):    Ansatz mit Haut-Sekret und ohne Substrat

Referenz 2 (Ref. 2):    Ansatz ohne Haut-Sekret und mit Substrat

Bedingt durch die stark orangebraune Färbung des Sekretes sind die Absorptionen zu Beginn der Messung bereits sehr hoch. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigen die gemessenen Absorptionen der Umsatzprobe und der Referenzen gleichermaßen.

Auch nach 24 h Inkubation konnte keine Bildung von p-Nitrophenol und damit das Fehlen einer  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Protease-Assay

Aufgrund der stark rotbraun gefärbten Proben konnte die fluorometrische Protease-Aktivitätsbestimmung mit FTC-Casein als Substrat nicht ausgewertet werden.

Die Enzymaktivitäts-Messungen konnten abschließend in keiner der untersuchten Proben enzymatische Aktivitäten nachweisen. Alle Messungen verliefen negativ auf die jeweils analysierten Enzymaktivitäten in den Flusspferd-Haut-Sekret-Proben.

**4.8 Bestimmung von Mengen- und Spurenelementen**

Angeleitet von den Aussagen Luck und Wrights (1964, 1987) über gemessene Elemente im Haut-Sekret des Flusspferdes, wurden an der Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie, Abteilung Boden- und Düngemitteluntersuchung, der Universität Hohenheim mit Hilfe der ICP-MS- (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy) und ICP-OES-Technik (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy) verschiedene Elementanalysen durchgeführt. In einem ersten Screening wurden ohne Bestimmung einer Eichgeraden 83 verschiedene chemische

Elemente des Periodensystems gemessen. Es wurden Haut-Sekret-Proben von unterschiedlichen Flusspferden (Mike, Zora, Habari je  $n \geq 3$ ) in einer Verdünnung von 1:5 verwendet. Die Proben wurden nach der üblichen augenscheinlichen Unterscheidung in hell, mittel und dunkel ausgewählt (siehe Tabelle 25).

Element-abhängig wurden unterschiedliche Analyse-Methoden gewählt: Die Elemente Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Natrium (Na), Zink (Zn) und Rubidium (Rb) wurden in allen Proben mittels ICP-MS analysiert. Kalium (K) musste anhand eines Flammenphotometers (ICP-OES) bestimmt werden, da es in allen durchgeführten Untersuchungen mittels ICP-MS nicht messbar war; die Kaliumwerte in allen Sekretproben waren außerdem zu hoch, um mit dem Spektroskopieverfahren (ICP-MS) gemessen zu werden.

Im sich anschließenden zweiten Versuch wurden insgesamt neun Haut-Sekret-Proben unterschiedlicher Farbe und von verschiedenen Tieren (Mike  $n = 3$ ; Zora  $n = 3$ ; Rosi  $n = 3$ ) erneut in einer Verdünnung von 1:5 auf das Vorkommen der Mengenelemente Calcium, Magnesium, Natrium und Kalium und der Spurenelemente Zink und Rubidium untersucht. Es wurde in diesem Fall zuvor eine Eichgerade erstellt. In allen Proben waren die untersuchten sechs Elemente nachweisbar. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der verschiedenen Farbnuancen des Sekretes und der unterschiedlichen Tiere nachgewiesen werden.

Tab. 25: Analytierte Durchschnittswerte in mg/l von Mengen- und Spurenelementen in Haut-Sekret-Proben von Flusspferden (pro Tier  $n = 3$ )

| Proben    | Ca     | K        | Mg    | Na    | Zn   | Rb   |
|-----------|--------|----------|-------|-------|------|------|
| RH        | 115,00 | 745,00   | 47,00 | 18,00 | 0,42 | 0,24 |
| RM        | 38,00  | 3994,00  | 37,00 | 65,00 | 0,74 | 1,48 |
| RD        | 20,00  | 3123,00  | 40,00 | 41,00 | 0,50 | 1,29 |
| ZH        | 26,00  | 6816,00  | 36,00 | 66,00 | 0,82 | 2,81 |
| ZM        | 20,00  | 6488,00  | 17,00 | 32,00 | 1,00 | 2,20 |
| ZD        | 30,00  | 3032,00  | 30,00 | 50,00 | 0,65 | 0,92 |
| <b>MH</b> | 38,00  | 10324,00 | 47,00 | 84,00 | 2,13 | 7,20 |
| <b>MM</b> | 16,00  | 4508,00  | 18,00 | 91,00 | 1,46 | 2,85 |
| <b>MD</b> | 36,00  | 4875,00  | 39,00 | 41,00 | 1,55 | 1,50 |

R = Rosi; Z = Zora; **M** = Mike

H = Hell; M = Mittel; D = Dunkel

#### 4.9 Bestimmung von antimikrobiellen Eigenschaften

Am Institut für Lebensmitteltechnologie und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie, der Universität Hohenheim erfolgten Untersuchungen der Proben des Flusspferd-Haut-Sekretes auf antimikrobiellen Besatz in Ausstrichen auf LB-Agar. Bei den auf LB-Agar ausgestrichenen Haut-Sekret-Proben konnten unterschiedlich gefärbte und pleomorph geformte Kolonien beobachtet werden (siehe Abbildung 28).

Die Isolation der einzelnen Kolonien war aufgrund des hohen Verwachsungsgrades unter den einzelnen Kolonien nur schwer möglich.

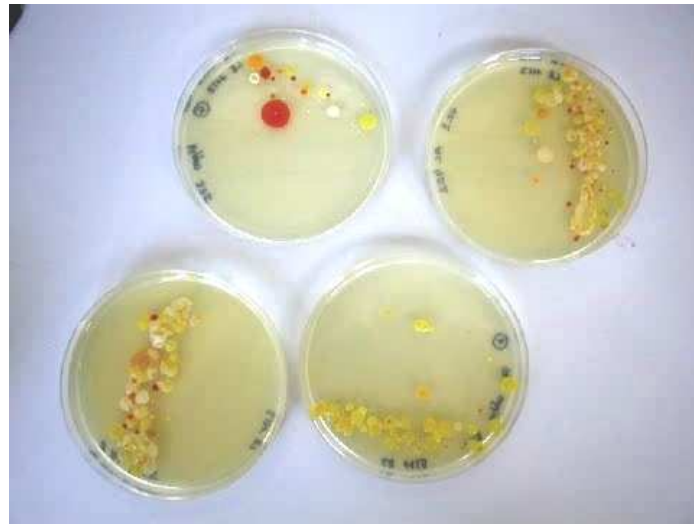


Abb. 28: Übersicht über das Kolonie-Wachstum auf mit Haut-Sekret geimpften LB-Agar-Platten

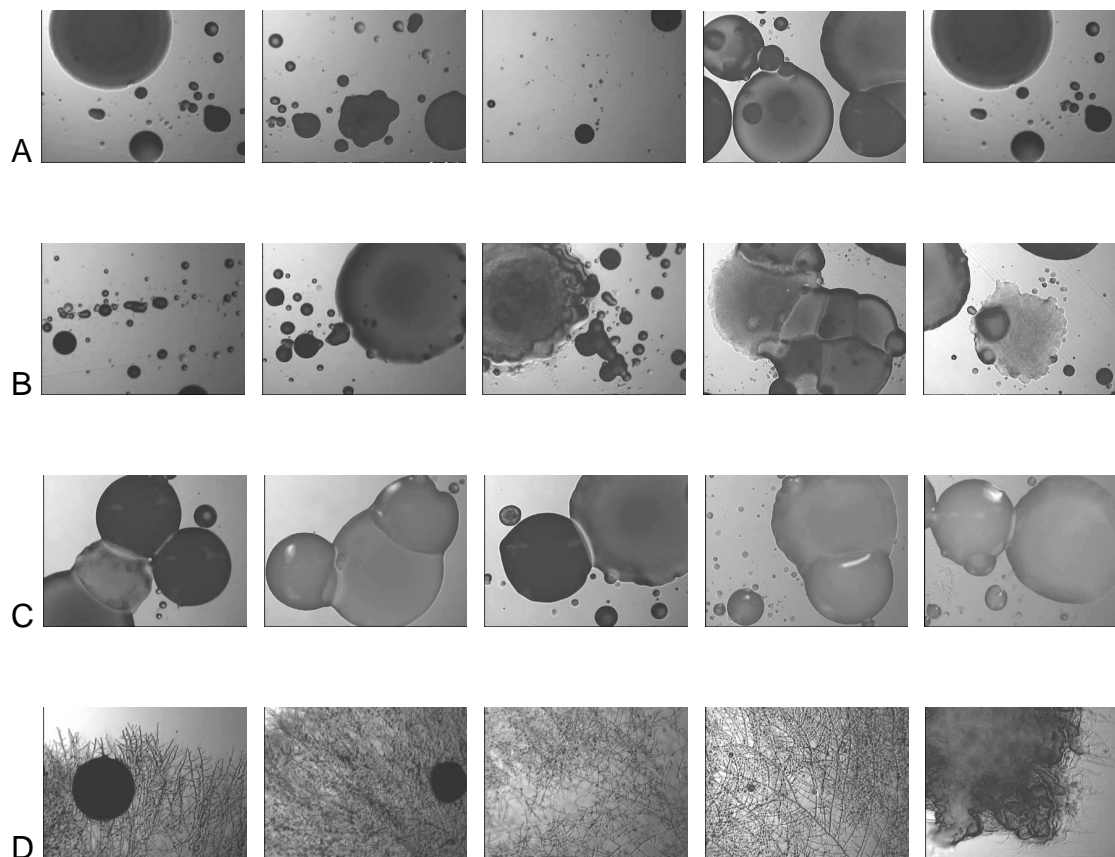


Abb. 29: Mikroskopie einzelner Kolonien des Verdünnungsausstriches von Sekret geimpften Agarplatten

Auf den mit Sekret geimpften Agarplatten wuchsen bakterielle Kulturen isoliert-rund (Reihe A), pleomorph (Reihe B) oder - teilweise stark - miteinander verwachsen (Reihe C). Auf einigen Agarplatten konnte Pilzhyphen-Wachstum (Reihe D) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 29).

#### Untersuchungen zur Überprüfung der antimikrobiellen Effekte des Haut-Sekretes

Um mögliche antimikrobielle Eigenschaften des Flusspferd-Haut-Sekretes zu bestimmen, wurden am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Minimale-Hemmstoffkonzentrations-Tests (MHK) mit selektiv-repräsentativen Krankheitserregern durchgeführt.

In Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass die Bestimmung der MHK verschiedener Sekret-Proben nicht durch die Messung der Optischen Dichte der Bakterien-Suspensionen möglich ist, da das Sekret während der Versuchsdauer bald seine Farbe änderte. Während der Vorversuche wurden die Erreger *Staphylococcus*

*aureus*, *Salmonella Senftenberg*, *Klebsiella oxytoca* und *Pseudomonas aeruginosa* verwendet.

Bei den folgenden Untersuchungen wurde die Lebendkeimzahl (KbE/ml) bestimmt. Hierzu wurde das Haut-Sekret seriell von 5,5 - 44,0 % verdünnt. Die Untersuchungen erfolgten unter Verwendung der Erreger *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella oxytoca* (siehe Tabelle 26). Für beide Keimarten wurde sowohl helles als auch dunkles Haut-Sekret verwendet.

Tab. 26: Lebendkeimzahl-Bestimmung von *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella oxytoca* unter Anwendung unterschiedlicher Haut-Sekret-Konzentrationen

| Serien-<br>ver-<br>dünnung | Kontrolle     |                    | Stamm                        |                              |                              |                              | Kontrolle          |
|----------------------------|---------------|--------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
|                            | Sekret<br>[%] | DS                 | K. oxytoca<br>+ DS           | K. oxytoca<br>+ HS           | S. aureus<br>+ DS            | S. aureus<br>+ HS            | HS                 |
| 1                          | 44,1          | $1,65 \times 10^7$ | $2,40 \times 10^8$           | $6,60 \times 10^8$           | $9,00 \times 10^6$           | $1,30 \times 10^8$           | $3,70 \times 10^8$ |
| 2                          | 22,1          | $4,60 \times 10^7$ | $7,70 \times 10^8$           | $1,30 \times 10^9$           | $1,20 \times 10^8$           | $2,90 \times 10^8$           | $3,30 \times 10^8$ |
| 3                          | 11,0          | $4,80 \times 10^7$ | $1,70 \times 10^9$           | $1,60 \times 10^9$           | $2,10 \times 10^8$           | $9,40 \times 10^8$           | $4,00 \times 10^8$ |
| 4                          | 5,5           | $4,60 \times 10^7$ | $1,40 \times 10^9$           | $1,60 \times 10^9$           | $2,90 \times 10^8$           | $9,90 \times 10^8$           | $3,90 \times 10^8$ |
| 5                          | 0,0           | $4,70 \times 10^7$ | $\emptyset 1,80 \times 10^9$ | $\emptyset 1,80 \times 10^9$ | $\emptyset 8,40 \times 10^8$ | $\emptyset 8,40 \times 10^8$ | $3,80 \times 10^8$ |

DS = dunkles Sekret

HS = helles Sekret

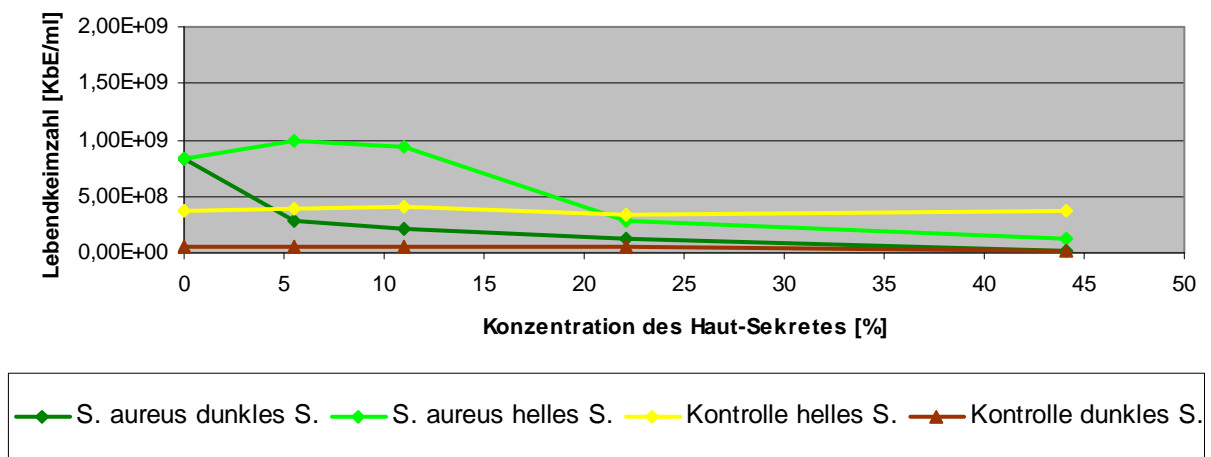


Abb. 30: Lebendkeimzahlbestimmung (KbE/ml) einer *Staphylococcus aureus*-Suspension unter Anwendung unterschiedlicher Haut-Sekret-Konzentrationen

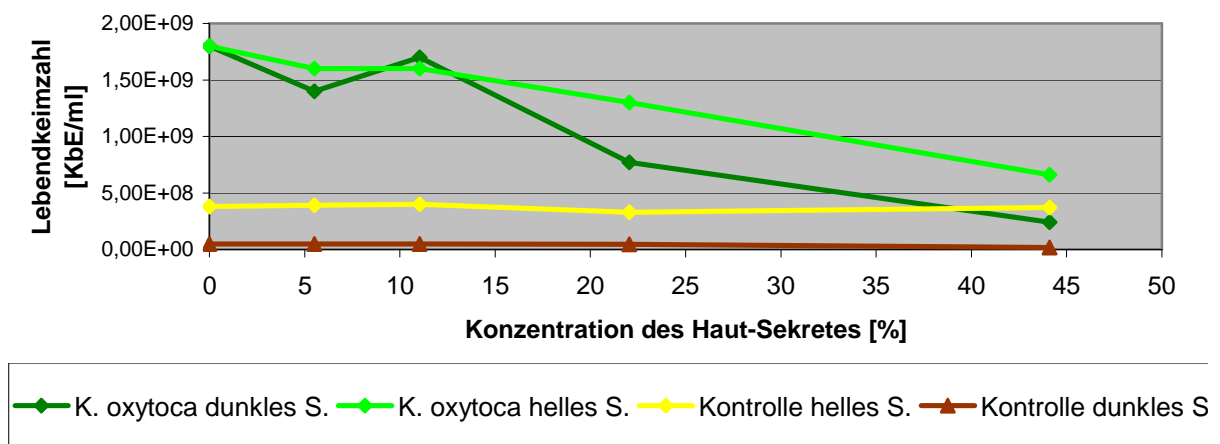


Abb. 31: Lebendkeimzahlbestimmung (KbE/ml) von *Klebsiella oxytoca*-Suspension unter Anwendung unterschiedlicher Haut-Sekret-Konzentrationen

In allen Untersuchungen konnte eine zum Teil deutliche Abnahme der Lebendkeimzahlen der jeweils mit Haut-Sekret inkubierten Testkeime, *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella oxytoca* beobachtet werden. Die höchste gewählte Konzentration des Haut-Sekretes von 44,1 % korrelierte dabei mit der stärksten Reduktion der Keimzahl beider Testbakterienstämme. Diese Beobachtungen konnten insbesondere für das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus* gemacht werden (siehe Abbildung 30). Bei einem Ausgangswert von  $8,40 \times 10^8$  KbE/ml wurde bei einer Sekret-Konzentration von



44,1 % der dunklen Probe ein Wert von  $9,00 \times 10^6$  KbE/ml erreicht. Das entspricht einer deutlichen Reduktion der Staphylococccen-Kolonien um circa  $10^2$  KbE/ml. Das helle Haut-Sekret zeigte eine allgemein geringere Wirkung als das dunkle Haut-Sekret. Das helle Haut-Sekret erreichte bei einer Konzentration von 44,1 % einen Wert von  $8,40 \times 10^8$  KbE/ml auf  $1,30 \times 10^8$  KbE/ml – das entspricht einer Reduktion von  $7,1 \times 10^1$  KbE/ml.

Auch auf *Klebsiella oxytoca* übte die Behandlung mit dunklem Haut-Sekret eine deutlich zu messende antibakterielle Aktivität aus. Die Wirkung dieses Sekretes auf die Kolonien von *Klebsiella oxytoca* war aber - verglichen mit der auf *Staphylococcus aureus* – deutlich weniger stark ausgeprägt (siehe Abbildung 31). Bei einer Konzentration von 44,1 % erreichte das dunkle Sekret mit einem Ausgangswert von  $1,80 \times 10^9$  KbE/ml einen Wert von  $2,40 \times 10^8$  KbE/ml und somit eine Reduktion um fast  $10^1$  KbE/ml. Im Gegensatz dazu hatte das helle Sekret wie bei *Staphylococcus aureus* eine geringere Wirkung und erreichte bei einem Einsatz von einer Konzentration von 44,1 % des Sekretes einen Wert von  $6,6 \times 10^8$  KbE/ml. Dies entspricht einer Reduktion von  $10^1$  KbE/ml.

Das Sekret besitzt eine eigene Bakterienbiota mit Keimzahlen von bis zu  $10^7$  -  $10^8$  KbE/ml (siehe Tabelle 26).

## Untersuchung zur Überprüfung der antimikrobiellen Effekte der HGS

Tab. 27: Bestimmung der Optischen Dichte der Bakterien-Suspensionen von *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella oxytoca* nach Einwirkung von unterschiedlichen HGS-Konzentrationen

| HGS [mg/ml]        | OD (K. oxytoca) | OD (S. aureus) | Zeit [h] |
|--------------------|-----------------|----------------|----------|
| 4,41               | 0,003           | 0,003          | 0        |
|                    | 0,000           | 0,005          | 1        |
|                    | 0,000           | 0,003          | 2        |
|                    | 0,000           | 0,000          | 4        |
|                    | 0,002           | 0,000          | 6        |
|                    | 0,000           | 0,000          | 24       |
| 2,21               | 0,000           | 0,001          | 0        |
|                    | 0,002           | 0,000          | 1        |
|                    | 0,004           | 0,000          | 2        |
|                    | 0,020           | 0,000          | 4        |
|                    | 0,049           | 0,000          | 6        |
|                    | 0,387           | 0,000          | 24       |
| Wachstumskontrolle | 0,002           | 0,002          | 0        |
|                    | 0,002           | 0,000          | 1        |
|                    | 0,004           | 0,002          | 2        |
|                    | 0,058           | 0,022          | 4        |
|                    | 0,119           | 0,055          | 6        |
|                    | 0,423           | 0,302          | 24       |

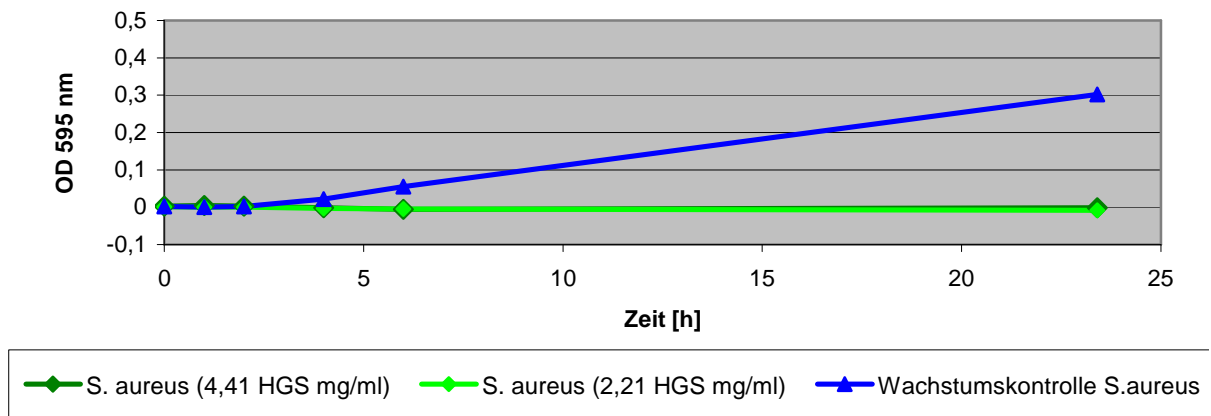


Abb. 32: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von HGS (mg/ml) auf *Staphylococcus aureus*

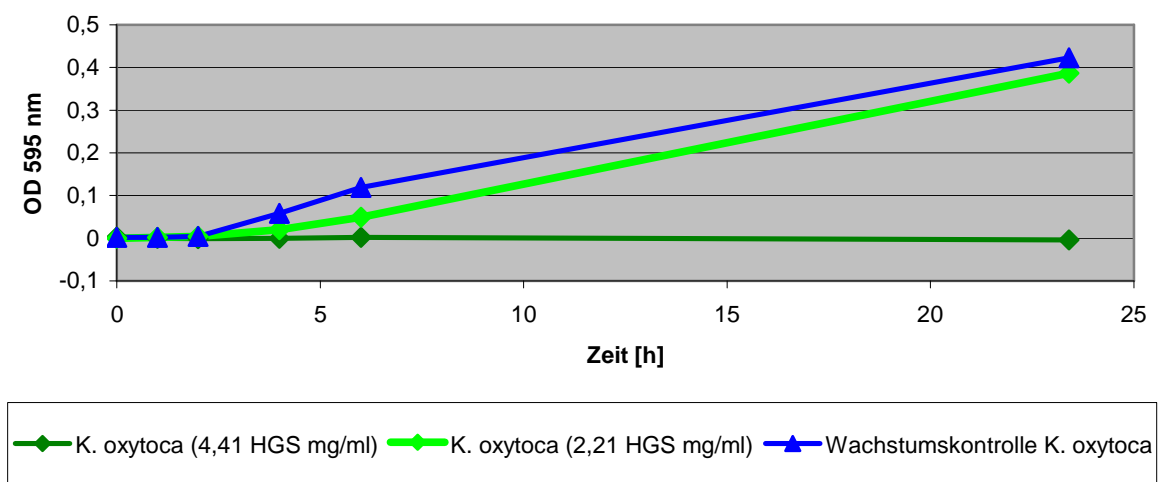


Abb. 33: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von HGS (mg/ml) auf *Klebsiella oxytoca*

Die Abbildungen 32 und 33 zeigen, dass durch eine 4,41%ige HGS-Konzentration eine Wachstumshemmung beider Keime über einen Zeitraum von 24 h erreicht werden konnte. Die eingesetzten Bakterien-Suspensionen vermehrten sich, im Gegensatz zur Wachstumskontrolle, in dieser Zeit nicht mehr messbar. Bei 2,21 % iger HGS-Konzentration wurden Bakterien der Gattungsguppe *Staphylococcus* gleich zu Beginn gehemmt, während diese Konzentration auf *Klebsiella oxytoca* keine erkennbare Wirkung zeigte. Das Wachstum von *Klebsiella oxytoca* war bei 2,21%iger HGS-Konzentration vergleichbar mit den Werten der Wachstumskontrolle ohne HGS.

Um die Ergebnisse der Optischen Dichte-Messung zu verifizieren, wurde eine Messung von *Staphylococcus aureus*-Kolonien mit 4,41 mg/ml Homogentisinsäure in Müller Hinton II Bouillon (pH 7,3) durchgeführt, die die Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* bestätigt (siehe Tabelle 28). Die Lebendkeimzahl der Animpfsuspension betrug bei *Staphylococcus aureus*  $2,7 \times 10^6$ /ml. Die Messung erfolgte in den Zeiten von 0,3 h, 3 h und 6 h. Bereits nach drei Stunden war kein Wachstum der Bakterien mehr zu verzeichnen.

Tab. 28: Bestimmung der Optischen Dichte von *Staphylococcus aureus* mit 4,41mg/ml HGS in einem Zeitraum von 0-6h

| HGS [mg/ml]   | Zeit [h] | Lebendkeimzahl [KbE/ml] |
|---------------|----------|-------------------------|
| 0 (Kontrolle) | 0        | $2,7 \times 10^6$       |
|               | 0,3      | $5,1 \times 10^5$       |
|               | 3,0      | $5,8 \times 10^6$       |
|               | 6,0      | $3,9 \times 10^7$       |
| 4,41          | 0        | $2,7 \times 10^6$       |
|               | 0,3      | $1,7 \times 10^5$       |
|               | 3,0      | 0                       |
|               | 6,0      | 0                       |

Die Ergebnisse der Lebendkeimzahl-Bestimmung bestätigten das Ergebnis der Optischen Dichte-Messung, denn auch die Optische Dichte-Messung zeigte eine Abtötung aller Testkeim-Kulturen nach 3h unter Anwendung der HGS-Konzentration von 4,41 mg/ml.

#### Agar-Diffusions-Test:

Zur weiteren Überprüfung des Inhibitions potentials der Homogentisinsäure auf den Erreger *Staphylococcus aureus* wurde eine Untersuchung auf einem festen Nährboden durchgeführt (siehe Abbildung 34). *Staphylococcus aureus* (LTH 1493) wurde in Standard I -Medium auf einem Standard I -Agar aufgetragen. Danach wurde je ein Filter-Blättchen mit 10 mg/ml und 4,41 mg/ml Homogentisinsäure getränkt, aufgelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Homogentisinsäure war beim Auftropfen auf das Filterblättchen bereits oxidiert, das heißt abgedunkelt.

Das Filter-Blättchen mit 10 mg/ml Homogentisinsäure zeigte einen Hemmhof mit einem Durchmesser von 1,5 cm. Der Durchmesser des anderen Blättchens beträgt 1,3 cm.

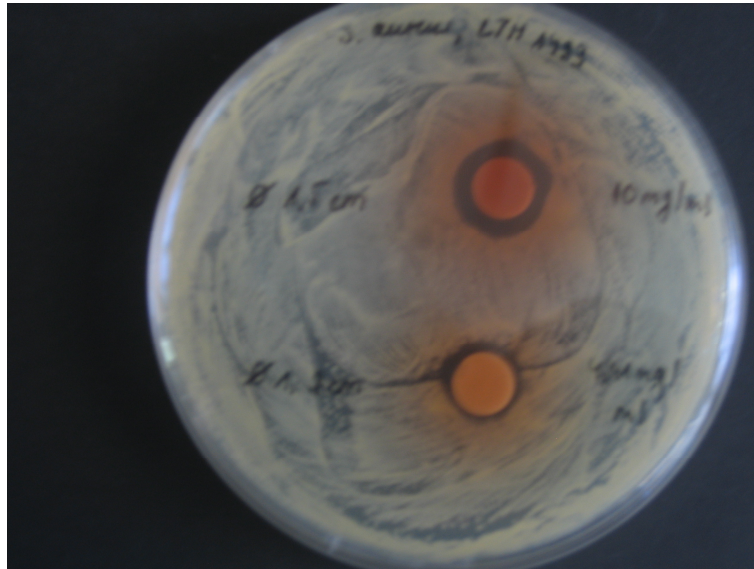


Abb. 34: Agardiffusions-Test mit *Staphylococcus aureus* und HGS in den Konzentrationen 10 mg/ml und 4,41 mg/ml

#### 4.10 Bestimmungen mit High Performance Liquid Chromatography

Die Bestimmung der Gehalte der Lipochrome Lutein und Zeaxanthin und der Vitamine A, B<sub>1</sub>, C und E und der Vitaminvorstufe beta-Carotin im Sekret und die Detektion auf Phenole beziehungsweise Polyphenole, erfolgte durch zwei unterschiedliche chromatographische Techniken.

#### 4.11 Chromatographische Bestimmung von Carotinoiden Lutein und Zeaxanthin

Die orange-rot-braune Farbe des nachgedunkelten Haut-Sekretes der Flusspferde ließ die Anwesenheit von Lipochromen vermuten. Bei den anfänglichen Messungen am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim wurden in fast allen Proben in der Tat Lutein und Zeaxanthin gemessen (siehe Abbildung 35). Um eine Verunreinigung mit pflanzlichen Inhaltsstoffen und damit pflanzlichen Lipochromen auszuschließen, wurden die Tiere vor der Probenentnahme gewaschen. In ersten Untersuchungen blieb die Waschung der

Tiere zunächst aus. Wurden in den Haut-Sekret-Proben der ungewaschenen Tiere die Carotinoid-Verbindungen Lutein und Zeaxanthin regelmäßig und in höherer Konzentration nachgewiesen, so konnte in 83 % der gewonnenen Proben nach dem Waschen der Tiere kein Lutein und Zeaxanthin mehr nachgewiesen werden. In den 17 % der Proben, die noch Lutein und Zeaxanthin enthielten, fiel die Konzentration jedoch deutlich geringer als in den nicht gewaschenen Proben aus (siehe Abbildung 36).

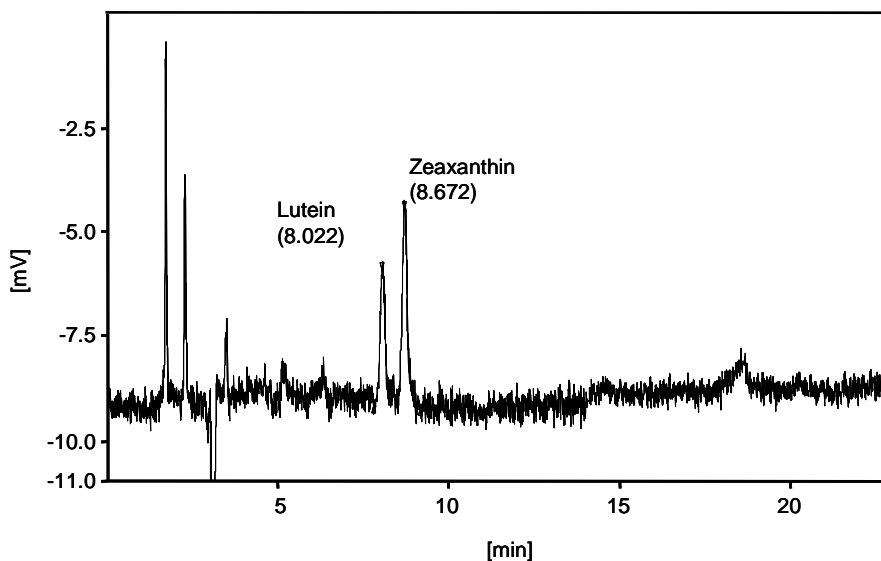


Abb. 35: HPLC-Chromatogramm einer Haut-Sekret-Probe eines vor der Probennahme nicht gewaschenen Tieres

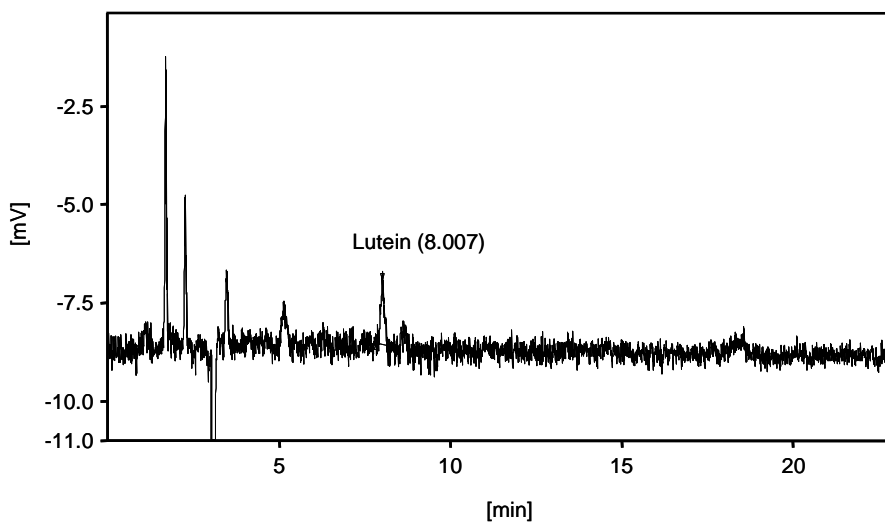


Abb. 36: HPLC-Chromatogramm einer Haut-Sekret-Probe eines vor der Probennahme gewaschenen Tieres

### MS-Messungen

Am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, der Universität Hohenheim wurden die oben genannten Ergebnisse der chromatographischen Bestimmung von Lutein und

Carotinoiden mittels HPLC anhand der MS (mit ungewaschenen und gewaschenen Haut-Sekret-Proben) überprüft und bestätigt.

#### **4.12 Chromatographische Bestimmung von Phenole, Polyphenole und Vitaminen**

Es wurden mit Hilfe einer am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim etablierten HPLC-Standardmethode 24 Haut-Sekret-Proben unterschiedlicher Farben auf die Vitamine A, B<sub>1</sub>, C und E und die Vitamin-Vorstufe beta-Carotin untersucht. In keiner der hell, mittel und dunkel gefärbten Haut-Sekret-Proben konnte ein Vorkommen von Vitaminen oder Vitamin-Vorstufen bestimmt werden. Diese Art der chromatographischen Bestimmung stellte sich als direkte Phenol-Messmethode als ungeeignet dar, da hier Phenole anhand ihres Resveratrol-Gehaltes detektiert werden. Da in den Haut-Sekret-Proben kein Resveratrol nachweisbar war, wurden die Messungen auf Phenol- und Polyphenol-Gehalt im Haut-Sekret eingestellt.

#### **4.13 Bestimmung der Messung am Nuclear Magnetic Resonance**

Bei den HPLC-Trennungen zur Untersuchung des Vorkommens von Vitamin C konnten bei jedem HPLC-Durchlauf immer an den gleichen Positionen drei Peaks nicht zu identifizierender Substanzen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 37). Zur weiteren Analyse der drei unbekanntenen Peaks, wurden erneute HPLC-, NMR- und MS- Untersuchungen am Institut für Chemie, Fachgebiet Bioorganische Chemie, der Universität Hohenheim durchgeführt.



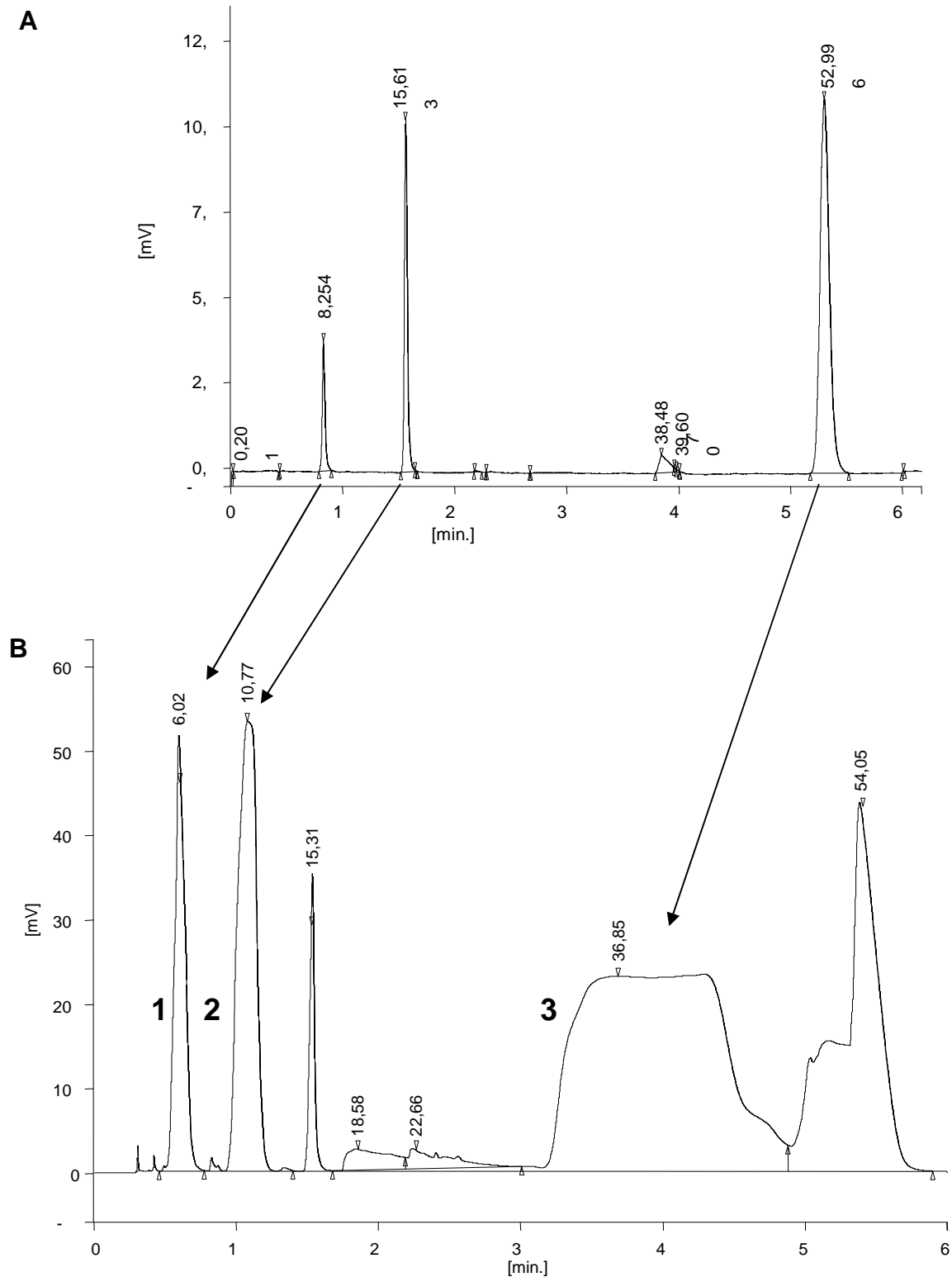


Abb. 37: Chromatogramme von Peak 1-3

**A:** Analytische HPLC

**B:** Semipräparative HPLC (AQUA, C18, 125A, 5  $\mu\text{m}$ , 10 x 250 mm Gesamtvolumen 1200  $\mu\text{l}$  der Probe; 4  $\mu\text{l}$  von 1200  $\mu\text{l}$  injiziert)

Durch die angewendeten Methoden konnte Peak 3 eindeutig als Homogentisinsäure, 2,5-Dihydroxyphenylessigsäure, identifiziert werden. Dieser Peak 3 kam in 27,6% der Proben vor.

Weiterhin wurde ermittelt, dass der 2. Peak aus einem polymeren Material besteht.

Peak 1 setzte sich aus einem Gemisch von mindestens zwei Komponenten zusammen, wobei für die Hauptkomponente die Struktur der 2,5-Dihydroxyphenylessigsäure abgeleitet werden konnte.

Für die Bestimmung der unbekanntenen Peaks wurden 18, beziehungsweise 34 Sekret-Proben von 4 verschiedenen Flusspferden (Mike, Rosi, Zora, Habari) mit den üblichen 3 unterschiedlichen Sekret-Farben, hell, mittel und dunkel, verwendet. Tabelle 29 zeigt die Häufigkeit und den prozentualen Anteil der Peaks in den jeweiligen Proben.

Es konnte in allen untersuchten verschieden gefärbten Sekret-Proben kein Unterschied im Vorkommen aller drei Peaks festgestellt werden. Auch Unterschiede im Vorhandensein aller drei Peaks zwischen den einzelnen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tieren konnten zu keiner Zeit beobachtet werden.

Tab. 29: Häufigkeit und prozentualer Anteil der Peaks 1 bis 3 in  $n \geq 18$  der unterschiedlich gefärbten Haut-Sekret-Proben

|                                | Peak 1<br>(n = 18) | Peak 2<br>(n = 18) | Peak 3<br>(n = 34) |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Hell                           | 6,0                | 5,0                | 7,0                |
| Mittel                         | 1,0                | 4,0                | 7,0                |
| Dunkel                         | 5,0                | 5,0                | 12,0               |
| $\Sigma$                       | 12,0               | 14,0               | 26,0               |
| Anteil der Proben mit Peak [%] | 66,6               | 77,7               | 27,6               |

#### 4.14 Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin

Aufgrund des Vorkommens von HGS im Haut-Sekret der Flusspferde wurden weitere helle und dunkle Haut-Sekret-Proben auf das Vorhandensein der Aminosäuren, Phenylalanin und Tyrosin, mittels RP-HPLC überprüft.

Die Auswertungen der Phenylalanin- und Tyrosin-Gehalte am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim in den unterschiedlichen Haut-Sekret-Proben zeigten - unter Beachtung der

Standardabweichungen – dass Phenylalanin und Tyrosin annähernd gleich konzentriert im Haut-Sekret vorkommen (siehe Tabelle 30). Die gemessenen Konzentrationen zeigten für die dunklen Proben auf den ersten Blick einen höheren arithmetisch gemittelten Wert, unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergeben sich aber keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 30: Vorkommen von Phenylalanin und Tyrosin c[ $\mu$ M] in hellem und dunklem Haut-Sekret

|              | <b>MW</b>            | <b>MW</b>             | <b>SD</b>            | <b>SD</b>             |
|--------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
|              | <b>helles Sekret</b> | <b>dunkles Sekret</b> | <b>helles Sekret</b> | <b>dunkles Sekret</b> |
| Tyrosin      | 1,09                 | 2,57                  | 0,66                 | 1,60                  |
| Phenylalanin | 1,64                 | 3,37                  | 0,96                 | 2,93                  |

## 5 Diskussion

### 5.1 Beobachtung der Flusspferde

Zur Beobachtung der Haut und des Haut-Sekretes standen neun und zur Gewinnung des Haut-Sekretes vier Flusspferde unterschiedlichen Alters (1 Monat bis 46 Jahre) zur Verfügung. Bei allen Untersuchungen wurden keine altersabhängigen und geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Produktion des Haut-Sekretes festgestellt. Die abgegebenen Sekretmengen unterschieden sich von Tier zu Tier sehr stark. So zeigte zum Beispiel der Flusspferd-Bulle „Mike“ in der Stuttgarter Wilhelma im Anschluss an die Waschung bereits nach einigen Minuten eine erneute Haut-Sekret-Bildung, wohingegen die Flusspferd-Kuh „Rosi“ an einigen Tagen auch drei Stunden nach der Waschung kein erneutes Haut-Sekret gebildet hatte. Im Zoo Hannover konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Vergleicht man zum einen Mutter und Tochter, „Kiboko“ und „Habari“, mit einem Altersunterschied von 10 Jahren oder die beiden Schwestern, „Cherry“ und „Himba“, mit einem Altersunterschied von 2 Jahren, zeigt im ersten Fall die jüngere eine stärkere Sekret-Produktion, wohingegen im letzteren Falle die Sekretion bei dem jüngeren Tier an einigen Tagen während des Untersuchungszeitraumes gänzlich aussetzte. Bei einem, während der Untersuchungen im Zoo Hannover geborenem Jungtier, konnte bereits kurz nach der Geburt eine deutliche Sekret-Produktion beobachtet werden - dies bestätigt die Aussagen und Untersuchungen zweier Autoren (Schumacher, 1918; Toldt, 1916) an einem neugeborenen Flusspferd.

Aber auch bei den Tieren mit allgemein starker Sekret-Produktion blieb an einigen Tagen nach der Waschung die Haut vollständig trocken. Verschiedene Autoren beschreiben, dass Tiere der freien Wildbahn unter Stress, Aufregung oder Bewegung augenscheinlich mehr Sekret absondern (Allbrook, 1962). Zur Überprüfung dieser Literatur-Angaben wurde besonders an den Tagen mit geringer Sekret-Produktion versucht, eine Stress-Situation unter Zoo-Bedingungen zu simulieren. Die Möglichkeiten dazu waren allerdings sehr eingeschränkt. Zum einen musste die hohe Verletzungsgefahr der Tiere, die zu dem Zeitpunkt der Probennahme meist zu zweit in einem Stall untergebracht waren, beachtet werden und zum anderen war der mögliche Bewegungsradius im Gehege sehr gering. Eine Provokation der Flusspferde erfolgte, indem die Tiere mit Hilfe von Futter in unterschiedliche

Richtungen gelockt wurden. Nach einer Provokationsprobe von 15 Minuten konnte allerdings noch immer keine augenscheinlich verstärkte Haut-Sekret-Produktion beobachtet werden. Die Produktion des Haut-Sekretes scheint folglich keiner Beeinflussung durch Stress oder keinen damit verbundenen adrenergen Signalen zu unterliegen.

Die Probennahmen erfolgten in der Wilhelma über ein Jahr hinweg entweder am frühen Morgen im Zeitraum von 6.30 Uhr bis 9.00 Uhr oder mittags zwischen 12.00 Uhr und 14.00 Uhr. Im Zoo Hannover waren in unterschiedlichen Monaten die Zeiten von 7.00 Uhr bis 9.00 Uhr und von 16.30 Uhr bis 17.30 Uhr vorgegeben. Im beobachteten Zeitraum von einem Jahr konnten für die Jahreszeiten Frühling, Sommer, Herbst und Winter und die verschiedenen Tageszeiten keine subjektiven Unterschiede in der Haut-Sekret-Produktion festgestellt werden. Auch Temperaturunterschiede beeinflussten die Produktion des Sekretes nicht.

Der einzige einflussnehmende Faktor schien die relative Luftfeuchte in der jeweiligen Stallung zu sein. Es konnten keine Luftfeuchte-Messungen direkt im Stall durchgeführt werden. Vergleiche mit Daten vom Wetteramt sind zwar hinweisend, aber kaum beurteilbar, da die Tiere sich zum Zeitpunkt der Probennahme in den Stallungen befanden. Die hauptsächlichen Probennahmen konnten nur vor und nach den Öffnungszeiten der Zoos erfolgen, da sonst in dieser Zeit den Besuchern der Blick auf die Tiere verwehrt geblieben wäre. Zum gleichen Zeitpunkt mussten auch die Reinigungen des Gebäudes durchgeführt werden. Die Beobachtung, dass die Produktion des Haut-Sekretes umso höher ausfällt, je niedriger die Luftfeuchte ist, wurde während der unterschiedlichen Art der Reinigung der Stallungen festgestellt. Je nach Verschmutzungs-Grad des Stalles wurde entweder nur eine Bürste und ein Wasserschlauch oder ein Wasserdampfstrahler verwendet. Bei der letzteren Reinigungsart entstand je nach Dauer des Einsatzes des Dampfstrahlers innerhalb kürzester Zeit eine hohe Luftfeuchte im Stall, so dass sogar beim Bullen „Mike“, der eine allgemein sehr gute Sekretion aufwies, die Produktion für den Zeitraum der Reinigungsarbeiten aussetzte.

Die in der Literatur bestehenden unterschiedlichen Meinungen (Luck, 1964; Allbrook, 1962; Tomes, 1850) über den Zeitpunkt der Haut-Sekretion gaben Anlass genauere Untersuchungen durchzuführen. Die Beobachtungen der Sekretproduktion unter

Wasser erwies sich zunächst als sehr schwierig, da sie nur bei den Tieren ersichtlich war, die den Rücken und den Kopf nicht kontinuierlich unter Wasser hielten. In der Wilhelma war es jedoch möglich, die Tiere unter Wasser zu berühren und den „schleimigen“ Sekret-Überzug haptisch wahrzunehmen. Um sicher zu stellen, dass es sich nicht um altes an Land eingetrocknetes Sekret handelt, wurden die Tiere unter Wasser mit dem Schwamm gewaschen. Nach kurzer Zeit war das Haut-Sekret erneut fühlbar.

Die in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Beobachtungen und Untersuchungen zeigten, dass die Tiere sowohl im Wasser als auch am Land sezernieren.

Hierbei ist zu beachten, dass alle Beobachtungen und Ergebnisse an Zootieren erfolgten. Ob dies auch für Tiere der freien Wildbahn gilt, bleibt zu diskutieren.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass keine alters- oder geschlechtsabhängigen, tages- oder jahreszeitlichen Unterschiede in der Produktion des Haut-Sekretes der Flusspferde beobachtet werden konnten. Die Haut-Sekretion kann zu jeder Zeit stattfinden. Da die anatomische Morphologie der Hautdrüse nicht die einer Schweißdrüse darstellt, ist auszuschließen, dass es sich bei dem Sekret um eine schweißähnliche Substanz handelt. Folglich ist die Verwendung des Begriffes „Schweiß“ für die Haut-Sekretion der Flusspferde nicht korrekt.

## **5.2 Technik der Sekretgewinnung**

Vor Gewinnung von Sekretproben war es notwendig, das Vertrauen der Tiere zu gewinnen und sie durch Konditionierung an den Vorgang der Probenentnahme und speziell an den der Waschungen zu gewöhnen. Die angestrebte, von Luck und Wright (1964) verwendete Kanülen-Technik zum Gewinnen von Haut-Sekretmaterial direkt aus dem Drüsenlumina an toten Tieren, konnte an den lebenden Probanden der vorliegenden Arbeit aus Gründen des Tierschutzes und aufgrund der Verletzungsgefahr für Tier und Mensch in der vorliegenden Arbeit nicht umgesetzt werden. Auch die Anwendung von Gaze zum Aufsaugen des Haut-Sekretes - wie von Saikawa et al. 2004 beschrieben - erschien im Rahmen dieser Arbeit nicht praktikabel.

Um eine unerwünschte Polymerisation der Probe durch Lichteinfall zu vermeiden, wäre eine Abdunklung des Stalles günstig gewesen. Dies war aber aufgrund der

Architektur, der Sicherheit für Tier und Mensch und während der Reinigungsarbeiten des Zoo-Personals nicht durchführbar.

Da ein möglicher Einfluss auf die Farbveränderung des Haut-Sekretes durch Luft-Sauerstoff besteht, wurden die Proben mit Argon überschichtet, um den Sauerstoff aus dem Reaktionsgefäß zu entfernen oder den Sauerstoffgehalt in der Probe zumindest gering zu halten. Dieses Verfahren wurde eingestellt, da die Farbauswertung keinen Unterschied zwischen den mit Argon behandelten und den nicht behandelten Sekret-Proben erkennen ließ.

### **5.3 Zellvitalität**

Aus Gesprächen mit Tierpflegern im Zoo Hannover war bekannt, dass das Personal Flusspferd-Sekret als eine Art „Handlotion“ verwendet. Besonders bei trockenen, spröden Hautveränderungen im Winter, soll das Sekret Rhagaden schließen können und für eine elastische Haut sorgen.

#### Untersuchungen mit Haut-Sekret der Flusspferde

Die praktische Erfahrung mit dem Haut-Sekret als Handlotion war Anlass Untersuchungen an einem, am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim, etablierten Modell mit Hautfibroblasten (HFP-1-Zellen) durchzuführen. Ziel war es, anhand von Zellvitalitätsmessungen zu untersuchen, ob das Haut-Sekret die HFP-1-Zellen in ihrer Vitalität positiv beeinflusst. Weiterhin sollte eine nicht-zytotoxische Sekret-Konzentration ermittelt werden, um mit dieser gerade noch tolerierten Konzentration weitere Untersuchungen auf anderen Gebieten durchführen zu können. Außerdem sollte geklärt werden, ob die verschieden gefärbten Haut-Sekrete einen unterschiedlichen Einfluss auf die Zellen ausüben (siehe Abbildungen 38 bis 40).

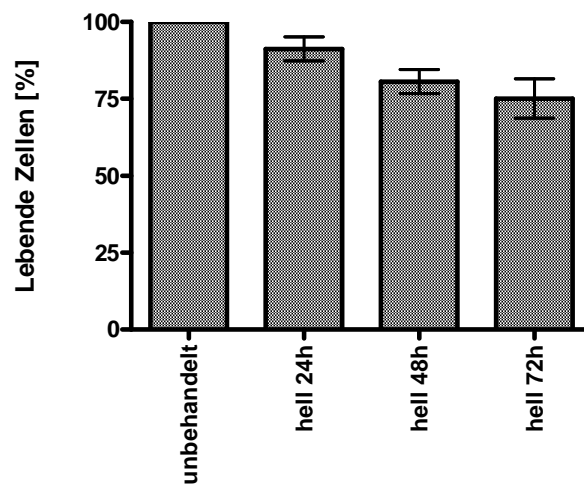


Abb. 38: HFP-1-Zell-Modell: Durchschnittswerte aller Haut-Sekrete für die Farbe „hell“ zu den ausgewählten Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) in % lebenden Zellen in einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Tab. 12)

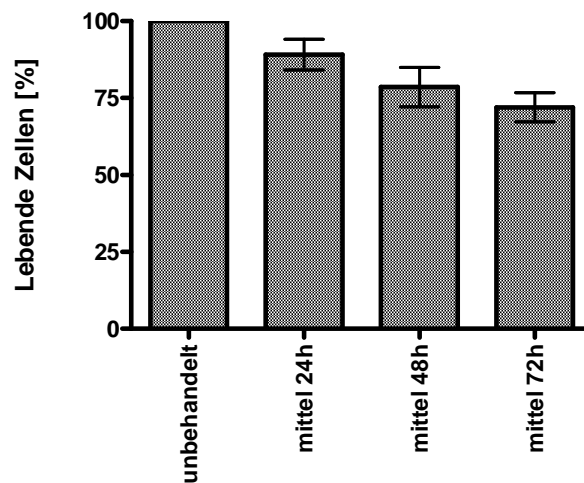


Abb. 39: HFP-1-Zell-Modell: Durchschnittswerte aller Haut-Sekrete für die Farbe „mittel“ zu den ausgewählten Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) in % lebenden Zellen in einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Tab. 14)



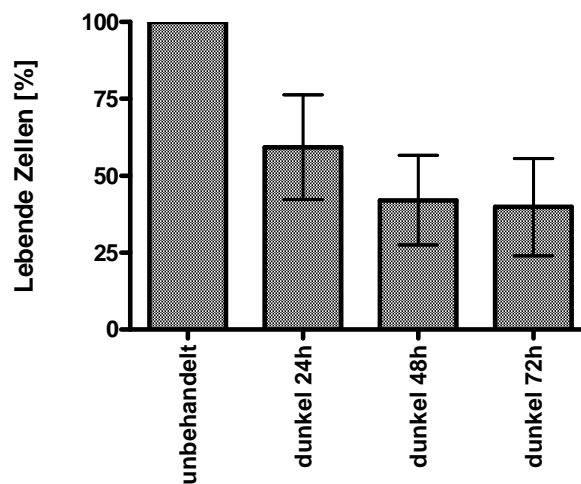


Abb. 40: HFP-1-Zell-Modell: Durchschnittswerte aller Haut-Sekrete für die Farbe „dunkel“ zu den ausgewählten Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) in % lebenden Zellen in einer Verdünnung von 1:5 (n = 5) (s. Tab. 16)

Entgegen der Erwartung einer messbaren Vitalitäts-Steigerung der behandelten Zellen, zeigte sich eine gewisse zytotoxische Wirkung des Haut-Sekretes aller Sekret-Proben, jeweils abhängig von ihrer Farbe.

Wie aus den Abbildungen 38 bis 40 ersichtlich ist, nimmt die Vitalität der HFP-1-Zellen mit der Zeit ab. Mit Voranschreiten der Zeit dunkelt das Haut-Sekret innerhalb weniger Minuten ab. In Abhängigkeit zur Zeit steigt die zytotoxische Potenz des Sekretes. Das dunkle Sekret zeigt im Gegensatz zu den Farben hell und mittel, eine deutlich höhere Hemmwirkung zu allen Zeitpunkten. Der Grund dafür ist unbekannt - möglicherweise wirken sich polymerisierende Substanzen im dunklen Haut-Sekret hemmend aus.

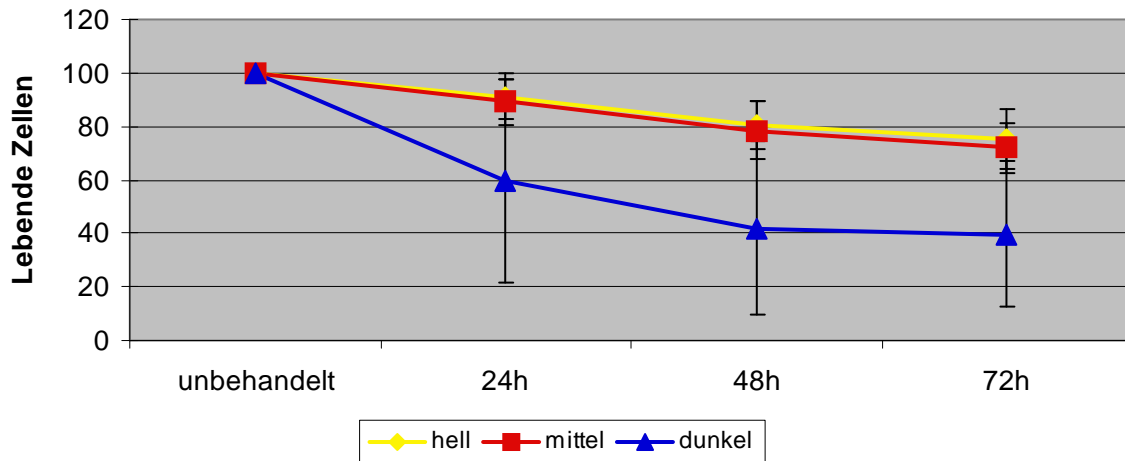


Abb. 41: Darstellung der zytotoxischen Effekte des Haut-Sekretes auf die HFP-1-Zellen im Zellkultur-Modell

Damit konnte gezeigt werden, dass das Haut-Sekret der Flusspferde keine Schutzwirkung auf die HFP-1-Zellen ausübt. Dabei ist zu beachten, dass die hemmende Wirkung des Haut-Sekretes für die humanen Fibroblasten gilt. Dieses ist nicht zwangsläufig auf die Haut des Flusspferdes zu übertragen.

### Untersuchungen mit HGS

Welcher Inhaltsstoff im Sekret die zytotoxische Wirkung auslöst ist unbekannt. Am Institut für Chemie, Fachgebiet Bioorganische Chemie, der Universität Hohenheim wurde mittels MS und NMR die Homogentisinsäure zu unterschiedlichen Konzentrationen in mehreren Haut-Sekreten gefunden. Dieser HGS-Anteil im Sekret könnte als mögliche Ursache für die Zytotoxizität des Haut-Sekretes der untersuchten Flusspferde in Frage kommen. Es wurden Untersuchungen mit HFP-1-Zellen und HGS nach der gleichen Methodik wie mit dem Flusspferd-Sekret angelegt. Hierbei wurde nicht das Sekret auf die HFP-1-Zellen aufgetragen, sondern die HGS in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 - 25 mM). Bei einer gepufferten Salzlösung (Hanks) von pH 7,82 wurde der pH-Wert durch Zusatz von 1 mM HGS aufgrund ihres hohen Säure-Gehaltes auf einen Wert von 7,00 verschoben, wodurch die Zellen abgetötet wurden. Folglich ist das Zellkulturmodell nicht für Versuche mit HGS geeignet, da die Toleranz des pH-Wertes nur in sehr engen Grenzen für die HFP-1-Zellen liegen darf und bei pH 7 die HFP-1 gehemmt werden. Des Weiteren

konnte über eine pH-Wert Messung der HGS in Hank´s-Medium eine Zytotoxizität der HGS aufgrund ihrer starken Säurepotenz nachgewiesen werden. Bereits ab einer Konzentration von 1 mM HGS kam es zu einer starken pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich, die den Tod der so behandelten Zellkulturen bedeutete. Für die beobachtete zytotoxische Auswirkung kann folglich viel mehr der deutlich saure pH-Wert und weniger das Vorhandensein der eigentlichen HGS im Medium angenommen werden.

Aber nicht nur die pH-Wert Verschiebung beeinflusst negativ das Untersuchungsmodell der Zellkultur, sondern auch die Interaktion zwischen MTT und HGS. Es konnte durch Untersuchungen mit den beiden Substanzen ohne Zellen nachgewiesen werden, das MTT mit HGS reagiert, ohne dass eine enzymatische Reaktion durch Zellen beteiligt war. Je höher die HGS-Konzentration war, umso mehr Formazansalzkrystalle wurden auch gebildet. Die Kristallverbindungen wurden anschließend durch den ELISA-Reader fälschlicherweise als erhöhte Zellvitalität gemessen.

#### **5.4 UV-Bestrahlung**

Saikawa et al. (2004, 2006) postulierten, dass die im Sekret gefundenen Pigmente UV-Strahlen zwischen 200 - 380 nm absorbieren und deshalb eine UV-protective Wirkung haben könnten.

Beobachtungen im Zoo im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließen keinen Zusammenhang zwischen Sonneneinstrahlung und Sekretverfärbung erkennen - das Haut-Sekret verfärbte sich unabhängig vom Aufenthalt im Stall oder im Außengehege in wenigen Minuten.

Es konnte durch Beobachtungen der Tiere im Außengehege jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob andere biotische und abiotische Faktoren wie pH-Wert oder Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft Einfluss nehmen auf die Verfärbung des Haut-Sekretes.

An einem am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim etablierten Zell-Modell wurden UV-Bestrahlungen an HFP-1-Zellen in Kombination mit Haut-Sekret der Flusspferde durchgeführt. Hierbei sollte überprüft werden, ob das auf die HFP-1-Zellen aufgetragene Sekret die Zellen vor UV-Bestrahlung schützt und ob die unterschiedlich gefärbten Sekrete

verschiedenartig potenten UV-Schutz bieten (siehe Abbildungen 42 bis 44). Dazu wurde die beschriebene Fibroblasten-Zelllinie zur Überprüfung der Zellvitalität mit und ohne UV-Bestrahlung, sowie mit und ohne Flusspferd-Sekret verwendet. Zunächst wurde angenommen, dass das Flusspferd-Sekret vor den UV-Strahlen einen schützenden Effekt ausübt.

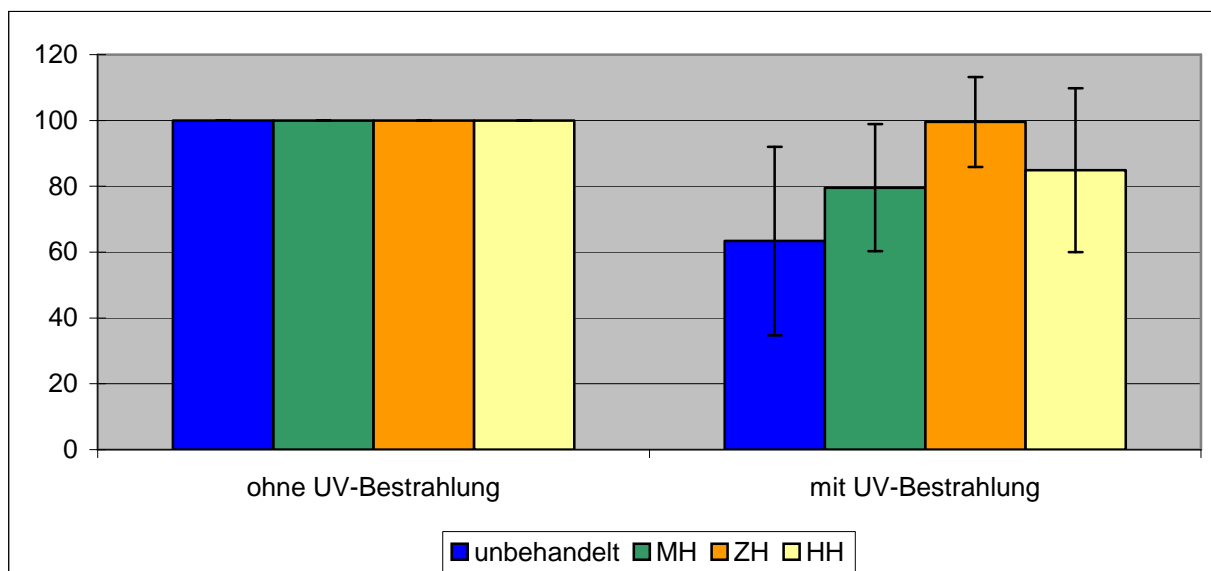


Abb. 42: Durchschnittswerte der Sekrete der Farbe „hell“ in % lebenden HFP-1-Zellen nach 24 h mit UV-Bestrahlung (pro Tier n = 3) (s. Tab. 17)  
 R = Rosi; Z = Zora; M = Mike  
 H = hell; M = mittel; D = dunkel

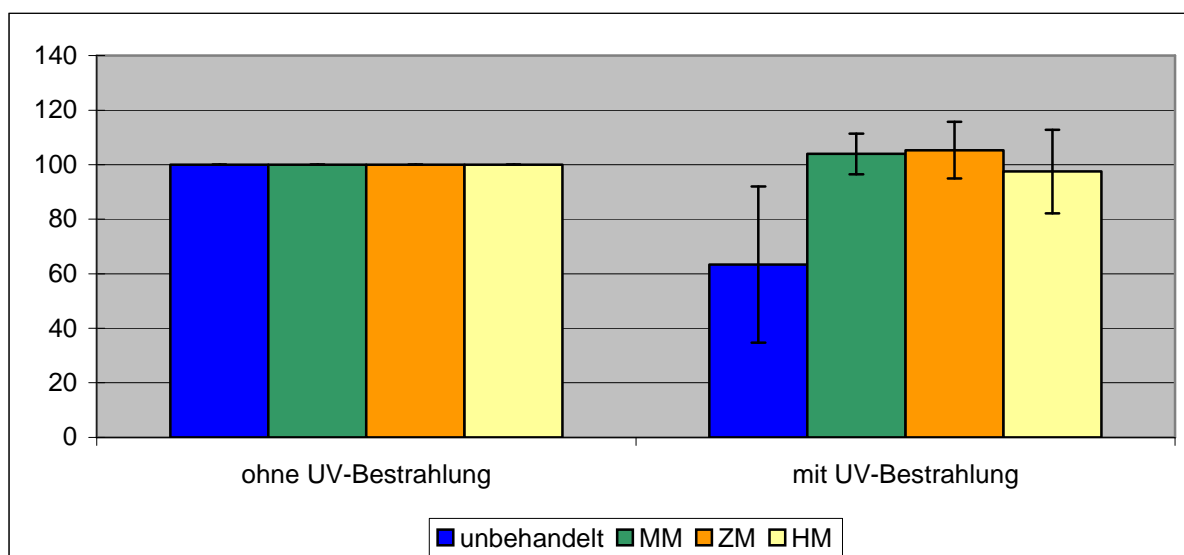


Abb. 43: Durchschnittswerte der Haut-Sekrete der Farbe „mittel“ in % lebenden Zellen nach 24 h mit UV-Bestrahlung (pro Tier n = 3) (s. Tab. 18)  
 R = Rosi; Z = Zora; M = Mike  
 H = hell; M = mittel; D = dunkel

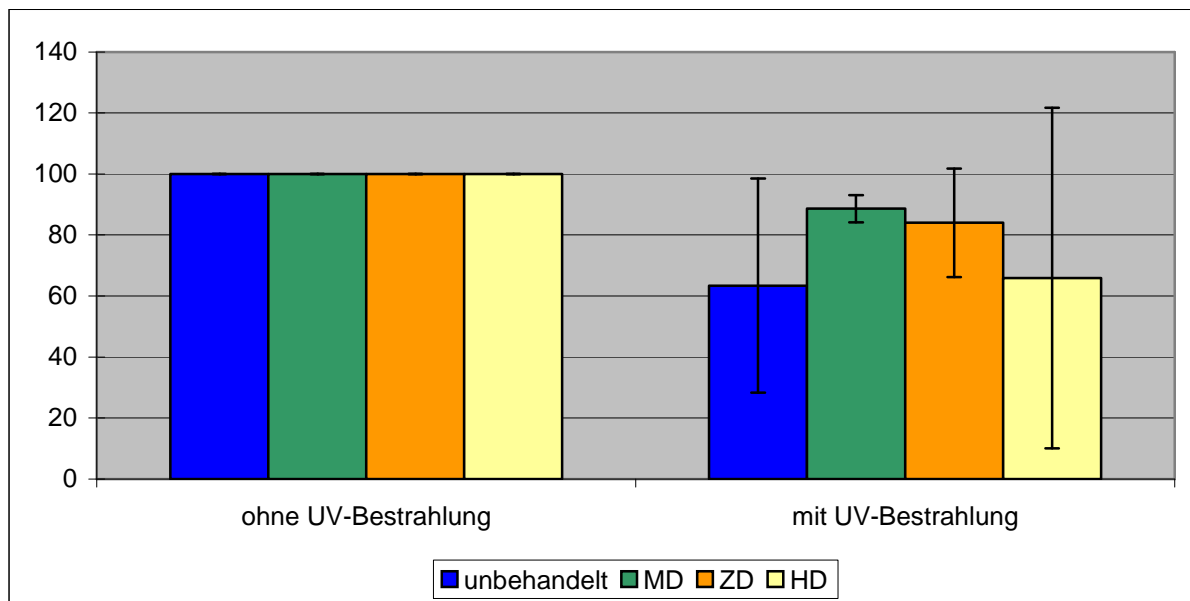


Abb. 44: Durchschnittswerte der Haut-Sekrete der Farbe „dunkel“ in % lebenden Zellen nach 24 h mit UV-Bestrahlung (pro Tier n = 3) (s. Tab. 19)  
 R = Rosi; Z = Zora; M = Mike  
 H = hell; M = mittel; D = dunkel

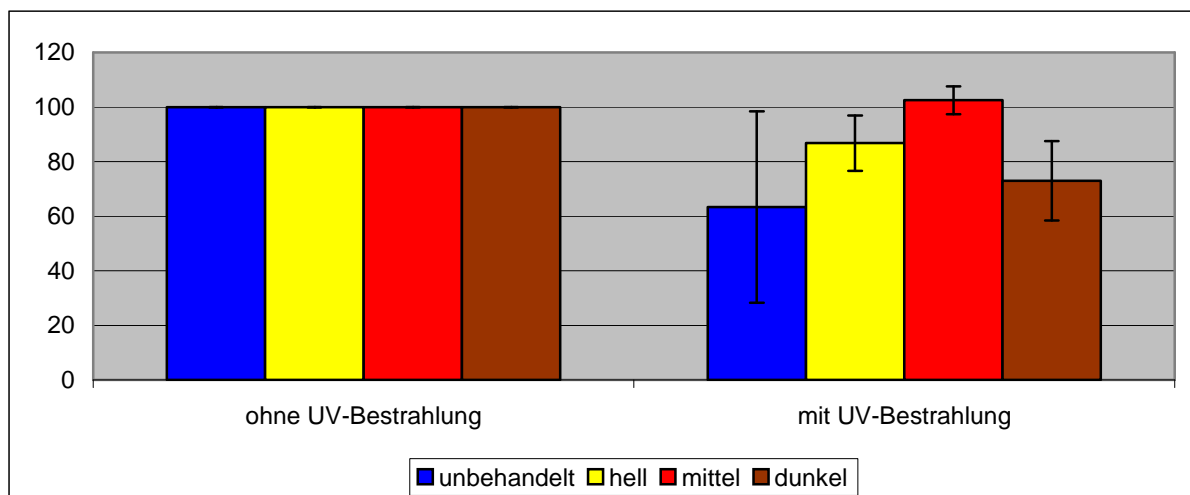


Abb. 45: Durchschnittswerte aller Haut-Sekrete und Farben in % lebenden Zellen nach 24 h mit UV-Bestrahlung

Es zeigte sich, dass die Sekrete der Farben „hell“ und „mittel“ einen leichten UV-Schutz; das dunkle Sekret jedoch keine oder nur geringe UV-protective Wirkung aufwies (siehe Abbildung 45). Diese Ergebnisse lassen sich mit den Befunden der Arbeitsgruppe Saikawa et al. vergleichen. Allerdings beziehen sich die gewonnenen Daten der vorliegenden Arbeit auf das gesamte Haut-Sekret und nicht auf einzelne

isolierte Pigmente wie sie von Saikawa und Arbeitsgruppe (2004) beschrieben werden.

Eine Schutzwirkung des Haut-Sekretes gegenüber schädlicher Auswirkungen der Sonneneinstrahlung bleibt also möglich, auch wenn die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe in den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit weiterhin unbekannt sind. So darf angenommen werden, dass die von Saikawa und Arbeitsgruppe (2006) beschriebenen Pigment-Inhaltsstoffe und die in der vorliegenden Arbeit bestätigte UV-Schutzwirkung des Sekretes, vor allem bei Tieren, die in freier Wildbahn leben, einen wirksamen Schutz der Haut darstellt.

### **5.5 Durchflusszytometrie**

Die in der Zellkultur sowie mit UV-Bestrahlung durchgeführten Versuche mit HGS und MTT wiesen eine Interaktion beider Substanzen auf, die zur Formazansalzbildung führte. Die Untersuchungen der Zellkultur ergaben keine Ergebnisse, da es vermutlich schon bei geringen HGS-Konzentrationen zu einer Reaktion zwischen der HGS und des MTTs kam. Somit wurde das Kriterium zur Messung der Zellvitalität extramitochondrial umgangen. Anfänglich wurden niedrigste HGS-Konzentrationen von bis zu 5 mM als kaum oder nicht zytotoxisch-wirksam vermutet. Dennoch besteht die Vermutung, dass auch HGS-Konzentrationen von nur 0,1 mM unter reaktiver Beteiligung von MTT eine zytotoxische Potenz entfalten können. Um die Zytotoxizität und die Bildung von Formazansalz-Kristallen genauer auszuwerten, wurden Messungen am Durchflusszytometer durchgeführt. Anhand dieser Messung wurden lebende und apoptotische Zellen gezählt. Dieses Verfahren stellt einen fest definierten Apoptose-Grad dar, der aus definierten Parametern besteht und nicht von einer oxidativen Umsetzung, wie bei den MTT-Messungen, abhängig ist. Das Ergebnis zeigt, dass eine HGS-Konzentration zwischen 5-10 mM eindeutige zytotoxische Wirkungen entfaltet.

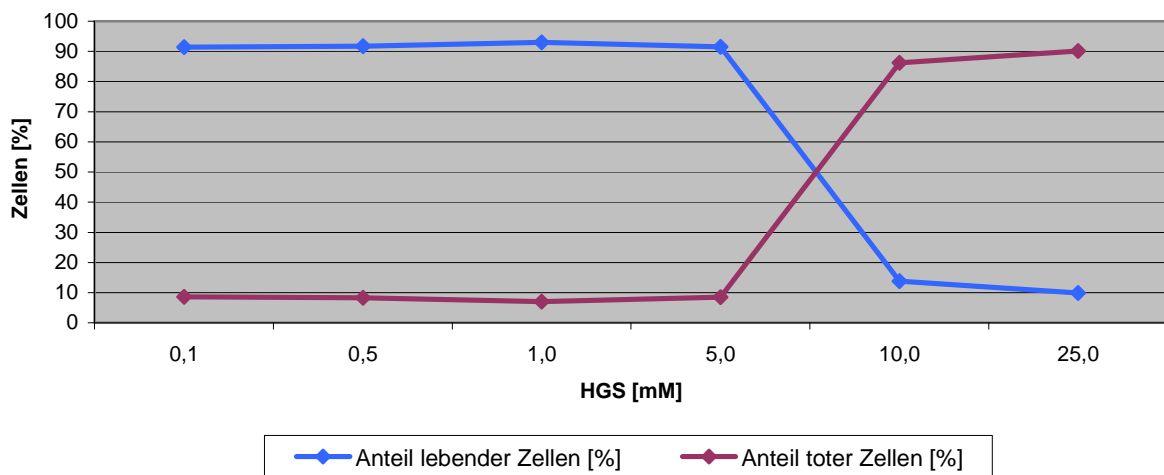


Abb. 46: Durchflusszytometrie: Vorkommen und Vitalität von HFP-1-Zellen unter Behandlung mit unterschiedlichen HGS-Konzentrationen (s. Tab. 21)

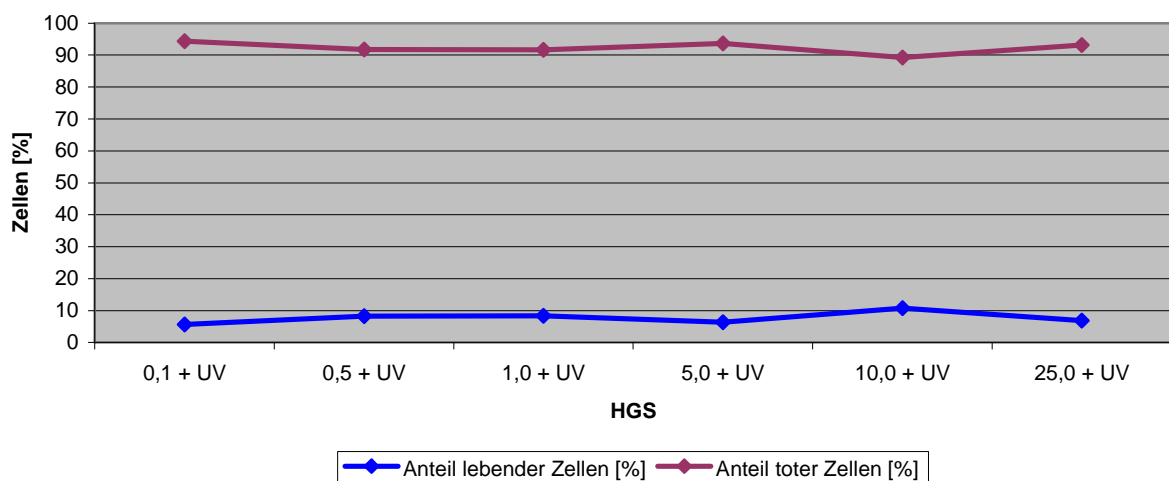


Abb. 47: Durchflusszytometrie: Vorkommen und Vitalität von HFP-1-Zellen unter Behandlung mit unterschiedlichen HGS-Konzentrationen mit und ohne UV-Bestrahlung (s. Tab. 22)

Die Zusammenfassung aller Ergebnisse dieses Untersuchungs-Abschnittes belegt, dass der HGS-Anteil im Haut-Sekret der Flusspferde nicht verantwortlich für eine UV-schützende Wirkung des Sekretes sein kann.

## 5.6 Monolayer-Modell

In freier Wildbahn wurde häufig beobachtet, dass zum Teil sehr schwerwiegende Verletzungen der Flusspferde relativ schnell und komplikationslos, ohne Vorkommen einer bakteriellen Infektion heilen.

Im Untersuchungszeitraum kam es auch bei den im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Tieren durch Rangordnungskämpfe zu leichten Verletzungen. Dies betraf vor allem drei Tiere zu unterschiedlichen Zeiten. Nach einigen Tagen hatten sich die Wunden ohne eitrige Wundheilungsstörung geschlossen und hinterließen weißes Narbengewebe, das nach einigen Wochen wieder die graue Farbe der restlichen Haut des Flusspferdes annahm.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob das Haut-Sekret der Auslöser für die schnelle Wundheilung sein könnte, wurden Untersuchungen am sogenannten Monolayer-Zellkultur-System am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) der Fraunhofer Gesellschaft in Stuttgart durchgeführt. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Unterschiede zwischen der Wirkkraft der verschieden gefärbten Sekrete bestehen.

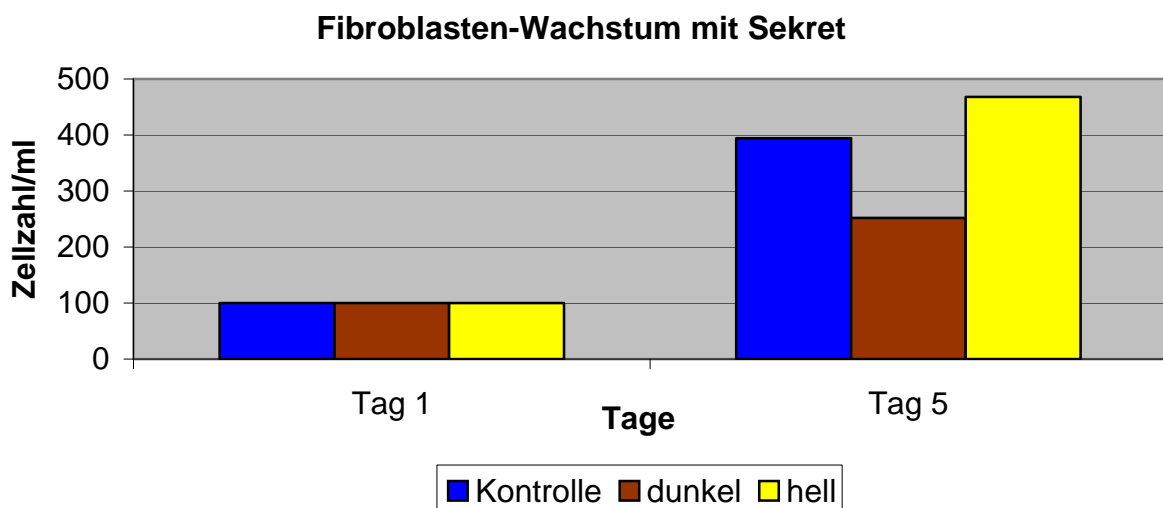


Abb. 48: Monolayer-Zellkultur-Modell: Wachstumsanalyse von Hautfibroblasten unter Stimulus mit hellem und dunklem Flusspferd-Haut-Sekret (Zellzahl/ml) (s. Tab. 23)

Das helle Sekret fördert nach 5 Tagen offensichtlich das Wachstum der Fibroblasten (siehe Abbildung 48). Das zeigt, dass Inhaltsstoffe insbesondere des hellen Haut-Sekretes an der Wundheilung beteiligt sein können. Nicht auszuschließen ist, dass auch ganz andere unbekannte Faktoren dafür ausschlaggebend sein können.



## 5.7 Enzymaktivität

Saikawa et al. (2004) isolierten rote und orangefarbene Pigmente aus dem Flusspferd-Sekret. Neben diesen Farbstoffen können jedoch noch weitere Substanzen für die Farbgebung des Haut-Sekretes der Flusspferde verantwortlich sein. Die bereits nach einigen Minuten entstehende rote beziehungsweise rotbraune Sekretfarbe könnte zum Beispiel durch Carotinoide, wie Lutein und Zeaxanthin, zu Stande kommen. Im farblosen Sekret könnte eine Überlagerung der Lipochromanteile durch andere Inhaltsstoffe vorliegen, die die Wahrnehmung der orange-roten Farbe solcher Pigmente nicht erkennen lässt. Um das vermutete Vorkommen von Lipochromen im Sekret zu prüfen, wurde eine HPLC-Auftrennung für die am häufigsten vorkommenden Carotinoide durchgeführt. Es wurden im Rahmen der Enzymaktivitätsmessungen und mit Hilfe der HPLC-Analytik auf Vorkommen von Carotinoiden nennenswerte Gehalte von Lutein und Zeaxanthin geprüft. Auch untersucht wurde, ob die isolierten Lipochrome womöglich erst im Sekret entstehen. In den dazu durchgeführten Enzymaktivitäts-Messungen konnten in allen untersuchten Proben keine Enzyme der Terpen-Biosynthese bestimmt werden. Die Neusynthese von Carotinoiden im Haut-Sekret kann deshalb ausgeschlossen werden.

Die Anwesenheit von Carotinoiden kann auch durch eine Kontamination der Sekret-Probe mit pflanzlichen Inhaltsstoffen wie Gras, Heu, Obst, Gemüse, Kot oder damit verschmutztem Poolwasser erklärt werden. Dies konnte mit Hilfe des HPLC-Trenn-Verfahrens bestätigt werden, indem der Carotin- und Carotinoid-Gehalt in den untersuchten Sekretproben nach intensiver Waschung der Tiere deutlich reduziert werden konnte.

## 5.8 Mengen- und Spurenelemente

Luck und Wright veröffentlichten 1964 und 1987 Untersuchungsergebnisse von verschiedenen Mengen- und Spurenelemente, die in Haut-Sekret-Proben von Flusspferden gemessen wurden. Wright (1964) berichtete über die extreme Streuung der Werte in den jeweiligen Haut-Sekretproben. Es wurden von Luck und Wright allerdings keine Hinweise zur Methodik der Sekret-Untersuchung und der Empfindlichkeit der Messungen postuliert.

Nachdem eine Elementaranalyse an der Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie, Abteilung Boden- und Düngemitteluntersuchung, der Universität Hohenheim (siehe Tabelle 25) durchgeführt wurde, zeigte sich eine sehr hohe Streuung der Einzelwerte. Weiterhin konnte kein Bezug zu den unterschiedlichen Sekret-Färbungen und den Sekreten einzelner Tiere hergestellt werden. In der nachfolgenden Tabelle - unter den aktuellen Messungen - werden nur die sechs Elemente dargestellt (Tabelle 31), die in allen untersuchten Haut-Sekret-Proben gemessen werden konnten.

Tab. 31: Übersicht über die Konzentrationen verschiedener Mengen- und Spurenelemente im Haut-Sekret des Flusspferdes, Angaben in mg/l

| Substanz                      | Aktuelle Messungen<br>(2006-2007) | Messungen von<br>Wright<br>(1987) | Messungen von Luck<br>und Wright (1964) |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Ca <sup>2+</sup>              | 28                                |                                   | 10                                      |
| K <sup>+</sup>                | 4691                              | 5460                              | 11037                                   |
| Mg <sup>2+</sup>              | 39                                |                                   |   |
| Na <sup>+</sup>               | 59                                | 28                                | 414                                     |
| Zn <sup>2+</sup>              | 1                                 | -                                 | -                                       |
| Rb <sup>+</sup>               | 2                                 | -                                 | -                                       |
| Cl <sup>-</sup>               | -                                 | 644                               | 4550                                    |
| CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> | -                                 | 5970                              | -                                       |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | -                                 |                                   | 12261                                   |

Bis heute wird für das Flusspferd-Haut-Sekret der Begriff Schweiß verwendet, obwohl bereits in der Literatur beschrieben wird, dass es sich bei der sezernierenden Drüse der Flusspferde um eine tubuloazinäre Drüse handelt, bei der Schweißdrüse, Glandula sudorifera, der übrigen Säugetiere aber um eine apokrin sezernierende Hautdrüse. Die Befunde von Luck und Wright und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Kalium-Gehalt in besonders hoher Konzentration, der Natrium-Gehalt hingegen in vergleichsweise niedriger Konzentration vorliegt.

Die Tatsache, dass im Haut-Sekret der Flusspferde Kalium in einer 80-fachen Konzentration im Vergleich zum Natrium vorliegt, weist eindeutig daraufhin, dass es sich nicht um Schweiß – hier ist der Natrium-Gehalt um das 4- bis 5-fache höher - handelt (Freund, 2003).

## 5.9 Antimikrobielle Eigenschaften

Saikawa et al. (2004) wiesen mit Hilfe der Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* A3 beziehungsweise *Klebsiella pneumoniae* PC1602 eine antibiotische Wirkung des isolierten roten Pigments aus dem Flusspferd-Sekret nach.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte analysiert werden, ob das Sekret an sich, ohne Isolation der einzelnen Pigmente aus Saikawas Analysen, eine antibiotische Wirkung aufweist oder ob weitere Faktoren dafür verantwortlich sein könnten. Für die Untersuchungen, die am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, der Universität Hohenheim durchgeführt wurden, wurde statt isolierter Pigmente, das Gesamt-Sekret verwendet. Ein weiterer Unterschied zu den Untersuchungen von Saikawa et al. bestand darin, dass die antimikrobiellen Effekte des Haut-Sekretes nicht nur an Gram-negativen, sondern auch an Gram-positiven Bakterien untersucht werden sollten.

Im Hinblick auf den unterschiedlichen Zellwandaufbau zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Spezies wurden verschiedene Resultate erwartet.

Während der ersten Untersuchungen traten mehrere Probleme auf. Da das Sekret eine Eigenfärbung aufwies, war die am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, der Universität Hohenheim etablierte Methode der Optischen-Dichte-Messung nicht beziehungsweise nur unzureichend durchführbar. Es wurde daher die MHK-Bestimmung favorisiert. Weitere Probleme ergaben sich durch die von Probe zu Probe unterschiedlichen Sekret-Zusammensetzungen, die vermutlich für die zum Teil großen Unterschiede der Ergebnisse verantwortlich waren.

Es konnten in allen untersuchten Proben mehr oder weniger deutliche antibakterielle Wirkungen des Flusspferd-Sekretes beobachtet werden, die sich insbesondere auf Gram-positive Bakterien-Spezies auszuwirken schienen. Untersuchungen, bei denen die Proben vorher über Sephadex gereinigt wurden, zeigten keine antibakterielle Wirkung. Die antibakterielle Substanz geht also offensichtlich durch die Aufreinigungs-Prozedur des Sekretes verloren. Ein Fehler in der Durchführung des Versuches konnte aufgrund der parallel laufenden positiven Wachstumskontrollen mit *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella oxytoca* ausgeschlossen werden.

Untersuchungs-Ansätze, die statt Flusspferd-Sekret reine Homogentisinsäure enthielten, zeigten eine nur noch geringe antibakterielle Wirkung. Diese Ergebnisse

wurden anschließend zusätzlich mit einem Agar-Diffusions-Test bestätigt. Die HGS ist die in der vorliegenden Arbeit einzige sicher definierte Substanz im Haut-Sekret. Unter Umständen ist der HGS-Anteil des Haut-Sekretes die einzige für die antimikrobielle Eigenschaft des Sekretes verantwortliche Substanz. Die variierenden Ergebnisse über die antibiotische Wirkung der HGS lassen sich durch die HPLC-Messungen erklären, bei denen in allen gemessenen Proben unterschiedliche HGS-Mengen dokumentiert wurden.

Der von Saikawa et al. (2004) beschriebene antimikrobielle Schutz - vermittelt durch ein rotes Pigment - konnte aufgrund variierender Untersuchungstechniken in der vorliegenden Arbeit zu keiner Zeit reproduziert werden.

## **5.10 High Performance Liquid Chromatography**

### **5.10.1 Lutein/Zeaxanthin**

Die bereits beschriebene Farbgebung des rot-orange-braun nachgedunkelten Haut-Sekretes der Flusspferde legt den Verdacht nahe, dass Inhaltsstoffe aus der Lipochromklasse für die Farbgebung verantwortlich sein könnten. Daher wurden Sekret-Proben mittels HPLC-Trennungen auf Carotinoide untersucht, wobei Lutein und Zeaxanthin identifiziert wurden. Beide Substanzen wurden in allen Proben gefunden, auffällig war aber die zu verzeichnenden großen Konzentrationsschwankungen: Eine Erklärung für diese Schwankungen bestand darin, dass das Haut-Sekret durch Futtermittel-, Kot- oder Blütenstaub mit pflanzlichen Lipochromen verunreinigt war. Um eine Kontamination in der Folge ausschließen zu können, wurden die Tiere vor der Sekretgewinnung anschließend gewaschen. Im Ergebnis konnten so in allen untersuchten Proben nur noch minimale beziehungsweise gar keine Konzentrationen von Lutein und Zeaxanthin gemessen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den im Sekret nachgewiesenen Carotinoiden um Verunreinigungen aus pflanzlichem Material, aus Futter, Kot und Umgebungsmilieu handelt.

Daher wurden auch alle weiteren Untersuchungen am MS eingestellt.

### **5.10.2 Vitamine, Phenole und Polyphenole**

Mit Hilfe der HPLC-Methode erfolgten stichpunktartige Untersuchungen der Sekret-Proben auf die Vitamine A, E, C, B<sub>1</sub> und das Provitamin A beta-Carotin. Die

Aussagen von Saikawa et al. (2004) über die unterschiedlichen Eigenschaften des Haut-Sekretes ließen die Vermutung zu, dass das Sekret eventuell eine antioxidative Wirkung ausübt. Dies könnte durch das unregelmäßige und in verschiedenen konzentrierte Vorkommen von Vitaminen bedingt sein. Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnte in keiner der Proben Vitamin A, Vitamin E, Vitamin C oder Vitamin B<sub>1</sub> nachgewiesen werden. Damit kann eine Beteiligung von antioxidativ wirksamen Vitaminen oder Vitamin-Verbindungen im Haut-Sekret der Flusspferde ausgeschlossen werden.

Im Laufe der Untersuchungen des Sekretes auf Vorkommen von Vitaminen ergaben sich allerdings unerwartete interessante Beobachtungen: In jedem HPLC-Durchlauf konnten an den immer gleichen Positionen drei zunächst nicht zu identifizierende Peaks beobachtet werden. Zur weiteren Analyse der drei auffälligen HPLC-Peaks wurden die Haut-Sekret-Proben in der Folge mittels NMR- und MS-Technik weiter untersucht.

### **5.11 Nuclear Magnetic Resonance**

In der Arbeit von Saikawa et al. (2004) wurden zwei spezifische Farbpigmente charakterisiert, die dem Haut-Sekret die dunkle Farbe verleihen sollen. Es handelt sich hierbei um ein rotes und ein orange-farbenes Pigment. Beide sind nicht-benzoide aromatische Verbindungen. Das rote Pigment, die von Saikawas Arbeitsgruppe benannte Hipposudorinsäure, und das orangefarbene Pigment, die sogenannte Norhipposudorinsäure, wurden mittels UV-Spektrum, <sup>1</sup>H-NMR, LC-MS und FAB-MS identifiziert und nachgewiesen. Als Ausgangsprodukt vermutete Saikawas Arbeitsgruppe die Homogentisinsäure, die ein Abbauprodukt von Phenylalanin und Tyrosin darstellt.

In den Analysen des Institutes für Chemie, Fachgebiet Bioorganische Chemie, der Universität Hohenheim im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das Vorkommen von HGS in 27,6% aller Untersuchungen eindeutig bestätigt werden, wohingegen die von Saikawa et al. beschriebenen Pigmente nicht detektiert wurden. Die Isolierungs- und Reinigungsschritte für die Farbpigmente waren unter Anwendung der experimentellen Angaben des Nature-Artikels nicht reproduzierbar. Der Nachweis von HGS in den Proben des Sekretes wurde mittels NMR-, HPLC- und MS - Technik geführt.

Bei den NMR-Analysen wurden drei unbekannte Peaks im Sekret genauer untersucht.

Peak 3 konnte eindeutig als HGS identifiziert werden. Die NMR spektroskopische Untersuchung der Peak 1 ergab, dass es sich um ein Substanzgemisch mit einer Hauptkomponente handelt, welche mittels NMR eindeutig als 2,5-Dihydroxy-phenylglykolsäure identifiziert wurde. Die in Peak 2 enthaltene Verbindung konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Die NMR- und MS-Spektren legen jedoch die Vermutung nahe, dass es sich um ein Polymer handeln könnte, das durch Oxidation der HGS mit Luftsauerstoff entstanden sein könnte. pH abhängige Stabilitätsuntersuchungen der HGS zeigten, dass HGS in Lösung bei einem pH-Wert von 7 über Tage stabil bleibt. Bei einem pH von 11 hingegen, ähnlich wie im Sekret, änderte sich durch Luftoxidation schon nach kurzer Zeit die Probenlösung hinsichtlich Aussehen und Farbe durch augenscheinliche Braunfärbung. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass auch im Sekret auf der Haut der Flusspferde spontane Polymerisationen der HGS, abhängig von pH-Wert und Sauerstoffgehalt, stattfinden. Die farbliche Veränderung des Haut-Sekretes von durchsichtig über blass-rosa zu rot-braun bis dunkelbraun könnte somit erklärt werden, auch ohne dass UV-Strahlung als Katalysator oder Initiator vorhanden sein muss.

Die in der Tabelle (siehe Tabelle 29) dargestellte Häufigkeit der drei untersuchten Peaks in den Sekretproben verdeutlicht, dass der HGS-Peak nur in 27,6 % der untersuchten Proben vorkam, wohingegen Peak 1 und 2 mit 66,6 % beziehungsweise 77,7 % eine deutlich größere Häufigkeit aufwiesen.

## 5.12 Phenylalanin und Tyrosin

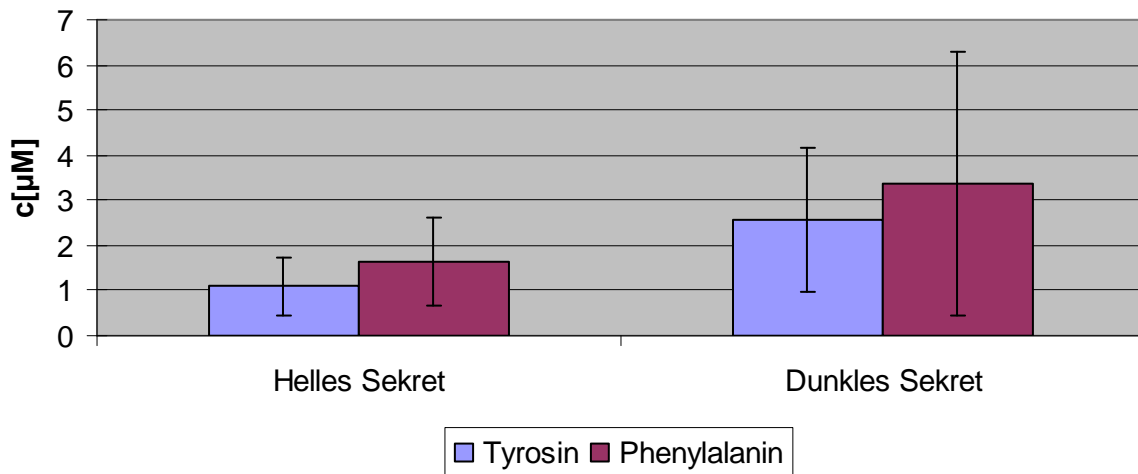


Abb. 49: Vorkommen von Phenylalanin und Tyrosin in hell und dunkel gefärbtem Haut-Sekret unter Berücksichtigung der Standardabweichung

Unter Annahme, dass auch die chemisch-biologischen Vorstufen von HGS alpha-L-Tyrosin beziehungsweise alpha-L-Phenylalanin parallel mit ihr im Haut-Sekret der Flusspferde vorkommen, wurde in sich anschließenden HPLC-Auftrennungen nach beiden Inhaltsstoffen gesucht.

Dabei wurde zunächst vermutet, dass der alpha-L-Phenylalanin-Anteil in hellen Haut-Sekret-Proben ein relativ höherer wäre und in der Folge ein Abbau des Phenylalanins zu HGS ablaufen könnte. In den Aliquoten der dunklen Sekret-Proben, müsste dann folglich ein höher konzentrierter HGS-Anteil nachzuweisen sein. Die HPLC-Ergebnisse konnten diese Vermutungen allerdings nur anteilig bestätigen: Der Aminosäuren-Gehalt, sowohl in dem hellen, als auch im dunklen Sekret ähnelte sich sehr. Die parallel mittels HPLC-Technik durchgeführten HGS-Bestimmungen konnten zeigen, dass sich in den hellen und mittleren Sekret-Farben annähernd gleiche HGS-Konzentrationen, in den dunklen Proben sogar – entgegen der anfänglichen Vermutung – deutlich niedrigere HGS-Konzentrationen nachzuweisen waren. Ob und in wie weit im Haut-Sekret der Flusspferde ein alternativer alpha-L-Phenylalanin-Metabolismus konnte im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit nicht erörtert werden.

## 6 Ausblick

Ein im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit immer wieder auftretendes Problem lag in der Schwierigkeit, der möglichst sterilen Haut-Sekretgewinnung am lebenden Flusspferd. Obwohl die Tiere vor der Probennahme gewaschen wurden, bestand zu jeder Zeit die Möglichkeit einer Kontamination der Haut-Sekret-Probe. Hilfreich – in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit jedoch kaum realisierbar – wäre eine Probenentnahme unter klinischen Bedingungen. Das bedeutet unter anderem für den Zeitraum der Probennahme, dass die Tiere zur besseren Fixation in eine Art Zwangsstand in einem abgedunkelten Raum geführt werden müssten, um die ständige Bewegung der Tiere zu unterbinden und um den Lichteinfall auf die jeweiligen Sekret-Proben regulieren zu können. Dies würde ein sauberes Arbeiten ermöglichen. Ferner würde eine Entnahme der Sekretproben mit einer geeigneten Kanüle helfen, um vollkommen unkontaminierte, „sterile“ Proben direkt aus dem Drüsen-Lumen zu gewinnen.

Darüber hinaus wäre für weitere Untersuchungen eine Isolierung der von Saikawa et al. (2004) gefundenen Pigmente sinnvoll.

Für die Untersuchungen an Zellkulturmodellen mit und ohne UV-Bestrahlung müsste analysiert werden, welche Substanz im Sekret zytotoxisch wirkt, und ob ein anderes Untersuchungsmodell sinnvoller wäre.

Auch die Untersuchungen zu den antimikrobiellen Eigenschaften könnten eventuell direkt mit den isolierten Pigmenten durchgeführt werden.

Aufgrund der Präsenz von Homogentisinsäure im Sekret wäre der Nachweis einer antimikrobiellen Wirkung dieses Metaboliten von großem Interesse. Das Vorkommen der Homogentisinsäure im Urin von Patienten mit dem Krankheitsbild der Alkaptonurie und das damit durch Luftoxidation verbundene Phänomen des Nachdunkelns des Harns, kann in gewisser Weise mit dem Farbverhalten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Haut-Sekret-Proben des Flusspferdes verglichen werden. Es bleibt zu klären, in welcher Weise der Homogentisinsäure-Anteil im Harn von Alkaptonurie-Patienten und im Haut-Sekret des Flusspferdes verantwortlich für die beobachtete Farbreaktion ist.

Ein weiterer interessanter noch zu untersuchender Aspekt ist die Beobachtung, dass diejenigen Flusspferde („Rosi“ und „Kiboko“), die allgemein eine sehr niedrige



Sekretproduktion zeigten, einen saisonal begünstigten, insbesondere in den Sommermonaten dieser Arbeit auffälligen, grünen cutanen Moos- und Algen-Belag aufwiesen.

Baum et al. (2000) haben sogenannte „Antifoulingsmechanismen“ der Epidermis des Wales *Globicephala melas* untersucht und unter anderem festgestellt, dass eine Substanz im Sekret der Epidermis der Tiere der Anheftung von potentiellen Besiedlern wie etwa Seepocken entgegenwirkt. Aufgrund des aquatischen Lebens der Flusspferde wäre es naheliegend, dass auch in ihrem Haut-Sekret Substrate nachgewiesen werden können, die einen Antifoulingsmechanismus möglich und wirksam machen. Es liegt nahe, dass die im Flusspferd-Sekret nachgewiesene Homogentisinsäure oder ihren Abbauprodukten in diesem Rahmen eine bedeutsame Rolle zukommen können.

## 7 Zusammenfassung

### **Untersuchungen zum Haut-Sekret des Flusspferdes (*Hippopotamus amphibius*)**

In der vorliegenden Arbeit sollten Inhaltsstoffe und Wirkungen des Haut-Sekretes der Flusspferde (*Hippopotamus amphibius*) quantitativ und qualitativ untersucht werden. Über einen Zeitraum von einem Jahr hinweg wurden dazu Haut-Sekret-Proben von Zoo-Flusspferden gesammelt. An fünf Tieren unterschiedlichen Alters und Geschlechts wurde zu verschiedenen Tages- und Jahreszeiten Haut-Sekret von Kopf und Rücken mit Hilfe einer besonderen Technik gewonnen. Das native Haut-Sekret, das in der älteren Literatur auch als „blutiger Schweiß“ bezeichnet wird, verfärbt sich auf der Hautoberfläche innerhalb weniger Minuten von farblos über mehrere Zwischenstufen nach dunkelbraun.

An humanen Fibroblasten-Zellkulturen und den damit durchgeführten UV-Bestrahlungsversuchen konnte für das helle und für das mittlere Haut-Sekret im Gegensatz zum dunklen eine sowohl zytoprotektive, wie auch UV-protective Wirkung ermittelt werden. Beide Effekte können für das Flusspferd - insbesondere unter Bedingungen der freien Wildbahn - einen wirksamen Hautschutz darstellen.

Ergebnisse der Bestimmung Minimaler Hemmstoff-Konzentrationen verweisen weiterhin auf eine antimikrobielle Eigenschaft des Haut-Sekretes. Die antimikrobiellen Wirkungen insbesondere gegen *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella oxytoca* stellen möglicherweise eine Erklärung für die oft zitierte komplikationslose Wundheilung beim Flusspferd dar.

Mit Hilfe von HPLC-Trennverfahren und MS-Untersuchungen wurde das Sekret weiterhin auf das Vorhandensein spezieller antioxidativer Substrate, wie Lutein und Zeaxanthin, Phenole und Polyphenole, die Vitamine A, B<sub>1</sub>, C, E und die Vitaminvorstufe beta-Carotin analysiert. In keinen der untersuchten Haut-Sekretproben konnten - unabhängig von der jeweiligen Farbe des Haut-Sekretes - die beschriebenen Antioxidantien nachgewiesen werden.

Weitere Messungen unter anderem der Oxygenase, beta-Galactosidase und Protease im Haut-Sekret ergaben keinen Hinweis auf Enzymaktivitäten.

In etwa ein Drittel aller Proben konnte - ohne Abhängigkeit vom jeweiligen Verfärbungsgrad der Sekrete - Homogentisinsäure (HGS) im Haut-Sekret der Flusspferde nachgewiesen werden. Außerdem fanden sich die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin als Inhaltsstoffe. Das Vorkommen der HGS im alkalischen Haut-Sekret könnte die nach wenigen Minuten auf der Hautoberfläche eintretende Verfärbung des Sekretes durch Luftoxidation erklären.

Im Sekret wurden zum Teil hohe Konzentrationen an Mengen- und Spurenelementen nachgewiesen. Der Befund, dass dabei Kalium in einer 80 fach höheren Konzentration als Natrium vorliegt, ist ein deutlicher Beweis, dass es sich bei dem Sekret nicht um Schweiß handeln kann.

Die im Rahmen der Arbeit regelmäßig durchgeführten Beobachtungen an den Zoo-Flusspferden ergaben keine Unterschiede in der Sekretproduktion in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Tages- oder Jahreszeit.

## 8 Summary

**Anne Karen Dinah Lankisch**

### **Investigations of the cutaneous secretion of the hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*)**

This study is a qualitative and quantitative investigation of the contents and effects of the cutaneous secretion of the hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*). Samples of the cutaneous secretions of zoo hippopotami were collected over the course of a year. The samples were taken at various times of day from the head and back of five hippopotami of different age and sex. The hippopotamus' cutaneous secretion, previously sometimes termed "blood sweat", gradually changes hue on the surface of the skin, going from colorless to dark brown over the course of a few minutes.

By means of ultraviolet (UV) irradiation trials on human fibroblast cell cultures, the light-colored and intermediate phases of the cutaneous secretion - in contrast to the dark phase - were shown to have both cytoprotective and UV-protective effects. Both of these actions may represent effective skin defenses, particularly in wild-living animals.

Furthermore, testing of minimal inhibitory concentrations revealed antimicrobial properties of the cutaneous secretion. Its antimicrobial actions, particularly against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella oxytoca*, may explain the frequently mentioned uncomplicated wound healing process in the hippopotamus.

By means of high-performance liquid chromatography and mass spectrometry the secretion was analyzed for the presence of specific antioxidative substances such as lutein and zeaxanthin, phenols and polyphenols, vitamins A, B<sub>1</sub>, C and E, and the vitamin precursor beta-carotene. In none of the samples, regardless of the color of the cutaneous secretion, could any of these antioxidants be demonstrated.

Investigations of the oxygenase, beta-galactosidase and protease content of the cutaneous secretion showed no evidence of enzyme activity.

About one third of the samples, irrespective of coloration, revealed the presence of homogentisic acid (HGA) in the cutaneous secretion. The amino acids L-

phenylalanine and L-tyrosine were also detected. The presence of HGA in the alkaline secretion could explain the color change over the course of a few minutes on the skin surface, oxidation occurring on exposure to the air.

Electrolytes and trace elements were found, sometimes in high concentrations. The presence of potassium in an 80 times higher concentration than sodium constitutes clear proof that the secretion cannot be sweat.

Regular observation of the zoo hippopotami in this study revealed no differences in the amount of secretion depending on age or sex of the animal, time of day, or season of the year.

## 9 Literaturverzeichnis

- Allbrook D. (1962) *The morphology of the subdermal glands of Hippopotamus amphibius*. Proceedings of the Zoological Society of London, 139, S. 67-73
- Baum C., Meyer W., Stelzer R., Fleischer L.-G., Siebers D. (2002) *Average nanorough skin surface of the pilot whale (Globicephala melas, Delphinidae): considerations on the self-cleaning abilities based on nanoroughs*. Marine Biology, 140, 3, Springer Berlin, Heidelberg, S.653-657
- Boisserie J.R., Lihoreau F., Brunet M. (2005) *The position of Hippopotamidae within Cetartiodactylo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102 (5), S. 1537-1541
- Chumpolkulwong N., Kakizono T., Ishii H., Nishio N. (1997) *Enzymatic conversion of  $\beta$ -carotene to astaxanthin by cell-extracts of a green alga Haematococcus pluvialis*. Biotechnology Letters 19 (5), S. 443-446
- Crisp E. (1867) *On some points connected with the anatomy of the hippopotamus*. Proceedings of the Zoological Society of London, S. 601-603
- Crisp E. (1962) *On some points connected with the anatomy of the hippopotamus*.(1867) Proceedings of the Zoological Society of London, S. 601-603  
in: *The morphology of the subdermal glands of Hippopotamus amphibius*. (1962) Allbrook D., Proceedings of the Zoological Society of London, 139, S. 67-73

- Dietrich M., Meinzerhagen J, Ringhoff M, Eich J (2006) *Erlebnis-Zoo Hannover*. Vista Point Verlag, 2. Auflage, Köln, S. 56-57
- Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. (1991) *Anatomie der Haustiere Lehrbuch für Studium und Praxis*. Ferdinand Enke Verlag, 1. Auflage, Stuttgart, S. 390-408
- Eltringham S.K. (1999) *The Hippos*. T & AD Poyser Natural History, Academic Press, London
- Erhardt J.G., Mack H., Sobeck U., Biesalski H.K. (2002)  *$\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol concentration and antioxidant status in buccal mucosal cells and plasma after supplementation*. British Journal of Nutrition; 87, S. 471-475
- Franz P.I., Conrad J., Biesalski H.K. (1998) *Modulation of UVA-induced lipid peroxidation and suppression of UVB-induced ornithine decarboxylase response by all-trans-retinoic acid in human skin fibroblasts in vitro*. Biolog.Chemie, 379, S. 1263-1269
- Freund U., Kettern B. (2003) *IDM – Informationszentrale Deutsches Mineralwasser*. DCM Meckenheim, 3. Auflage, Bonn
- Greten H. (2005) *Innere Medizin*. Thieme Verlag, 12. Auflage; Stuttgart
- Hasegawa M., Adachi J. (1996) *Phylogenetic position of cetaceans relative to artiodactyls: Reanalysis of mitochondrial and nuclear sequences*. Molecular Biology and Evolution, 13, S. 710-717

- Hees H., Sinowatz F. (2000) *Histologie - Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Deutscher Ärzte-Verlag, 3. Auflage; Köln, S. 94-150, S. 455-469
- Homes V. (2003) *Das große Hipposterben*. WWF-Presseinformation, Frankfurt, Deutschland
- Jauch D. (2006) *Wilhelma - Der zoologisch-botanische Garten in Stuttgart*. G. Ad. Stehn's Buch- und Verlagshandlung, Stuttgart, S. 56
- Klingel H. (1988) *Großflusspferde (Gattung Hippopotamus amphibius)*.  
in: Grzimeks Enzyklopädie, Kindler, Berlin, 5, S. 58-79
- König H.E., Liebich H.-G. (1999) *Anatomie der Haussäugetiere, Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis Band II*. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 2. Auflage; Stuttgart, S. 325-334
- Kränzle E. (1912) *Untersuchungen über die Haut des Schweines*. Arch.f. mikr. Anat., Abt. I, Bd. 79  
in: *Histologische Untersuchung der äußeren Haut eines neugeborenen Hippopotamus amphibius L.* (1918) Schumacher S., in Denkschriften 94. Band, Kaiserliche Akademie der Wissenschaft in Wien, S. 1-53
- Liebich H.-G. (1999) *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 3. Auflage, Stuttgart, S. 35-66, S. 303-324



- Löffler G. (2001) *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 4. Auflage; Berlin, Heidelberg, S. 251-287
- Löffler G., Petrides P. (1998) *Biochemie und Pathochemie*. Springer-Verlag, 6. Auflage; Berlin, Heidelberg, New York, S. 522-598
- Luck C.P., Wright P.G. (1964) *Aspects of the anatomy and physiology of the skin of the Hippopotamus (H.amphibius)*. Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences, 49, S. 1-14
- Montagna (1956) *The Structure and Function of Skin*. New York: Academic Press Inc.  
in: *Aspects of the anatomy and physiology of the skin of the Hippopotamus (H.amphibius)*. (1964) Luck C.P., Wright P.G.; Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences, 49, S. 1-14
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1996) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III, Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, 3. Auflage; Berlin, Wien, S. 443-487
- Nowak, R.M. (1999), *Walker's Mammals of the World, Volume I*, Baltimore and London, John Hopkins University Press
- Petzsch H. (1992) *Urania Tierreich, Säugetiere*. Urania-Verlag, 1. Auflage; Leipzig, Jena, Berlin; S. 427-434

- Philpott et al. (1996) *The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques.* Blood , 87, 6, S. 2244-2251
- Phornphutkul C, Introne WJ, Perry MB, Bernadini I, Murphey MD, Fitzpatrick DL, Anderson PD, Huizing M, Ankister Y, Gerber LH, Gahl WA (2002), *Natural history of alkaptonuria.* The new England Journal of Medicine; 347 (26), S. 2111-2121
- Pitman C.R.S. (1962) *Albino Hippopotamus.* Proceedings of the Zoological Society of London, 139 (4), S. 531-534
- Reinwein D, Benker G, Jockenhövel F (2000) *Checkliste Endokrinologie und Stoffwechsel.* Thieme Verlag, 4. Auflage, Stuttgart , S. 442
- Saikawa Y., Hashimoto K., Nakata M., Yoshihara M., Nagai K., Ida M., Komiya T. (2004) *The red sweat of the hippopotamus.* Nature 429, S. 363
- Saikawa Y., Moriya K., Hashimoto K., Nakata M. (2006) *Synthesis of hipposudoric and norhipposudoric acids: the pigments responsible for the color reaction of the red sweat of Hippopotamus amphibius.* Tetrahedron Letters 47, S. 2535-2538
- Schumacher S. (1918) *Histologische Untersuchung der äußeren Haut eines neugeborenen Hippopotamus amphibius L..* in Denkschriften 94. Band, Kaiserliche Akademie der Wissenschaft in Wien, S. 1-53

Stuart, C und T (2000), Field Guide of the Larger Mammals of Afrika, Cape Town: Struik

Toldt jun. K. (1915) *Äußerliche Untersuchung eines neugeborenen Hippopotamus Amphibius L. mit besonderer Berücksichtigung des Integuments und Bemerkungen über die fetalen Formen der Zehenspitzenbekleidung bei Säugetieren.* In Denkschriften, 92. Band, Kaiserliche Akademie der Wissenschaft in Wien, S. 653-670

Tomes J. (1850) *On the blood-coloured exudation from the skin of the hippopotamus.* Proceedings of the Zoological Society of London, S.160-162

Weber M. (1886) *Ursprung der Cetaceen.* Studien über Säugetiere, Verlag von Gustav Fischer, Jena, S. 1-18

Weber M. (1918) Studien über Säugetiere. (1886) Jena  
in: *Histologische Untersuchung der äusseren Haut eines neugeborenen Hippopotamus amphibius L..* (1918) Schumacher S.; in Denkschriften 94. Band, Kaiserliche Akademie der Wissenschaft in Wien, S. 1-53

Wright P.G. (1987) *Thermoregulation in the hippopotamus on land.* South African Medical Journal 22, S. 237-242  
in: *The Hippos.* (1999) Eltringham S.K.; T & AD Poyser Natural History, Academic Press, London

Wright P.G., Luck C.P. (1959) *The skin secretion of the Hippopotamus.* J. Physiol. 148, 22P

in: *The morphology of the subdermal glands of Hippopotamus amphibius.*  
(1962) Allbrook D., Proceedings of the Zoological Society of London, 139,  
S. 67-73

Wurster J. (2006) *Synergistische Wirkung einer kombinierten Gabe von Vitamin C und E in HMEC-1.* Diplomarbeit, Universität Hohenheim, Stuttgart

---

## Anhang

### Materialienliste für 3.2

- Schwamm (20 x 25 cm) (ATU – Auto-Teile Unger Handels GmbH & Co.KG, Stuttgart, Deutschland)
- Silikon-Teigschaber (Dr. Oetker, Bielefeld, Deutschland)
- Reaktionsgefäß, 2 ml, PP, durchsichtig (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäß, 2 ml, PP, undurchsichtig, braun (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäß, 15 ml, 120 x 17 mm, PP, (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Etiketten zur Markierung der Probe
- Aluminiumfolie
- Trockeneis
- Eis einer wässrigen Lösung

### Materialienliste für 3.3

Kulturmedium:

- Standardwachstumsmedium Dulbeccos' Modified Eagle Medium (DMEM) (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit Zusatz von:
  - 10 % Foetales Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin, Deutschland)
  - 5 % Penicillin/Streptomycin (100 U/100 µg/ml) (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Phosphate gepufferte Kochsalzlösung (PBS<sup>-</sup>), ohne zweiwertige Ionen:

- 2 l H<sub>2</sub>O reinst
- 16,0 g/l Natriumchlorid (NaCl) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,4 g/l Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 0,4 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2,88 g/l Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Trypsin/EDTA Lösung (0.05 %/0,02% ) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

## Solubilisierungsreagenz:

- 10 g Sodium dodecylsulfate (SDS) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 4 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 0,6 ml Essigsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Triton X-100<sub>reinst</sub> (final Konz.0, 1 %) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Thiazolblau (MTT) 10 mg MTT/ml PBS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

## Zellkulturmaterialien:

- Reaktionsgefäß, 2 ml, PP, durchsichtig (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäß, 2 ml, PP, undurchsichtig, braun (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäß, 15 ml, 120 x 17 mm, PP (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäß, 50 ml, 114 x 28 mm, PP (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Pasteurpipetten, 150 mm (VWR BDH Prolabo, Leuven, Belgien)
- Pipettenspitzen unterschiedlicher Volumina (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- ecoLab-Filtrationsvorsätze, steril, 30 mm, Por. 0,2 µm (neoLab, Heidelberg, Deutschland)
- Zellkultur-Mikroplatten (96-well-Format) (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- cellstar<sup>®</sup> tissue culture Flasks (T 75 75 cm<sup>2</sup>) (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Mikroliterpipetten unterschiedlicher Größen

## Geräte und Software:

- Begasungsbrutschrank BB16 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
- Biofuge 13 (Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland)
- EL 340 Microplate (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA)
- Laborzentrifuge 3K15 (Sigma, Osterode, Deutschland)
- Microflow Biological Safety Cabinet (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- MicroWin (Software) (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland)

- Neubauer Zählkammer (VWR BDH Prolabo, Leuven, Belgien)
- Olympus CK2 Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland)
- Vortex (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
- Graph Pad Prism 4. Version (Graph Pad Software, Inc.; California, USA)

### **Materialienliste für 3.4**

Chemikalien:

- Hanks' Salt Solution (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

- Zellkultur Schalen, 60 mm (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)

Geräte:

- UV-Bestrahlungsanlage (Dr.Gröbel UV-Elektronik, Ettlingen, Deutschland)
- UVA-Leuchtstofflampen Typ FLD 15 W/05 (Dr.Gröbel UV-Elektronik, Ettlingen, Deutschland)
- UVB-Leuchtstofflampen Typ F 15T8 (Dr.Gröbel UV-Elektronik, Ettlingen, Deutschland)
- UVA-Sensor RM-11UVA (Dr.Gröbel UV-Elektronik, Ettlingen, Deutschland)
- UVB-Sensor RM-11UVB (Dr.Gröbel UV-Elektronik, Ettlingen, Deutschland)
- Dosimeter UV-MAT zur Bestrahlungssteuerung (Dr.Gröbel UV-Elektronik, Ettlingen, Deutschland)
- Wärmetisch ME 12501 (MEDAX, Kiel, Deutschland)

### **Materialienliste für 3.5**

- 7-Aminoactinomycin D (Sigma, Missouri, USA)
- Unicam UV/VIS Spectrometer UV2 (ATI-UNICAM, Cambridge, UK)

### **Materialienliste für 3.9**

Bakterienstämme:

Alle Versuche wurden mit Bakterienstämmen durchgeführt, die am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie (LTH, interne Bezeichnung) der Universität Hohenheim vorhanden waren:

- Staphylococcus aureus (LTH 1493)
- Klebsiella oxytoca (LTH 645)
- Pseudomonas aeruginosa (LTH 6008)
- Salmonella Senftenberg (LTH 5703)

Nährmedien:

- Standard I: 15 g/l Trypton (Becton and Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- g/l Hefeextrakt (Becton and Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- g/l NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 1 g/l D(+)Glucose (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 0,85% NaCl 8,5 g/l (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Der pH-Wert wurde für die Untersuchungen mit dem Haut-Sekret der Flusspferde mit NaOH bei 7,5 und für die Versuche mit der Homogentisinsäure bei circa 7,3 eingestellt.

Für die Herstellung fester Nährböden wurde

- Standard-I-Agar: s. Standard I, zusätzlich 12 g/l Agar (Becton and Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Mueller-Hinton-II-Bouillon 22 g/l (Becton, Dickonson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- H<sub>2</sub>O, bidest.

verwendet.

Verbrauchsmaterialien:

- Petrischalen 92 x 16 mm mit Nocken (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zellkulturmikroplatten, 96-well-Format (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Einmal-Küvetten 1,5 ml halbmikro (Brand, Wertheim, Deutschland)
- 2,5-Dihydroxyphenylacetic Acid (Homogentisinsäure) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)



- Merck-pH Indikatorstäbchen (Universalindikator, pH 0-14) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Antibiotikatestblättchen für Photo (Ø 9 mm, Schleicher & Schuell – Whatman GmbH, Dassel, Deutschland)

Geräte:

- DU 640 Spectrophotometer (Beckmann, Fullerton, USA)
- MICROPLATE READER; Model 450 (Bio Rad, München, Deutschland)

**Materialienliste für 3.10.1**

High Performance Liquid Chromatography-Anlage:

- Pro Star pump 210 (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- UV-VIS Dual  $\lambda$  Absorbance Detector Waters 2487 (Waters, Arcade, New York, USA)
- Fluorescence Detector Waters 474 (Waters, Arcade, New York, USA)
- Autosampler Dynamax (Rainin, Oakland, USA)
- STAR chromatography workstation Version 5.31 HPLC software (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Vortex Genie (Bender und Hohbein AG, Zürich, Schweiz)
- Biofuge fresco (Hereaus Sepatech, Osterode, Deutschland)

Verbrauchsmaterial:

- Braune, undurchsichtige HPLC-Kunststoffvials mit Cap (VWR International GmbH, Bruchsal, Deutschland)

Extraktionsmittel für Carotinoide:

- 50 % Ethanol p.A. (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2 x 700  $\mu$ l n-Hexan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 100 mg Natriumchlorid pro Probe
- 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 6
- 12,55 g Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 1,29 g di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

- 40 mg Natriumazid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

#### Laufmittel für Carotinoide:

- 82 % Acetonitril (VWR International bvba/spri, Leuven, Belgien) (v/v)
- 15 % tert.-Butyl-methyl-ether (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (v/v)
- 3 % Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) (v/v)
- 0,02 % Triethylamin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (v/v)
- 0,0084 % Essigsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) (v/v)
- Reinsubstanz als Kalibrationsmittel (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

#### Materialienliste für 3.10.2

##### Material für HPLC-Analytik mit elektrochemischen Detektoren:

- Pro Star pump 9012 (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- UV-VIS Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Elektrochemischer Detektor Coulchem II (ESA, Chelmsford, USA)
- Autosampler (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- STAR chromatography workstation Version 5.31 HPLC software (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Vortex Genie (Bender und Hohbein AG, Zürich, Schweiz)
- Biofuge fresco (Hereaus Sepatech, Osterrode, Deutschland)

##### Verbrauchmaterial:

- Braune, undurchsichtige, HPLC-Kunststoffvials mit Cap (VWR International GmbH, Bruchsal, Deutschland)

##### Laufmittel:

- 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 2,5, mit 0,005% Natriumazid (Merck, Darmstadt, Deutschland) x 1 H<sub>2</sub>O
- 21,2 g Natrium-di-hydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland) x 1 H<sub>2</sub>O
- 2000 ml H<sub>2</sub>O reinst

- 100 mg Natriumazid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 3 ml 89 %ige o-Phosphorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Zum Zwischenspülen der Säule wurde Methanol (MeOH) / H<sub>2</sub>O, 50:50, (v/v) verwendet.

**A Lebenslauf****Anne Karen Dinah Lankisch**

- 14.06.1977      Geboren in Göttingen als Tochter von Dinah Lankisch,  
geb. Michaelsen und Paul Lankisch
- 1983-1987      Hainbund-Grundschule in Göttingen
- 1987-1989      Orientierungsstufe Stadtmitte in Lüneburg
- 1989-1997      Wilhelm-Raabe-Schule (Gymnasium) in Lüneburg,  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1997-2000      Ausbildung zur Tierärzthelferin in der Tierklinik  
Wahlstedt/Schleswig-Holstein
- 2000-2006      Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-  
Universität in München
- 02.02.2006      Staatsexamen Tiermedizin
- 01.02.2007      Approbation als Tierärztin
- April 2006      Beginn der Promotion an der Universität Hohenheim in Stuttgart
- 08.02.2008      Tag der Promotion

## **B Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Hans Konrad Biesalski, Direktor des Instituts für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, für die Überlassung des Themas und eines Laborplatzes, sowie für die Hilfe bei der Kommunikation zwischen den einzelnen Instituten, an denen experimentelle Arbeiten durchgeführt worden sind.

Herrn Professor Dr. Walter Rambeck, Institut für Physiologische Chemie und Tierernährung, danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Themas an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und seine hilfreichen Hinweise bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Vor allem Herrn Dr. Dr. Christoph Hinterseher, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München und Herrn Dr. Dirk Schilling, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, gilt mein größter Dank für ihre fabelhafte Unterstützung dieser Arbeit, ihre Ideen, ihre Kreativität, Motivation, Verständnis, ihren Antworten zu jeder Tages- und Nachtzeit. Durch alle Höhen und Tiefen haben sie mich begleitet und mir immer wieder das Ziel vor Augen geführt. Aber nicht nur dafür bin ich ihnen dankbar, sondern auch für ihre Freundschaft.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Andrea Flaccus, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, die mich durch alle Schwierigkeiten des „Zelllebens“ begleitet und unermüdlich unterstützt hat.

Auch Herrn Michael Wolter, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, möchte ich herzlichst für die unendlichen HPLC-Läufe, die Ideen und die Unterstützung danken.

Ferner danke ich Herrn Wolfgang Stütz, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim für die freundliche „Thiamin-Unterstützung“.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Dr. Tobias Jung für vielerlei Hilfestellung im „Uni-Alltag“, insbesondere in Computerfragen.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. Uwe Beifuß, Leiter des Instituts für Chemie, Fachgebiet Bioorganische Chemie, Universität Hohenheim, für die hervorragende Kooperation. Mein Dank gilt besonders seinen Mitarbeitern Herrn Dr. Jürgen Conrad, Frau Sabine Mika und Frau Iris Klaiber. Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. Jürgen Conrad für seine unendlichen Bemühungen mit seinem Wissen und der entsprechenden Technik, das „Letzte“ aus den Proben zu holen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Herbert Schmidt, Leiter des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittel-mikrobiologie, Universität Hohenheim für das stetige Interesse am Fortschreiten dieser Arbeit und seine immer freundliche, geduldige Betreuung hinsichtlich der „Bakterien“. Ein Dankeschön auch an seine Mitarbeiterin Frau Claudia Lis für die freundliche Durchführung der Untersuchungen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. Lutz Fischer, Leiter des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Biotechnologie, Universität Hohenheim und besonders seiner Mitarbeiterin Frau Anja Manns für die Messungen der Enzymaktivität.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Professor Dr. Dr. Reinhold Carle, Leiter des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, Universität Hohenheim, und besonders seinem Mitarbeiter Herrn Dr. Dietmar Kammerer für die freundlichen MS-Messungen.

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. Jörn Breuer, Leiter der Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie, Abteilung Boden- und Düngemitteluntersuchung, der

Universität Hohenheim, und besonders seinen Mitarbeiterinnen, Frau Bärbel Horn und Frau Andrea Ruf, für die Messungen der Mengen- und Spurenelementen.

Ferner danke ich Frau Professor Dr. Heike Mertsching und Frau Dr. Michaela Weimer des Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik der Fraunhofer Gesellschaft in Stuttgart für zellkulturelle Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt dem Zootierarzt der Wilhelma- dem Zoologisch-Botanischen Garten in Stuttgart, Herrn Dr. Rietschel für die freundliche Erlaubnis zur Durchführung der Probennahmen und dem geduldigen, netten Pfligenteam der Flusspferde.

Ein weiterer besonderer Dank gilt dem zoologischen Leiter des Zoos Hannover, Herr Dr. Heiner Engel, dem Zootierarzt Dr. Andreas Knieriem und dem ebenfalls sehr nettem Pfligenteam für die freundliche Unterstützung zur Durchführung der Probennahme an den Flusspferden. Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Frau Petra Kauzaninkat und Herrn Heinrich Grütter.

Ein symbolisches „Danke“ geht an meine „Probanden“, ohne die die Anfertigung dieser Dissertation gar nicht möglich gewesen wäre. Ich danke Rosi, Mike, Zora, Kiboko, Habari, Cherry, Himba, Victoria und dem „kleinen“ Fridolin für die erlebnisreiche, faszinierende und unvergessliche Zeit.

Barbara und Dr. Victor Martinez danke ich sehr für die bereitwillige, kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder Tim und Antje für die jahrelange Unterstützung, die Motivation, das in mich gesetzte Vertrauen und den Zuspruch während des Studiums und der Anfertigung dieser Dissertation.