

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**Ultrastrukturelle, glykohistochemische und
immunhistochemische Untersuchungen am Blut des
Haushuhnes (*Gallus gallus domesticus*)**

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

von Heike Katharina Gantert
aus Donaueschingen

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Für Silke

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	9
II. LITERATURÜBERSICHT	11
1. Allgemeines zum Blut des Huhnes	11
2. Beschreibung der einzelnen Blutzellen	13
2.1. Erythrozyten.....	13
2.1.1. Allgemeines.....	13
2.1.2. Morphologie.....	14
2.1.3. Aufgaben.....	14
2.2. Thrombozyten.....	15
2.2.1. Allgemeines.....	15
2.2.2. Morphologie.....	15
2.2.3. Aufgaben.....	17
2.3. Leukozyten.....	18
2.3.1. Heterophile Granulozyten	18
2.3.1.1. Allgemeines	18
2.3.1.2. Morphologie	19
2.3.1.3. Aufgaben	20
2.3.2. Eosinophile Granulozyten.....	21
2.3.2.1. Allgemeines	21
2.3.2.2. Morphologie	21
2.3.2.3. Aufgaben	22
2.3.3. Basophile Granulozyten.....	23
2.3.3.1. Allgemeines	23
2.3.3.2. Morphologie	23
2.3.3.3. Aufgaben	24
2.3.4. Lymphozyten	24
2.3.4.1. Allgemeines	24
2.3.4.2. Morphologie	25
2.3.4.3. Aufgaben	26
2.3.5. Monozyten.....	27
2.3.5.1. Allgemeines	27
2.3.5.2. Morphologie	27
2.3.5.3. Aufgaben	28

3. Glykohistochemie	29
3.1. Allgemeines	29
3.1.1. Definition und Herkunft der Lektine.....	29
3.1.2. Einteilung und Bindungseigenschaften der Lektine.....	30
3.1.3. Funktion und Anwendung der Lektine.....	31
3.2. Zuckerstrukturen und Lektinbindungsstellen auf den Blutzellen des Huhnes...32	
4. Immunhistochemie	35
4.1. Allgemeines	35
4.2. Spezifische Antigene der T-Lymphozyten	35
4.3. Zytoskelett der Vogelblutzellen.....	36
4.3.1. Allgemeines.....	36
4.3.2. Zytoskelettale Elemente der einzelnen Blutzellen	37
4.3.2.1. Erythrozyten.....	37
4.3.2.2. Thrombozyten	38
4.3.2.3. Leukozyten.....	40
III. MATERIAL UND METHODEN	42
1. Untersuchungsmaterial	42
2. Lichtmikroskopische Färbungen	44
2.1. Haema-Schnellfärbung (Diff-Quick).....	44
2.2. Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung.....	44
2.3. May-Grünwald-Färbung	45
2.4. Giemsa-Färbung	45
2.5. Panoptische Färbung nach Pappenheim.....	46
2.6. Sirius-Red-Färbung.....	46
2.7. Toluidinblau-Färbung	47
2.8. Periodic acid Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)	47
2.9. Alcianblau-Färbung	48
3. Elektronenmikroskopie.....	49
4. Glykohistochemie	51
4.1. FITC markierte Lektine.....	51
4.2. Biotinylierte Lektine	53
4.3. Vorbehandlung mit Hemmzuckern	54
4.4. Vorbehandlung mit Neuraminidase	55

5. Immunhistochemie	56
5.1. Immunhistochemische Untersuchungen spezifischer Antigene der T-Lymphozyten	56
5.2. Immunhistochemische Identifizierung der eosinophilen Granulozyten.....	57
5.3. Untersuchungen des Zytoskeletts	59
5.3.1. Histochemischer Nachweis von Aktin mit Phalloidin-TRITC.....	59
5.3.2. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin.....	60
 IV. ERGEBNISSE	62
 1. Blutbilder der untersuchten Hühner	62
 2. Ergebnisse der lichtmikroskopischen Färbungen.....	64
2.1. Erythrozyten.....	64
2.2. Thrombozyten	66
2.3. Heterophile Granulozyten.....	69
2.4. Eosinophile Granulozyten	74
2.5. Basophile Granulozyten	78
2.6. Lymphozyten.....	81
2.7. Monozyten	84
 3. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie	88
3.1. Erythrozyten.....	88
3.2. Thrombozyten	89
3.3. Heterophile Granulozyten.....	90
3.4. Eosinophile Granulozyten	91
3.5. Lymphozyten.....	92
3.6. Monozyten	93
 4. Ergebnisse der Glykohistochemie.....	95
4.1. D-Mannose und D-Glukose spezifische Lektine	95
4.1.1. Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA)	95
4.1.2. Bindung von Lens culinaris Agglutinin (LCA)	99
4.1.3. Bindung von Pisum sativum Agglutinin (PSA).....	102
4.2. D-Galaktose spezifische Lektine	105
4.2.1. Bindung von Peanut Agglutinin (PNA)	105
4.2.2. Bindung von Ricinus communis Agglutinin (RCA).....	107
4.2.3. Bindung von Viscum album Agglutinin (VAA)	109
4.3. N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifische Lektine	110
4.3.1. Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSL I)	110

4.3.2.	Bindung von Sophora japonica Agglutinin (SJA).....	110
4.3.3.	Bindung von Soybean Agglutinin (SBA).....	110
4.3.4.	Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA).....	110
4.4.	D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifische Lektine.....	112
4.4.1.	Bindung von Sambucus nigra Agglutinin (SNA).....	112
4.5.	N-Acetyl-D-Glukosamin und N-Acetyl-D-Neuraminsäure spezifische Lektine.....	116
4.5.1.	Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA).....	116
4.6.	N-Acetyl-D-Glukosamin spezifische Lektine.....	120
4.6.1.	Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs).....	120
4.7.	L-Fukose spezifische Lektine.....	123
4.7.1.	Bindung von Ulex europaeus Agglutinin I (UEA I).....	123
4.8.	Für Oligosaccharide spezifische Lektine.....	123
4.8.1.	Bindung von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E).....	123
4.8.2.	Bindung von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L).....	125
4.8.3.	Bindung von Maackia amurensis Agglutinin I - Leukoagglutinin (MAA I).....	127
4.9.	Ergebnisse der Vorbehandlung mit Hemmzuckern.....	129
4.10.	Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	131
5.	Ergebnisse der Immunhistochemie.....	132
5.1.	Nachweis spezifischer Antigene der T-Lymphozyten.....	132
5.2.	Nachweis spezifischer Antigene der eosinophilen Granulozyten.....	134
5.3.	Ergebnisse der Untersuchungen des Zytoskeletts.....	135
5.3.1.	Nachweis von Aktin.....	135
5.3.2.	Nachweis von Vimentin.....	139
5.3.3.	Nachweis von Tubulin.....	142
5.3.4.	Nachweis von Myosin.....	145
5.3.5.	Nachweis von Zytokeratin.....	145
V.	DISKUSSION.....	146
1.	Blutproben.....	146
2.	Lichtmikroskopische Färbungen.....	147
3.	Elektronenmikroskopie.....	153
4.	Glykohistochemie.....	157

5. Immunhistochemie	165
5.1. Immunhistochemische Untersuchungen spezifischer Antigene der T-Lymphozyten und der eosinophilen Granulozyten	165
5.2. Untersuchungen des Zytoskeletts	166
VI. ZUSAMMENFASSUNG	171
VII. SUMMARY	174
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	176
IX. ANHANG	188
1. Verzeichnis der Gebrauchslösungen	188
1.1. Lichtmikroskopie	188
1.2. Elektronenmikroskopie	190
1.3. Glykohistochemie	193
1.4. Immunhistochemie	194
2. Tabellenverzeichnis	195
3. Bildverzeichnis	197
X. DANKSAGUNG	204

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abk.	Abkürzung
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua dem.	Aqua demineralisata
BCR	B cell receptor
ca.	circa
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
CD	Cluster of differentiation
ConA	Concanavalin Agglutinin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
EM	Elektronenmikroskopie
EMBP	Eosinophil major basic protein
ERY	Erythrozyt
F-Aktin	filamentöses Aktin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fuc	fucose
G-Aktin	globuläres Aktin
Gal	galactose
GalNAc	N-acetylgalactosamine
GHC	Glykohistochemie
Glc	glucose
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GP	Glykoprotein
GSL I	Griffonia simplicifolia Agglutinin I

H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HKT	Hämatokrit
IHC	Immunhistochemie
KGW	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
krist.	kristallin
LB	Lohmann Brown
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LEU	Leukozyt
LM	Lichtmikroskopie
LSL	Lohmann Selected Leghorn
m	männlich
M	Molar
MAA I	Maackia amurensis Agglutinin I
Man	mannose
Min	Minute
Neu5Ac	N-acetylneuraminic acid
OT	Objektträger
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RCA	Ricinus communis Agglutinin

rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SB	scale bar
SBA	Soybean Agglutinin
SJA	Sophora japonica Agglutinin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
TCR	T cell receptor
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UEA I	Ulex europaeus Agglutinin I
U/Min	Umdrehungen/Minute
VAA	Viscum album Agglutinin
w	weiblich
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert

I. EINLEITUNG

Was war zuerst da: Die Henne oder das Ei? Dieses Rätsel konnte bis heute nicht sicher gelöst werden. Fest steht jedoch, dass der Vorfahre unserer Haushühner das aus Asien stammende Bankivahuhn ist. Hühner wurden bereits vor 4000 bis 5000 Jahren domestiziert und gehören somit zu den ältesten Nutztieren der Menschen. In der heutigen Zeit zählen sie zu den am intensivsten genutzten Haustieren. Durch moderne Zuchtmethoden entstanden hochleistungsfähige Mast- und Legehybriden, um der steigenden Nachfrage nach Eiern und Hühnerfleisch gerecht zu werden. Die wirtschaftliche Bedeutung von Hühnern beruht jedoch nicht ausschließlich auf der Produktion von Eiern und Fleisch, auch in der Forschung sind Hühner als Modellorganismus von Bedeutung.

Da die Leistungsfähigkeit eines Bestandes stark von der Gesundheit der Tiere abhängt, ist die Krankheitsdiagnostik und Prophylaxe von Infektionen von großer Bedeutung. Auf Grund der Tatsache, dass Vögel bis spät in den Krankheitsprozess meist keine oder nur unspezifische Symptome zeigen, kann die Blutuntersuchung nützliche Einblicke in den Gesundheitsstatus der Tiere geben und gilt als wichtiges, wenig invasives diagnostisches Hilfsmittel. Um jedoch Abweichungen und damit eventuell zusammenhängende Erkrankungen erkennen zu können, ist das Wissen über die normale Hämatologie gesunder Hühner von Bedeutung. Im Jahre 1961 verfassten Lucas und Jamroz die erste vergleichende Beschreibung der verschiedenen Hühnerblutzellen. Seitdem untersuchten verschiedene Autoren zahlreiche Aspekte der Blutzellen des Huhnes. Eine umfassende ultrastrukturelle und histochemische Untersuchung der Hühnerblutzellen liegt bis heute jedoch nicht vor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die ultrastrukturelle, glykohistochemische und immunhistochemische Charakterisierung der Blutzellen des Huhnes und die Gewinnung weiterer Erkenntnisse über deren genauen Aufbau. Zunächst gibt eine Literaturübersicht einen Überblick über den aktuellen Forschungsstand und bietet sogleich die Grundlage für eine kritische Bewertung der eigenen Befunde. Anschließend werden die Morphologie und die Ultrastruktur der Blutzellen anhand lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Methoden dargestellt und analysiert. Mit Hilfe von markierten Pflanzenlektinen werden die verschiedenen Zuckerstrukturen auf den Hühnerblutzellen ermittelt. Der Nachweis spezifischer Antigene der Blutzellen sowie der zytoskelettalen Elemente erfolgt mittels immunhistochemischer Methoden.

Die vorliegende Arbeit bietet einen Gesamtüberblick über die ultrastrukturellen und histochemischen Eigenschaften der Hühnerblutzellen und steht somit im Dienste weiterführender Forschung.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Allgemeines zum Blut des Huhnes

Das Blut der Vögel unterscheidet sich vom Säugerblut hauptsächlich durch die kernhaltigen Erythrozyten und Thrombozyten sowie durch die heterophilen Granulozyten als Äquivalent zu den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere.

Das Blut hat zahlreiche Aufgaben. Es führt Elektrolyte, Nährstoffe, Atemgase Wasser und Hormone zu den Körperzellen und dient dem Abtransport der Stoffwechselendprodukte zu den Ausscheidungsorganen (Jain, 1993). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr des Körpers, bei der Gerinnung sowie bei der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts und der Körpertemperatur (Sinowatz und Hees, 2006).

Das Blutvolumen der Vögel beträgt in etwa 6%-12% des Körpergewichts (Campbell und Ellis, 2007). Die Werte variieren je nach Spezies (Sturkie, 1976) und Geschlecht. Dabei sind das Blutvolumen ($6,3 \pm 0,4$ ml/100g KGW) und das Plasmavolumen ($4,4 \pm 0,3$ ml/100g KGW) von den weiblichen Tieren der Rasse Lohmann Selected Leghorn höher als das Blutvolumen ($5,6 \pm 0,5$ ml/100g KGW) und das Plasmavolumen ($3,1 \pm 0,4$ ml/100g KGW) der Hähne (Bond und Gilbert, 1958).

Hühner können aufgrund einer schnellen Mobilisation von extrazellulärer Flüssigkeit einen großen Blutverlust besser tolerieren als Säugetiere (Ploucha et al., 1981). Die Menge der mobilisierten Flüssigkeit beträgt während den ersten 90 Minuten nach dem Blutverlust bei Hühnern 13-17% des Ausgangsblutvolumens und ist damit doppelt so hoch wie beim Hund (Hebert et al., 1989).

Das Blut setzt sich aus einem zellulären Anteil, den Blutzellen und einem flüssigen Anteil, dem Blutplasma, zusammen (Sinowatz und Hees, 2006). Der zelluläre Anteil des Blutes besteht aus den Erythrozyten, den Thrombozyten (Spindelzellen) und den Leukozyten. Die Leukozyten werden unterteilt in die Lymphozyten, Monozyten und heterophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Das Blutplasma besteht im Wesentlichen aus Wasser und Proteinen (Sinowatz und Hees, 2006), wobei der aviäre Plasmaproteingehalt weit unter dem Wert des Menschen liegt (Prinzinger und Misovic, 1994). Das Plasmaprotein setzt sich in erster Linie aus verschiedenen Gerinnungsfaktoren und Immunglobulinen zusammen (Jain, 1993). Außerdem sind im Plasma

zahlreiche weitere Stoffe wie Kohlenhydrate, stickstoffhaltige Nichtproteine, Lipide, Fettsäuren, Hormone, Enzyme, anorganische Bestandteile und Elektrolyte in Lösung (Prinzinger und Misovic, 1994). Vögel weisen aufgrund ihres hohen Energieumsatzes einen ungefähr doppelt so hohen Blutglukosewert wie Säugetiere auf (Prinzinger und Misovic, 1994).

Vögel haben einen mittleren Hämatokritwert von $45 \pm 7,1\%$. Die Werte reichen von 25% bei einem jungen weiblichen Haushuhn bis zu 62% bei der Taube (Prinzinger und Misovic, 1994). Dabei ist der Hämatokritwert männlicher Haushühner (40,8%) höher als der der weiblichen Tiere (25,5%) (Prinzinger und Misovic, 1994). Außerdem haben kleine Vogelarten mit einem hohen Stoffwechsel einen höheren Hämatokritwert als große Arten. Somit verhält sich der Hämatokritwert proportional zum Stoffwechsel (Prinzinger und Misovic, 1994).

Die verschiedenen Blutwerte werden nicht nur von Faktoren wie Geschlecht, Stoffwechsel und Spezies beeinflusst. Auch der Einfluss von Alter, Jahreszeit, Tageszeit, Ernährung, Fortpflanzung, Krankheit und Erregungszustand spielen eine Rolle (Jain, 1993). So sind zum Beispiel jahreszeitliche Veränderungen des Blutbildes, wie z.B. der Erythrozytenzahl, des Hämatokritwerts, der Lymphozytenzahl und der Heterophilenzahl (Dobšinský und Dobšinská, 1976) und tageszeitliche Schwankungen der Lymphozyten, Monozyten und heterophilen Granulozyten bekannt (Maxwell, 1981). Bei Hühnern sind darüber hinaus die Erythrozytenzahl und der Hämatokritwert in der Dunkelheit höher als in der Helligkeit (Zhou et al., 1998). Auffallend sind auch die Altersunterschiede der Referenzwerte. Die Erythrozytenzahl, der Hämoglobinwert und der Hämatokritwert sind in der Regel bei jungen Vögeln niedriger als bei adulten (Jain, 1993; Howlett et al., 2002). Außerdem haben unterernährte Greifvögel niedrigere Hämatokrit- und Plasmaproteinwerte als gut genährte Vögel (Ferrer et al., 1987). Generell sind Blutvolumen, Plasmavolumen, Erythrozytenvolumen und Hämoglobinkonzentration bei Wasservögeln in Relation zum Körpergewicht höher als bei Nichtwasservögeln (Bond und Gilbert, 1958).

2. Beschreibung der einzelnen Blutzellen

2.1. Erythrozyten

2.1.1. Allgemeines

Die Anzahl der kernhaltigen Erythrozyten im Blut der Vögel beträgt im Durchschnitt $3,30 \pm 1,12 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Prinzinger und Misovic, 1994). Bei Hühnern beträgt die Erythrozytenzahl beim weiblichen Tier $2,7-3 \times 10^6/\mu\text{l}$ und beim männlichen Tier $3,2-3,8 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Hodges, 1977). Testosteron bewirkt einen Anstieg der Erythrozytenzahl im Vogelblut, während Östrogen ein Absinken bewirkt. Letzterer Effekt liegt vermutlich an einer Änderung der Knochenmarksaktivität (Taber und Davis, 1943; Hebert et al., 1989). Die männlichen Tiere der Rasse Lohmann Selected Leghorn haben zudem ein höheres Erythrozytenvolumen und eine höhere Hämoglobinkonzentration als die Hennen (Bond und Gilbert, 1958). Auch das Alter beeinflusst die Erythrozytenzahl und den Hämoglobinwert. Bei jungen Vögeln sind letztere in der Regel niedriger als bei den adulten (Jain, 1993; Howlett et al., 2002). Außerdem nimmt die Erythrozytenzahl mit zunehmender Körpergröße ab, während das Volumen der Erythrozyten zunimmt (Prinzinger und Misovic, 1994). Das Erythrozytenvolumen korreliert mit dem Sauerstoffbedarf der Vögel: Kleinere Erythrozyten können effektiver Sauerstoff transportieren als große Erythrozyten (Prinzinger und Misovic, 1994). Darüber hinaus ist die Erythrozytenzahl bei steigendem Energiebedarf, wie z.B. bei Zugvögeln oder bei Kälte erhöht (Prinzinger und Misovic, 1994).

Die Lebensdauer der Erythrozyten des Haushuhnes beträgt 28-35 Tage (Sturkie, 1986) und liegt damit weit unter der Lebensdauer der Erythrozyten der Säugetiere. Dies ist auf einen doppelt so hohen Stoffwechsel der kernhaltigen Zellen und auch auf den höheren Stoffwechsel und die höhere Körpertemperatur der Vögel zurückzuführen (Prinzinger und Misovic, 1994). Aviäre Erythrozyten verbrauchen bei Raumtemperatur das Sieben- bis Zehnfache an Sauerstoff als die Säugererythrozyten (Lumeij, 1987). Darüber hinaus besitzt der aviäre Erythrozyt eine geringere Deformierbarkeit und eine höhere Konzentration an freiem zytoplasmatischem Hämoglobin als die Erythrozyten der Säugetiere (Smith et al., 2000).

2.1.2. Morphologie

Die Erythrozyten der Hühner sind abgeflachte, ovale Zellen mit einem zentralen, elliptischen Zellkern. Die Größe der Vogelerythrozyten beträgt je nach Spezies 10-18 x 5-7 x 2,4-3,8 µm. Die Maße des Zellkerns variieren mit Werten von 5-7 x 2,5 x 1,5-2,5 µm (Prinzinger und Misovic, 1994). Somit sind die Erythrozyten der Vögel, verglichen mit denen der Reptilien und Amphibien, die kleinsten kernhaltigen Erythrozyten (Prinzinger und Misovic, 1994).

Mit einem Anteil von bis zu 5% der Gesamterythrozytenpopulation finden sich unreife Erythrozyten im zirkulierenden Blut (Campbell und Ellis, 2007). Sie färben sich eher basophil an und besitzen einen runderen Zellkern mit weniger stark kondensiertem Chromatin (Campbell und Dein, 1984; Campbell, 1988; Campbell 2004). Sehr selten sind im Vogelblut auch zellkernlose Erythrozyten (Erythroplastid) zu finden (Canfield, 1998).

Lichtmikroskopisch stellen sich im Zytoplasma der Erythrozyten in Zellkernnähe meist ein paar rötlich-braune Körperchen dar (Forkner, 1929). Außerdem färben sich mit Janusgrün fast immer einige bläulich-grüne stäbchenförmige Mitochondrien an (Forkner, 1929).

Elektronenmikroskopisch ist in den Erythrozyten ein gleichmäßiger Zellkern mit einem weiten perinukleären Raum zu erkennen (Schumacher, 1965). In einem sehr geringen Anteil der Zellkerne der Hühnererythrozyten finden sich unter dem Elektronenmikroskop granuläre Komplexe. Hierbei handelt es sich um einen amorphen Bereich, in dem sich etliche große Granula (ca. 30 nm) befinden. Die Aufgabe dieser granulären Gefüge ist vermutlich die Speicherung von Stoffen, die in inaktiven Erythrozytenzellkernen nicht mehr gebraucht werden (Pearson und Davies, 1982). Im Zytoplasma der Erythrozyten stellen sich elektronenmikroskopisch Mitochondrien, Komponenten des Zytoskeletts und bei juvenilen Erythrozyten auch vereinzelt Ribosomen dar (Schumacher, 1965; Harris und Brown, 1971; Barrett und Dawson, 1974; Hodges, 1977). Hauptbestandteil der Erythrozyten ist mit 60-90% der Trockensubstanz das Hämoglobin. Im Kern liegt weniger als 1% des Gesamthämoglobins vor (Davies, 1961; Prinzinger und Misovic, 1994).

2.1.3. Aufgaben

Die Hauptfunktion der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff (Passantino et al., 2007). Dabei besitzt das aviäre Hämoglobin ein geringeres Sauerstoffbindungsvermögen als das der Säugetiere (Hebert et al., 1989). Durch

die niedrigere Affinität zum Sauerstoff kann dieser schneller an das Gewebe abgegeben werden (Coates, 1975). Die Sauerstoffbindungsaffinität ist beim Vogel durch den pH-Wert des Blutes reguliert (Isaacks et al., 1980). Die Erythrozyten sind aber nicht nur für den Transport von Sauerstoff verantwortlich, bei Hühnern können sie auch durch die Freisetzung von Zytokinen bei manchen Immunantworten unterstützend mitwirken (Passantino et al., 2007). Da die aviären Erythrozyten einen Zellkern besitzen, sind sie nicht wie die kernlosen Säugererythrozyten auf die anaerobe Glykolyse angewiesen, sondern können Fette und Proteine aerob verstoffwechseln (Hazelwood, 1986).

2.2. Thrombozyten

2.2.1. Allgemeines

Die kernhaltigen aviären Thrombozyten, auch als Spindelzellen bezeichnet, sind nach den Erythrozyten die zweithäufigsten Blutzellen im Vogelblut (Campbell und Ellis, 2007). Sie entsprechen funktionell den Blutplättchen der Säugetiere (Lucas und Jamroz, 1961). Im Blutausschlag liegen die Thrombozyten einzeln oder gelegentlich auch in Gruppen von mehreren aggregierten Zellen vor (Forkner, 1929; Jain, 1993). Die Lebensdauer eines Hühnerthrombozyten ist sehr kurz, sie beträgt *in vitro* nur ein paar Stunden (Lam, 1997).

Die Thrombozytenzahl der Vögel beträgt zwischen 20.000 und 30.000 pro μl Blut (Fox und Solomon, 1981; Campbell, 1995). Andere Autoren geben Thrombozytenzahlen bis zu 40.000 pro μl Blut an (Jain, 1993; Prinzing und Misovic, 1994). Bei der Wachtel beträgt der Wert bis zu 130.000 pro μl Blut (Prinzing und Misovic, 1994). Die genaue Thrombozytenzahl ist jedoch schwierig zu ermitteln, da die Thrombozyten zur Aggregation neigen (Lucas und Jamroz, 1961; Campbell, 1984; Zinkl, 1986). Bei der Zahl der Thrombozyten sind beim Huhn keine Altersunterschiede zu erkennen (Janzarik, 1981; Prinzing und Misovic, 1994). Jedoch haben weibliche Hühner im Schnitt eine höhere Thrombozytenzahl als die männlichen Tiere (Janzarik, 1981).

2.2.2. Morphologie

Die Thrombozyten der Vögel sind kleine, runde bis ovale Zellen. Ihre Größe beträgt $6-10 \times 4-7 \mu\text{m}$ (Prinzing und Misovic, 1994), bzw. $3-5 \times 2-4,5 \mu\text{m}$ (Wirth, 1950). Die aviären Thrombozyten besitzen einen rundlichen bis ovalen Zellkern

mit dicht gepacktem Chromatin (Lucas und Jamroz, 1961; Campbell, 1984). Die Maße des Nukleus werden mit $3,4 \times 2 \mu\text{m}$ angegeben (Schumacher, 1965).

Das Zytoplasma der Thrombozyten stellt sich lichtmikroskopisch farblos bis hellgrau dar. Im Gegensatz dazu haben die kleinen Lymphozyten ein basophileres und weniger umfangreiches Zytoplasma und können so von den Thrombozyten differenziert werden (Maxwell, 1974; Campbell und Ellis, 2007). Im Zytoplasma der Spindelzellen befinden sich zahlreiche Vakuolen unterschiedlicher Größe und Formen, aufgrund derer letzteres netzartig, bzw. blasig erscheinen kann (Grecchi et al., 1980). Die Vakuolen kommen vor allem bei aktivierten oder phagozytierenden Thrombozyten vor (Fox und Solomon, 1981). Häufig enthält das Zytoplasma an den Zellpolen außerdem kleine spezifische, eosinophile Granula (Campbell und Ellis, 2007).

Die Thrombozyten der Vögel reagieren mit der Grimelius-Färbemethode und bei der Periodic acid Schiff (PAS)-Reaktion positiv (Swayne et al., 1986). Sie enthalten demnach Serotonin und komplexe Kohlenhydrate, wie z.B. Glykogen. Bei einer Aktivierung der Thrombozyten neigen diese zur Aggregation und zeigen eine unregelmäßige Zelloberfläche mit Pseudopodien, eine Degranulation ihrer spezifischen Granula oder einen pyknotischen Zellkern (Lucas und Jamroz, 1961; Carlson et al., 1968; Janzarik, 1981; Canfield, 1998; Latimer und Bienzle, 2000; Campbell und Ellis, 2007). Im Falle eines erhöhten Thrombozytenverbrauches können im zirkulierenden Blut zudem unreife Zellformen zu finden sein. Sie sind größer und haben ein basophileres Zytoplasma (Canfield, 1998).

Die Zellorganellen der Spindelzellen befinden sich meist in der Nähe der Zellkernmembran (Maxwell, 1974). Elektronenmikroskopisch sind im Zytoplasma der Hühnerthrombozyten Vakuolen, endoplasmatisches Retikulum, kleine Mitochondrien, ein deutlich ausgebildeter Golgi-Apparat, Lysosomen, zahlreiche Vesikel, ein paar freie Ribosomen und einzelne elektronendichte glykogenhaltige Granula zu erkennen (Schumacher, 1965; Sweeny und Carlson, 1968; Carlson et al., 1968; Maxwell, 1974). Die Vakuolen werden von einem osmiophilen, unregelmäßig verteilten Material begrenzt (Schumacher, 1965). Manche größere Vakuolen beinhalten elektronendichtes Material (Maxwell, 1974). Außerdem sind gelegentlich Glykogenrosetten und sehr selten kleine fettähnliche Tropfen im Zytoplasma vorhanden (Maxwell, 1974). Ein charakteristisches Merkmal der Thrombozyten ist weiterhin ein Bündel von Mikrotubuli unterhalb der Zellmembran (Maxwell, 1974; Grecchi et al., 1980). Darüber hinaus sind ultrastrukturell zytoplasmatische Einschlüsse zu erkennen. Sie stellen sich als

vielschichtige Myelin-ähnliche Gebilde und elektronendichte bläschenförmige Körperchen dar (Sweeny und Carlson, 1968; Carlson et al., 1968; Grecchi et al., 1980). Bei den elektronendichten bläschenförmigen Körperchen handelt es sich vermutlich um die spezifischen, eosinophilen Granula, die unter dem Lichtmikroskop erkennbar sind (Sweeny und Carlson, 1968). Sie erscheinen elektronenmikroskopisch nicht homogen, sondern zunächst als Ansammlung von mehreren kleinen Granula (Campell und Ellis, 2007). Nach ihrer Degranulation hinterlassen sie die bläschenförmigen Gebilde im Zytoplasma (Sweeny und Carlson, 1968; Kuruma et al., 1970). Die spezifischen Granula beinhalten in erster Linie Serotonin (5-Hydroxytryptamin) (Hodges, 1977) und entsprechen den „dense bodies“ der Säuger (Kuruma et al., 1970).

Der Zellkern der Thrombozyten weist unter dem Elektronenmikroskop eine ungleichmäßige Verteilung des Kernchromatins auf. Dabei ist das Heterochromatin umfangreicher vertreten als das Euchromatin. In den Verdichtungszone des Chromatins befinden sich runde bis ovale Aufhellungen (Schumacher, 1965; Maxwell, 1974). Außerdem ist die äußere Kernmembran deutlich gewellt (Schumacher, 1965).

2.2.3. Aufgaben

Die aviären Thrombozyten bilden durch Aggregation und Adhäsion einen primären Thrombus und nehmen dabei dieselbe Funktion ein wie die Blutplättchen der Säugetiere (Lucas und Jamroz, 1961; Edmonds, 1968; Bounous und Stedman, 2000). Dabei verläuft die Hämostase beim Vogel wesentlich schneller als beim Säuger (Stopforth, 1970; Prinzinger und Misovic, 1994). Bereits zehn Sekunden nach der Gefäßläsion erfolgt in vivo die Bildung von Fibrin (Belleville et al., 1982).

Die Spindelzellen spielen aber nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Blutgerinnung, sondern sind auch bei der unspezifischen Immunabwehr beteiligt, da sie zur Phagozytose fähig sind (Sweeny und Carlson, 1968; Wigley et al., 1999). Dabei scheint die Phagozytose die Thrombenbildung nicht störend zu beeinflussen (Edmonds, 1970). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hühnerthrombozyten gram-positive Bakterien und andere Bakterienstämme (Carlson et al., 1968; Wigley et al., 1999), Newcastle disease Viren (Lam, 1997) und Fremdmaterialien, wie kolloidalen Kohlenstoff, Latexpartikel und Farbstoffe phagozytieren können (Carlson et al., 1968; Grecchi et al., 1980; Lam, 1997; Wigley et al., 1999). Dabei

zeigen die Thrombozyten der Hühner eine geringere Phagozytoseleistung als die heterophilen Granulozyten (Wigley et al., 1999). In phagozytierenden Thrombozyten kommt es zu einem Anstieg der Sauerstoffradikalproduktion (oxidativer Burst) (Wigley et al., 1999). Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen wurde bei Hühnerthrombozyten auch nach der Bindung des monoklonalen Antikörpers 11C3 an das aviäre Äquivalent des Thrombozyten-Integrins GPIIb-IIIa entdeckt (Corbel et al., 1995). Ein Beleg für die Phagozytoseleistung der Thrombozyten sind außerdem die saure-Phosphatase-positiven Lysosomen im Zytoplasma der Zellen (Sweeny und Carlson, 1968; Taffarel und Oliveira, 1993). Die Hühnerthrombozyten besitzen außerdem einen C3b-Rezeptor (Bounous und Stedman, 2000).

Des Weiteren sind die Hühnerthrombozyten in der Lage, Proteine zu synthetisieren. Darunter sind auch die Glykoproteine IIb und IIIa, die wie bei den humanen Blutplättchen auf der Zelloberfläche der Thrombozyten sitzen (Kunicki und Newman, 1985). Die kernhaltigen Zellen enthalten also höchstwahrscheinlich mRNA, die für diese Proteine codiert (Kunicki und Newman, 1985).

2.3. Leukozyten

Die Leukozyten werden unterteilt in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Bei letzteren wird zwischen heterophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten unterschieden.

Die Gesamtleukozytenzahl der Vögel beträgt $9-32 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Cray, 2000; Pollack et al., 2005). Dabei ist die Leukozytenzahl abhängig von Geschlecht und Alter: Bei weiblichen Vögeln sind die Leukozytenzahlen höher als bei den männlichen Tieren (Prinzinger und Misovic, 1994) und juvenile Vögel weisen höhere Leukozytenzahlen auf als die adulten (Howlett et al., 2002). Aber auch Faktoren wie zum Beispiel Stress, Handling, Mauser, Krankheit, Umweltbedingungen, Fütterung, Haltung und Jahreszeit führen zu großen Variationen der Leukozytenzahlen innerhalb einer Spezies (Campbell, 1994).

2.3.1. Heterophile Granulozyten

2.3.1.1. Allgemeines

Im Blut der Vögel kommen die heterophilen Granulozyten von den drei Granulozytenarten am häufigsten vor. Beim Huhn machen sie 15-50% der

Gesamtleukozyten aus (Cray, 2000; Pollack et al., 2005). Dabei schwankt die Anzahl der heterophilen Granulozyten der Hühner je nach Tageszeit (Maxwell, 1981; Cahyaningsih et al., 1990a), aber auch bei Stress oder Anstrengung kann ihre Menge vorübergehend erhöht sein (Latimer und Bienzle, 2000; Campbell, 2004).

Die heterophilen Granulozyten stellen das funktionelle Äquivalent zu den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere dar (Lucas und Jamroz, 1961). Die Bezeichnung „heterophil“ resultiert aus der andersartigen Anfärbbarkeit der Granula im Gegensatz zu denen der neutrophilen Granulozyten der Säugetiere (Latimer und Bienzle, 2000).

2.3.1.2. Morphologie

Die heterophilen Granulozyten sind runde Zellen mit einem mittleren Durchmesser von 10-15 µm (Prinzinger und Misovic, 1994). Gelegentlich können sie eine unregelmäßige Form und Pseudo- bzw. Lobopodien aufweisen (Maxwell, 1973).

Der Zellkern der heterophilen Granulozyten ist zwei- oder dreifach gelappt. Das Chromatin erscheint grobkörnig. Oft wird der Nukleus zum Teil von den zytoplasmatischen Granula überlagert (Campbell und Ellis, 2007).

Das Zytoplasma erscheint farblos und enthält zahlreiche Granula, die sich mit Romanowsky-Färbungen eosinophil zeigen. Bei der Periodic acid Schiff-Reaktion reagieren die Granula negativ (Andreasen und Latimer, 1990). In der Regel sind die zytoplasmatischen Granula stäbchenförmig, sie können aber auch oval oder rund sein (Campbell und Ellis, 2007). Die Granula können, bedingt durch den Färbevorgang oder bei akuten Entzündungsprozessen, gelegentlich auch atypisch erscheinen und wenig angefärbt, teilweise herausgelöst oder verschmolzen sein. Bei einer partiellen oder vollständigen Degranulation wird der Inhalt der Granula herausgelöst, so dass die runden zentralen Körper der primären Granula zum Vorschein kommen. In solch einem Fall ähneln sie den runden Granula der eosinophilen Granulozyten und können mit diesen verwechselt werden (Kelenyi und Nemeth, 1969; Latimer et al., 1988).

Selten kommen im Blutausschlag von gesunden Vögeln auch unreife heterophile Granulozyten vor. Sie haben ein basophileres Zytoplasma, einen unsegmentierten Zellkern und unreife zytoplasmatische Granula (Campbell und Ellis, 2007). Bei einer Immunantwort weisen die heterophilen Granulozyten toxische Veränderungen auf. Morphologisch zeigen sich diese durch eine

vermehrte Basophilie des Zytoplasmas, zytoplasmatische Vakuolen, degranulierte bzw. abnormale Granula, oder durch eine Degeneration des Zellkerns (Campbell und Ellis, 2007).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen primäre, sekundäre und tertiäre Granula in den aviären heterophilen Granulozyten (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Dieterien-Lievre, 1988). Sie unterscheiden sich in ihrer Form, Größe und Osmiophilie (Maxwell, 1973). Die spindelförmigen, primären Granula kommen mit einem Anteil von 48,3% am häufigsten vor. Sie erscheinen elektronendicht und haben eine Größe von $1,5 \times 0,6 \mu\text{m}$ (Daimon und Caxton-Martins, 1977). In der Mitte der primären Granula ist regelmäßig ein runder, elektronendichterer Körper zu erkennen (Maxwell, 1973; Campbell und Ellis, 2007). Die ovalen sekundären Granula treten mit 24,7% weniger zahlreich auf und sind mit einem Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ kleiner als die primären Granula (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Sie sind weniger elektronendicht und enthalten exzentrisch gelegenes filamentöses Material (Campbell und Ellis, 2007). Die tertiären Granula machen 27% der gesamten Granula aus. Sie sind mit einem Durchmesser von $0,1 \mu\text{m}$ die kleinste Granulaart. Sie haben einen elektronendichten Kern, der von einem elektronendurchlässigen Bereich umgeben wird (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten der Hühner sind außerdem ein gut ausgeprägter Golgi-Apparat, Mitochondrien, Glykogengranula und Vesikel zu erkennen (Kriesten und Enbergs, 1969; Maxwell, 1973).

2.3.1.3. Aufgaben

Die heterophilen Granulozyten entsprechen funktionell ihrem Äquivalent im Säugerblut. Wie die neutrophilen Granulozyten sind auch die heterophilen Granulozyten der Vögel maßgeblich an der Phagozytose und Beseitigung von Bakterien, Zelltrümmern und Fremdpartikeln aus dem zirkulierenden Blut und Gewebe beteiligt (Topp und Carlson, 1972). Sie wandern bei Entzündungsprozessen aktiv in das Gewebe aus (Harmon, 1998) und migrieren dort entlang eines chemischen Gradienten an den Ort der Entzündung, um die Erreger abzutöten (Claver und Quaglia, 2009). Die heterophilen Granulozyten der Vögel wirken außerdem bei der Immunabwehr von viralen und parasitären Infektionen mit (Rose et al., 1979; Lam et al., 1996) und sind zudem in der Lage, Hefen zu phagozytieren und abzutöten (Brune et al., 1972). Dabei zeigen die heterophilen Granulozyten eine geringere Phagozytoseleistung als die neutrophilen Granulozyten der Menschen und Hunde (Brooks et al., 1996), sind

aber bei der Phagozytose und Zerstörung von Bakterien leistungsfähiger als die aviären Monozyten (Stabler et al., 1994). In der Lunge und in den Luftsäcken der Vögel gewährleisten die heterophilen Granulozyten die primäre zelluläre Abwehr gegen eindringende Krankheitserreger, da dort keine Makrophagen angesiedelt sind (Harmon, 1998).

Die heterophilen Granulozyten zerstören Mikroorganismen anhand von bakteriziden oxidativen und nichtoxidativen Mechanismen (Campbell und Ellis, 2007). Da die heterophilen Granulozyten der Hühner keine alkalische Phosphatase, Katalase und Myeloperoxidase für die sauerstoffabhängige Abtötung von Erregern enthalten (Brune und Spitznagel, 1973; Dri et al., 1978; Andreasen und Latimer, 1990), beruht ihre antimikrobielle Aktivität jedoch in erster Linie auf nichtoxidativen Mechanismen (Andreasen und Latimer, 1990; Stabler et al., 1994). Dennoch verbrauchen sie Sauerstoff und produzieren freie Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid (Campbell, 2004), wenn auch in einem geringeren Umfang als die neutrophilen Granulozyten der Säugetiere (Dri et al., 1978; Brooks et al., 1996). Die sauerstoffunabhängige Abtötung der Mikroorganismen erfolgt mittels Lysozymen, kationischen antimikrobiellen Peptiden und sauren Hydrolasen, wie zum Beispiel Kathepsin, saure Phosphatase und Arylsulfatase (Osculati, 1970; Brune und Spitznagel, 1973; Ericsson und Nair, 1973; Daimon und Caxton-Martins, 1977; Evans et al., 1994; Harmon, 1998; Maxwell und Robertson, 1998).

2.3.2. Eosinophile Granulozyten

2.3.2.1. Allgemeines

Beim Huhn machen die eosinophilen Granulozyten 0-16% der Gesamtleukozyten aus (Cray, 2000; Pollack et al., 2005). Im Gegensatz zu den Lymphozyten, Monozyten und heterophilen Granulozyten unterliegt die Anzahl der eosinophilen Granulozyten beim Huhn keinen tageszeitlichen Schwankungen (Maxwell, 1981).

2.3.2.2. Morphologie

Die aviären eosinophilen Granulozyten sind runde bis unregelmäßig geformte Zellen mit einem Durchmesser von 10-15 µm (Prinzinger und Misovic, 1994). Sie besitzen einen meist zweigeklappten Zellkern, der sich dunkler anfärbt als der Zellkern der heterophilen Granulozyten. Das Zytoplasma zeigt sich im Gegensatz zu dem farblosen Zytoplasma der heterophilen Granulozyten bläulich. Die zytoplasmatischen Granula sind üblicherweise rund, bei manchen Spezies, wie

zum Beispiel Greifvögeln, aber auch oval oder länglich. Sie färben sich in der Regel intensiv eosinophil, können mit Romanowsky-Färbungen aber auch farblos bis blassblau erscheinen oder groß und geschwollen sein (Campbell und Ellis, 2007). Bei der Periodic acid Schiff-Reaktion und der Sirius-Red-Färbung reagieren die eosinophilen Granulozyten positiv. Sie enthalten demnach Glykogen und basische Polyaminosäuren (Santos et al., 2003).

Anders als die heterophilen und basophilen Granulozyten besitzen die eosinophilen Granulozyten der Hühner nur einen Granulotyp. Elektronenmikroskopisch erscheinen die Granula in der Regel rund bis oval, mit einem Durchmesser von 0,25-1,0 µm und einem elektronendichten, homogenen Inhalt (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Maxwell, 1978). Sie können auch tief eingekerbt, halbmondförmig oder vakuolisiert sein (Maxwell und Siller, 1972; Maxwell, 1978). Im Gegensatz zu den Gänsevögeln besitzen die eosinophilen Granula der Hühner keinen kristallinen Kern (Maxwell, 1978; Maxwell, 1986; Dieterien-Lievre, 1988). Ein zentraler runder Körper, wie er bei den heterophilen Granula elektronenmikroskopisch zu finden ist, fehlt bei den eosinophilen Granulozyten ebenfalls (Bounous und Stedman, 2000). Andere Autoren beschreiben ultrastrukturell zwei Arten von Granula: Die großen, kugelförmigen primären Granula als Vorstufen der kleineren, stäbchenförmigen spezifischen Granula (Campbell und Ellis, 2007). Ultrastrukturelle Untersuchungen der eosinophilen Granulozyten zeigen außerdem einen deutlichen Golgi-Apparat, raues endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, freie Ribosomen und Vesikel im Zytoplasma (Hodges, 1977; Santos et al., 2003).

2.3.2.3. Aufgaben

Zu den Aufgaben der aviären eosinophilen Granulozyten gehören die Phagozytose von Bakterien und Fremdpartikeln, die Regulierung von allergischen Reaktionen und die Abtötung von Parasiten. Zudem zeigen sie eine proinflammatorische Aktivität (Maxwell, 1984; Maxwell und Burns, 1986; Latimer und Bienzle, 2000). Die Abtötung der Endoparasiten erfolgt mittels Exozytose von zytotoxischen Stoffen, wie dem Major Basic Protein (MBP), Peroxidasen, Sauerstoffmetaboliten und H₂O₂-Halogenen (Jain, 1993).

Die eosinophilen Granulozyten zerstören Mikroorganismen anhand von oxidativen und nichtoxidativen Mechanismen. Im Gegensatz zu den Myeloperoxidase-freien heterophilen Granulozyten enthalten die eosinophilen Granulozyten Peroxidase für die sauerstoffabhängige Abtötung der Erreger (Andreasen und Latimer, 1990). Außerdem beinhalten die spezifischen Granula

hohe Konzentrationen an argininreichen basischen Proteinen, wie dem Major Basic Protein (MBP) sowie an Enzymen wie saurer Phosphatase und Arylsulfatase (Dieterien-Lievre, 1988; Andreasen und Latimer, 1990). Bei den Granula der eosinophilen Granulozyten handelt es sich demnach um Lysosomen (Daimon und Caxton-Martins, 1977).

2.3.3. Basophile Granulozyten

2.3.3.1. Allgemeines

Die basophilen Granulozyten sind im Blut der Vögel häufiger zu finden als bei den Säugetieren (Campbell und Ellis, 2007). Sie machen im Hühnerblut einen Anteil von 0-8% der Gesamtleukozyten aus (Cray, 2000; Pollack et al., 2005). Im Gegensatz zu der Lymphozyten-, Monozyten- und heterophilen Granulozytenzahl unterliegt die Anzahl der basophilen Granulozyten beim Huhn keinen tageszeitlichen Schwankungen (Maxwell, 1981).

2.3.3.2. Morphologie

Die basophilen Granulozyten der Vögel sind runde Zellen mit einem Durchmesser von 10-15 μm (Prinzinger und Misovic, 1994). Sie enthalten rundliche, tief basophile oder metachromatische Granula, die den Zellkern häufig überlagern. Die basophilen Granula können bedingt durch den Färbevorgang ganz oder teilweise ausgewaschen sein und als Vakuolen im Zytoplasma erscheinen (Campbell und Ellis, 2007). Der Zellkern der aviären basophilen Granulozyten ist ungelappt und rund bis oval (Latimer und Bienzle, 2000). Oft liegt er exzentrisch in der Zelle (Maxwell, 1973).

Elektronenmikroskopisch sind im Zytoplasma der basophilen Granulozyten zahlreiche Granula, ein Golgi-Apparat, Zentriolen, Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Lipidtropfen und Glykogengranula zu erkennen (Maxwell, 1973). Die zytoplasmatischen Granula haben einen Durchmesser von 0,1-0,8 μm und einen feingranulären Inhalt. In der Regel haben sie eine runde Form, können aber auch Einkerbungen aufweisen. Im Allgemeinen können bei Vögeln drei verschiedene Arten von Granula unterschieden werden. Die häufigste Granulaart ist elektronendicht und weist einen sehr kompakten Inhalt auf. Die zweite Art hat einen weniger kompakten Inhalt und der Inhalt der dritten Granulaart erscheint honigwabenartig (Maxwell, 1973). Beim Huhn gibt es dagegen nur zwei verschiedene Granulatypen. Die Mehrzahl machen die Typ I-Granula aus. Sie sind rund und haben einen Durchmesser von etwa 0,6 μm . Ihr

Inhalt ist je nach Reifegrad der Zelle von variabler Elektronendichte. Die runden Typ II-Granula sind seltener anzutreffen als erstere und nur 0,1 µm groß. Sie weisen einen sehr elektronendichten, homogenen Inhalt auf. Diese kleinen Granula stehen häufig in Kontakt mit den Typ I-Granula (Daimon und Caxton-Martins, 1977).

2.3.3.3. Aufgaben

Die Aufgabe der basophilen Granulozyten der Vögel ist bisher nicht vollständig bekannt. Da ihre zytoplasmatischen Granula jedoch Histamin enthalten, entspricht ihre Funktion vermutlich der der basophilen Granulozyten der Säugetiere und der Mastzellen (Dieterien-Lievre, 1988). Die aviären basophilen Granulozyten sind bei akuten Entzündungsreaktionen und Hypersensibilitätsreaktionen vom Soforttyp beteiligt (Carlson und Allen, 1969; Fox und Solomon, 1981; Maxwell und Robertson, 1995) und spielen eine Rolle bei der Abwehr gegen Ekto- und Endoparasiten (Ferris und Bacha, 1986; Dusbabek et al., 1988). Außerdem können die basophilen Granulozyten der Hühner, im Gegensatz zu denjenigen der Säugetiere, Fremdmaterialien wie kolloidalen Kohlenstoff phagozytieren (Dhodapkar et al., 1982). Basophile Infiltrate in versuchsweise herbeigeführten Sarkomen zeigen zudem eine Basophilen-assoziierte Tumortoxizität (Burton und Higginbotham, 1966). Neben Histamin enthalten die Granula Heparin, zinkhaltige Proteine und in einem kleinen Anteil saure Phosphatase. Peroxidase und alkalische Phosphatase sind nicht vorhanden (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Sinowatz und Hees, 2006).

2.3.4. Lymphozyten

2.3.4.1. Allgemeines

Die Lymphozyten sind beim Huhn die am häufigsten vorkommenden Leukozyten im zirkulierenden Blut. Sie machen 29-84% der Gesamtleukozyten aus (Cray, 2000; Pollack et al., 2005). Davon sind die T-Lymphozyten mit einem Anteil von 72% und die B-Lymphozyten mit einem Anteil von 14% vertreten (Nowak et al., 1982). Im Blut befinden sich allerdings nur etwa 1% der Gesamtlmphozyten (Lösch et al., 2000). Die Lymphozytenzahl unterliegt beim Huhn einem Tagesrhythmus (Maxwell, 1981; Cahyaningsih et al., 1990b). Außerdem haben juvenile Vögel mehr Lymphozyten als adulte (Howlett et al., 2002) und die Lymphozytenzahl kann bei Vögeln stressbedingt vorübergehend erhöht sein (Latimer und Bienzle, 2000; Campbell, 2004).

2.3.4.2. Morphologie

Die aviären Lymphozyten sind üblicherweise runde Zellen, können aber auch eine unregelmäßige Form aufweisen. Sie haben einen runden Zellkern, der zentral oder exzentrisch in der Zelle liegt. Er besitzt stark kondensiertes Chromatin und ist gelegentlich an einer Stelle leicht eingekerbt (Campbell und Ellis, 2007). Die Lymphozyten haben ein hohes Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis. Der schmale Zytoplasmasaum zeigt sich schwach basophil und ohne Vakuolen. Ab und zu kann das Zytoplasma der aviären Lymphozyten deutliche azurophile Granula (Campbell und Ellis, 2007) oder Pseudopodien aufweisen (Maxwell, 1974). Die Lymphozyten reagieren bei der Periodic acid Schiff-Reaktion positiv (Raskin und Valenciano, 2000).

Im Blut der Hühner sind kleine, mittelgroße und große Lymphozyten zu finden (Bounous und Stedman, 2000). Die kleinen Lymphozyten sind runde Zellen mit einem Durchmesser von 4-10 µm (Prinzinger und Misovic, 1994). Ihr Zellkern kann rund, oval, unregelmäßig oder eingekerbt sein (Maxwell, 1974). Er wird umgeben von einem schmalen, basophilen Zytoplasmasaum (Bounous und Stedman, 2000). Die mittelgroßen Lymphozyten sind rund bis oval (Maxwell, 1974) und haben ein umfangreicheres und manchmal schwächer basophiles Zytoplasma (Bounous und Stedman, 2000). Charakteristisch für die mittelgroßen Lymphozyten sind die elektronenmikroskopisch erkennbaren, ausgeprägten perinukleären Zisternen und die, im Vergleich mit den anderen Leukozyten, relativ geringe Menge an Zellorganellen (Maxwell, 1974). Selten sind im Blutausstrich der Vögel große Lymphozyten mit einem Durchmesser von 11-15 µm zu finden (Prinzinger und Misovic, 1994). Sie haben viel Zytoplasma und ihr vergleichsweise blasser Zellkern variiert in der Form von rund über oval bis abgewinkelt. Ihr Nukleus kann auch an einer Seite abgeflacht sein (Bounous und Stedman, 2000). Die mittelgroßen und großen Lymphozyten können leicht mit den Monozyten verwechselt werden (Campbell und Ellis, 2007). Die im Zytoplasma der großen Lymphozyten gelegentlich vorkommenden azurophilen Granula sind jedoch größer und färben sich intensiver an als die feinen, eosinophilen Granula der Monozyten. Außerdem besitzen die Monozyten etwas mehr Zytoplasma und einen blasserem Zellkern (Bounous und Stedman, 2000).

Reaktive Lymphozyten haben ein stark basophiles Zytoplasma und stark kondensiertes Kernchromatin. Diese treten bei einer Antigenstimulation auf, können aber vereinzelt auch im normalen Vogelblut zu finden sein (Campbell und Ellis, 2007). Selten sind Plasmazellen vertreten. Hierbei handelt es sich um große B-Lymphozyten mit reichlich stark basophilem Zytoplasma, einem

ausgeprägten Golgi-Apparat und einem exzentrischen Zellkern (Campbell und Ellis, 2007).

Elektronenmikroskopisch enthält das Zytoplasma der aviären Lymphozyten Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, einen Golgi-Apparat, Zentriolen, Mikrotubuli, pinozytotische Vesikel, Vakuolen mit einem Durchmesser bis zu 0,1 μm und elektronendichte Granula mit einem Durchmesser von 0,1-1,0 μm . Selten sind auch Lipidtropfen zu erkennen (Maxwell, 1974). Der Golgi-Apparat, die Zentriolen und die Mikrotubuli sind meist gegenüber der Einkerbung des Zellkernes lokalisiert (Maxwell, 1974). Der Zellkern besitzt ultrastrukturell viel Euchromatin, welches bei den mittelgroßen Lymphozyten häufig von einem schmalen Saum Heterochromatin umgeben wird. Die kleinen Lymphozyten weisen eine gleichmäßige Verteilung des Chromatins auf (Maxwell, 1974).

2.3.4.3. Aufgaben

Die Lymphozyten dienen in erster Linie der spezifischen Immunabwehr. Dabei entsprechen die aviären Lymphozyten funktionell den Säugerlymphozyten. Es wird zwischen T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen unterschieden (Claver und Quaglia, 2009).

Die B-Lymphozyten besitzen auf ihrer Zelloberfläche zahlreiche spezifische zellmembranständige Antikörpermoleküle, die B-Zell-Rezeptoren (B cell receptor = BCR), gegen ein bestimmtes Antigen. Fremde, immunogene Strukturen können so gebunden und erkannt werden (Lösch et al., 2000). Nach der Bindung an das Antigen werden die B-Lymphozyten zu Plasmazellen aktiviert und produzieren spezifische humorale Antikörpermoleküle gegen die fremden Strukturen (Prinzinger und Misovic, 1994; Lösch et al., 2000). Die T-Lymphozyten sind für die zellvermittelte Immunität verantwortlich (Claver und Quaglia, 2009). Es wird zwischen den CD4-positiven T-Helferzellen und den CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen unterschieden. Zu den Hauptaufgaben der T-Helferzellen gehört die Hilfe für antikörperproduzierende B-Zellen sowie die Aktivierung von Makrophagen. Diese Immunreaktionen werden durch die Produktion und Freisetzung von verschiedenen Zytokinen induziert. Die wichtigste Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten ist die Tötung von virusinfizierten Zellen (Lösch et al., 2000). Gleichzeitig werden T- und B-Gedächtniszellen gebildet, die die spezifische Immunreaktion speichern und bei einer erneuten Infektion mit demselben Antigen eine beschleunigte und effektive Immunreaktion auslösen (Lösch et al., 2000). Die natürlichen Killerzellen sind ein Teil des unspezifischen

Abwehrsystems. Sie können sowohl virusinfizierte Zellen als auch Tumorzellen mittels zytotoxischen Faktoren abtöten (Lösch et al., 2000).

2.3.5. Monozyten

2.3.5.1. Allgemeines

Die Monozyten sind die größten Leukozyten im Blutausschlag der Vögel (Campbell und Ellis, 2007). Sie machen beim Huhn 0-7% der Gesamtleukozyten aus (Cray, 2000; Pollack et al., 2005). Dabei haben juvenile Vögel höhere Monozytenzahlen als adulte (Howlett et al., 2002) und die Werte unterliegen tageszeitlichen Schwankungen (Maxwell, 1981; Kondo et al., 1992).

2.3.5.2. Morphologie

Die Monozyten sind mit einem mittleren Durchmesser von etwa 14 µm üblicherweise die größten Leukozyten im zirkulierenden Blut der Vögel (Prinzinger und Misovic, 1994). Sie sind in ihrer Form sehr variabel. Es handelt sich um runde bis amöboide Zellen mit viel Zytoplasma und einem pleomorphen Zellkern. Dieser kann rund, oval, bohnenförmig oder eingekerbt sein (Maxwell, 1974; Campbell und Ellis, 2007) sowie manchmal auch eine gelappte Form aufweisen (Forkner, 1929; Canfield, 1998). Des Weiteren ist er eher blass und besitzt locker kondensiertes Chromatin. Das blaugraue Zytoplasma erscheint aufgrund der zahlreichen Vakuolen oft schaumig. Gelegentlich sind feine zytoplasmatische eosinophile Granula oder Pseudopodien zu erkennen. Im Zytoplasma der Monozyten sind häufig zwei Zonen zu unterscheiden – eine hellere Zone um den Zellkern und eine dunklere periphere Zone (Campbell und Ellis, 2007; Clark et al., 2009).

Das Zytoplasma der Monozyten und Makrophagen enthält zahlreiche Zellorganellen, die sich häufig in der Nähe der Zellkerneinkerbung befinden (Maxwell, 1974). Elektronenmikroskopisch zeigen sich ein ausgeprägter Golgi-Apparat, Zentriolen, Mikrotubuli, Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, zahlreiche Ribosomen und unterschiedlich viele Vesikel, Lipidtropfen und Lysosomen (Maxwell, 1974; Dieterien-Lievre, 1988). Außerdem sind kleine elektronendichte Granula mit einem Durchmesser von 0,1-0,5 µm im Zytoplasma verteilt (Maxwell, 1974). Des Weiteren sind Bündel von feinen, wellenförmigen Filamenten zu erkennen, die sich parallel zu der Zellkernmembran erstrecken (Maxwell, 1974). Die Zellmembran setzt sich aus Bläschen oder Filamenten zusammen (Dieterien-Lievre, 1988). Im Zellkern ist das Euchromatin zentral und

das Heterochromatin in der Peripherie lokalisiert (Maxwell, 1974).

2.3.5.3. Aufgaben

Die im Blut zirkulierenden Monozyten gehören zu dem sogenannten Monozyten-Makrophagen-System. Zu den Aufgaben des Monozyten-Makrophagen-Systems zählen die Abwehr von Bakterien, Pilzen, Viren und Protozoen, sowie die Phagozytose und Beseitigung von geschädigten, alten, virusinfizierten und tumorösen Zellen (Latimer und Bienzle, 2000). Die Monozyten wandern nach kurzer Zirkulation aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe aus und differenzieren sich dort zu Makrophagen (Harmon, 1990).

Die aviären Monozyten erfüllen eine Vielfalt von Funktionen. Zu ihren Hauptaufgaben gehören die Phagozytose und die Zerstörung von eingedrungenen Krankheitserregern, Fremdpartikeln sowie Tumorzellen im Rahmen der unspezifischen, zellulären Immunabwehr (Qureshi et al., 1986; Qureshi und Miller, 1991; Prinzinger und Misovic, 1994; Stabler et al., 1994). Dabei sind sie stark amöboid beweglich (Prinzinger und Misovic, 1994). Monozyten, die im zirkulierenden Blut phagozytiertes Material enthalten, werden ebenfalls als Makrophagen bezeichnet. Diese Zellen sind in der Regel größer als die normalen Monozyten (Canfield, 1998). Das phagozytierte Material wird in den Makrophagen der Hühner mit hydrolytischen Enzymen wie Lysozymen und saurer Phosphatase verdaut (Fox und Solomon, 1981). Außerdem können sie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen bilden (Sung et al., 1991; Desmidt et al., 1996; Bounous und Stedman, 2000). Zu den Funktionen der Monozyten zählen außerdem die Sekretion von Prostaglandinen und Zytokinen, die die Aktivität von Lymphozyten und anderen Makrophagen regulieren (Bonney und Davies, 1984; Kimball, 1990). Eine der wichtigsten Aufgaben der Monozyten ist zudem ihre Rolle in der erworbenen Immunabwehr (Auger and Ross, 1992). Sie spalten die phagozytierten Antigene und präsentieren die dabei entstehenden Fragmente den T-Lymphozyten (Dieterien-Lievre, 1988; Lösch et al., 2000).

3. Glykohistochemie

3.1. Allgemeines

Die Glykohistochemie ist ein Verfahren zum Nachweis von kohlenhydrathaltigen Makromolekülen. Im Gegensatz zu den üblichen histochemischen Färbungen für Kohlenhydrate, wie zum Beispiel die Alcianblau-Färbung oder die PAS-Reaktion, verfügen Lektine über eine ausgezeichnete Spezifität und können Kohlenhydrate selektiv darstellen (Sinowatz und Hees, 2006; Roth, 2011).

3.1.1. Definition und Herkunft der Lektine

Lektine sind kohlenhydratbindende Proteine. Sie weisen keine enzymatische Aktivität an ihrem Liganden auf und unterscheiden sich von Antikörpern und Sensor- bzw. Transportproteinen für freie Mono- und Oligosaccharide (Gabius et al., 2011).

Der Begriff „Lektin“ wurde im Jahre 1954 von Boyd und Shapleigh eingeführt. Er ist von dem lateinischen Wort „legere“ für „auswählen“ abgeleitet (Boyd und Shapleigh, 1954; Rüdiger, 1978; Franz, 1990), da Lektine bestimmte Kohlenhydrate spezifisch binden können (McCoy, 1987). Besitzen sie die Fähigkeit Zellen zu agglutinieren, werden sie auch als Agglutinine bzw. Hämagglutinine, wenn es sich dabei um Erythrozyten handelt, bezeichnet. Proteine aus Pflanzen, die Erythrozyten agglutinieren können, werden auch Phytohämagglutinine genannt (Gabius et al., 2011).

Lektine sind ubiquitäre, natürlich vorkommende Proteine. Meistens handelt es sich um Glykoproteine mit einem Kohlenhydratanteil von 2-50%. Lediglich ConA und WGA enthalten keine Zucker, während STA (*Solanum tuberosum* Agglutinin) etwa zur Hälfte aus Kohlenhydraten besteht (Rüdiger, 1978; Rüdiger, 1982). Lektine kommen in Pflanzen, Mikroorganismen, Pilzen, Tieren und Menschen vor (Lis und Sharon, 1973; Rüdiger, 1978; Rüdiger, 1982; Roth, 2011). Mehr als die Hälfte aller bekannten Pflanzenlektine stammt aus den Leguminosen (Hülsenfrüchte), gefolgt von den Araceae (Aronstabgewächse), Cucurbitaceae (Kürbisgewächse) und Liliaceae (Liliengewächse) (Rüdiger und Gabius, 2009). In den Pflanzen sind die Lektine in erster Linie in den Samen und anderen Speicherorganen, wie Rinde, Wurzel, Knolle und Zwiebel enthalten. Daneben kommen sie auch in geringerer Konzentration in den restlichen Pflanzenteilen vor (Rüdiger, 1978; Rüdiger, 1982; Rüdiger und Gabius, 2009). Intrazellulär befinden

sich die Pflanzenlektine in membranumhüllten Proteinspeicherorganellen, den sogenannten „*protein bodies*“. Dort liegen sie gemeinsam mit Speicherproteinen, Enzymen und Phytinsäure vor (Rüdiger und Gabius, 2009).

3.1.2. Einteilung und Bindungseigenschaften der Lektine

So verschieden wie die Quellen der Lektine, so unterschiedlich ist auch ihre individuelle Zuckerspezifität und somit ihr Reaktionsvermögen mit den verschiedenen Glykanen von zellulären Glykoproteinen und Glykolipiden (McCoy, 1987; Roth, 2011). Die Bindung eines Lektins beruht jedoch nicht ausschließlich auf der Interaktion mit einem Glykan, sie geht zusätzlich mit hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen einher (Roth, 2011). Auch die Art der Bindung und die folgenden Zuckerreste in einem Oligosaccharid sind von Bedeutung (Wu et al., 2009). So sind viele Lektine scheinbar spezifisch für ein Monosaccharid, reagieren aber mit verschiedenen Oligosaccharidketten, die mit diesem Zucker enden, mit unterschiedlicher Affinität (Wu et al., 2009).

Die Lektine können entsprechend ihrer so genannten nominalen Zuckerspezifität in Gruppen eingeordnet werden. Diese Klassifikation basiert auf Ergebnissen aus Agglutinationsversuchen mit Hemmzuckern und ist folglich stark vereinfacht (Roth, 2011).

Tabelle 1: Einteilung ausgewählter Pflanzenlektine. Modifiziert nach Goldstein, Poretz, Rüdiger und Gabius (Goldstein und Poretz, 1986; Rüdiger und Gabius, 2001; Rüdiger und Gabius, 2009; Gabius et al., 2011)

Name des Lektins	Herkunft	Abk.	Zuckerspezifität
Concanavalin Agglutinin	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)	ConA	D-Mannose und D-Glukose
Lens culinaris Agglutinin	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)	LCA	
Pisum sativum Agglutinin	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	PSA	
Peanut Agglutinin	<i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuss)	PNA	D-Galaktose
Ricinus communis Agglutinin	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)	RCA	

Viscum album Agglutinin	<i>Viscum album</i> (Mistel)	VAA	
Griffonia simplicifolia Agglutinin I	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)	GSL I	N-Acetyl-D- Galaktosamin
Sophora japonica Agglutinin	<i>Sophora japonica</i> (Chinesischer Schnurbaum)	SJA	
Dolichos biflorus Agglutinin	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikanische Pferdebohne)	DBA	
Soybean Agglutinin	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	SBA	
Sambucus nigra Agglutinin	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	SNA	
Wheat germ Agglutinin	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	WGA	N-Acetyl-D- Glukosamin und N- Acetyl-D- Neuraminsäure
Ulex europaeus Agglutinin I	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	UEA I	L-Fukose
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	PHA-E	Oligosaccharide
Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	PHA-L	
Maackia amurensis Agglutinin I - Leukoagglutinin	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)	MAA I	

3.1.3. Funktion und Anwendung der Lektine

Die biologische Bedeutung von Pflanzenlektinen kann in externe und interne Funktionen eingeteilt werden (Rüdiger und Gabius, 2001). Externe Funktionen sind unter anderem der Schutz der Pflanzen vor Insekten, Pilzen und herbivoren Tieren, sowie die Beteiligung bei der Symbiose zwischen den Pflanzen und Bakterien (Rüdiger und Gabius, 2009). Interne Aufgaben der Pflanzenlektine sind

die Beteiligung an Keimungs- und Wachstumsprozessen, die Regulierung von enzymatischen Aktivitäten, die Anordnung von Speicherproteinen und Enzymen in den „*protein bodies*“ und Vermittlung des Kontaktes zwischen den Speicherproteinen und der Membran der „*protein bodies*“ (Rüdiger und Gabius, 2009).

In ihren Anwendungsmöglichkeiten sind die Lektine sehr vielfältig und werden als nützliche Instrumente in der Biochemie, Zellbiologie, Medizin und jüngst auch in der Chip-Technologie eingesetzt (Rüdiger und Gabius, 2009). Ein entscheidender Punkt für die Verwendung der Pflanzenlektine ist ihre Stabilität. So können sie in der Regel problemlos konjugiert werden, ohne dass ihre Bindungseigenschaften beeinflusst werden (McCoy, 1987; Rüdiger und Gabius, 2009). Um die Wechselwirkung der Lektine mit ihren Bindungsstellen der Zellen mikroskopisch sichtbar zu machen, können sie an verschiedene Markersubstanzen gekoppelt werden. So können sie direkt mit verschiedenen Fluorochromen, Enzymen oder kolloidalen Goldpartikeln markiert werden oder für den indirekten Nachweis an beispielsweise Biotin gekoppelt werden, welches anschließend anhand von markiertem Streptavidin sichtbar gemacht wird (Roth, 2011). Aufgrund ihrer Fähigkeit Kohlenhydratstrukturen selektiv zu binden, sind sie ein bewährtes Hilfsmittel für den histochemischen Nachweis von Glykanen und für die Erstellung von Kohlenhydratprofilen von Zellen und Geweben (Lis und Sharon, 1973; McCoy, 1987; Rüdiger und Gabius, 2001; Roth, 2011). Auf diese Weise können krankheitsbedingte Veränderungen der Kohlenhydratzusammensetzung der Zellen ohne weiteres festgestellt werden (Rüdiger und Gabius, 2009). In der Immunologie ist ein weiterer Anwendungsbereich einzelner Lektine die Stimulation der Mitose in Lymphozyten, wobei hiervon in erster Linie T-Lymphozyten betroffen sind (Lis und Sharon, 1973; Rüdiger, 1981; Rüdiger und Gabius, 2009). Diese mitogene Eigenschaft, wie auch die lektinvermittelte Freisetzung von Mediatoren, weisen auf ein therapeutisches Potential der Pflanzenlektine hin (Rüdiger und Gabius, 2009). Auch in der Tumorforschung ist der Einsatz von Lektinen weit verbreitet (Aub et al., 1963; Franz, 1990; Sharon und Lis, 2004).

3.2. Zuckerstrukturen und Lektinbindungsstellen auf den Blutzellen des Huhnes

Oligosaccharide vermitteln, wie auch Proteine und Nukleinsäuren, die Speicherung und Weiterleitung von biologischer Information. Allerdings besitzen

Oligosaccharide eine viel höhere strukturelle Variabilität (André et al., 2006). Die Strukturvielfalt ist bedingt durch das Potential der Variabilität der Verknüpfungspunkte der Zucker, der anomeren Position und der Ringgröße sowie durch die Ausbildung von Kettenverzweigungen (Gabijs, 2008). Aus dieser Kombinationsvielfalt ergibt sich die hohe Informationsspeicherkapazität der Kohlenhydrate (André et al., 2006). Sie bergen mit ihrer komplexen räumlichen Gestalt spezifische Strukturinformationen (Lindhorst, 2000). Die Lektine lesen und übersetzen diese Information der Oligosaccharide in biologische Informationen (André et al., 2006).

In Zellen und auf Zelloberflächen befinden sich zahlreiche Glykokonjugate, wie Glykoproteine, Glykolipide und Proteoglykane (McCoy, 1987; André et al., 2006). Auf der Zelloberfläche von eukaryotischen Zellen und Bakterien bilden die Zuckeranteile der in der Zellmembran eingelagerten Glykoproteine und Glykolipide eine Schicht aus Kohlenhydraten, die Glykokalyx (Bennett, 1963; Silbernagl und Despopoulos, 2001; Jörns et al., 2003; Gabijs et al., 2011). Dieser Kohlenhydratanteil der Zellmembranen wird vorwiegend aus Galaktose, Mannose, Fukose, Galaktosamin, Glukosamin, Glukose und Sialinsäure zusammengesetzt (Djilali et al., 1987). Die Glykokonjugate der Zellen sind an vielen biologischen Prozessen beteiligt (André et al., 2006). So spielt die Glykokalyx eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen, zum Beispiel bei verschiedenen Vorgängen der Immunantwort (Sasmal et al., 2002; Jörns et al., 2003). Die terminalen Kohlenhydratreste der Glykokalyx können anhand von Lektinen ermittelt werden (Jörns et al., 2003).

Die Erythrozytenmembran der Hühner enthält Glykophorine, die O- und N-Glykane aufweisen. Ein typisches Merkmal dieser Sialoglykoproteine der Hühnererythrozyten ist der hohe Gehalt an Mannose und der verhältnismäßig geringe Gehalt an N-Acetyl-Galaktosamin. Dies weist auf ein relativ hohes Verhältnis von N-Glykanen zu O-Glykanen, verglichen mit dem humanen Glykophorin A, hin. Bei den Glykophorinen der Säugetiere handelt es sich um reichlich O-glykosylierte Membran-Sialoglykoproteine, die einen sehr geringen Gehalt an N-Glykanen aufweisen (Duk, 2000). Des Weiteren besitzen die Plasmamembran und die Kernhülle der Hühnererythrozyten eine starke Affinität zu ConA, was auf glukose- und mannosereiche Glykoproteine hinweist (Vidal, 1997; Moraes und Mello, 2006). Die Stärke der Markierung mit ConA ist jedoch pH-Wert abhängig. Bei einem pH-Wert von 6,5 färbt sich die Kernhülle intensiver an, während die ConA-Affinität der Glykokalyx bei einem pH-Wert von 7,2 stärker

ist. Beträgt der pH-Wert nur 5,0, ist generell mit einer schwächeren Bindung des Lektins zu rechnen (Moraes und Mello, 2006). *Vibrio cholerae* (Serogruppe O1) besitzt ein N-Acetyl-Glukosamin spezifisches Hämagglutinin, welches an diesen Zucker in der Erythrozytenmembran der Hühner bindet. So konnte in Versuchen durch eine Vorbehandlung des N-Acetyl-Glukosamin mit dem spezifischen Lektin die Bindung von *Vibrio cholerae* an das Glykoprotein der Hühnererythrozyten vollständig gehemmt werden (Sasmal et al., 2002).

Rund 70% der Lymphozyten im peripheren Blut der Hühner sind PNA-positiv. Die hohe Affinität von PNA beruht auf einer geringen Sialylierung der Glykokonjugate auf den Lymphozyten, da nach der Abspaltung endständiger Sialinsäure auch die zuvor PNA-negativen Zellen agglutinieren (Schauenstein et al., 1983). Auch die Lektine ConA, WGA, RCA II, PHA-P (Phytohämagglutinin) binden mit starker Affinität an die Lymphozyten der Hühner. UEA und GSL I binden hingegen nicht an die peripheren Blutlymphozyten (Flower und Wilcox, 1981).

Im Thymus der Hühner binden Mannose und N-Acetyl-Glukosamin spezifische Lektine an Makrophagen und an Lymphozyten in der Thymusrinde. ConA, LCA und WGA binden schwach bis mäßig an die T-Lymphozyten der T-Zell-Region. Das N-Acetyl-Glukosamin spezifische Lektin DSA (*Datura stramonium* Agglutinin) bindet stark an die Makrophagen in Thymusrinde und -mark (Jörns et al., 2003). In der Bursa Fabricii binden LCA und WGA an Makrophagen. Ferner werden in den Follikeln der Bursa Fabricii die B-Lymphozyten von ConA markiert (Jörns et al., 2003). In der Milz der Hühner binden ConA, LCA, PNA und WGA an die B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (Jörns et al., 2003). Im Knochenmark der Hühner bindet das Galaktose-spezifische Lektin PNA an heterophile Granulozyten, Monozyten, basophile Granulozyten und kleine Lymphozyten. Erythroide Zellen und sich entwickelnde Thrombozyten im Knochenmark zeigen hingegen keine Affinität zu PNA (Sorrell, 1988). Während der Kultivierung von Hühnerthrombozyten zeigen diese eine zunehmende Expressierung von Fukose- und Galaktoseresten auf ihrer Zelloberfläche, was sich durch eine steigende Affinität der Lektine UEA I und PNA darstellt (DaMatta et al., 1998).

4. Immunhistochemie

4.1. Allgemeines

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis von bestimmten antigenen Makromolekülen in Zellen und Geweben (Sinowatz und Hees, 2006). Hierfür werden antigenspezifische, an Markersubstanzen gekoppelte Antikörper eingesetzt. Dabei wird zwischen der direkten und indirekten Immunmarkierung unterschieden (Romeis, 2010). Bei der direkten Methode bindet ein markierter Antikörper direkt an das spezifische Antigen, während bei der indirekten Methode ein markierter Sekundärantikörper an den zuvor aufgetragenen antigenspezifischen Primärantikörper bindet (Sinowatz und Hees, 2006, Romeis, 2010). Die Markierung der Antikörper erfolgt durch Koppelung an z.B. Fluoreszenzfarbstoffe (Fluoreszeinisothiocyanat = FITC, etc.). Die Lokalisation der gesuchten antigenen Strukturen wird so unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Sinowatz und Hees, 2006; Romeis, 2010).

4.2. Spezifische Antigene der T-Lymphozyten

Auf den Leukozyten der Vögel können durch immunzytochemische Methoden insgesamt in etwa 30-40 verschiedene Antigene bestimmt werden (Ratcliffe et al., 1993). In diesem Kapitel soll jedoch nur auf die Antigenstruktur der T-Lymphozyten sowie deren Untergruppen näher eingegangen werden.

Die T-Lymphozyten tragen als charakteristisches Oberflächenmolekül den T-Zell-Rezeptor (T cell receptor = TCR) zur Antigenerkennung, wobei zwischen dem $\alpha\beta$ -TCR und dem $\gamma\delta$ -TCR unterschieden wird (Liebich, 2010). Über die Funktion der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten ist bisher wenig bekannt (Erf et al., 1998; Lösch et al., 2000). Beim Huhn, wie auch beim Schaf, Rind und Schwein, sind die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten (=TCR1-Lymphozyten) häufig vertreten, während sie beim Menschen und bei der Maus nur selten vorkommen (Sowder et al., 1988). Des Weiteren gibt es beim Huhn zwei Typen von $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren, den TCR2 und TCR3 (Erf et al., 1998). Die peripheren $\alpha\beta$ -T-Zellen des Huhnes sind entweder CD4- oder CD8-positiv, während die $\gamma\delta$ -T-Zellen CD4- und CD8-negativ sind (Sowder et al., 1988; Luhtala et al., 1993).

Die T-Lymphozyten der Hühner tragen außerdem verschiedene spezifische CD-Moleküle (CD = cluster of differentiation) (Sinowatz und Hees, 2006), wie CD3

(Chen et al., 1986), CD4, CD8 (Chan et al., 1988) und CD 28 (Vainio et al., 1991; Young et al., 1994) auf ihrer Zelloberfläche. Das CD4-Molekül wird auf ca. 45% der Lymphozyten und CD8 auf ca. 15% der Blutlymphozyten der Hühner exprimiert (Chan et al., 1988). Das aviäre CD8-Molekül liegt entweder als $\alpha\beta$ -Heterodimer oder als $\alpha\alpha$ -Homodimer vor (Chan et al., 1988; Ratcliffe et al., 1993). Dabei befindet sich das $\alpha\beta$ -Heterodimer auf der Mehrzahl der CD8-Lymphozyten, während das $\alpha\alpha$ -Homodimer nur auf einem kleinen Teil der CD8-Lymphozyten vorkommt (Ratcliffe et al., 1993). Das CD3-Molekül der Vögel ist stets mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert (Lösch et al., 2000). Sie bilden zusammen den so genannten T3/TCR-Komplex (Chen et al., 1986).

Charakteristische Oberflächenantigene der T-Lymphozyten sind des Weiteren chT1, chTw5, chT6, chT7, chTw9, chTw10 und chT11 (Chen et al., 1984; Schauenstein et al., 1988; Lee und Tempelis, 1992; Haury et al., 1993; Ratcliffe et al., 1993).

4.3. Zytoskelett der Vogelblutzellen

4.3.1. Allgemeines

Das Zytoskelett ist ein aus feinen Proteinfilamenten und -röhrchen bestehendes Netzwerk im Zytoplasma der Zelle (Schröder und Diener, 2000). Es wird im Wesentlichen aus drei verschiedenen Arten von Proteinstrukturen aufgebaut: den Aktinfilamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten. Außerdem sind zahlreiche Proteine vorhanden, die diese Zytoskelettelemente untereinander verflechten (Liebich, 2010).

Aktinfilamente haben einen Durchmesser von 6-8 nm und machen in etwa 20% des Gesamtproteins in einer Zelle aus (Liebich, 2010). Sie setzen sich aus G-Aktin (globulärem Aktin) und F-Aktin (filamentösem Aktin) zusammen (Holmes et al., 1990; Richelme et al., 1996). Die Mikrotubuli sind Proteinzylinder mit einem Durchmesser von 25 nm und einer Länge von bis zu mehreren Mikrometern. Sie bestehen aus dem Polypeptid Tubulin, welches sich wiederum aus den Untereinheiten α - und β -Tubulin zusammensetzt. Mikrotubuli sind sehr labil und können schnell und dynamisch auf- und abgebaut werden (Liebich, 2010). Die Intermediärfilamente sind stabile Polypeptidketten mit einem Durchmesser von 8-10 nm, die im Zytoplasma entlang von Zug- und Drucklinien meist parallel zueinander verlaufen. Sie werden in die Keratinfilamente, Desminfilamente, Vimentinfilamente, Neurofilamente und Gliafilamente unterteilt (Lazarides, 1980)

und besitzen je eine unterschiedliche Gewebespezifität. Vimentin etwa, kommt in mesenchymalen Zellen und Zellen mit mesenchymaler Herkunft vor (Lazarides, 1980).

Das Zytoskelett erfüllt zahlreiche Aufgaben. Es dient der mechanischen Stabilisierung der Zelle und der Aufrechterhaltung der Zellform, intrazellulären zytoplasmatischen Transportvorgängen und Bewegungen einzelner Organellen. Darüber hinaus sorgt das Zytoskelett für Bewegungsvorgänge bzw. Mobilität der gesamten Zelle (z.B. migrierende Zellen) und für die Ausbildung von Zellfortsätzen (Schröder und Diener, 2000; Liebich, 2010). Zudem ist das Zytoskelett verantwortlich für die Umformung der unreifen Erythrozyten von einer sphärischen in eine ellipsoide Form und gewährleistet die Reversibilität von traumatischen Deformationen der Zellen (Claver und Quaglia, 2009).

4.3.2. Zytoskelettale Elemente der einzelnen Blutzellen

4.3.2.1. Erythrozyten

Die reifen aviären Erythrozyten sind bikonvexe, elliptische Scheiben (Granger et al., 1982). Im Gegensatz zu den Säugererythrozyten besitzen sie einen Zellkern und ein paar Mitochondrien. Auch das Zytoskelett der Vogelerythrozyten weist einige charakteristische Besonderheiten auf. In den Erythrozyten der Vögel sind die drei wesentlichen Zytoskelettelemente, die Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli, vertreten (Granger und Lazarides, 1982). Diese befinden sich in drei deutlich erkennbaren, miteinander verbundenen zytoskelettalen Bereichen, wie dem Spektrin-basierten Membranskelett, dem transzytoplasmatischen System aus Intermediärfilamenten und dem marginalen Band aus Mikrotubuli.

Wie auch die Erythrozyten der Menschen enthalten die aviären Erythrozyten ein submembranöses Netzwerk aus Spektrin- und Aktinfilamenten (Branton et al., 1981), welches beim Vogel in erster Linie aus α - und β -Spektrinen zusammengesetzt ist (Granger et al., 1982). Dieses Membranskelett enthält außerdem Proteine, wie Protein 4.1, Tropomyosin und Ankyrin. Letzteres ist beim Vogel als Goblin bekannt (Granger et al., 1982; Granger und Lazarides, 1984; Moon und Lazarides, 1984). Das Membranskelett trägt zur Gestalt, Widerstandsfähigkeit und Elastizität der Zelle bei.

Neben dem Spektrin-basierten Membranskelett besitzen die aviären Erythrozyten direkt unterhalb der Zellmembran ein marginales Band aus Mikrotubuli (Behnke,

1970; Joseph-Silverstein und Cohen, 1984). Dieses, auch als Randstreifen bezeichnete, marginale Band ist auch bei den kernhaltigen Erythrozyten der Fische, Amphibien und Reptilien zu beobachten (Meves, 1911; Fawcett und Wittebsky, 1964; Maser und Philpott, 1964). Es handelt sich dabei um lange, direkt unterhalb der Zellmembran parallel verlaufende Bündel aus Mikrotubuli (Maser und Philpott, 1964). Die Anzahl der Mikrotubuli sinkt mit fortschreitendem Zellalter der Erythrozyten (Barrett und Dawson, 1974). Die Entwicklung der jungen Erythrozyten geht mit der Transformation von einer sphärischen zu einer flachen Form einher (Barrett und Dawson, 1974). Während dieser Formveränderung spielen die Mikrotubuli eine entscheidende Rolle. Für die Aufrechterhaltung der flachen, ellipsoiden Form der reifen Erythrozyten sind sie dagegen nicht ausschlaggebend (Barrett und Dawson, 1974). Sie dienen jedoch als flexibler Rahmen, der die Zelle von innen vor einer Deformation schützt. Außerdem gewährleistet dieser Rahmen die Reversibilität von Verformungen der Zelle (Joseph-Silverstein und Cohen, 1984).

Die Intermediärfilamente der Hühnererythrozyten bilden ein dreidimensionales, zytoplasmatisches Netzwerk, welches den Zellkern mit dem Membranskelett verbindet (Granger und Lazarides, 1982). Die Intermediärfilamente sind aus zwei Polypeptiden zusammengesetzt: Vimentin kommt in vielen verschiedenen Zellarten vor (Lazarides, 1980) und Synemin, ein Protein mit hohem Molekulargewicht, wurde ursprünglich in der glatten Muskulatur der Vögel isoliert (Granger, 1980; Granger et al., 1982). Dabei bildet Vimentin bei den Erythrozyten der Hühner die Hauptkomponente, während Synemin in periodischen Abständen an den Vimentin-Hauptstrang bindet und diesen quervernetzt (Granger et al., 1982; Moon und Lazarides, 1983). Desmin, der vorherrschende Bestandteil der Intermediärfilamente im Muskel, konnte in den Erythrozyten nicht nachgewiesen werden (Granger et al., 1982). Synemin und Vimentin erstrecken sich als ein schlingenförmiges, ineinander verflochtenes zytoplasmatisches Netzwerk von Filamenten vom Zellkern zur Zellmembran (Granger et al., 1982). Sie erhalten so die Zellform und sichern die Position des Nukleus in der Zelle (Virtanen et al., 1979).

4.3.2.2. Thrombozyten

Das Zytoskelett der Thrombozyten der Säugetiere ist aus Aktinfilamenten, einem submembranösen Bündel aus Mikrotubuli und Intermediärfilamenten zusammengesetzt. Dabei machen die Aktinfilamente den Hauptanteil der Zytoskelettproteine aus, während Vimentin in einem nur geringen Anteil

vorkommt (Spangenberg, 1990; Tablin, 2000; Fox, 2001). Die Aktinfilamente bilden ein Netzwerk im Zytoplasma der Zellen, sowie das submembranöse Membranskelett. Letzteres ist aus kurzen Aktinfilamenten aufgebaut, welche über das Protein Spektrin vernetzt werden (Fox, 2001). Vimentin bildet in inaktivierten Blutplättchen einen Ring nahe der Zellmembran. Bei einer Aktivierung hingegen erstreckt sich Vimentin als ein Netzwerk über die gesamte Zelle, bis in die Pseudopodien hinein (Muszbek, 1987; Tablin, 2000).

Die kernhaltigen Thrombozyten der Vögel, Fische, Amphibien und Reptilien unterscheiden sich morphologisch von den Blutplättchen der Säugetiere: Die Blutplättchen sind stark abgeflachte, winzige zellkernlose Scheiben, während die kernhaltigen Thrombozyten größere und dickere kernhaltige Zellen sind (Lee et al., 2004). Ungeachtet dieser Unterschiede in der Größe und Form der Zellen, haben die kernhaltigen Thrombozyten zwei charakteristische strukturelle Merkmale mit den Blutplättchen gemeinsam: Ein kanalikuläres Membransystem direkt unterhalb der Zellmembran (Daimon und Uchida, 1978; White und Clawson, 1980) und ein submembranöses Bündel aus Mikrotubuli (Fawcett und Wittebsky, 1964; Behnke, 1970). In den kernhaltigen Thrombozyten der Hühner bilden 20-35 Mikrotubuli ein ringförmiges Bündel direkt unter der Zellmembran, welches elektronenmikroskopisch vor allem an den Zellpolen zu erkennen ist (Fawcett und Wittebsky, 1964; Behnke, 1970; Maxwell, 1974; Grecchi et al., 1980). Im Gegensatz dazu bilden beim Fisch mehr als hundert Mikrotubuli dieses Bündel und es befindet sich nicht direkt unterhalb der Zellmembran, sondern nahe des Zellkernes (Fawcett und Wittebsky, 1964). Anders als bei den Erythrozyten sind die Mikrotubuli bei den Thrombozyten der Hühner maßgeblich für die Erhaltung der Zellform verantwortlich (Fawcett und Wittebsky, 1964; Behnke, 1970).

Das marginale Band aus Mikrotubuli wird in den nicht aktivierten kernhaltigen Thrombozyten von einem kortikalen Netzwerk aus F-Aktin umgeben, welches gelegentlich verdichtete Stellen aufweist. Dieses Membranskelett unterstützt die Mikrotubulifunktion und dient als flexibler Rahmen, der die Zellform der Thrombozyten gewährleistet (Lee et al., 2004). Des Weiteren befindet sich im Zytoplasma in unmittelbarer Nähe zu dem breiteren, marginalen Band aus Mikrotubuli ein schmaleres Band aus F-Aktin (Lee et al., 2004).

Bei einer Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Aggregation und Adhäsion der Zellen sowie zu morphologischen Veränderungen, wie Pseudopodienbildung und Abrundung der Zellen. Auch der Zellkern verändert seine Form zu einem gelappten, bis hin zu einem fragmentierten Zustand. Die zytoskelettalen

Veränderungen in den aktivierten kernhaltigen Thrombozyten der Vögel entsprechen den Vorgängen in den Blutplättchen der Säugetiere. Die Mikrotubuli in den kernhaltigen Thrombozyten geben ihre ursprüngliche Organisation auf und nehmen eine gekrümmte bis wellige Form an. Bündel von Mikrotubuli sind dann im zentralen Bereich der Zelle angeordnet und liegen in unmittelbarer Nähe des gelappten bis fragmentierten Zellkernes der aktivierten Thrombozyten. F-Aktin dahingegen breitet sich im gesamten Zytoplasma bis in die Pseudopodien hinein aus. Letzteres spielt dabei eine vorherrschende Rolle bei der Formveränderung der Thrombozyten (Lee et al., 2004).

4.3.2.3. Leukozyten

Das Zytoskelett der Leukozyten der Säugetiere ist ein zelluläres Netzwerk aus Proteinen, welches aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten aufgebaut ist (Strukov et al., 1983; Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004). Es ist maßgeblich an den wichtigsten Funktionen der Leukozyten, wie Motilität, Leukozytenmigration, Antigenerkennung, Bindung und Phagozytose von verschiedenen Strukturen sowie Degranulation und Fusion der Granula mit dem Phagosom beteiligt (Strukov et al., 1983; Vicente-Manzanares et al., 2002; Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004). Die Funktionsfähigkeit des Zytoskeletts basiert dabei auf einer hohen Wandlungsfähigkeit durch den reversiblen Auf- und Abbau der Zytoskelettproteine (Strukov et al., 1983). Außerdem ist es äußerst beweglich und flexibel und ermöglicht somit den Leukozyten, durch enge Spalträume zu ihrem Ziel im Gewebe zu migrieren (Vicente-Manzanares et al., 2002).

Die Aktinfilamente steuern in erster Linie Zellbewegungen und gewährleisten die Verformbarkeit der Membran. Dies wird durch die schnelle Polymerisation und Depolymerisation der Filamente, aber auch durch Zellkontraktionen mit Hilfe von Motorproteinen, wie dem Aktin-bindenden Myosin, bewerkstelligt (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004). Die Mikrotubuli der Leukozyten spielen eine Rolle bei der Degranulation bzw. Phagozytose. Sie stehen in engem Kontakt mit lysosomalen Granula, Vesikeln und Phagosomen. Dabei sind die lysosomalen Granula und Vesikel entlang der Mikrotubuli aneinandergereiht und gruppieren sich um die Phagosomen. Das deutet darauf hin, dass die Mikrotubuli eine Leitschiene darstellen, über die die Lysosomen zu der phagozytischen Vakuole gelangen (Ryder et al., 1982). Die meisten Intermediärfilamente der Leukozyten sind aus Vimentin aufgebaut. Sie gewährleisten die Stabilität und das Widerstandsvermögen der Zellen während der Diapedese (Vicente-Manzanares

und Sanchez-Madrid, 2004).

Bei den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere gehört Aktin zu den Hauptkomponenten des Zytoskeletts (Bengtsson et al., 2006). Vimentin ist in den nichtaktivierten neutrophilen Granulozyten der Menschen eher perinukleär zu finden, während sich die Vimentinfilamente in den aktivierten Zellen im hinteren Zellpol anordnen (Olins et al., 2000). Der Inhalt der Granula der eosinophilen Granulozyten von Krähenscharbe, Tölpel, Kormoran, Seidenreiher und Weißstorch ist aus dichten Bündeln von Mikrofilamenten in unterschiedlichen Anordnungen aufgebaut. Einzig in den Granula vom Kuhreiher sind neben den Mikrofilamenten auch Mikrotubuli zu erkennen. Bei Hühnern ist dieser faserartige Inhalt nicht bekannt (Maxwell, 1978). Tubulin und Aktin spielen in den humanen basophilen Granulozyten eine bedeutende Rolle bei der Histaminfreisetzung. Die Aktinfilamente sind bei den Mastzellen netzförmig um die Granula angeordnet (Nielsen et al., 2004). Bei den basophilen Granulozyten der Vögel sind die aus Mikrotubuli bestehenden Zentriolen üblicherweise am Rand der Zelle gelegen, während sie bei den aviären heterophilen Granulozyten eine zentrale Position im Zytoplasma einnehmen (Maxwell, 1973). Das Zytoskelett der Lymphozyten der Säugetiere ist ebenfalls aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten zusammengesetzt (Brown et al., 2001; Nieminen et al., 2006; Billadeau et al., 2007). Dabei besitzen die humanen B-Lymphozyten viele Aktinfilamente, während die T-Lymphozyten und Plasmazellen ein ausgeprägtes Netzwerk an Intermediärfilamenten aufweisen (Zauli et al., 1988). Die Aktinfilamente sind in den Lymphozyten der Menschen in der submembranösen Region lokalisiert, die Mikrotubuli verlaufen strahlenförmig vom Zentrosom ausgehend in die Peripherie und Vimentin bildet ein Geflecht im Zytoplasma (Brown et al., 2001). Bei den aviären Lymphozyten sind die Zentriolen und Mikrotubuli für gewöhnlich gegenüber der Einkerbung des Zellkernes lokalisiert (Maxwell, 1974). Über das Zytoplasma der Monozyten der Säugetiere erstreckt sich ein Netzwerk aus Aktinfilamenten, welches sich bis in die Pseudopodien hinein verlängert (Meloni, 2011). Auch Vimentin bildet ein zytoplasmatisches Netzwerk in den Monozyten und Makrophagen (Nieminen et al., 2006). Die Mikrotubuli weisen demgegenüber einen vom perinukleären Bereich ausgehenden strahlenförmigen Verlauf auf (Meloni, 2011). Auch bei den aviären Monozyten sind die Zentriolen und Mikrotubuli in der Regel gegenüber der Einkerbung des Zellkernes lokalisiert (Maxwell, 1974). Des Weiteren sind in den Monozyten der Vögel Bündel von feinen, wellenförmigen Filamenten zu erkennen, die sich parallel zu der Zellkernmembran erstrecken (Maxwell, 1974).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Die Blutproben für die vorliegende Arbeit stammen von insgesamt 30 Hühnern. Dabei handelt es sich um 15 Tiere der Rasse Lohmann Brown (=LB, braune Legehybriden) und 15 Tiere der Rasse Lohmann Selected Leghorn (=LSL, weiße Legehybriden). Darunter sind 28 weibliche und zwei männliche Tiere, jeweils im Alter von 12-24 Monaten.

Die Tiere wurden von der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische sowie von dem Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Blutentnahme zur Verfügung gestellt. Das Blut wurde aus der rechten Vena jugularis in Lithium-Heparin-Röhrchen übertragen.

Von dem Blut jedes Tieres wurden Blutausstriche auf unbeschichtete Super Frost®-Objektträger (ROTH, Karlsruhe) angefertigt und nach dem Lufttrocknen unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Ein Teil der Blutausstriche wurde direkt nach dem Ausstreichen für 10 Minuten in Methanol (ROTH, Karlsruhe) fixiert. Außerdem wurde von jedem Huhn im Labor (Synlab.vet, Augsburg) ein kleines Blutbild erstellt.

Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Hühner und die Untersuchungsmethoden

(EM=Elektronenmikroskopie, LM=Lichtmikroskopie, GHC=Glykohistochemie, IHC=Immunhistochemie, LSL=Lohmann Selected Leghorn, LB=Lohmann Brown)

Huhn Nr.	Rasse	Alter	w/m	EM	LM	GHC	IHC
1	LSL	12 Mo	m		x	x	
2	LB	24 Mo	m		x	x	
3	LB	12 Mo	w		x	x	
4	LSL	12 Mo	w		x	x	
5	LB	12 Mo	w		x	x	
6	LB	12 Mo	w		x	x	
7	LSL	12 Mo	w		x	x	
8	LB	12 Mo	w		x	x	

9	LSL	12 Mo	w		x	x	
10	LSL	12 Mo	w		x	x	
11	LSL	12 Mo	w			x	
12	LB	12 Mo	w			x	x
13	LB	12 Mo	w			x	x
14	LB	12 Mo	w			x	x
15	LB	12 Mo	w			x	x
16	LB	12 Mo	w			x	x
17	LB	12 Mo	w			x	x
18	LB	12 Mo	w		x	x	x
19	LB	12 Mo	w		x	x	x
20	LSL	12 Mo	w			x	x
21	LSL	12 Mo	w			x	x
22	LSL	12 Mo	w			x	x
23	LSL	12 Mo	w			x	x
24	LSL	12 Mo	w			x	x
25	LSL	12 Mo	w				x
26	LB	18 Mo	w				x
27	LB	18 Mo	w				x
28	LSL	18 Mo	w				x
29	LSL	18 Mo	w	x			x
30	LSL	18 Mo	w	x			x

2. Lichtmikroskopische Färbungen

Für die folgenden Färbungen dienten Blutausstriche von je 12 Tieren. Es wurden fünf Übersichtsfärbungen (Diff-Quick, H.E., May-Grünwald, Giemsa, Pappenheim) und vier substrathistochemische Färbungen (Sirius-Red, Toluidinblau, PAS, Alcianblau) durchgeführt. Zum Schutz der gefärbten Ausstriche wurden diese nach dem Lufttrocknen mit einer dünnen Schicht Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim) und einem Deckglas (ROTH, Karlsruhe) bedeckt und dunkel aufbewahrt.

Die gefärbten Präparate wurden an einem Lichtmikroskop (Aristoplan, LEITZ, Wetzlar) ausgewertet. Für die Fotodokumentation diente die an das Lichtmikroskop angeschlossene Kamera Lumenera USB Camera Release 3.8 (LUMENERA CORPORATION, Ottawa, Canada). Die Bezugsquellen der Materialien sind im Anhang (Kapitel IX.1.1.) aufgelistet.

2.1. Haema-Schnellfärbung (Diff-Quick)

Bei dieser Schnellfärbemethode färben sich die Zellkerne dunkelblau-violett. Die Granula der neutrophilen Granulozyten zeigen sich rosa, die der eosinophilen Granulozyten orange-rot und die der basophilen Granulozyten dunkelviolett-schwarz. Das Zytoplasma der Lymphozyten färbt sich hellviolett und das der Monozyten hellblau. Die Erythrozyten erscheinen rötlich und die Thrombozyten violett.

Durchführung der Färbung:

1. Eintauchen der OT in Fixierlösung	5 x 1 Sekunde
2. Eintauchen in Färbelösung I (rot)	5 x 1 Sekunde
3. Eintauchen in Färbelösung II (blau)	5 x 1 Sekunde
4. Spülen mit Aqua dest.	

2.2. Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung

Die H.E.-Färbung stellt eine Übersichtsfärbung dar, bei der sich die Zellkerne blau und das Zytoplasma rot anfärben (Mulisch und Welsch, 2010).

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol	10 Minuten
2. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer	20 Minuten
3. Spülen mit Aqua dest.	
4. „Bläuen“ in fließendem Leitungswasser	20 Minuten
5. Einstellen in Eosinlösung	10 Minuten
6. Spülen mit Aqua dest.	

2.3. May-Grünwald-Färbung

Bei der May-Grünwald-Färbung handelt es sich um eine einfache Differentialfärbung. Dabei stellen sich die Zellkerne blau-violett dar. Die eosinophilen Granula färben sich ziegelrot und die neutrophilen Granula hellviolett bis rötlich, während die basophilen Granula kräftig blau-violett sind. Das Zytoplasma der Erythrozyten zeigt sich rötlich, das der Lymphozyten blau und das der Monozyten taubenblau. Die Thrombozyten erscheinen violett (Mulisch und Welsch, 2010).

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol	10 Minuten
2. Bedecken der OT mit May-Grünwald-Lösung	4 Minuten
3. Auftropfen der gleichen Menge Aqua dest.	10 Minuten
4. Spülen mit Aqua dest.	

2.4. Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung ist ebenfalls eine einfache Differentialfärbung, bei der sich das Zellkernchromatin der Blutzellen rötlich-violett bis blau anfärbt. Das Zytoplasma der Erythrozyten ist rötlich und das der Lymphozyten blau. Das Monozytenzytoplasma nimmt einen grau-blauen Farbton an, wobei manchmal feine purpurrote Azurkörnchen enthalten sein können. Die neutrophilen Granula zeigen sich hell-violett bzw. rötlich, die eosinophilen Granula sind rot bis rotbraun

und die basophilen Granula kräftig dunkelviolet gefärbt. Die Thrombozyten erscheinen blau mit violetter Innenkörper (Mulisch und Welsch, 2010).

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol	10 Minuten
2. Bedecken der OT mit 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung	45 Minuten
3. Spülen mit Aqua dest.	

2.5. Panoptische Färbung nach Pappenheim

Bei dieser Färbemethode handelt es sich um eine Kombination aus der May-Grünwald-Färbung und der Giemsa-Färbung. Hier zeigen sich die Zellkerne rötlich-violett bis blau. Die Granula der eosinophilen Granulozyten sind orange bis ziegelrot, die der neutrophilen Granulozyten hellviolett und die der basophilen Granulozyten dunkelviolet gefärbt. Das Zytoplasma der Erythrozyten erscheint rosa und das der Lymphozyten hellblau. Das Zytoplasma der Monozyten färbt sich graublau, teilweise zeigen sich hier die feinen Azurkörnchen purpurrot (Mulisch und Welsch, 2010).

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol	10 Minuten
2. Bedecken der OT mit May-Grünwald-Färbelösung	3 Minuten
3. Auftropfen der gleichen Menge Aqua dest.	1 Minute
4. Abgießen der Färbelösung	
5. Bedecken der OT mit 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung	20 Minuten
6. Spülen mit Aqua dest.	

2.6. Sirius-Red-Färbung

Die Sirius-Red-Färbung ermöglicht die gezielte Anfärbung von eosinophilen Granulozyten im Blutausstrich. Deren Granula zeigen sich intensiv rot (Wehrend et al., 2004).

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Präparate in Methanol	10 Minuten
2. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer	10 Minuten
3. „Bläuen“ in fließendem Leitungswasser	15 Minuten
4. Einstellen in Sirius-Red-Färbelösung	90 Minuten
5. Spülen mit Aqua dest.	

2.7. Toluidinblau-Färbung

Diese Färbung stellt basophile Strukturen blau dar, daneben sind aber auch violette, rot-violette oder rote (metachromatische) Strukturen als basophil einzustufen (Mulisch und Welsch, 2010). Auf diese Weise können unter anderem die basophilen Granulozyten gut dargestellt werden.

Durchführung der Färbung:

1. Bedecken der OT mit Toluidinblau-Färbelösung	5 Minuten
2. Spülen mit Aqua dest.	

2.8. Periodic acid Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

Die PAS-Reaktion dient dem Nachweis von komplexen Kohlenhydraten. Dabei stellen sich PAS-positive Substanzen leuchtend rot, magenta, pink oder hellviolett dar, während die Zellkerne blau gefärbt sind (Mulisch und Welsch, 2010).

Zur gezielten Darstellung von Glykogen wurde ein Teil der Blutausstriche mit Amylase vorbehandelt. Das Enzym baut eventuell vorhandenes Glykogen ab, so dass die anschließende PAS-Reaktion schwächer ausfällt.

Durchführung der Färbung:

<i>Amylase-Vorbehandlung:</i> 0,5% α -Amylase auf OT auftropfen, 37°C	10 Minuten
1. Fixieren der Ausstriche in Formoldampf	5 Minuten
2. Spülen mit Leitungswasser	

3. 0,5% wässrige Perjodsäurelösung unter Lichtabschluss	5 Minuten
4. Spülen mit Aqua dest.	
5. Einstellen in Schiffs Reagenz unter Lichtabschluss	15 Minuten
6. Spülen in SO ₂ -Wasser	2 x 2 Minuten
7. Spülen mit fließendem Leitungswasser	3 Minuten
8. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer	5 Minuten
9. „Bläuen“ in fließendem Leitungswasser	8 Minuten

2.9. Alcianblau-Färbung

Die Färbung mit Alcianblau 8GX bei einem pH-Wert von 2,5 dient dem Nachweis von sauren Glykoproteinen, wobei hier sowohl Sulfat- als auch Carboxylgruppen positiv reagieren. Bei einem pH-Wert von 1,0 färben sich dagegen nur die stark sulfatierten Glykoproteine. Positiv reagierende Substanzen sind türkis-blau gefärbt. Die Zellkerne stellen sich hellrot dar und der Hintergrund erscheint zartrosa (Mulisch und Welsch, 2010).

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol	10 Minuten
2. Einstellen in Alcianblaulösung pH 1,0/pH 2,5	10 Minuten
3. Spülen mit fließendem Leitungswasser	3 Minuten
4. Spülen mit Aqua dest.	
5. Einstellen in Kernechtrotlösung	10 Minuten
6. Spülen mit fließendem Leitungswasser	3 Minuten
7. Spülen mit Aqua dest.	

3. Elektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Blutproben in Zentrifugenröhrchen ohne Gerinnungshemmer verbracht und unmittelbar nach der Entnahme bei 2000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Das zentrifugierte Blut wurde mindestens eine Stunde bei 4°C aufbewahrt. Von den entstehenden drei Schichten im Zentrifugenröhrchen wurde nur die mittlere, weiße Schicht zur Weiterverarbeitung verwendet. Es wurden die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt (Bezugsquellen der Materialien siehe Anhang):

1. Fixieren der Probe in Karnovsky-Gebrauchslösung eine Stunde bei 4°C
2. Wechseln der Probe in Karnovsky-Gebrauchslösung über Nacht bei 4°C
3. Waschen in 0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) dreimal je eine Stunde bei 4°C
4. Vorkontrastieren mit 1,5% Kaliumferrocyanid + 1% Osmiumtetroxid in 0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) für 2 Stunden bei 4°C
5. Wechseln in 0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) dreimal je 20 Minuten bei 4°C
6. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe auf dem Schüttler bei RT: Je 20 Minuten in Ethanol 30% und 50%, dann je 30 Minuten in Ethanol 70% und 90%, dann Ethanol absolut dreimal je 30 Minuten
7. Propylenoxid zweimal je 15 Minuten auf dem Schüttler bei RT
8. Schrittweise Einbetten in Epon auf dem Schüttler bei RT: Epon-Propylenoxid-Gemisch (Verhältnis 1:2) für eine Stunde, dann Epon-Propylenoxid-Gemisch (Verhältnis 1:1) über Nacht, dann reines Epon für eine Stunde
9. Proben in Einbettformen aus Silikon (PLANO, Wetzlar) gießen
10. Polymerisation ca. 48 Stunden bei 60°C
11. Anfertigen von Semidünnschnitten (Dicke: 1µm) mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, REICHERT-JUNG, Wien)
12. Färbung der Semidünnschnitte mit Färbelösung nach Richardson und Auswahl geeigneter Bereiche unter dem Lichtmikroskop (Aristoplan, LEITZ, Wetzlar)

13. Anfertigen von Ultradünnschnitten (Dicke: 60nm) mit dem Ultramikrotom (Ultracut E, REICHERT-JUNG, Wien)

14. Schnitte auf Kupfernetze (Grids hexagonal Copper 150 Mesh, POLYSCIENCES, Warrington, USA) auffangen

15. Nachkontrastieren mit 80-100µl Uranylacetat je Grid 20 Minuten, dann dreimal Waschen in Aqua dest., anschließend 80-100µl Bleicitrat nach Reynolds auf die Grids tropfen und 3-5 Minuten kontrastieren, dann wieder dreimal Waschen in Aqua dest. und Trocknen der Grids

16. Elektronenmikroskopie und fotografische Dokumentation der Proben am Elektronenmikroskop Zeiss EM 902 (ZEISS, Oberkochen)

4. Glykohistochemie

Die glykohistochemischen Untersuchungen wurden anhand von vierzehn direkt an Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelten Lektinen und drei biotinylierten Lektinen durchgeführt. Pro Lektin wurden zehn Blutausstriche vom Huhn auf die Lektinbindung an die verschiedenen Blutzellen untersucht. Zusätzlich wurden je drei Ausstriche ohne vorherige Fixierung mit Methanol und eine Negativkontrolle mitgefärbt. Als Positivkontrolle dienten Blutausstriche von Strauß oder Rind. Die fertig gefärbten Ausstriche wurden bis zur Auswertung im Kühlschrank unter Lichtabschluss aufbewahrt.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20, LEITZ, Wetzlar). Die Fotoaufnahmen wurden mit der Progress®CF cool Kamera (JENOPTIK, Jena) und dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM 510 Meta, ZEISS, Oberkochen) angefertigt. Die Bezugsquellen der Materialien sind im Anhang (Kapitel IX.1.3.) aufgelistet.

4.1. FITC markierte Lektine

Die in dieser Arbeit eingesetzten FITC markierten Lektine sind mit ihrer jeweiligen Zuckerspezifität in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten FITC markierten Lektine. Modifiziert nach Gabius, Habermann, Monsigny und Rüdiger (Monsigny et al., 1980; Rüdiger und Gabius, 2001; Rüdiger und Gabius, 2009; Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011).

Lektin	Abkürzung	Spezifität für Monosaccharide
Concanavalin Agglutinin	ConA	Man/Glc
Lens culinaris Agglutinin	LCA	Man/Glc
Pisum sativum Agglutinin	PSA	Man/Glc
Peanut Agglutinin	PNA	Gal
Ricinus communis Agglutinin	RCA	Gal
Griffonia simplicifolia Agglutinin I	GSL I	GalNAc

Sophora japonica Agglutinin	SJA	GalNAc
Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	GalNAc
Soybean Agglutinin	SBA	GalNAc
Wheat germ Agglutinin	WGA	GlcNAc/Neu5Ac
Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs	GlcNAc *
Ulex europaeus Agglutinin I	UEA I	Fuc
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	PHA-E	**
Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	PHA-L	**

Man: D-Mannose, Glc: D-Glukose, Gal: D-Galaktose, GlcNAc: N-Acetyl-D-Glukosamin, Neu5Ac: N-Acetyl-D-Neuraminsäure, GalNAc: N-Acetyl-D-Galaktosamin, Fuc: L-Fukose

* WGAs ist bei physiologischem pH-Wert negativ geladen, im Gegensatz zu dem positiv geladenen WGA. WGAs bindet nicht an Glykokonjugate, die N-Acetyl-D-Neuraminsäure enthalten, bindet aber an N-Acetyl-D-Glukosamin enthaltende Glykokonjugate. Somit kann der N-Acetyl-D-Neuraminsäuregehalt ermittelt werden (Monsigny et al., 1980).

** Keine Monosaccharide als Liganden bekannt

Die Blutausrichthe wurden nach folgendem Protokoll gefärbt:

1. Fixieren in Methanol und lufttrocknen lassen	10 Minuten
2. Waschen mit PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
3. 100 µl des mit PBS-Puffer verdünnten Lektins (10µg/ml) auftragen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer unter Lichtabschluss	60 Minuten
5. Waschen mit PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3 x 5 Minuten
6. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

Als Negativkontrolle wurde auf je einen Blutausschrieb vom Huhn anstatt des Lektins 100µl PBS-Puffer aufgetragen.

4.2. Biotinylierte Lektine

Die in nachfolgender Tabelle aufgelisteten biotinylierten Lektine wurden mittels der Streptavidin-Biotin-Methode auf ihre Bindungsfähigkeit an den Hühnerblutzellen untersucht.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten biotinylierten Lektine. Modifiziert nach Gabius, Habermann und Rüdiger (Rüdiger und Gabius, 2001; Rüdiger und Gabius, 2009; Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011).

Lektin	Abkürzung	Spezifität für Monosaccharide
Viscum album Agglutinin	VAA	Gal
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	Gal/GalNAc
Maackia amurensis Agglutinin I - Leukoagglutinin	MAA I	**

Man: D-Mannose, Glc: D-Glukose, Gal: D-Galaktose, GlcNAc: N-Acetyl-D-Glukosamin, Neu5Ac: N-Acetyl-D-Neuraminsäure, GalNAc: N-Acetyl-D-Galaktosamin, Fuc: L-Fukose

** Keine Monosaccharide als Liganden bekannt

Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Fixieren der Blutausschriebe in Methanol	10 Minuten
2. Waschen mit PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
3. Protein Block Serum-Free auftropfen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10 Minuten
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100 µl des mit PBS-Puffer verdünnten Lektins (10µg/ml) auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer	60 Minuten
8. Waschen mit PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten

9. 200µl des mit PBS-Puffer verdünnten Streptavidin-FITC (Konzentration 1:500) auftragen	
10. Inkubieren in Feuchtkammer unter Lichtabschluss	30 Minuten
11. Waschen mit PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3 x 5 Minuten
12. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

Als Negativkontrolle wurden Ausstriche verwendet, auf die anstatt des Lektins 100µl PBS-Puffer aufgetragen wurde. Die anderen Arbeitsschritte entsprechen dem oben genannten Protokoll.

4.3. Vorbehandlung mit Hemmzuckern

Die Vorbehandlung mit Hemmzuckern dient der Überprüfung der Spezifität der stark positiv reagierenden Lektine ConA, PSA, LCA, WGA und WGAs. Hierfür wurden die Lektine mit ihrem jeweils spezifischen Kohlenhydrat jeweils 30 Minuten (für WGA und WGAs) bzw. 60 Minuten (für ConA, PSA und LCA) vorinkubiert. Die jeweiligen Konzentrationen der in der Lektinverdünnung (10 µg/ml PBS) gelösten Hemmzucker sind in der Tabelle unten aufgeführt. Anschließend wurden 100µl des Lektin-Hemmzucker-Gemischs auf je zwei Objektträger aufgetragen. Die weiteren Schritte entsprechen dem in Kapitel 4.1. genannten Protokoll für FITC markierte Lektine. Die Positivkontrolle stellte je ein Ausstrich vom Strauß dar. Als Negativkontrolle wurde auf je einen Ausstrich das Lektin ohne Hemmzucker aufgetragen.

Tabelle 5: Hemmzucker für die Lektin histochemie

Lektin	Hemmzucker	Konzentration
Con A	Methyl- α -Mannopyranosid	84,8mg/ml
PSA	Methyl- α -Mannopyranosid	84,8mg/ml
LCA	Methyl- α -Mannopyranosid	84,8mg/ml
WGA	Chitin Hydrolysat	1 : 4
WGAs	Chitin Hydrolysat	1 : 4

4.4. Vorbehandlung mit Neuraminidase

Bei den negativ bzw. sehr schwach reagierenden Lektinen VAA, SBA, DBA, SJA und GSL I wurde eine Vorbehandlung mit Neuraminidase durchgeführt. Diese spaltet eventuell vorhandene endständige Sialinsäure ab, so dass die Lektine dann an die vorher maskierten Zuckerstrukturen der Blutzellen binden können.

Für jedes Lektin wurden drei Blutausrichthe vom Huhn folgendem Protokoll unterzogen:

1. Fixieren in Methanol	10 Minuten
2. Waschen in Natrium-Acetatpuffer (pH 5,5)	3 x 5 Minuten
3. 200µl Neuraminidase-Gebrauchslösung auftragen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer, 37°C	60 Minuten
5. Waschen mit PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
6. 100µl der Lektinverdünnung (10µg/ml PBS) auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer, dunkel	60 Minuten
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
9. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

5. Immunhistochemie

Folgende Untersuchungen wurden zur Differenzierung der CD4- und CD8-Lymphozyten sowie zur Darstellung der eosinophilen Granulozyten und der verschiedenen Zytoskelettbestandteile durchgeführt.

Die Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20, LEITZ, Wetzlar) ausgewertet. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit der Progress®CF cool Kamera (JENOPTIK, Jena) und dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM 510 Meta, ZEISS, Oberkochen). Die Bezugsquellen der Materialien sind im Anhang (Kapitel IX.1.4.) aufgelistet.

5.1. Immunhistochemische Untersuchungen spezifischer Antigene der T-Lymphozyten

Für die immunhistochemische Identifizierung der CD4- und CD8-Lymphozyten wurden frische, maximal zwei Tage alte Blutausstriche von je zehn Hühnern verwendet. Die Hälfte der Blutausstriche wurde nach dem Ausstreichen in Methanol fixiert, die andere Hälfte blieb unfixiert. Die mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelten spezifischen Lymphozytenantikörper wurden mit Antibody-Diluent auf die in der Tabelle angegebene Konzentration verdünnt.

Tabelle 6: Antikörper zum Nachweis von CD4- und CD8-Lymphozyten

Zielzelle	Antikörper	Wirt	Reaktivität	Konz.
CD4-Lymphozyten	CD4-Antikörper (FITC)	Maus	Huhn, Vogel	1:50
CD8-Lymphozyten	CD8 α -Antikörper (FITC)	Maus	Huhn, Pute	1:200

Die immunhistochemische Differenzierung der Lymphozyten wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Die Hälfte der Blutausstriche 10 Minuten in Methanol fixieren, die andere Hälfte nur lufttrocknen lassen

2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4) 3 x 5 Minuten

3. Protein Block Serum-Free auftropfen

4. Inkubieren in Feuchtkammer	10 Minuten
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100µl Antikörperlösung pro Objektträger auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer bei Raumtemperatur, dunkel	60 Minuten
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
9. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

Die Positivkontrolle stellte je ein Putenblutausstrich dar. Auf die Negativkontrolle wurde anstatt der Antikörperlösung nur 100µl Antibody-Diluent aufgetragen. Die gefärbten Präparate wurden bis zur Auswertung im Kühlschrank unter Lichtabschluss aufbewahrt.

5.2. Immunhistochemische Identifizierung der eosinophilen Granulozyten

Für die folgende Untersuchung wurden zehn frische Blutausstriche vom Huhn verwendet. Die Konzentrationen der in Antibody-Diluent gelösten Primär- und Sekundärantikörper sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 7: Antikörper zum Nachweis des Major Basic Protein der eosinophilen Granulozyten

Zielzelle	Primärantikörper	Konz.	Sekundärantikörper	Konz.
Eosinophile Granulozyten	Mouse anti-human Eosinophil Major Basic Protein (EMBP)	1:100	Rabbit anti-mouse-IgG- FITC	1:20

Für die immunhistochemische Darstellung des Major Basic Protein der eosinophilen Granulozyten wurde folgendes Protokoll durchgeführt:

1. Die Hälfte der Blutausrüche 10 Minuten in Methanol fixieren, die andere Hälfte nur lufttrocknen lassen	
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
3. Protein Block Serum-Free auftragen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10 Minuten
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100µl der Primärantikörperlösung auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer bei 5°C	über Nacht
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
9. 200µl der Sekundärantikörperlösung auftragen	
10. Inkubieren in Feuchtkammer, Raumtemperatur, dunkel	30 Minuten
11. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3 x 5 Minuten
12. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

Die Ausstriche wurden bis zur Auswertung unter Lichtabschluss im Kühlschrank aufbewahrt.

5.3. Untersuchungen des Zytoskeletts

5.3.1. Histochemischer Nachweis von Aktin mit Phalloidin-TRITC

Für die Darstellung von F-Aktin der Hühnerblutzellen wurden zehn frische, maximal drei Tage alte Blutausstriche untersucht. Der Nachweis erfolgte mithilfe des an TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) gekoppelten Toxins Phalloidin.

Tabelle 8: Nachweis von F-Aktin mit Phalloidin-TRITC

Zytoskelettaler Bestandteil	F- Aktin bindendes Reagenz	Konzentration
F-Aktin	Phalloidin-TRITC	1:500

Durchführung des Nachweises:

1. Die Hälfte der Blutausstriche 10 Minuten in Methanol fixieren, die andere Hälfte nur lufttrocknen lassen	
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
3. Protein Block Serum-Free auftropfen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10 Minuten
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100µl Phalloidin-TRITC (in Antibody-Diluent, 1: 500) auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer, dunkel, Raumtemperatur	45 Minuten
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3 x 5 Minuten
9. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

Die Positivkontrolle stellte ein Blutausstrich vom Strauß dar. Für die Negativkontrolle wurde auf einen Ausstrich anstatt des Phalloidin-TRITC 100µl des Antibody-Diluent aufpipetiert. Die Präparate wurden lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

5.3.2. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin

Für die Darstellung der zytoskelettalen Bestandteile Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin der Hühnerblutzellen dienten zehn maximal drei Tage alte Blutausrichthe. Der immunhistochemische Nachweis wurde indirekt mit FITC markierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Konzentrationen der in Antibody-Diluent gelösten Primär- und Sekundärantikörper sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9: Antikörper zur Untersuchung des Zytoskeletts (Bezugsquellen der Antikörper siehe Anhang)

Zytoskelettaler Bestandteil	Primärantikörper	Konz.	Sekundärantikörper	Konz.
Vimentin	Mouse anti-vimentin	1:500	Rabbit anti-mouse-IgG-FITC	1:20
Tubulin	Mouse anti-tubulin	2µg/ml	Rabbit anti-mouse-IgG-FITC	1:20
Myosin	Rabbit anti-non muscle myosin	1:500	FITC anti-rabbit IgG (made in goat)	1:300
Zytokeratin	Pancytokeratin plus	1:100	Rabbit anti-mouse-IgG-FITC	1:20

Der immunhistochemische Nachweis wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Die Hälfte der Blutausrichthe 10 Minuten in Methanol fixieren, die andere Hälfte nur lufttrocknen lassen	
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten
3. Protein Block Serum-Free auftropfen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10 Minuten
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100µl der Primär-Antikörperlösung aufpipetieren	
7. Inkubieren in Feuchtkammer, 7°C	über Nacht
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Minuten

9. 100µl der Sekundär-Antikörperlösung auftragen	
10. Inkubieren in Feuchtkammer unter Lichtabschluss	30 Minuten
11. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3 x 5 Minuten
12. Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

Die Negativkontrolle stellte je ein Ausstrich vom Huhn dar, auf den der Primärantikörper nicht aufgetragen wurde. Als Positivkontrolle wurde ein Ausstrich vom Strauß verwendet. Die Ausstriche wurden unter Lichtabschluss bei 7°C aufbewahrt.

IV. ERGEBNISSE

1. Blutbilder der untersuchten Hühner

Von allen untersuchten Tieren wurde im Labor Synlab.vet (Augsburg) ein kleines Blutbild erstellt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 10: Kleines Blutbild der einzelnen Hühner

Referenzbereiche: Leukozyten 9,0-32,0 G/l; Erythrozyten 1,3-4,5 T/l; Hämatokrit 23-55% (Quelle: Synlab.vet, Augsburg).

(LEU=Leukozyten, ERY=Erythrozyten, HKT=Hämatokrit, LSL=Lohmann Selected Leghorn, LB=Lohmann Brown)

Huhn Nr.	LEU (G/l)	ERY (T/l)	HKT (%)	Rasse	Alter	w/m
1	4,0	4,38	47	LSL	12 Mo	m
2	3,0	5,13	48	LB	24 Mo	m
3	10,0	2,48	30	LB	12 Mo	w
4	3,8	2,85	31	LSL	12 Mo	w
5	0,8	2,00	30	LB	12 Mo	w
6	1,0	1,25	32	LB	12 Mo	w
7	3,8	2,15	33	LSL	12 Mo	w
8	5,5	0,93	28	LB	12 Mo	w
9	1,5	3,05	30	LSL	12 Mo	w
10	3,5	2,70	32	LSL	12 Mo	w
11	4,0	1,50	29	LSL	12 Mo	w
12	3,5	2,53	30	LB	12 Mo	w
13	5,5	2,38	31	LB	12 Mo	w
14	3,5	2,09	31	LB	12 Mo	w
15	7,3	2,40	29	LB	12 Mo	w
16	6,5	2,06	27	LB	12 Mo	w
17	5,3	1,97	27	LB	12 Mo	w
18	4,3	1,77	29	LB	12 Mo	w

19	4,3	2,46	30	LB	12 Mo	w
20	4,8	1,99	28	LSL	12 Mo	w
21	6,8	2,39	30	LSL	12 Mo	w
22	1,8	2,79	31	LSL	12 Mo	w
23	2,8	2,07	29	LSL	12 Mo	w
24	5,0	2,64	31	LSL	12 Mo	w
25	4,3	2,37	27	LSL	12 Mo	w
26	7,8	2,54	31	LB	18 Mo	w
27	15,0	2,57	30	LB	18 Mo	w
28	10,0	2,50	31	LSL	18 Mo	w
29	7,5	2,48	31	LSL	18 Mo	w
30	10,0	2,43	30	LSL	18 Mo	w

Bei den Tieren der Rasse Lohmann Selected Leghorn liegen die Durchschnittswerte der Erythrozyten (2,6 T/l) und des Hämatokrits (31,3%) knapp über den Werten der Tiere der Rasse Lohmann Brown (ERY: 2,3 T/l; HKT: 30,9%). Die mittlere Leukozytenzahl ist bei der Rasse Lohmann Brown geringfügig höher als bei der Rasse Lohmann Selected Leghorn (LB: 5,6 G/l; LSL: 4,9 G/l). Dagegen liegen bei den männlichen Tieren die Mittelwerte der Erythrozytenzahlen (4,8 T/l) und der Hämatokritwerte (47,5%) deutlich über den Durchschnittswerten der weiblichen Tiere (ERY: 2,3 T/l; HKT: 29,9%). Die Leukozytenzahl liegt bei den weiblichen Tieren (5,4 G/l) im Mittel höher als bei den männlichen Tieren (3,5 G/l).

2. Ergebnisse der lichtmikroskopischen Färbungen

Anhand der verschiedenen Übersichts- und substrathistochemischen Färbungen wurden die Morphologie und die jeweilige Anfärbung der einzelnen Blutzellen untersucht.

2.1. Erythrozyten

Die Hühnererythrozyten sind ovale Zellen mit einem zentralen, spindelförmigen Zellkern und einer glatten Zellmembran. Bei vielen Erythrozyten findet sich lichtmikroskopisch im sonst gleichmäßigen Zytoplasma ein kleiner granulärer Einschluss, der sich vor allem in der Diff-Quick- und Toluidinblau-Färbung basophil darstellt. Außerdem können unreife Erythrozyten nachgewiesen werden. Sie sind runder als die reifen Erythrozyten und beinhalten einen runderen Kern mit locker strukturiertem Chromatin. Ihr Zytoplasma färbt sich graublau. Sehr vereinzelt finden sich Dakryozyten (tränenförmige Erythrozyten) in den Blutausstrichen. Es sind keine Erythroplastiden zu erkennen. Das Ergebnis der verschiedenen Übersichtsfärbungen ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 11: Übersichtsfärbungen der Erythrozyten

	Zytoplasma	Zellkern
Diff-Quick	rosa-orange	violett
H.E.	rosa-rot	dunkelblau
May-Grünwald	altrosa	blau
Giemsa	altrosa	blau
Pappenheim	altrosa	blau-violett

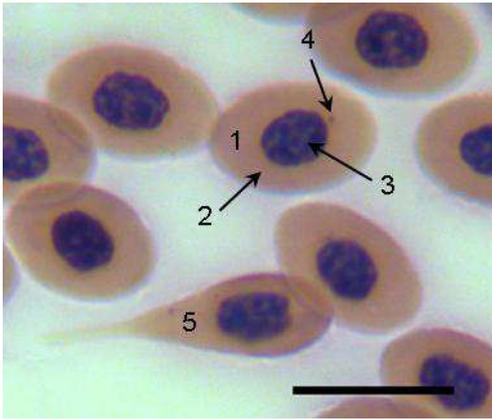


Bild 1: Blut Huhn, Erythrozyten. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Erythrozyt (1) und Dakryozyt (5). Im Zytoplasma (2) des Erythrozyten stellt sich ein kleiner basophiler Einschluss (4) dar. Der Zellkern (3) ist stark kondensiert. SB = 10 µm.

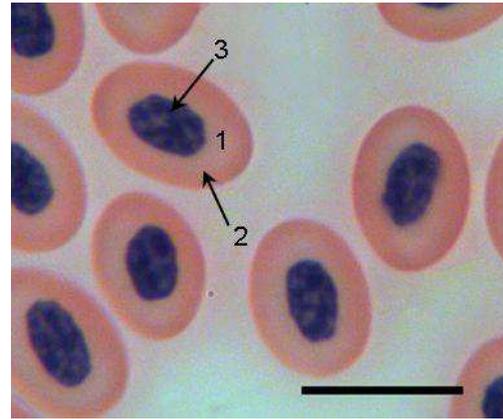


Bild 2: Blut Huhn, Erythrozyten. H.E.-Färbung.

Huhn 19, LB, weiblich, 12 Monate.

Erythrozyt (1). Im rosa-roten Zytoplasma (2) befindet sich zentral der spindelförmige, blaue Nukleus (3). SB = 10 µm.

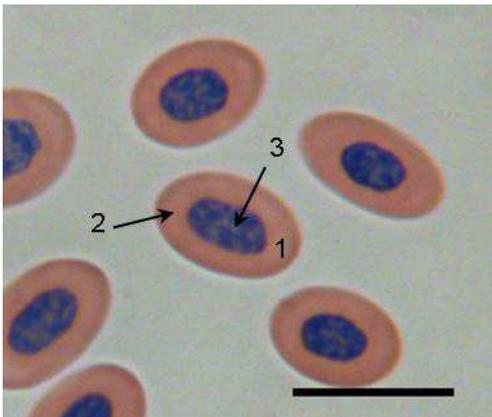


Bild 3: Blut Huhn, Erythrozyten. May-Grünwald-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Reifer Erythrozyt (1). Das gleichmäßige Zytoplasma (2) enthält einen zentralen, spindelförmigen Zellkern (3). SB = 10 µm.

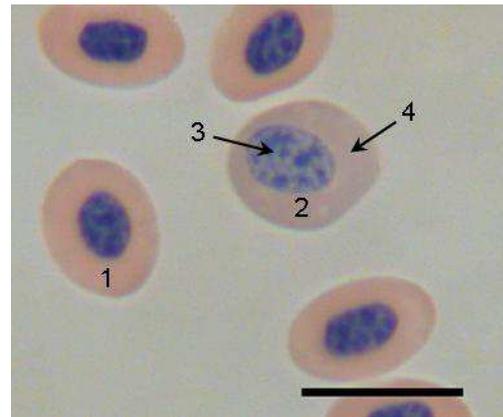


Bild 4: Blut Huhn, Erythrozyten. Giemsa-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Reifer Erythrozyt (1) und unreifer Erythrozyt (Polychromatozyt) (2). Das basophile Zytoplasma (4) des Polychromatozyten enthält einen rundlichen Zellkern mit locker kondensiertem Chromatin (3). SB = 10 µm.

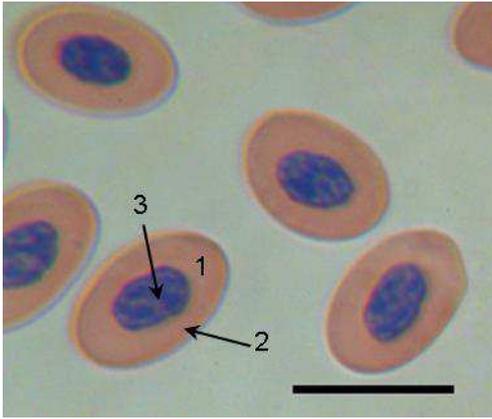


Bild 5: Blut Huhn, Erythrozyten. Pappenheim-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Erythrozyt (1). Das gleichmäßige Zytoplasma (2) enthält zentral einen basophilen Zellkern (3). SB = 10 µm.

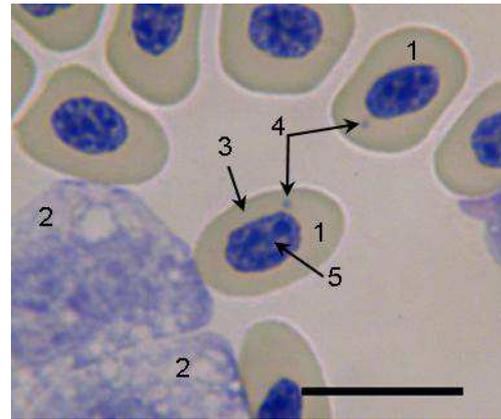


Bild 6: Blut Huhn, Erythrozyten. Toluidinblau-Färbung.

Huhn 4, LSL, weiblich, 12 Monate.

Erythrozyten(1) und Monozyten (2). Im Zytoplasma (3) der Erythrozyten befindet sich zellkernnah ein granulärer basophiler Einschluss. Der Zellkern (5) besitzt stark kondensiertes Chromatin. SB = 10 µm.

2.2. Thrombozyten

Die Thrombozyten erscheinen lichtmikroskopisch als kernhaltige, ovale bis runde Zellen mit blasigem, vakuolisiertem Zytoplasma. Sie liegen in den Ausstrichen oft in Aggregaten zusammen, kommen aber auch einzeln gelagert vor. Der Zellkern ist oval bis rund mit stark kondensiertem Chromatin. Bei einzelnen Thrombozyten sind zytoplasmatische Ausläufer oder Granula zu erkennen. Unreife Thrombozyten sind in den Ausstrichen nicht zu erkennen.

Tabelle 12: Übersichtsfärbungen der Thrombozyten

	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Diff-Quick	hellblau	violett	lila
H.E.	rosa-rot	violett	rosa-rot
May-Grünwald	hellgrau	blau	blau und rosa
Giemsa	farblos	blau	blau
Pappenheim	hellgrau	blau	blau und rosa

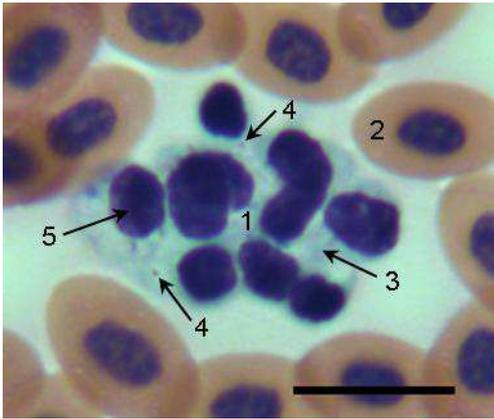


Bild 7: Blut Huhn, Thrombozyten. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Thrombozytenaggregat (1) und Erythrozyten (2). Das hellblaue Zytoplasma (3) der Thrombozyten enthält kleine lila Granula (4). Die Zellkerne färben sich violett (5). SB = 10 µm.

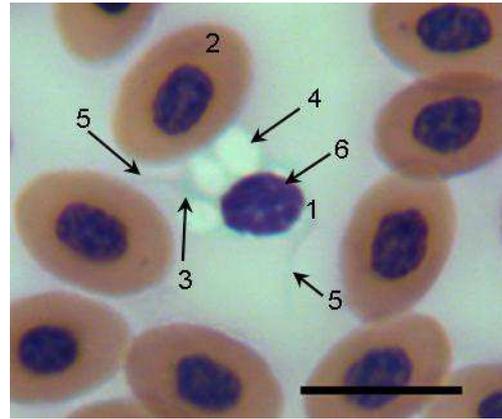


Bild 8: Blut Huhn, Thrombozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyt (1) und Erythrozyt (2). Das hellblaue Zytoplasma (3) des Thrombozyten weist Vakuolen (4) und zytoplasmatische Ausläufer (5) auf. Der Zellkern besitzt stark kondensiertes Chromatin (6). SB = 10 µm.

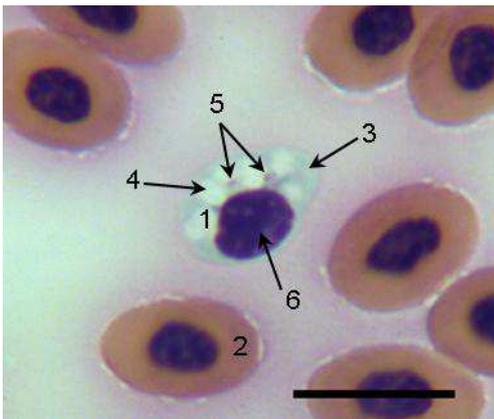


Bild 9: Blut Huhn, Thrombozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des Thrombozyten enthält Vakuolen (4) und Granula (5). Zellkern (6). SB = 10 µm.

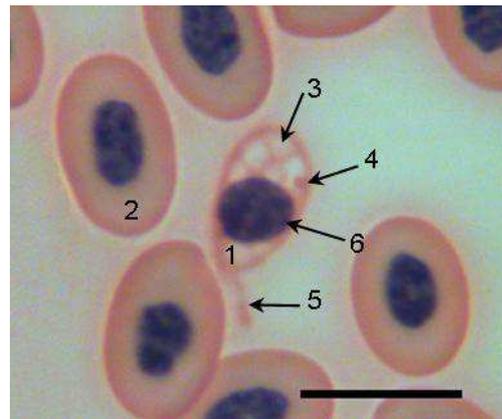


Bild 10: Blut Huhn, Thrombozyt. H.E.-Färbung.

Huhn 19, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Thrombozyten befinden sich eosinophile Granula (4) und zahlreiche Vakuolen (3). Zytoplasmatischer Ausläufer (5). Der runde Zellkern ist stark kondensiert (6). SB = 10 µm.

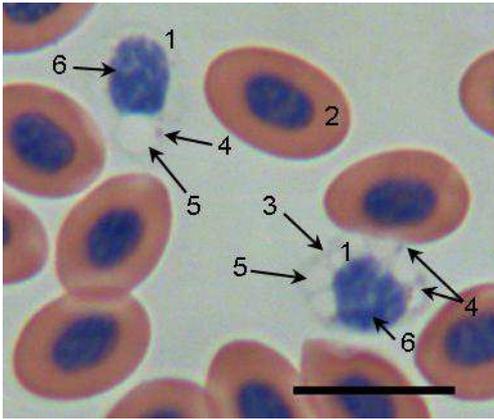


Bild 11: Blut Huhn, Thrombozyten. May-Grünwald-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyten (1) und Erythrozyten (2). Im hellgrauen Zytoplasma (3) der Thrombozyten befinden sich eosinophile und basophile Granula (4) sowie Vakuolen (5). Zellkern (6). SB = 10 µm.

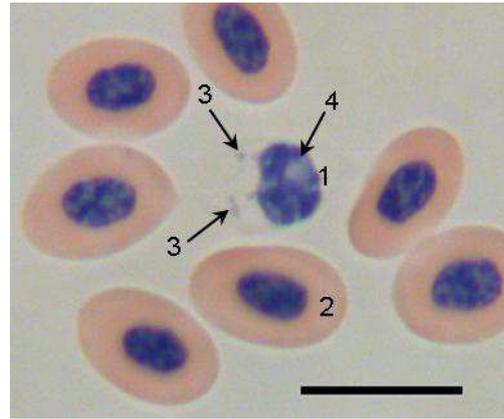


Bild 12: Blut Huhn, Thrombozyt. Giemsa-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im farblosen Zytoplasma des Thrombozyten liegt der Zellkern (4). Die zytoplasmatischen Granula färben sich blau (3). SB = 10 µm.

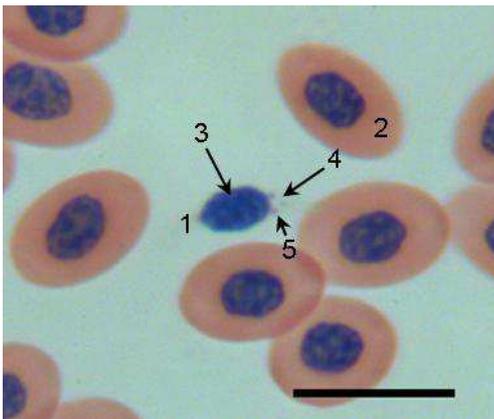


Bild 13: Blut Huhn, Thrombozyt. Pappenheim-Färbung.

Huhn 4, LSL, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Der Thrombozyt (1) enthält einen ovalen, stark kondensierten Zellkern (3) sowie einige basophile (4) und rosa Granula (5). SB = 10 µm.

Bei der PAS-Reaktion kann bei einzelnen Thrombozyten ein positives Ergebnis in den Granula beobachtet werden. Nach der Amylase-Vorbehandlung fällt die PAS-Reaktion negativ aus.

Tabelle 13: Substrathistochemie der Thrombozyten
(schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; stark positiv = +++)

	Lokalisation	Farbe	Intensität
PAS	Granula	pink	++
Amylase + PAS	-	-	-

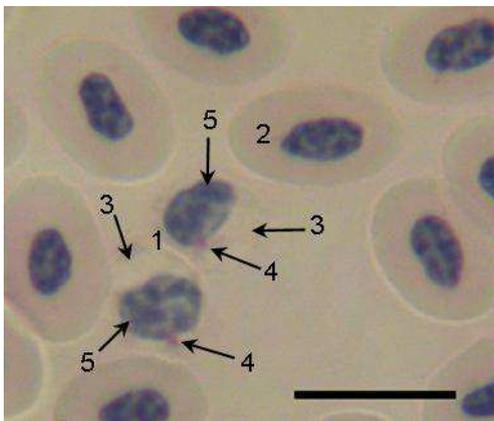


Bild 14: Blut Huhn, Thrombozyten. PAS-Reaktion.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyten (1) und Erythrozyten (2).
Im Zytoplasma (3) der Thrombozyten befindet sich der Zellkern (5) sowie deutlich PAS-positive Granula (4). SB = 10 µm.

2.3. Heterophile Granulozyten

Die heterophilen Granulozyten sind in jedem Ausstrich die am häufigsten vorkommenden Granulozyten. Sie stellen sich als rundliche Zellen mit zahlreichen länglichen, spindelförmigen Granula dar. Der Zellkern ist stark gelappt und von unregelmäßiger Form. Die Anfärbung von Zytoplasma, Zellkern und Granula mit den verschiedenen Übersichtsfärbungen ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

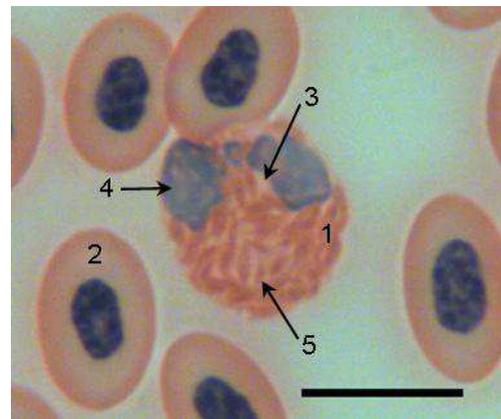
Tabelle 14: Übersichtsfärbungen der heterophilen Granulozyten

	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Diff-Quick	hellblau	lila	rot-rosa
H.E.	blassrosa	graublau	rot
May-Grünwald	rosa	hellblau	rot-rosa
Giemsa	hellgrau	blau-grün	farblos
Pappenheim	farblos	blau-grün	rosa-rot

**Bild 15:** Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des heterophilen Granulozyten (1) liegen zahlreiche spindelförmige Granula (3) und ein gelappter Zellkern mit grobkörnigem Chromatin (4). SB = 10 µm.

**Bild 16:** Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. H.E.-Färbung.

Huhn 19, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das blassrosa Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) enthält einen mäßig kondensierten Zellkern (4) sowie stäbchenförmige Granula (5). SB = 10 µm.

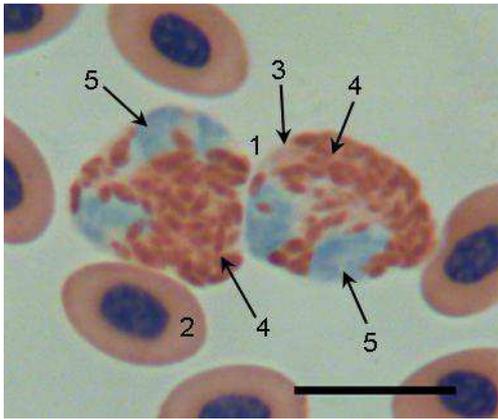


Bild 17: Blut Huhn, heterophile Granulozyten. May-Grünwald-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) der heterophilen Granulozyten (1) sind zahlreiche längliche Granula (4) enthalten. Die gelappten Zellkerne (5) sind unregelmäßig geformt. SB = 10 µm.

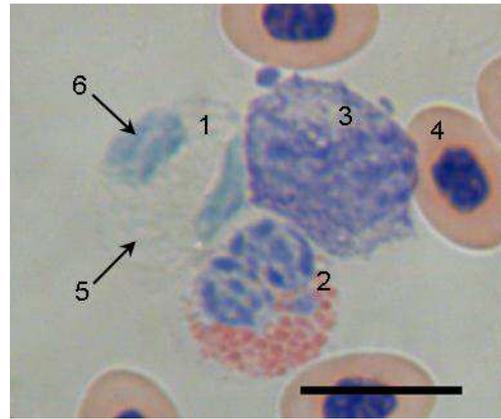


Bild 18: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Giemsa-Färbung.

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1), eosinophiler Granulozyt (2), Monozyt (3) und Erythrozyten (4). Die spindelförmigen Granula (5) des heterophilen Granulozyten (1) sind nicht angefärbt. Zellkern (6). SB = 10 µm.

Im Folgenden wird deutlich gemacht, wie sich die heterophilen Granulozyten bei einer partiellen oder vollständigen Degranulation darstellen. Die runden zentralen Körper der primären Granula lösen sich schwächer heraus und werden so sichtbar. In diesem Falle ähneln die sonst stäbchenförmigen heterophilen Granula den runden Granula der eosinophilen Granulozyten:

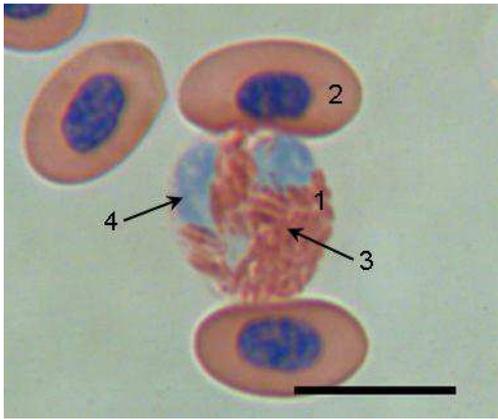


Bild 19: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Pappenheim-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Der heterophile Granulozyt (1) enthält unversehrte stäbchenförmige Granula (3). Zellkern (4). SB = 10 µm.

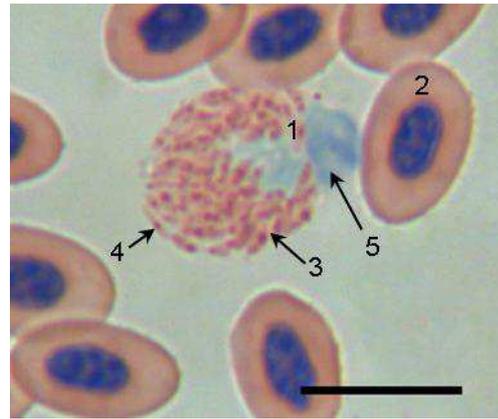


Bild 20: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Pappenheim-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die heterophilen Granula (3) sind teilweise degranuliert bzw. herausgelöst. Durch diesen Vorgang werden die runden zentralen Körper der primären Granula (4) sichtbar. Die längliche Form der Granula ist jedoch noch zu erkennen. Zellkern (5). SB = 10 µm.

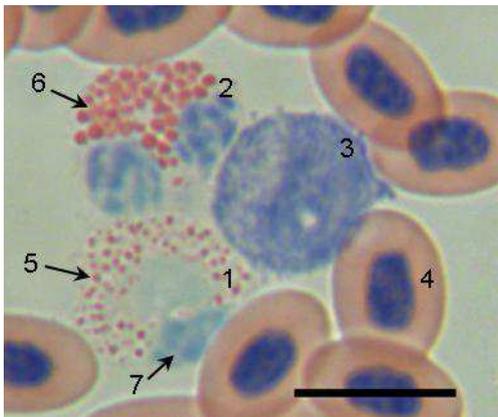


Bild 21: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Pappenheim-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1), eosinophiler Granulozyt (2), Monozyt (3) und Erythrozyten (4). Der Inhalt der heterophilen Granula ist herausgelöst, es verbleiben nur die runden zentralen Körper (5). Die ursprüngliche Spindelform der Granula ist nicht mehr zu erkennen. Die jetzt rund erscheinenden heterophilen Granula ähneln den Granula des eosinophilen Granulozyten (6). Zellkern des heterophilen Granulozyten (7). SB = 10 µm.

Bei der Alcianblau-Färbung (pH 2,5), der Sirius-Red-Färbung und der PAS-Reaktion zeigt jeweils das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten positive Reaktionsprodukte. Bei der PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung ist die Reaktion im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten abgeschwächt sichtbar. Die Alcianblau-Färbung (pH 1,0) fällt negativ aus. Nachfolgend die Ergebnisse der substrathistochemischen Untersuchungen.

Tabelle 15: Substrathistochemie der heterophilen Granulozyten (schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; stark positiv = +++)

	Lokalisation	Farbe	Intensität
Alcianblau (pH 2,5)	Zytoplasma	türkis	+
Sirius-Red	Zytoplasma	altrosa-rot	+
PAS	Zytoplasma	rosa-pink	++
Amylase + PAS	Zytoplasma	rosa	+

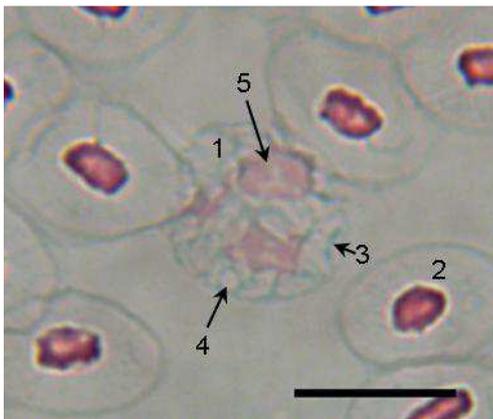


Bild 22: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Alcianblau-Färbung (pH 2,5).

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) reagiert schwach Alcianblau (pH 2,5)-positiv. Die Granula (4) zeigen keine Reaktion. Zellkern (5). SB = 10 µm.

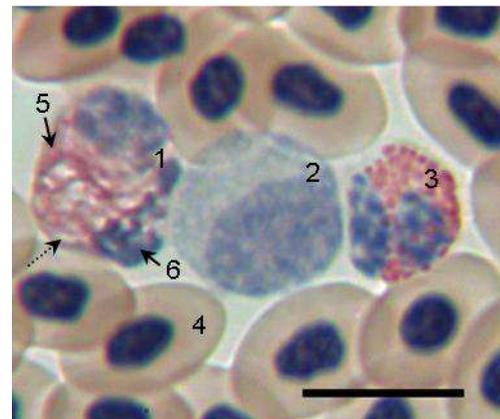


Bild 23: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Sirius-Red-Färbung.

Huhn 1, LSL, männlich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1), Monozyt (2), eosinophiler Granulozyt (3) und Erythrozyten (4). Das Zytoplasma (5) des heterophilen Granulozyten (1) färbt sich altrosa-rot. Die Granula reagieren negativ (gestrichelter Pfeil). Zellkern (6). SB = 10 µm.

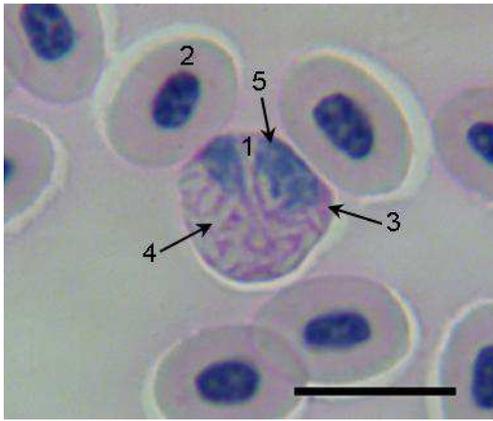


Bild 24: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. PAS-Reaktion.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) reagiert deutlich PAS-positiv. Die spindelförmigen Granula (4) zeigen keine Reaktion. Zellkern (5). SB = 10 µm.

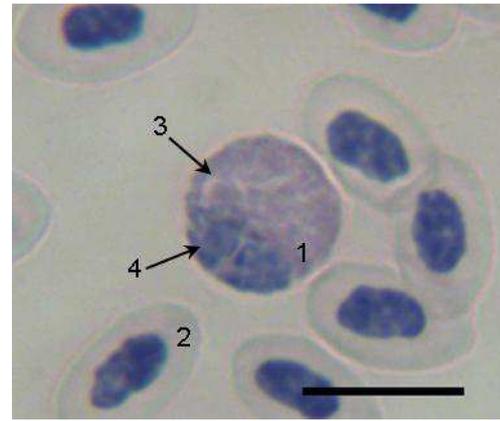


Bild 25: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die PAS-Reaktion im Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) ist abgeschwächt. Zellkern (4). SB = 10 µm.

2.4. Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten erscheinen als rundliche Zellen mit runden Granula, die meist nicht so dicht liegen wie die Granula der heterophilen Granulozyten und so das Zytoplasma nicht ganz ausfüllen. Der Zellkern ist zweifach gelappt, wobei beide Kernsegmente rund oder länglich sind. Manchmal ist noch ein drittes, kleineres rundes Zellkernsegment zu erkennen.

Tabelle 16: Übersichtsfärbungen der eosinophilen Granulozyten

	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Diff-Quick	graublau	lila	rosarot
H.E.	blassrosa	graublau	orange-rosa
May-Grünwald	hellgrau	graublau	rosarot
Giemsa	hellgrau	blau	rosarot
Pappenheim	hellgrau	blau	rosarot



Bild 26: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1), heterophile Granulozyten (2) und Erythrozyt (3). Die runden Granula (5) füllen das graublaue Zytoplasma (4) des eosinophilen Granulozyten (1) nicht vollständig aus. Der Zellkern (6) besitzt zwei nahezu gleichgroße Kernsegmente, sowie ein kleineres, drittes Kernsegment. SB = 10 µm.

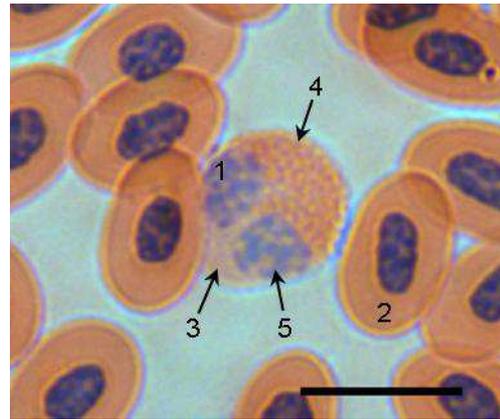


Bild 27: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. H.E.-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) enthält zahlreiche eosinophile Granula (4). Der Zellkern (5) weist zwei runde Segmente und mäßig kondensiertes Chromatin auf. SB = 10 µm.

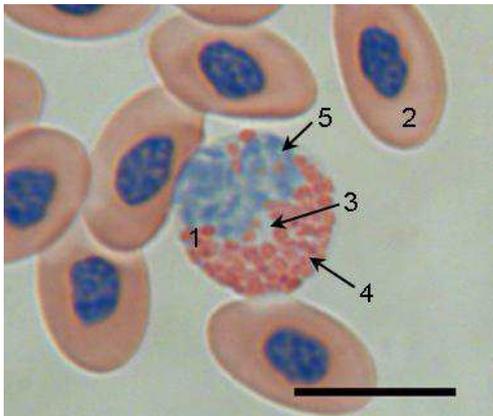


Bild 28: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. May-Grünwald-Färbung.

Huhn 1, LSL, männlich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im hellgrauen Zytoplasma (3) liegen der gelappte Zellkern (5) sowie die runden rosaroten Granula (4). SB = 10 µm.

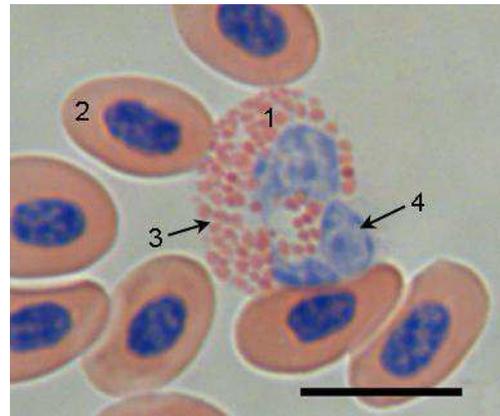


Bild 29: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. Giemsa-Färbung.

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die charakteristischen Granula (3) des eosinophilen Granulozyten (1) liegen weniger dicht im Zytoplasma. Zellkern (4). SB = 10 µm.

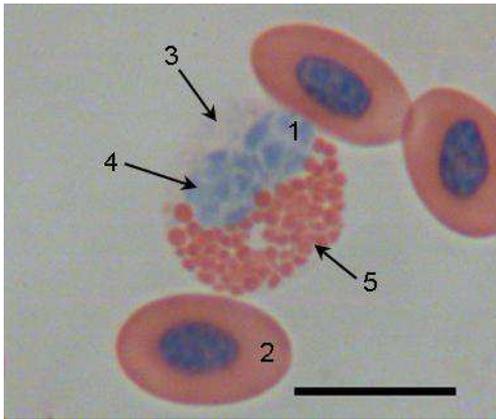


Bild 30: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. Pappenheim-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) wird von den kräftig eosinophilen Granula (5) nicht vollständig ausgefüllt. Der Zellkern besitzt locker kondensiertes Chromatin (4). SB = 10 µm.

Bei der Sirius-Red-Färbung kann eine deutlich positive Reaktion der eosinophilen Granula nachgewiesen werden. Bei der PAS-Reaktion zeigt sich das Zytoplasma schwach positiv. Nach vorangehender Amylasebehandlung kommt es dagegen zu keiner Färbung des Zytoplasmas.

Tabelle 17: Substrathistochemie der eosinophilen Granulozyten (schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; stark positiv = +++)

	Lokalisation	Farbe	Intensität
Sirius-Red	Granula	altrosa-rot	++
PAS	Zytoplasma	rosa	+
Amylase + PAS	-	-	-

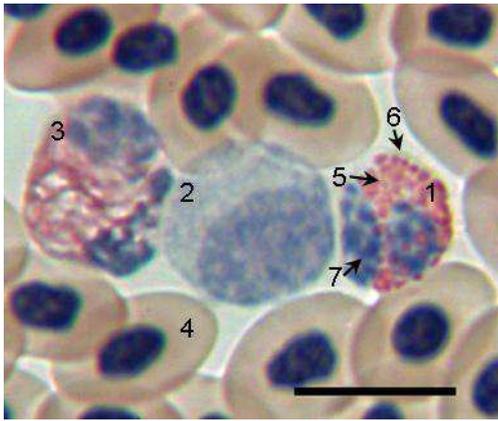


Bild 31: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. Sirius-Red-Färbung.

Huhn 1, LSL, männlich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1), Monozyt (2), heterophiler Granulozyt (3) und Erythrozyten (4). Die Granula (5) des eosinophilen Granulozyten (1) färben sich deutlich altrosa-rot. Das Zytoplasma (6) zeigt keine Reaktion. Zellkern (7). SB = 10 μm .

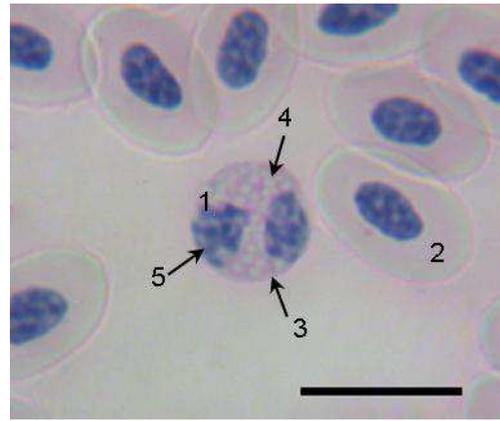


Bild 32: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. PAS-Reaktion.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des eosinophilen Granulozyten (1) reagiert schwach PAS-positiv, während die eosinophilen Granula (4) PAS-negativ sind. Zellkern (5). SB = 10 μm .

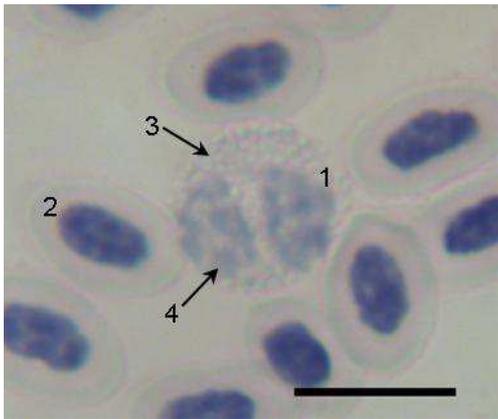


Bild 33: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula und das Zytoplasma (3) des eosinophilen Granulozyten (1) reagieren PAS-negativ. Zellkern (4). SB = 10 μm .

2.5. Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten stellen sich lichtmikroskopisch als runde oder auch als langgestreckte Zellen dar. Der Zellkern ist rund bis oval und liegt in den meisten Zellen am Rand. Die zahlreichen runden Granula können den Zellkern zum Teil überlagern. In manchen Färbungen sind die basophilen Granula nicht angefärbt oder durch den Färbeprozess ausgewaschen und erscheinen so als klare runde Vakuolen im Zytoplasma. Nachfolgend die Anfärbung der basophilen Granulozyten mit den unterschiedlichen Übersichtsmethoden.

Tabelle 18: Übersichtsfärbungen der basophilen Granulozyten

	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Diff-Quick	blasslila	lila	farblos
H.E.	blassrosa	violett	farblos
May-Grünwald	farblos	graublau	dunkellila
Giemsa	graublau	blau	farblos
Pappenheim	farblos	blau	lila

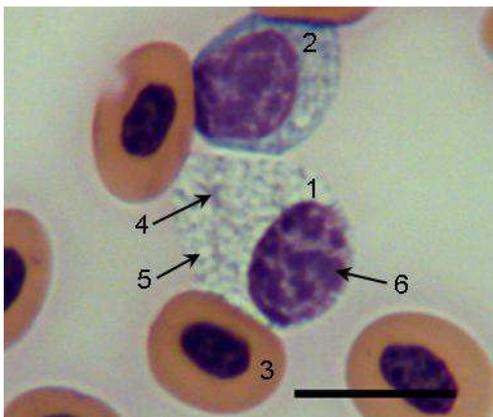


Bild 34: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1), Monozyt (2) und Erythrozyten (3). Das blasslila Zytoplasma (4) des basophilen Granulozyten (1) enthält zahlreiche farblose Granula (5). Der ovale Zellkern (6) liegt exzentrisch in der Zelle. SB = 10 µm.

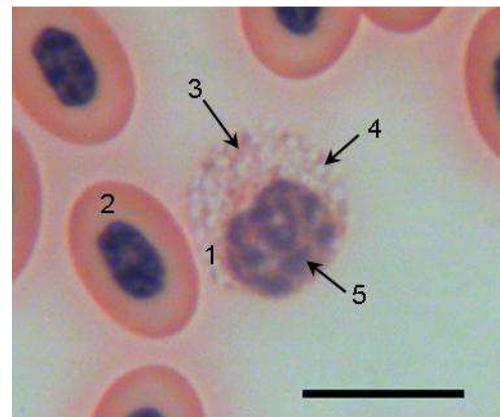


Bild 35: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. H.E.-Färbung.

Huhn 19, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die farblosen Granula (4) erscheinen als runde Vakuolen im blassrosa Zytoplasma (3) des basophilen Granulozyten (1). Der exzentrische Zellkern (5) besitzt mäßig kondensiertes Chromatin. SB = 10 µm.

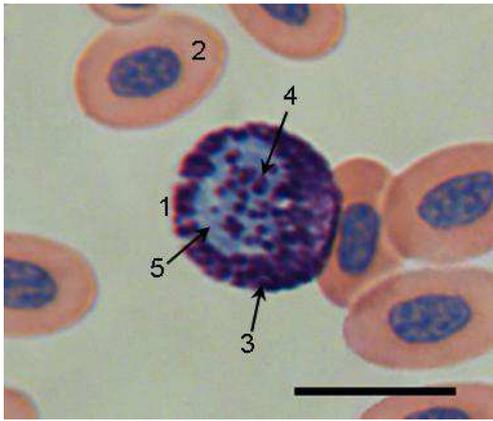


Bild 36: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. May-Grünwald-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die tief basophilen Granula (3) liegen zahlreich im Zytoplasma des basophilen Granulozyten (1) und überlagern (4) zum Teil den Zellkern (5). SB = 10 µm.

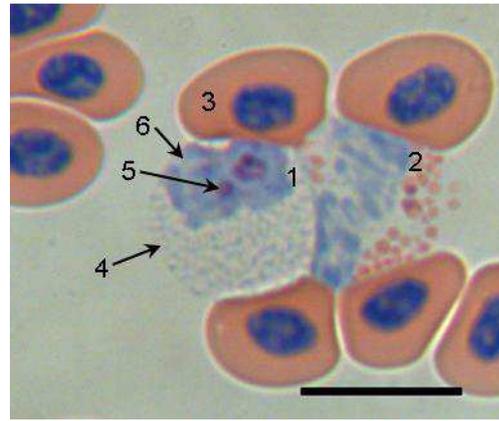


Bild 37: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. Giemsa-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1), eosinophiler Granulozyt (2) und Erythrozyten (3). Die zahlreichen Granula (4) des basophilen Granulozyten (1) sind größtenteils ausgewaschen und erscheinen als farblose runde Vakuolen im Zytoplasma. An wenigen Stellen ist noch eine leichte Färbung der Granula erkennbar (5). Zellkern (6). SB = 10 µm.

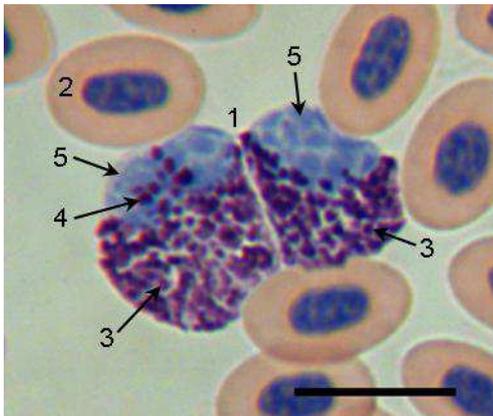


Bild 38: Blut Huhn, basophile Granulozyten. Pappenheim-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Die kräftig angefärbten runden Granula (3) der basophilen Granulozyten (1) liegen teilweise über dem Zellkern (4). Die Zellkerne (5) sind ungelappt und liegen am Rand der Zellen. SB = 10 µm.

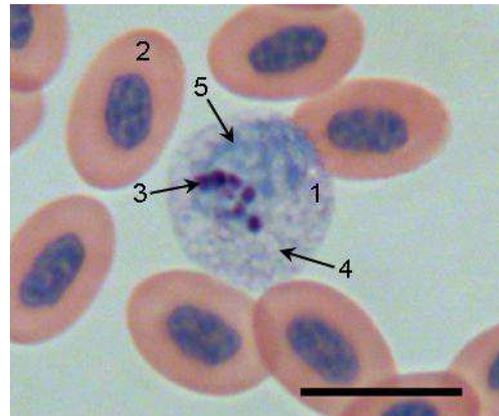


Bild 39: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. Pappenheim-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Bis auf wenige lila Granula (3) sind die Granula (4) des basophilen Granulozyten (1) größtenteils ausgewaschen. Zellkern (5). SB = 10 µm.

Bei den substrathistochemischen Färbungen zeigen sich die basophilen Granula mit Toluidinblau sehr deutlich. In der Alcianblau-Färbung (pH 2,5) stellen sich die basophilen Granula stark positiv dar. Bei einem pH- Wert von 1,0 ist die Reaktion der Granula dagegen nur deutlich positiv.

Tabelle 19: Substrathistochemie der basophilen Granulozyten (schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; stark positiv = +++)

	Lokalisation	Farbe	Intensität
Toluidinblau	Granula	dunkellila	+++
Alcianblau (pH 1,0)	Granula	türkis	++
Alcianblau (pH 2,5)	Granula	türkis	+++

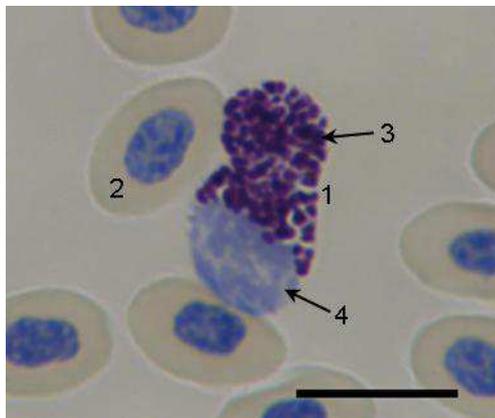


Bild 40: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. Toluidinblau-Färbung.

Huhn 4, LSL, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Der basophile Granulozyt (1) weist eine langgestreckte Form auf. Er enthält typisch runde, basophile Granula (3). Der ovale Zellkern (4) besitzt mäßig kondensiertes Chromatin und liegt exzentrisch in der Zelle. SB = 10 µm.

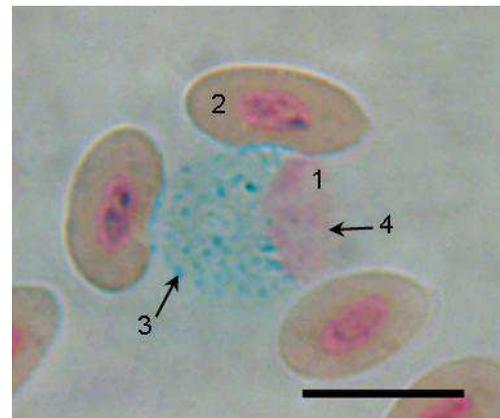


Bild 41: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. Alcianblau-Färbung (pH 1,0).

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) reagieren zum Teil deutlich Alcianblau (pH 1,0)-positiv. Zellkern (4). SB = 10 µm.

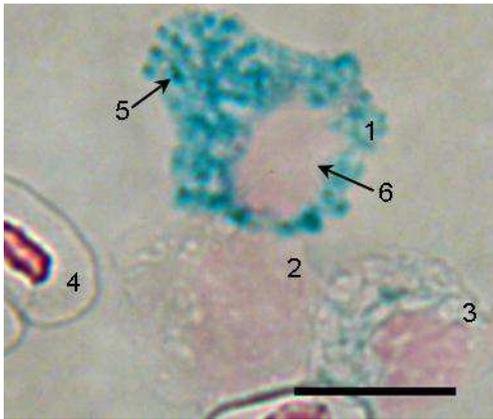


Bild 42: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. Alcianblau-Färbung (pH 2,5).

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1), Monozyt (2), heterophiler Granulozyt (3) und Erythrozyt (4). Die Granula (5) des basophilen Granulozyten (1) reagieren stark Alcianblau (pH 2,5)-positiv. Zellkern (6). SB = 10 µm.

2.6. Lymphozyten

Die Lymphozyten zeigen sich als runde Zellen mit wenig Zytoplasma. In den Ausstrichen sind Lymphozyten verschiedener Größen zu finden. Der exzentrisch liegende, kompakte Kern ist rund und füllt die Zelle fast ganz aus. Bei manchen Lymphozyten ist er an einer Stelle leicht eingezogen. Im schmalen Zytoplasmasaum färben sich kleine zytoplasmatische Granula an. Teilweise weisen die Lymphozyten zytoplasmatische Ausläufer auf.

Tabelle 20: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten

	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Diff-Quick	blau	violett	blau oder lila
H.E.	rosa	blau	blau
May-Grünwald	graublau	graublau	blau
Giemsa	blau	blau	blau-violett
Pappenheim	blau	blau	dunkelblau/rot

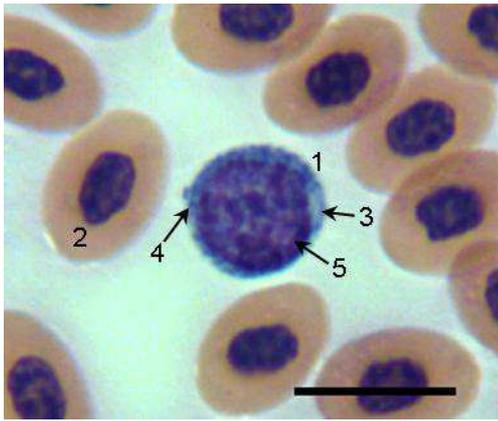


Bild 43: Blut Huhn, Lymphozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Der Lymphozyt (1) weist eine runde Form auf. Im schmalen Zytoplasmasaum (3) sind kleine blaue Granula (4) enthalten. Der stark kondensierte Zellkern (5) liegt exzentrisch. SB = 10 µm.

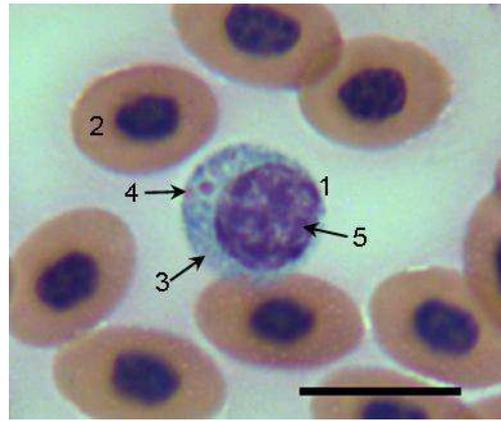


Bild 44: Blut Huhn, Lymphozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das basophile Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) enthält lila Granula (4) und einen runden Zellkern (5). SB = 10 µm.

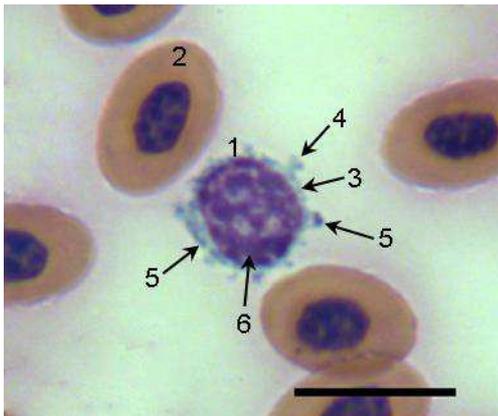


Bild 45: Blut Huhn, Lymphozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) weist Pseudopodien (4) und kleine blaue Granula (5) auf. Zellkern (6). SB = 10 µm.

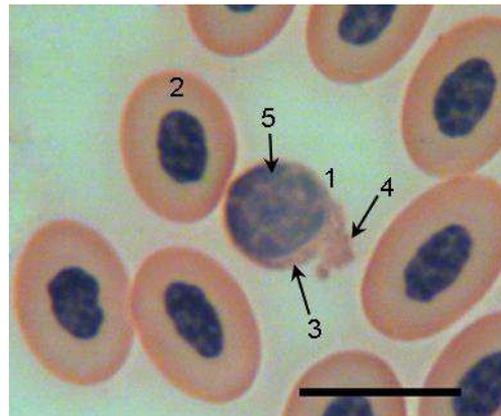


Bild 46: Blut Huhn, Lymphozyt. H.E.-Färbung.

Huhn 19, LB, weiblich, 12 Monate.

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Der schmale Zytoplasmasaum (3) weist zytoplasmatische Ausläufer (4) auf. Der runde Zellkern (5) ist randständig. SB = 10 µm.

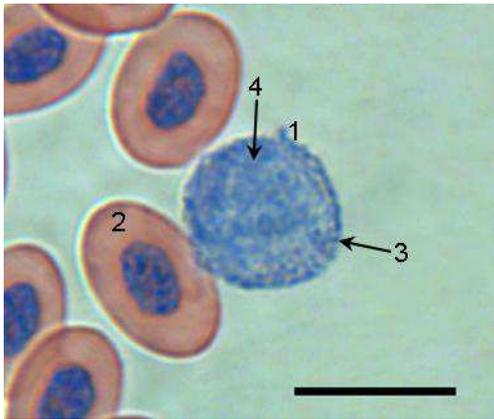


Bild 47: Blut Huhn, Lymphozyt. May-Grünwald-Färbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Mittelgroßer Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Lymphozyten sind zahlreiche kleine blaue Granula (3) enthalten. Zellkern (4). SB = 10 µm.

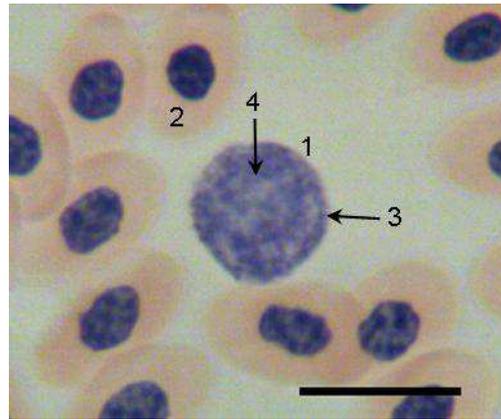


Bild 48: Blut Huhn, Lymphozyt. Giemsa-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Der runde Lymphozyt (1) weist ein basophiles, granuliertes Zytoplasma (3) sowie einen blauen Zellkern (4) auf. SB = 10 µm.

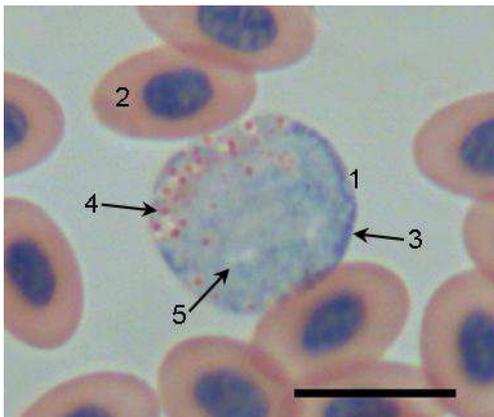


Bild 49: Blut Huhn, Lymphozyt. Pappenheim-Färbung.

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

Großer Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das basophile Zytoplasma (3) des großen Lymphozyten (1) enthält zahlreiche rote Granula (4). Der Zellkern (5) erscheint blass. SB = 10 µm.

Bei wenigen Lymphozyten reagieren die zytoplasmatischen Granula deutlich PAS-positiv. Bei der PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung sind keine PAS-positiven Reaktionsprodukte in den Lymphozyten zu finden.

Tabelle 21: Substrathistochemie der Lymphozyten
(schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; stark positiv = +++)

	Lokalisation	Farbe	Intensität
PAS	Granula	pink	++
Amylase + PAS	-	-	-

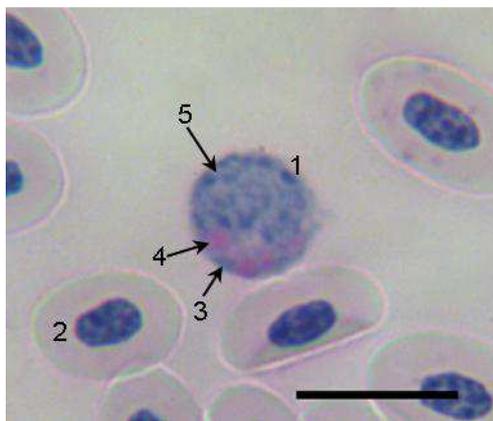


Bild 50: Blut Huhn, Lymphozyt. PAS-Reaktion.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im basophilen Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) reagieren die Granula deutlich PAS-positiv (4). Zellkern (5). SB = 10 µm.

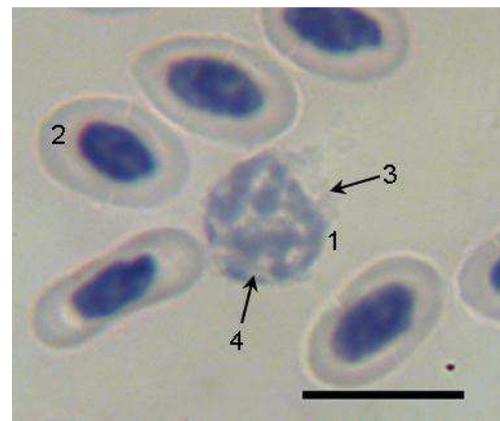


Bild 51: Blut Huhn, Lymphozyt. PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

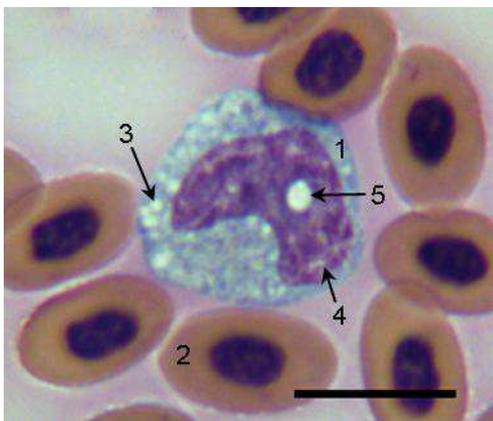
Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) weist keine PAS-positiven Reaktionsprodukte auf. Zellkern (4). SB = 10 µm.

2.7. Monozyten

Die Monozyten sind große, unregelmäßig geformte oder rundliche Zellen mit einem mittleren Durchmesser von 13 µm, die gelegentlich in Gruppen zusammen liegen. Der Zellkern ist bohnenförmig, rundlich oder oval mit locker kondensiertem Chromatin. Das umfangreiche Zytoplasma kann durch viele Vakuolen unterschiedlicher Größe blasig erscheinen. Teilweise liegen einzelne Vakuolen auch im Zellkern. Vereinzelt weisen die Monozyten zytoplasmatische Ausläufer auf. Bei keinem der Monozyten sind Granula im Zytoplasma zu erkennen.

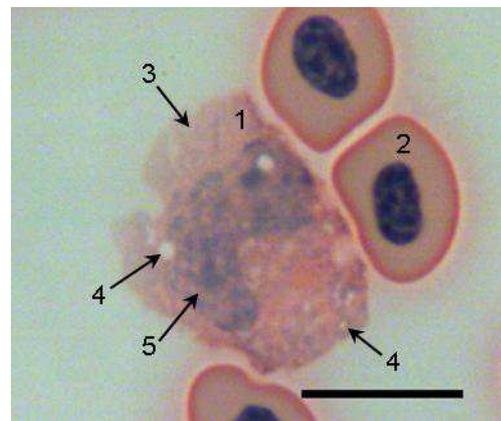
Tabelle 22: Übersichtsfärbungen der Monozyten

	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Diff-Quick	blau	lila-violett	-
H.E.	altrosa	graublau	-
May-Grünwald	graublau	blau	-
Giemsa	graublau	blau	-
Pappenheim	blau	blau	-

**Bild 52:** Blut Huhn, Monozyt. Diff-Quick-Färbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Das umfangreiche Zytoplasma des Monozyten (1) enthält Vakuolen (3). Im bohnenförmigen Zellkern (4) ist ebenfalls eine Vakuole zu erkennen (5). SB = 10 µm.

**Bild 53:** Blut Huhn, Monozyt. H.E.-Färbung.

Huhn 19, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Der unregelmäßig geformte Monozyt (1) besitzt viel Zytoplasma (3) mit Vakuolen unterschiedlicher Größe (4). Das Chromatin des Zellkernes (5) ist wenig kondensiert. SB = 10 µm.

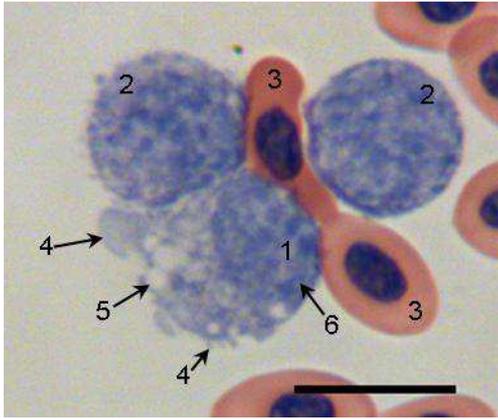


Bild 54: Blut Huhn, Monozyt. May-Grünwald-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1), aktivierte Lymphozyten (2) und Erythrozyten (3). Das Zytoplasma des Monozyten (1) weist zytoplasmatische Ausläufer (4) sowie Vakuolen (5) auf. Ovaler Zellkern (6). SB = 10 µm.

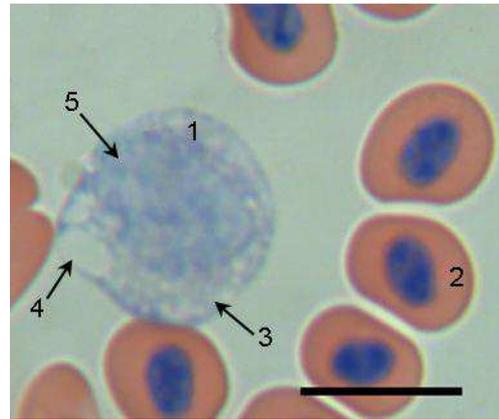


Bild 55: Blut Huhn, Monozyt. Giemsa-Färbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des runden Monozyten (1) enthält Vakuolen unterschiedlicher Größe (4) sowie einen blassen Zellkern (5). SB = 10 µm.

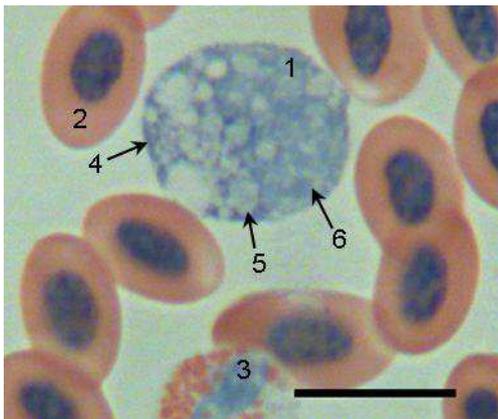


Bild 56: Blut Huhn, Monozyt. Pappenheim-Färbung.

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1), Erythrozyten (2) und eosinophiler Granulozyt (3). Das Zytoplasma (4) des Monozyten (1) erscheint aufgrund der zahlreichen Vakuolen (5) blasig. Zellkern (6). SB = 10 µm.

Bei der PAS-Reaktion zeigt sich das Zytoplasma der Monozyten schwach positiv.

Tabelle 23: Substrathistochemie der Monozyten
(schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; stark positiv = +++)

	Lokalisation	Farbe	Intensität
PAS	Zytoplasma	rosa	+
Amylase + PAS	-	-	-

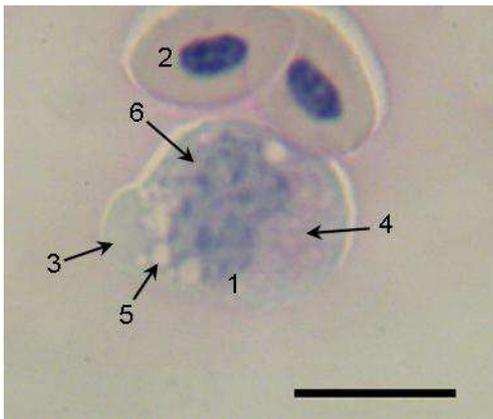


Bild 57: Blut Huhn, Monozyt. PAS-Reaktion.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten(2). Das Zytoplasma (3) des Monozyten (1) enthält schwach PAS-positive rosa Reaktionsprodukte (4) und Vakuolen (5). Zellkern (6). SB = 10 µm.

3. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie

Mittels transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde die Ultrastruktur der Blutzellen studiert. Dabei konnten alle Blutzellen, außer die basophilen Granulozyten, anhand ihrer Ultrastruktur eindeutig identifiziert werden.

3.1. Erythrozyten

Die Erythrozyten des Huhnes erscheinen elektronenmikroskopisch als langgestreckte Zellen mit glatter Oberfläche. Sie sind ca. $7 \times 1,5-2 \mu\text{m}$ groß. Ihr zentraler, stark heterochromatischer Zellkern ist oval bis länglich und enthält in einzelnen Erythrozyten einen amorphen Bereich. Um den Zellkern herum ist oft ein deutlicher perinukleärer Spalt zu erkennen. Im homogenen Zytoplasma sind bis auf vereinzelte Mitochondrien keine Zellorganellen vorhanden. Die Mitochondrien sind meist in der Nähe des Zellkernes lokalisiert. Mikrotubuli können in den Erythrozyten elektronenmikroskopisch nicht dargestellt werden.

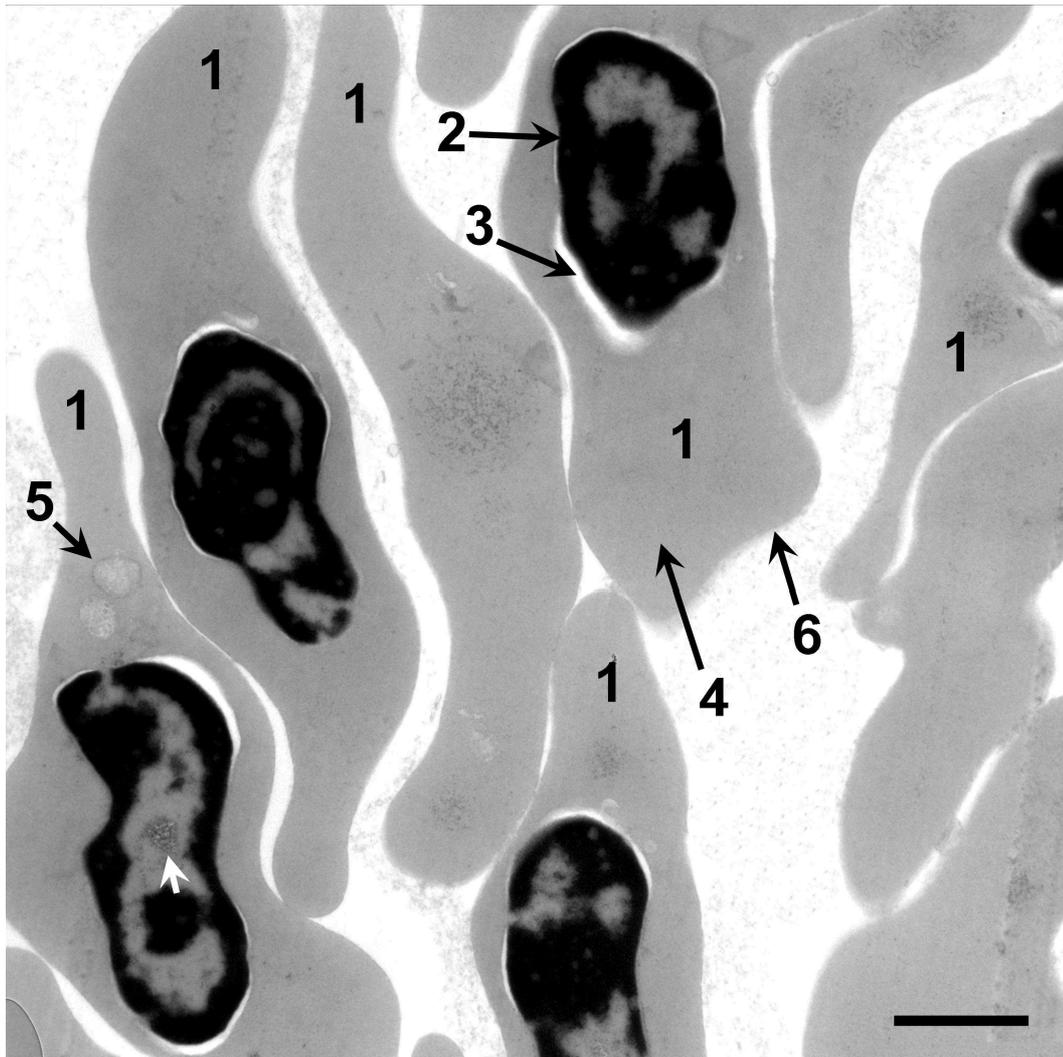


Bild 58: Blut Huhn, Erythrozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahme.

Die Erythrozyten (1) weisen eine langgestreckte Form auf. Zwischen dem Zellkern (2) und dem Zytoplasma (4) der Erythrozyten (1) befindet sich oft ein perinukleärer Spalt (3). In einem der Zellkerne ist ein runder amorpher Bereich zu erkennen (weißer Pfeil). Das homogene Zytoplasma (4) enthält in Zellkernnähe zum Teil Anschnitte von Mitochondrien (5). Die Zellmembran (6) ist glatt und weist keine Pseudopodien auf. SB = 1 μm .

3.2. Thrombozyten

Die Thrombozyten des Huhnes stellen sich elektronenmikroskopisch als rundliche Zellen mit einem Durchmesser von ca. 5 μm dar. In den Heterochromatin-Bereichen des ovalen Zellkernes sind vereinzelt runde Aufhellungen zu erkennen. Die Zellorganellen sind überwiegend im Zentrum der Thrombozyten lokalisiert. Das Zytoplasma enthält 0,2-0,4 μm große Granula mit elektronendichtem Inhalt, Glykogenpartikel und ca. 0,8-1,3 μm große zytoplasmatische Einschlüsse. Der homogene, mäßig elektronendichte Inhalt der zytoplasmatischen Einschlüsse ist zum Teil von Vakuolen durchsetzt.

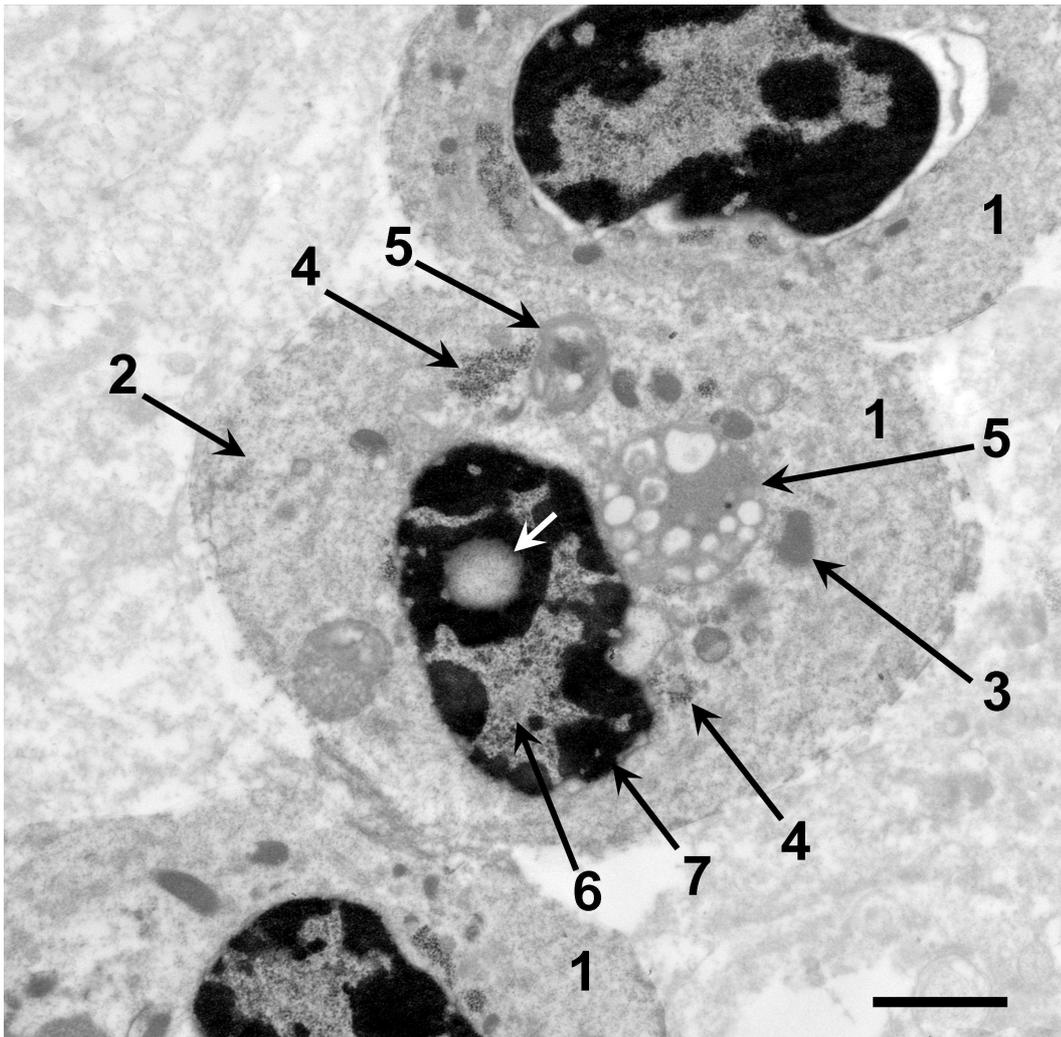


Bild 59: Blut Huhn, Thrombozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahme.

Thrombozyten (1). Im Zytoplasma (2) des Thrombozyten (1) sind Granula mit elektronendichtem Inhalt (3) und Ansammlungen von Glykogenpartikeln (4) zu erkennen. Außerdem zeigen sich große zytoplasmatische Einschlüsse (5). Deren homogener, mäßig elektronendichter Inhalt ist zum Teil vakuolisiert und erscheint blasig. Ovaler Zellkern mit Euchromatin (6) und viel Heterochromatin (7). In einem der Thrombozyten (1) ist eine runde Aufhellung im Heterochromatin zu erkennen (weißer Pfeil). SB = 1 μm .

3.3. Heterophile Granulozyten

Die heterophilen Granulozyten erscheinen elektronenmikroskopisch als unregelmäßig rundliche bis ovale Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern. Sie sind in etwa 4-8 μm groß. Das Zytoplasma enthält drei verschiedene Arten von Granula. Am häufigsten kommen die elektronendichten spindelförmigen Granula mit einer Größe von 1-1,3 x 0,5 μm vor, die sich im Querschnitt rund darstellen. Diese weisen charakteristischerweise zentral einen runden elektronendichteren Bereich auf. Darüber hinaus sind mäßig elektronendichte Granula mit inhomogenem Inhalt und einer Größe von ca. 0,7 μm sowie 0,1-0,3 μm kleine elektronendichte Granula zu erkennen. Außerdem enthält das Zytoplasma

Mitochondrien, Anschnitte von rauem endoplasmatischem Retikulum, Glykogenpartikel und einen gelappten Zellkern.

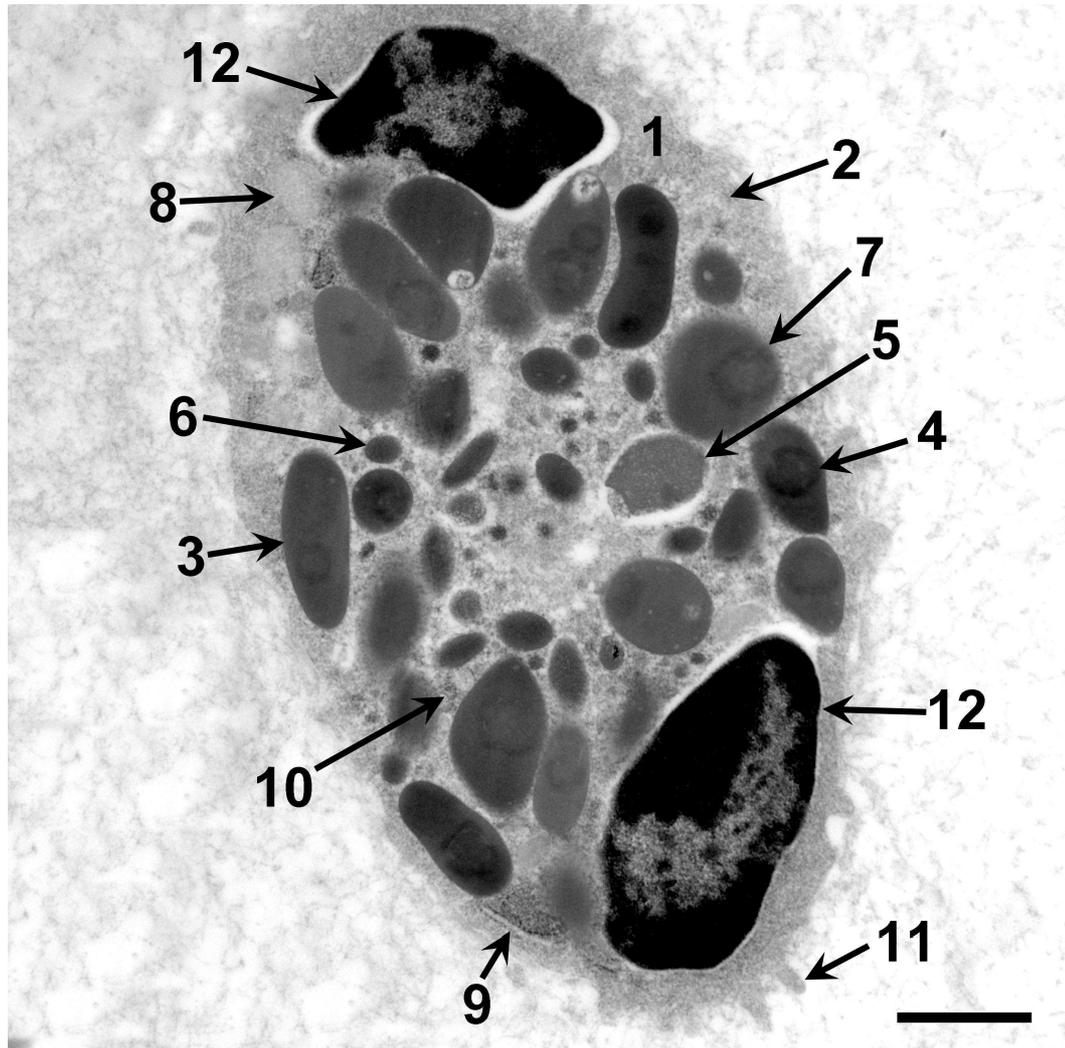


Bild 60: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Elektronenmikroskopische Aufnahme.

Das Zytoplasma (2) des heterophilen Granulozyten (1) enthält drei verschiedene Arten von Granula: Elektronendichte spindelförmige Granula (3), die zentral einen runden, elektronendichteren Bereich aufweisen (4), mäßig elektronendichte Granula mit einem inhomogenen Inhalt (5) und kleine elektronendichte Granula (6). Die spindelförmigen Granula erscheinen im Querschnitt rund (7). Im Zytoplasma (2) finden sich außerdem Mitochondrien (8), Anschnitte von rauem endoplasmatischem Retikulum (9) sowie Glykogenpartikel (10). Zytoplasmatischer Ausläufer (11). Zellkern (12). SB = 1 μm .

3.4. Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten der Hühner stellen sich ultrastrukturell als runde Zellen mit einem Durchmesser von ca. 5 μm dar. Sie enthalten elektronendichte, runde bis ovale Granula mit einer Größe von 0,3-1 μm . Diese sind im Gegensatz zu den Granula der heterophilen Granulozyten homogen und weisen keine runden zentralen Körper auf. Außerdem liegen sie weniger dicht im Zytoplasma.

Im Zytoplasma sind außerdem raues endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, Mitochondrien, Glykogenpartikel und Vesikel zu erkennen. Anschnitte des Zellkernes zeigen, dass das Euchromatin überwiegend zentral und das elektronendichte Heterochromatin peripher gelegen ist.

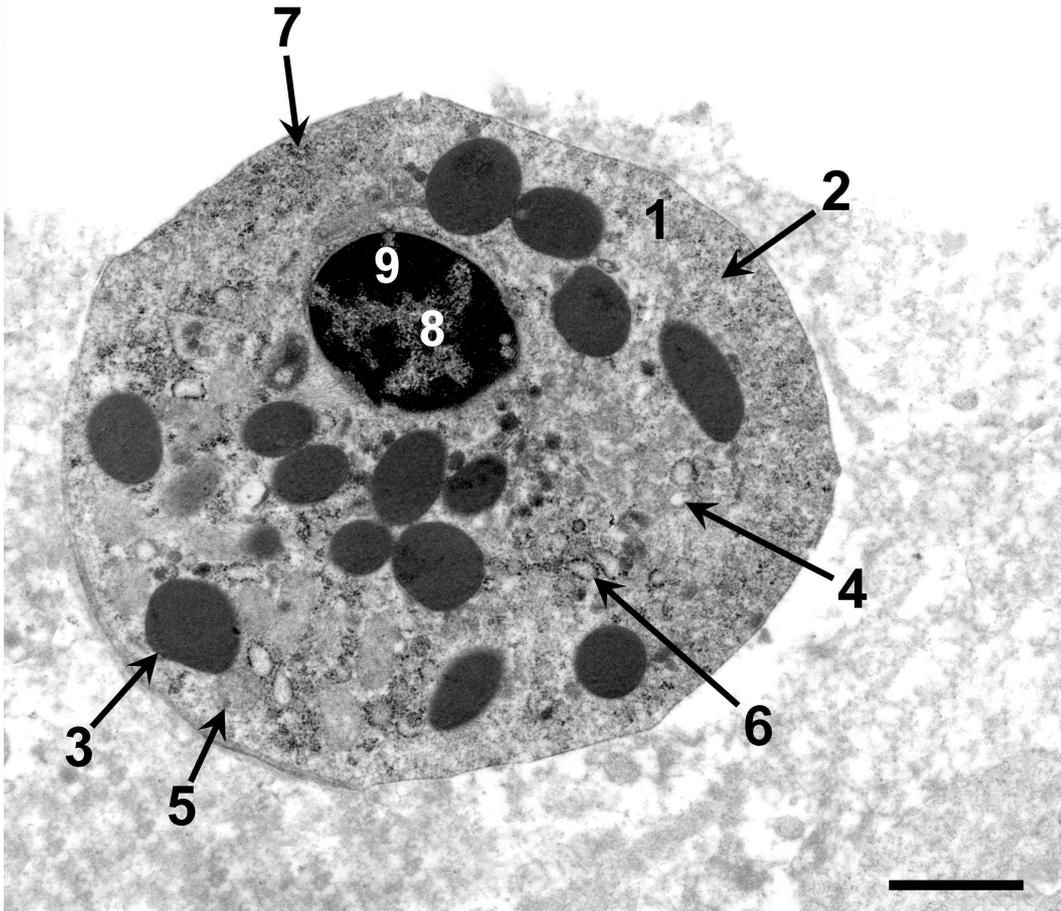


Bild 61: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. Elektronenmikroskopische Aufnahme.

Der eosinophile Granulozyt (1) weist eine runde Form auf. Im Zytoplasma (2) liegen locker verteilt einige elektronendichte runde bis ovale Granula (3). Das Zytoplasma (2) enthält außerdem Vesikel (4), Mitochondrien (5), raues endoplasmatisches Retikulum (6) und Glykogengranula (7). Im Anschnitt des Zellkernes sind das zentrale Euchromatin (8) und das periphere Heterochromatin (9) zu erkennen. SB = 1 µm.

3.5. Lymphozyten

Die Lymphozyten des Huhnes erscheinen unter dem Elektronenmikroskop als runde Zellen mit relativ wenigen Zellorganellen und einem hohen Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis. Ihr Durchmesser beträgt in etwa 3,5-4 µm. Zum Teil sind Pseudopodien erkennbar. Der runde Zellkern ist oft an einer Seite abgeflacht bzw. eingekerbt und liegt zentral oder exzentrisch in der Zelle. Im Zytoplasmasaum sind raues endoplasmatisches Retikulum, Glykogenpartikel,

kleine Vakuolen und vereinzelt ca. 0,3 μm große Granula mit mäßig elektronendichtem Inhalt zu erkennen.

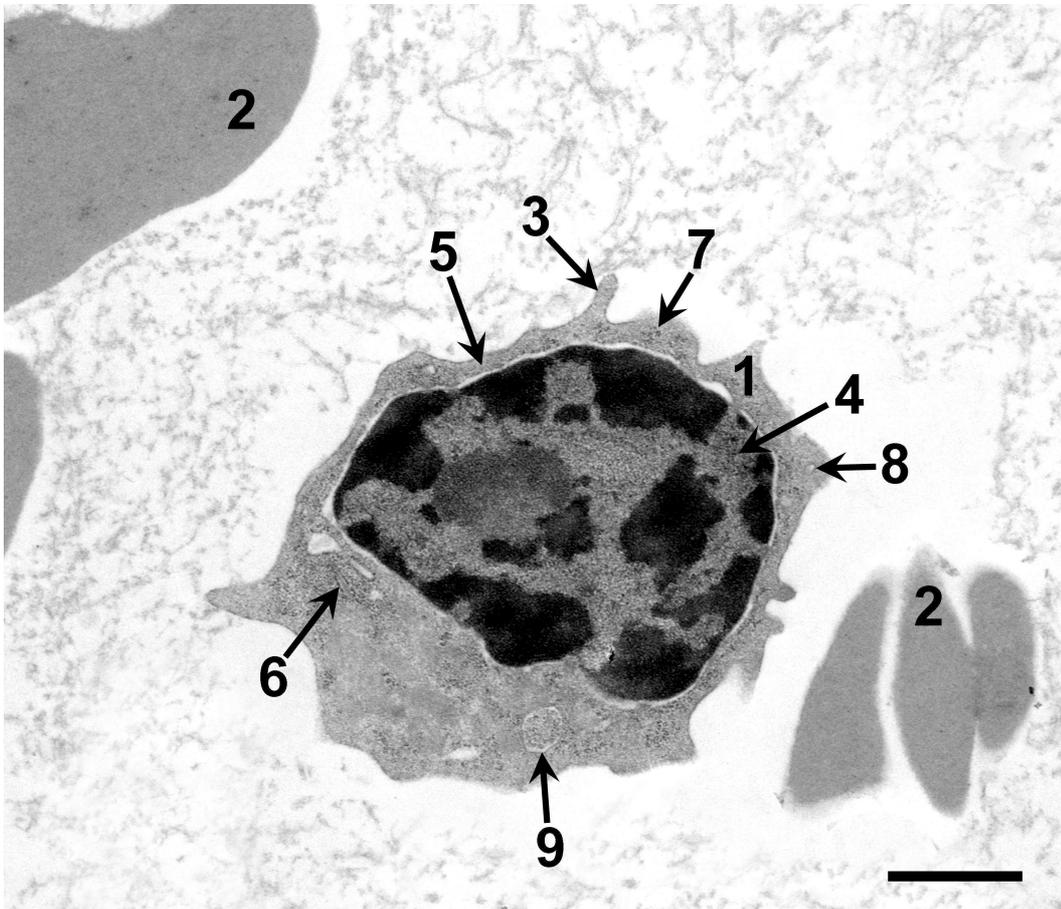


Bild 62: Blut Huhn, Lymphozyt und Erythrozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahme.

Lymphozyt (1) und Anschnitte von Erythrozyten (2). Der Lymphozyt (1) weist eine rundliche Form mit zytoplasmatischen Ausläufern (3) sowie ein hohes Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis auf. Der exzentrische Zellkern (4) ist an einer Seite abgeflacht. Das Zytoplasma (5) ist zellorganellenarm. Es enthält vereinzelt endoplasmatisches Retikulum (6), Glykogenpartikel (7), kleine Vakuolen (8) und Granula mit mäßig elektronendichtem Inhalt (9). SB = 1 μm .

3.6. Monozyten

Die Monozyten des Huhnes zeigen sich elektronenmikroskopisch als unregelmäßig geformte Zellen mit vielen Zellorganellen, die über das gesamte Zytoplasma verteilt sind. Ihre Größe beträgt in etwa 6 μm , kann jedoch je nach Schnittebene stark variieren. Das umfangreiche Zytoplasma enthält über das ganze Zytoplasma verteilt raues endoplasmatisches Retikulum, welches zum Teil stark dilatiert ist. Außerdem sind Glykogenpartikel, Ribosomen und 0,1-0,3 μm große Granula mit unterschiedlicher Elektronendichte zu erkennen.

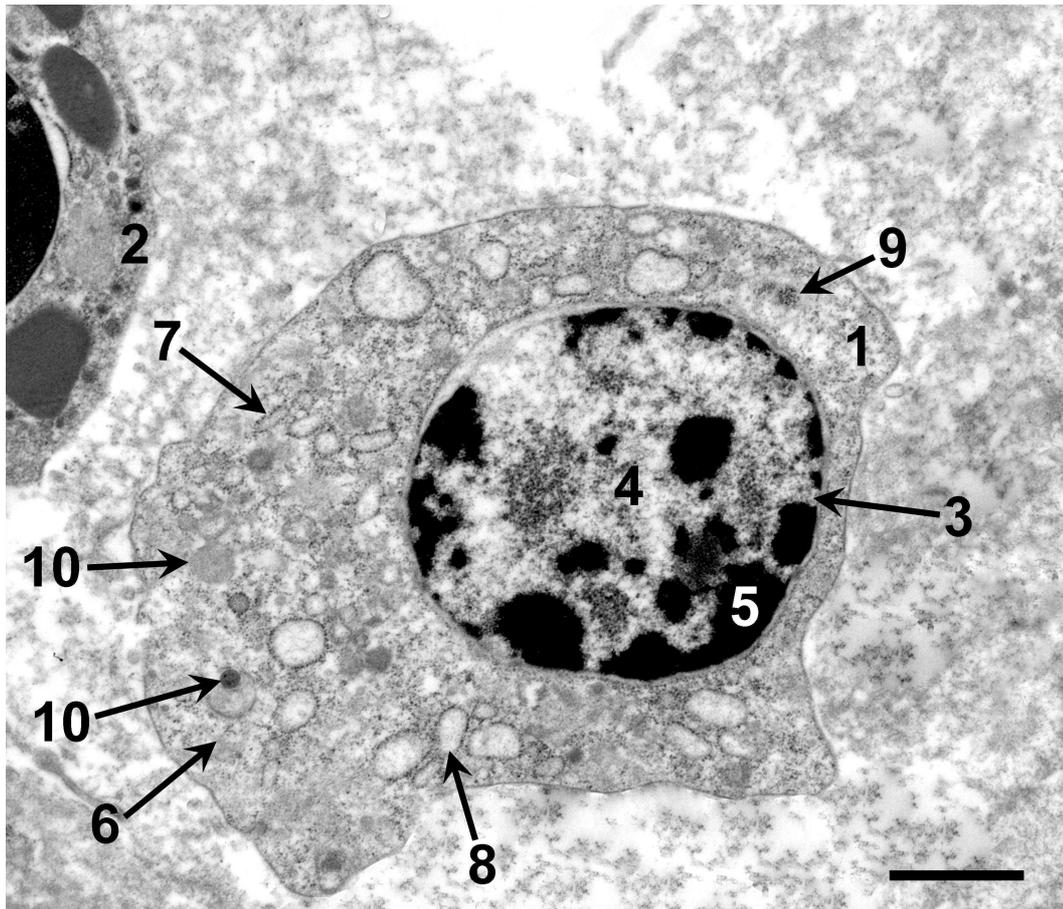


Bild 63: Blut Huhn, Monozyt und heterophiler Granulozyt. Elektronenmikroskopische Aufnahme.

Monozyt (1) und heterophiler Granulozyt (2). Im Zellkern (3) des Monozyten (1) zeigt sich das zentrale Euchromatin (4) und das periphere elektronendichte Heterochromatin (5). Das umfangreiche Zytoplasma (6) des Monozyten (1) enthält zahlreiche Zellorganellen. Es sind einige Anschnitte von rauem endoplasmatischem Retikulum (7) zu erkennen, welches zum Teil stark dilatiert erscheint (8). Außerdem stellen sich elektronendichte Glykogenpartikel (9) und unterschiedlich elektronendichte zytoplasmatische Granula (10) dar. SB = 1 μ m.

4. Ergebnisse der Glykohistochemie

Bei der Glykohistochemie zeigt sich die Lektinbindung anhand einer leuchtend grünen Fluoreszenz der Blutzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Eine eher gelbe Färbung ist als Eigenfluoreszenz zu werten. Diese ist auch in den Negativkontrollen zu sehen und kann vor allem bei den Granula der eosinophilen Granulozyten regelmäßig festgestellt werden. Auch im Zytoplasma der Erythrozyten sind bei den meisten positiv reagierenden Lektinen ein bis drei kleine Granula mit Eigenfluoreszenz zu erkennen, die in der Regel um den Zellkern lokalisiert sind. Für die Auswertung wurden nur die fixierten Ausstriche herangezogen, da sich bei den unfixierten Präparaten die Lektinbindung weniger deutlich darstellte. Für jedes Lektin wurde eine Tabelle erstellt, in der die Stärke der Fluoreszenz in eine negative (-), schwach positive (+/-), deutlich positive (+), stark positive (++) oder sehr stark positive (+++) Reaktion in Membran, Zytoplasma oder Granula eingeteilt wird. Die Blutzellen können anhand der Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI auch ohne Fluoreszenz differenziert werden.

4.1. D-Mannose und D-Glukose spezifische Lektine

4.1.1. Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA)

Bei den meisten untersuchten Blutausstrichen zeigt sich eine deutlich positive Bindung von ConA an die Erythrozytenmembran. Das Zytoplasma der Erythrozyten reagiert dagegen negativ. Die Thrombozyten weisen eine schwach positive Reaktion des Zytoplasmas und eine negative Reaktion der Membran auf. Die positive Reaktion im Zytoplasma ist in erster Linie um den Zellkern lokalisiert. Die Granula der Thrombozyten sind bei der Hälfte der Präparate schwach positiv. Die heterophilen Granulozyten zeigen in der Membran und im Zytoplasma eine stark positive Fluoreszenz, während die Granula schwach positiv reagieren. Bei den eosinophilen Granulozyten stellt sich lediglich die Membran in wenigen Fällen schwach positiv dar. Die Membran der basophilen Granulozyten reagiert zum Teil stark positiv und zum Teil negativ. Die Granula sind meist stark ConA-positiv, das Zytoplasma zeigt überwiegend keine oder eine schwache Fluoreszenz. Bei den Lymphozyten sind Zytoplasma und Granula bei den meisten Tieren deutlich ConA-positiv. Die Membran reagiert überwiegend negativ. Die Granula der Monozyten weisen eine starke Fluoreszenz auf, während bei Membran und Zytoplasma meist keine Bindung vorhanden ist.

Tabelle 24: Ergebnis ConA

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran		10%	70%	20%		100%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma		100%				100%
Granula	50%	50%				50%
Heterophile Granulozyten						
Membran	30%			60%	10%	70%
Zytoplasma			10%	80%	10%	100%
Granula	10%	80%	10%			90%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	70%	30%				30%
Zytoplasma	100%					100%
Granula	100%					100%
Basophile Granulozyten						
Membran	44,4%			55,5%	11,1%	66,6%
Zytoplasma	44,4%	22,2%	11,1%	22,2%		55,5%
Granula	22,2%			55,5%	22,2%	77,7%
Lymphozyten						
Membran	90%		10%			10%
Zytoplasma		40%	50%	10%		100%
Granula		10%	80%	10%		100%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	80%	20%				20%
Granula			10%	80%	10%	100%

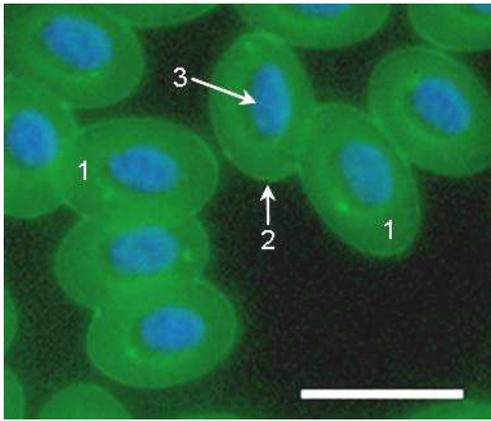


Bild 64: Blut Huhn, Erythrozyten. ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

ConA-FITC bindet die Zellmembran (2) der Erythrozyten (1) mit deutlicher Affinität. Zellkern (3). SB = 10 µm.

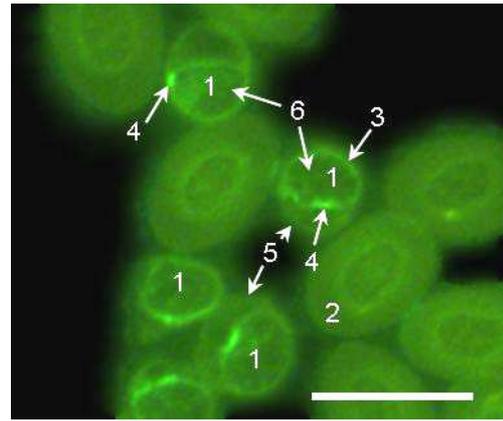


Bild 65: Blut Huhn, Thrombozyten. ConA-FITC.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyten (1) und Erythrozyten (2). Die Thrombozyten (1) zeigen eine schwach positive Reaktion des Zytoplasmas (3) und der zytoplasmatischen Granula (4). Die Fluoreszenz im Zytoplasma ist um den Zellkern lokalisiert. ConA-FITC bindet nicht an die Zellmembran (5). Zellkern (6). SB = 10 µm.

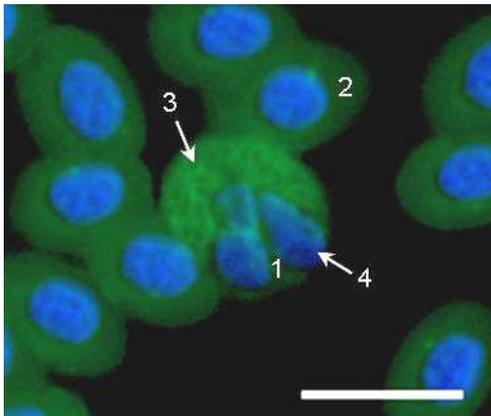


Bild 66: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). ConA-FITC bindet das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) mit starker Affinität. Zellkern (4). SB = 10 µm.

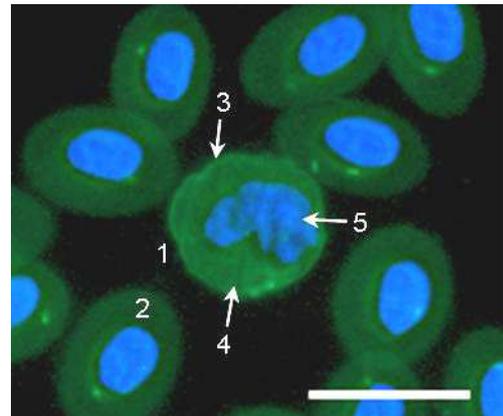


Bild 67: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Hier wird deutlich, dass die Zellmembran (3) des heterophilen Granulozyten (1) eine stark positive Reaktion zeigt. Das Zytoplasma (4) reagiert stark positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

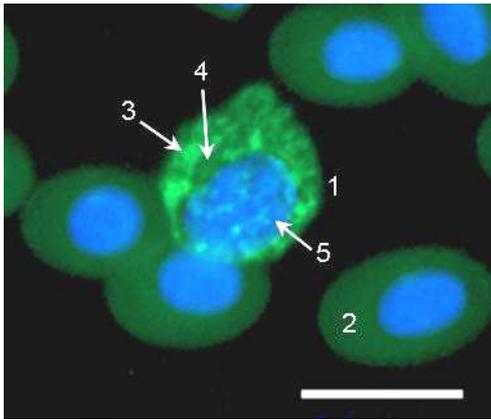


Bild 68: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). ConA-FITC bindet die Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) mit sehr starker Affinität. Das Zytoplasma (4) reagiert schwach positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

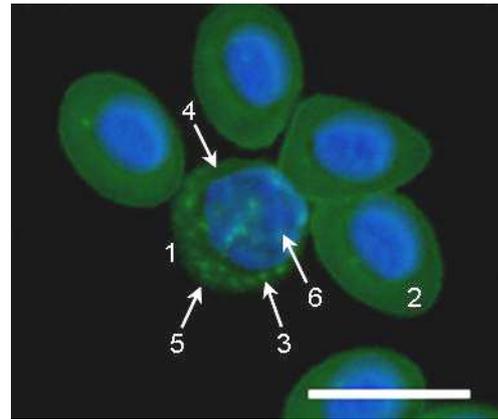


Bild 69: Blut Huhn, Lymphozyt. ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Die zytoplasmatischen Granula (3) des Lymphozyten (1) reagieren deutlich positiv. ConA-FITC bindet das Zytoplasma (4) mit schwacher Affinität. Die Zellmembran (5) reagiert negativ. Zellkern (6). SB = 10 µm.

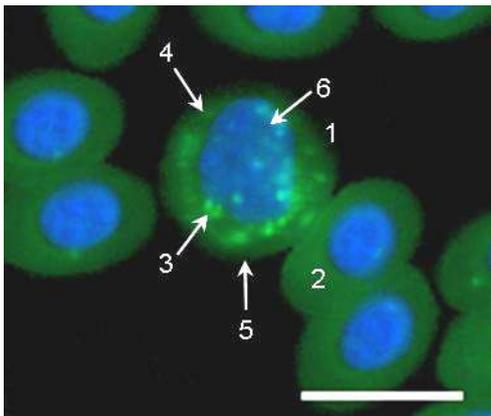


Bild 70: Blut Huhn, Monozyt. ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula (3) des Monozyten (1) weisen eine starke Fluoreszenz auf. Das Zytoplasma (4) und die Zellmembran (5) reagieren negativ. Zellkern (6). SB = 10 µm.

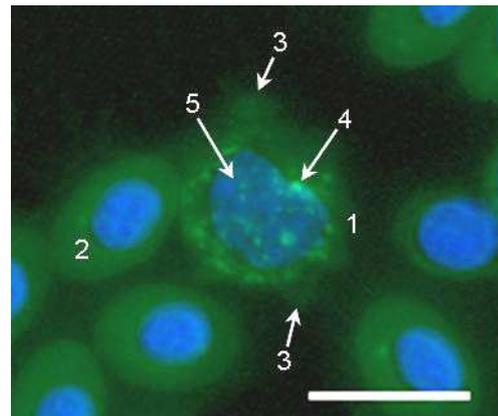


Bild 71: Blut Huhn, Monozyt. ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Der Monozyt (1) weist zytoplasmatische Ausläufer (3) auf. ConA-FITC bindet die Granula (4) mit starker Affinität. Zellkern (5). SB = 10 µm.

4.1.2. Bindung von Lens culinaris Agglutinin (LCA)

Bei LCA ist keine Fluoreszenz der Erythrozyten zu sehen. Die Thrombozyten reagieren im Zytoplasma, vor allem in Zellkernnähe, schwach positiv und in den Granula deutlich positiv. Die Membran der Thrombozyten stellt sich dagegen negativ dar. Bei den heterophilen Granulozyten kann man eine negative Membran, ein deutlich positives Zytoplasma und überwiegend deutlich positive Granula erkennen. Die eosinophilen Granulozyten zeigen nur im Zytoplasma eine schwach positive Reaktion. Die Granula der basophilen Granulozyten weisen eine starke Fluoreszenz auf, wogegen das Zytoplasma schwach positiv und die Membran negativ reagiert. Bei den Lymphozyten erfolgte ausschließlich im Zytoplasma eine schwache Bindung von LCA. Die Monozyten zeigen im Zytoplasma eine meist schwache und in den Granula eine überwiegend deutliche Fluoreszenz. Die Membran der Monozyten ist LCA-negativ.

Tabelle 25: Ergebnis LCA

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma		100%				100%
Granula		12,5%	75%	12,5%		100%
Heterophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma			100%			100%
Granula	12,5%	12,5%	62,5%	12,5%		87,5%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	12,5%	87,5%				87,5%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma		75%	25%			100%
Granula			12,5%	87,5%		100%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	25%	75%				75%
Granula	100%					0%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	50%	50%				50%
Granula		50%	50%			100%

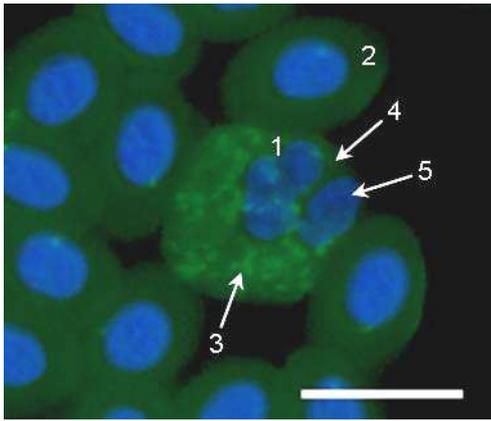


Bild 72: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. LCA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula (3) des heterophilen Granulozyten (1) reagieren deutlich bis stark positiv. Das Zytoplasma (4) zeigt sich deutlich positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

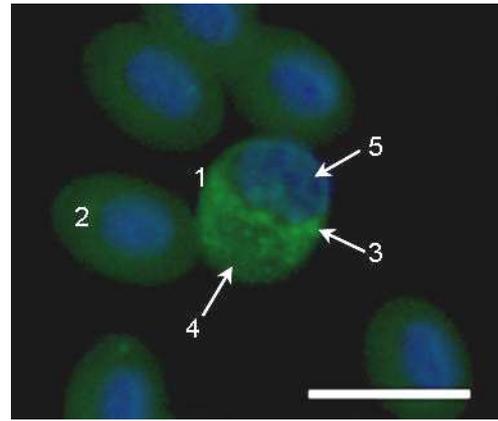


Bild 73: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. LCA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) weisen eine starke Fluoreszenz auf. Das Zytoplasma (4) reagiert schwach positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

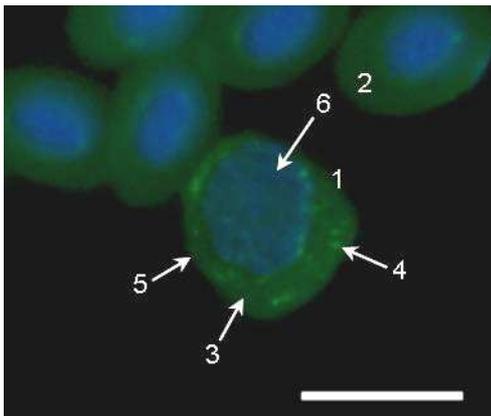


Bild 74: Blut Huhn, Monozyt. LCA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im schwach positiven Zytoplasma (3) des Monozyten (1) sind deutlich positive Granula (4) zu erkennen. Die Membran (5) reagiert nicht mit LCA-FITC. Zellkern (6). SB = 10 µm.

4.1.3. Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

PSA-FITC zeigt keine Affinität zu Membran oder Zytoplasma der Erythrozyten in den Ausstrichen. Auch die Membran und die Granula der Thrombozyten reagieren negativ, während das Zytoplasma eine schwache Fluoreszenz aufweist. Die heterophilen Granulozyten zeigen in den Granula eine schwach positive und im Zytoplasma eine stark positive Reaktion, während die Membran PSA-negativ ist. Bei den eosinophilen Granulozyten ist ausschließlich im Zytoplasma bei einzelnen Ausstrichen eine schwache Bindung von PSA vorhanden. Das Zytoplasma der basophilen Granulozyten fluoresziert bei der Hälfte der Ausstriche schwach, während die andere Hälfte keine Fluoreszenz aufweist. Auch in den basophilen Granula ist eine Fluoreszenz zu erkennen, die sich überwiegend stark positiv darstellt. Lediglich die Zellmembran reagiert auch in diesen Zellen negativ. Bei den Lymphozyten zeigt sich die Membran negativ, das Zytoplasma schwach positiv und die Granula deutlich positiv. Bei den Monozyten ist in der Membran keine und im Zytoplasma eine meist schwache Fluoreszenz vorhanden. Die Reaktion der Granula variiert von negativ bis sehr stark positiv.

Tabelle 26: Ergebnis PSA

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma		100%				100%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma			10%	80%	10%	100%
Granula	10%	80%	10%			90%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	60%	40%				40%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	50%	50%				50%
Granula	10%		20%	70%		90%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	30%	70%				70%
Granula		10%	80%	10%		100%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	30%	70%				70%
Granula	50%	10%	30%	10%		50%

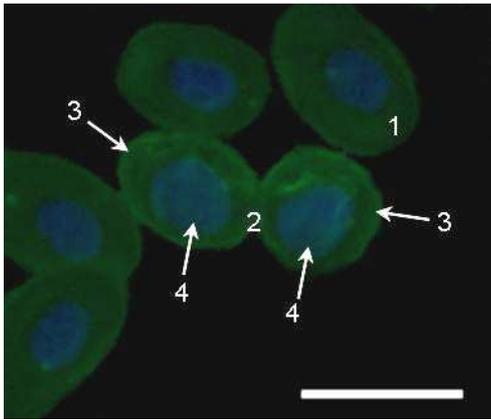


Bild 75: Blut Huhn, Thrombozyten. PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 18, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyten (1) und Erythrozyten (2). PSA-FITC bindet das Zytoplasma (3) der Thrombozyten (1) mit schwacher Affinität. Zellkern (4). SB = 10 µm.

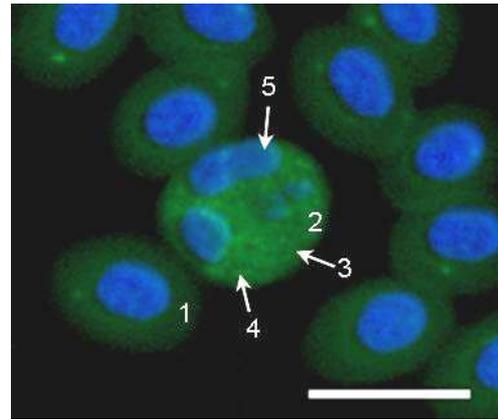


Bild 76: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Der heterophile Granulozyt (1) zeigt im Zytoplasma (3) eine stark positive und in den Granula (4) eine schwach positive Reaktion. Zellkern (5). SB = 10 µm.

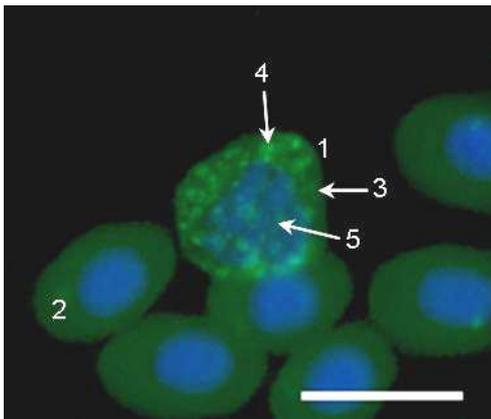


Bild 77: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 4, LSL, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des basophilen Granulozyten (1) fluoresziert schwach positiv und enthält stark positive Granula (4). Der Zellkern (5) wird von einzelnen Granula überlagert. SB = 10 µm.

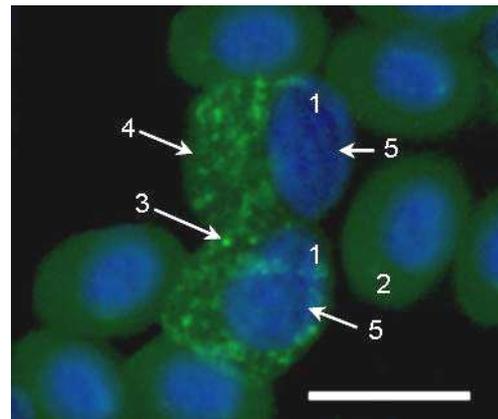


Bild 78: Blut Huhn, basophile Granulozyten. PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 5, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Die basophilen Granulozyten (1) enthalten stark positive Granula (3). Das Zytoplasma (4) zeigt sich schwach positiv. Randständige Zellkerne (5). SB = 10 µm.

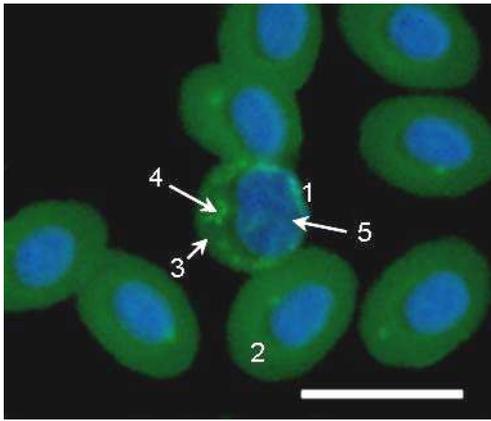


Bild 79: Blut Huhn, Lymphozyt. PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) enthält deutlich positive zytoplasmatische Granula (3). Zellkern (5). SB = 10 µm.

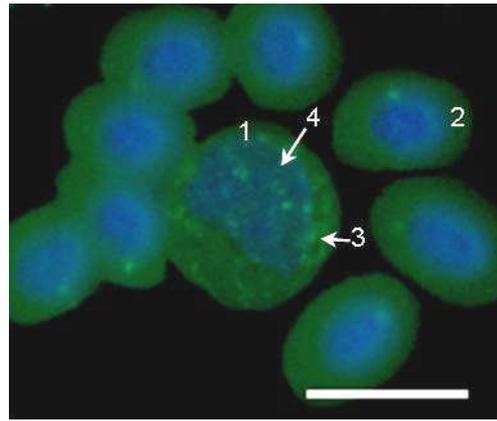


Bild 80: Blut Huhn, Monozyt. PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Der Monozyt (1) enthält deutlich positive feine zytoplasmatische Granula (3). Zellkern (4). SB = 10 µm.

4.2. D-Galaktose spezifische Lektine

4.2.1. Bindung von Peanut Agglutinin (PNA)

Bei PNA ist lediglich eine Bindung an die Granulozyten zu erkennen. Bei den heterophilen Granulozyten zeigt sich bei einigen Ausstrichen eine schwache bis deutliche Fluoreszenz der Zellmembran. Die Granula sind in den meisten Fällen schwach positiv. Die Granula der eosinophilen Granulozyten weisen eine schwache Bindung des Lektins auf. In nur einem Ausstrich kann eine schwache Reaktion der Granula der basophilen Granulozyten festgestellt werden.

Tabelle 27: Ergebnis PNA

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran	40%	40%	20%			60%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	10%	80%	10%			90%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula		90%	10%			100%
Basophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	90%	10%				10%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%

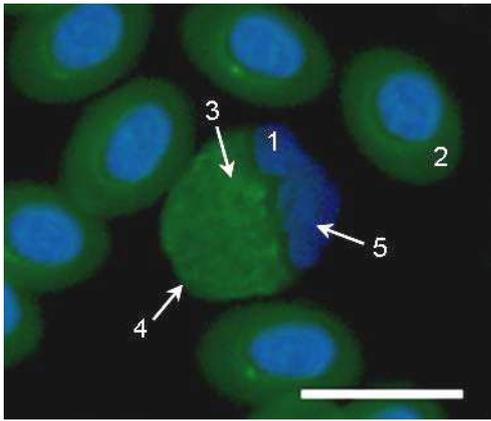


Bild 81: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. PNA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 7, LSL, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die heterophilen Granula (3) reagieren schwach positiv. Bei diesem heterophilen Granulozyten (1) bindet PNA-FITC nicht an die Zellmembran (4). Zellkern (5). SB = 10 µm.

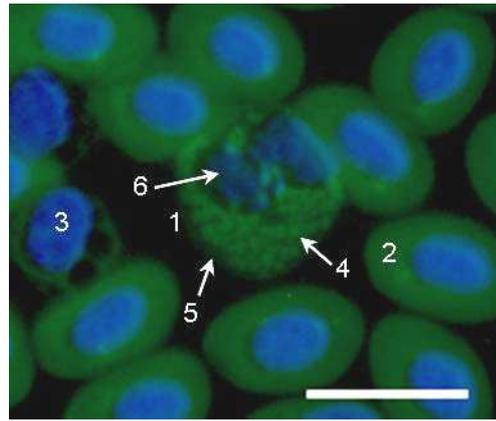


Bild 82: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. PNA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1), Erythrozyten (2) und Thrombozyt (3). PNA-FITC bindet an die Granula (4) des eosinophilen Granulozyten (1) mit schwacher Affinität. Das Zytoplasma (5) reagiert negativ. Zellkern (6). SB = 10 µm.

4.2.2. Bindung von *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

In keinem der Blutausstriche ist eine Bindung von RCA an die Erythrozyten, eosinophilen Granulozyten und Monozyten zu erkennen. Bei den Thrombozyten zeigt sich nur in einem Präparat eine schwache Fluoreszenz des Zytoplasmas, Membran und Granula binden nicht an RCA. Die heterophilen Granulozyten sind im Zytoplasma überwiegend schwach RCA-positiv, während RCA die Granula nur sehr selten bindet und sich die Membran negativ darstellt. Die Membran und das Zytoplasma der basophilen Granulozyten reagieren nicht mit RCA-FITC, die Granula zeigen aber eine überwiegend deutliche Fluoreszenz. Bei den Lymphozyten reagiert das Zytoplasma überwiegend schwach positiv und in den Granula zeigen sich sowohl negative als auch deutlich positive Reaktionen. In der Membran der Lymphozyten ist keine Fluoreszenz zu erkennen. In allen Präparaten ist eine starke Hintergrundfärbung vorhanden. Auch nach einer Reduktion der RCA-Konzentration auf 5 µg/ml PBS, bzw. 2,5 µg/ml PBS ist diese noch deutlich zu erkennen, während die Blutzellen jetzt nur noch sehr schwach bzw. nicht mehr an das Lektin binden.

Tabelle 28: Ergebnis RCA

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	85,7%	14,3%				14,3%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	14,3%	71,4%	14,3%			85,7%
Granula	85,7%	14,3%				14,3%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula		42,9%	57,1%			100%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	14,3%	71,4%	14,3%			85,7%
Granula	28,6%		71,4%			71,4%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%

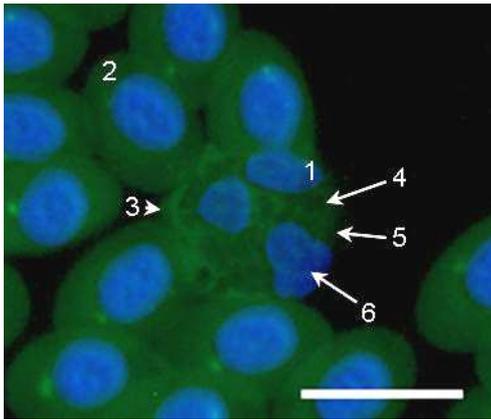


Bild 83: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. RCA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 1, LSL, männlich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) stellt sich schwach positiv dar. Das Lektin bindet nicht an die Granula (4) und die Membran (5). Zellkern (6). SB = 10 µm.

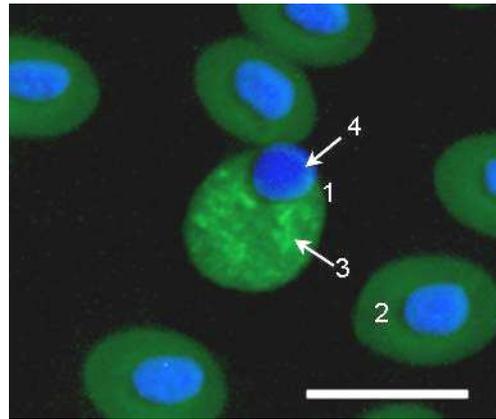


Bild 84: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. RCA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 5, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) reagieren deutlich positiv mit RCA-FITC. Zellkern (4). SB = 10 µm.

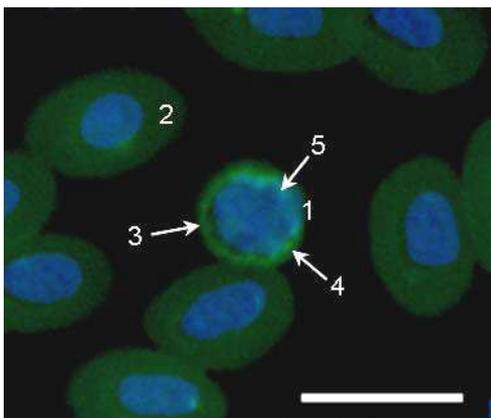


Bild 85: Blut Huhn, Lymphozyt. RCA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im schwach positiven Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) befinden sich zytoplasmatische Granula (4). Zellkern (5). SB = 10 µm.

4.2.3. Bindung von *Viscum album* Agglutinin (VAA)

Bei VAA ist in einzelnen Ausstrichen sehr selten eine schwache Bindung an einzelne Granula der heterophilen Granulozyten zu erkennen. Alle anderen Blutzellen reagieren nicht mit VAA.

4.3. N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifische Lektine

4.3.1. Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSL I)

Es kann keine Bindung von GSL I an die Hühnerblutzellen festgestellt werden.

4.3.2. Bindung von Sophora japonica Agglutinin (SJA)

Die Blutzellen zeigen mit dem Lektin SJA keine Reaktion.

4.3.3. Bindung von Soybean Agglutinin (SBA)

In keinem der untersuchten Ausstriche ist eine Fluoreszenz der Hühnerblutzellen zu erkennen.

4.3.4. Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

Die heterophilen Granulozyten weisen teilweise eine schwache Fluoreszenz in Membran, Zytoplasma und Granula auf. Alle anderen Blutzellen binden kein DBA.

Tabelle 29: Ergebnis DBA

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran	75%	25%				25%
Zytoplasma	62,5%	37,5%				37,5%
Granula	62,5%	37,5%				37,5%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%

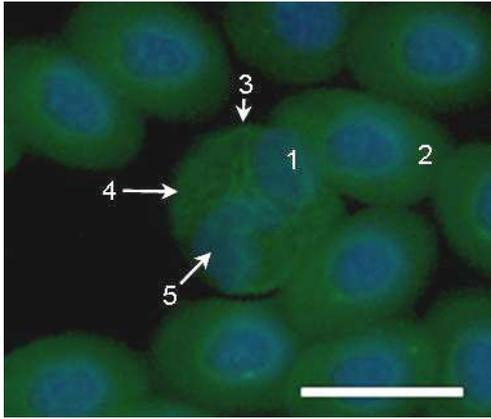


Bild 86: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. DBA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 1, LSL, männlich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Membran (3) und das Zytoplasma (4) des heterophilen Granulozyten (1) reagieren schwach positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

4.4. D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifische Lektine

4.4.1. Bindung von Sambucus nigra Agglutinin (SNA)

Bei den Erythrozyten ist eine starke Bindung von SNA an die Membran zu erkennen. Das Zytoplasma ist größtenteils schwach positiv. Die Thrombozyten zeigen eine überwiegend negative Reaktion der Membran und der Granula, das Zytoplasma stellt sich sowohl negativ als auch vor allem in Zellkernnähe schwach bis deutlich positiv dar. SNA bindet mit schwacher bis starker Affinität an den Randbereich der heterophilen Granula. Das Innere der Granula fluoresziert nicht. Das Zytoplasma und die Membran der heterophilen Granulozyten zeigen überwiegend keine Bindung von SNA. In wenigen Fällen ist jedoch eine schwache bis deutliche Reaktion der Membran zu erkennen. Bei den eosinophilen Granulozyten ist die Membran schwach bis deutlich SNA-positiv, das Zytoplasma schwach SNA-positiv und die Granula SNA-negativ. Das Zytoplasma und die Membran der basophilen Granulozyten stellen sich überwiegend negativ dar, nur in wenigen Fällen reagiert die Membran schwach oder auch stark auf SNA. Das Lektin bindet mit meist starker Affinität an die basophilen Granula. Das Zytoplasma und die Membran von Lymphozyten und Monozyten stellen sich überwiegend schwach positiv dar, die Granula beider zeigen keine Fluoreszenz.

Tabelle 30: Ergebnis SNA

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran			40%	60%		100%
Zytoplasma	20%	80%				80%
Thrombozyten						
Membran	70%	30%				30%
Zytoplasma	40%	30%	30%			60%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran	60%	20%	20%			40%
Zytoplasma	100%					0%
Granula		50%	20%	30%		100%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	20%	40%	40%			60%
Zytoplasma	10%	90%				90%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	60%	30%		10%		40%
Zytoplasma	100%					0%
Granula		20%		50%	30%	100%
Lymphozyten						
Membran	20%	60%	20%			80%
Zytoplasma	10%	90%				90%
Granula	100%					0%
Monozyten						
Membran	50%	50%				50%
Zytoplasma	40%	60%				60%
Granula	40%	30%	30%			60%

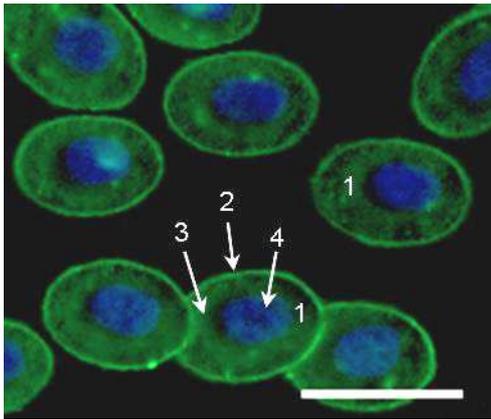


Bild 87: Blut Huhn, Erythrozyten. SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

SNA-FITC bindet mit starker Affinität an die Membran (2) der Erythrozyten (1). Das Zytoplasma (3) reagiert schwach positiv. Zellkern (4). SB = 10 µm.

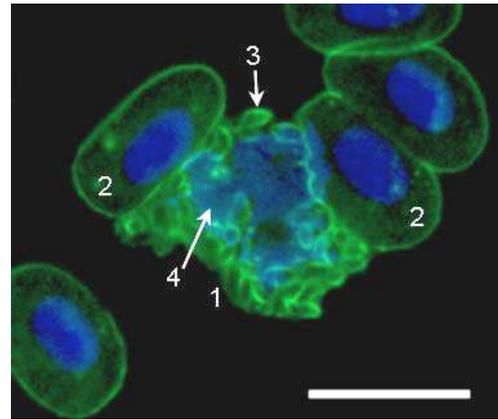


Bild 88: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). SNA-FITC bindet mit starker Affinität an den Randbereich der Granula (3) des heterophilen Granulozyten (1). Das Innere der Granula fluoresziert nicht. Zellkern (4). SB = 10 µm.

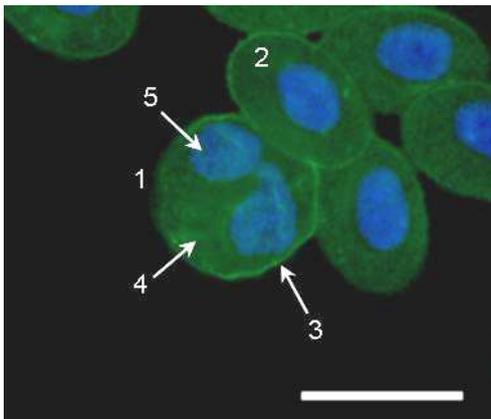


Bild 89: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 2, LB, männlich, 24 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Membran (3) des eosinophilen Granulozyten (1) reagiert deutlich positiv. Das Zytoplasma (4) reagiert schwach positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

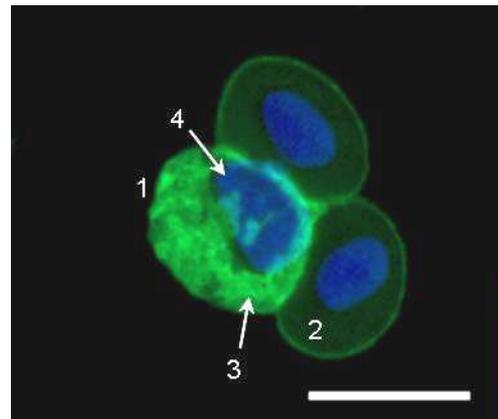


Bild 90: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). SNA-FITC bindet die Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) mit starker Affinität. Randständiger Zellkern (4). SB = 10 µm.

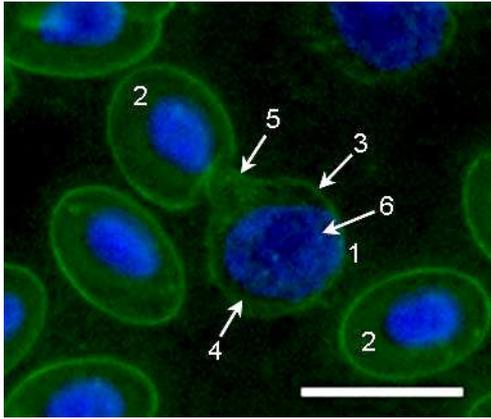


Bild 91: Blut Huhn, Lymphozyt. SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Membran (3) und das Zytoplasma (4) des Lymphozyten (1) stellen sich schwach positiv dar. Zytoplasmatischer Ausläufer (5). Zellkern (6). SB = 10 μ m.

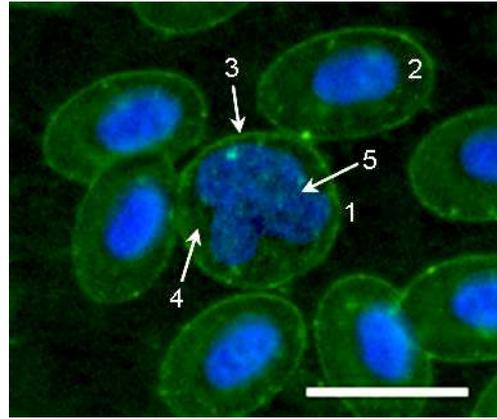


Bild 92: Blut Huhn, Monozyt. SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 8, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). SNA-FITC bindet mit schwacher Affinität an die Membran (3) und an das Zytoplasma (4) des Monozyten (1). Zellkern (5). SB = 10 μ m.

4.5. N-Acetyl-D-Glukosamin und N-Acetyl-D-Neuraminsäure spezifische Lektine

4.5.1. Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA)

WGA bindet mit deutlicher Affinität an die Erythrozytenmembran. Das Zytoplasma der Erythrozyten zeigt keine Fluoreszenz. Die Thrombozyten reagieren im Zytoplasma meist schwach positiv, wobei sich die Fluoreszenz in erster Linie um den Zellkern herum darstellt und in der Peripherie weniger stark zu erkennen ist. Die Membran und die Granula sind WGA-negativ. Bei den heterophilen Granulozyten ist in der Membran eine starke Fluoreszenz zu erkennen, das Zytoplasma und die heterophilen Granula reagieren überwiegend deutlich positiv auf WGA. Die Membran der eosinophilen Granulozyten zeigt sich negativ bis deutlich positiv. Das Zytoplasma und die Granula binden WGA in den meisten Fällen nicht oder nur schwach. Bei den basophilen Granulozyten stellt sich die Membran zum Teil negativ dar, zum Teil reagiert sie aber auch schwach bis stark positiv. Im Zytoplasma der basophilen Granulozyten ist eine größtenteils schwache Fluoreszenz zu erkennen, die Granula reagieren stark bis sehr stark positiv auf WGA. Die Membran der Lymphozyten zeigt nur sehr selten eine deutliche Fluoreszenz, in den meisten Fällen reagiert sie negativ. Das Lymphozytenzytoplasma bindet das Lektin mit deutlicher bis starker Affinität, die Granula stellen sich überwiegend stark positiv dar. Bei den Monozyten reagiert die Membran meist schwach positiv, das Zytoplasma zeigt sich negativ bis schwach positiv und die Granula reagieren überwiegend deutlich positiv nach Inkubation mit WGA-FITC.

Tabelle 31: Ergebnis WGA

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran		37,5%	62,5%			100%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma		62,5%	37,5%			100%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran			12,5%	75%	12,5%	100%
Zytoplasma		25%	62,5%	12,5%		100%
Granula		37,5%	62,5%			100%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	42,9%	42,9%	14,2%			57,1%
Zytoplasma	71,4%	28,6%				28,6%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	37,5%	12,5%	25%	25%		62,5%
Zytoplasma	25%	50%	25%			75%
Granula				75%	25%	100%
Lymphozyten						
Membran	87,5%		12,5%			12,5%
Zytoplasma			50%	50%		100%
Granula			12,5%	75%	12,5%	100%
Monozyten						
Membran	25%	50%	25%			75%
Zytoplasma	50%	50%				50%
Granula		12,5%	75%	12,5%		100%

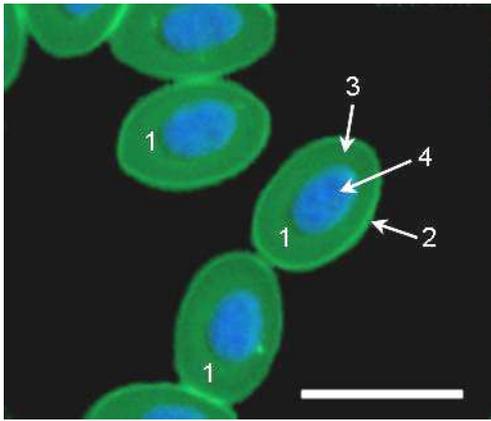


Bild 93: Blut Huhn, Erythrozyten. WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

WGA-FITC bindet mit deutlicher Affinität an die Membran (2) der Erythrozyten (1). Das Zytoplasma (3) reagiert negativ. Zellkern (4). SB = 10 µm.

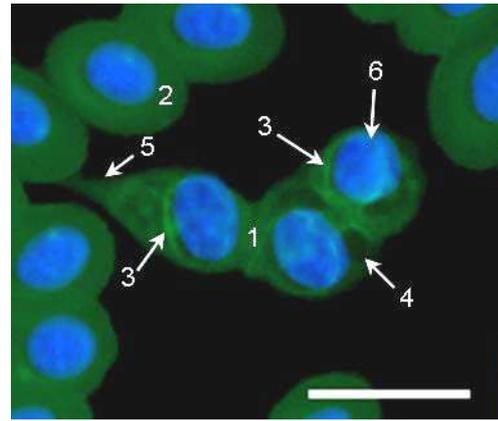


Bild 94: Blut Huhn, Thrombozyten. WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyten (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) der Thrombozyten (1) stellt sich in Zellkernnähe schwach positiv dar. Vakuole (4) im Zytoplasma (3). Zytoplasmatischer Ausläufer (5). Zellkern (6). SB = 10 µm.

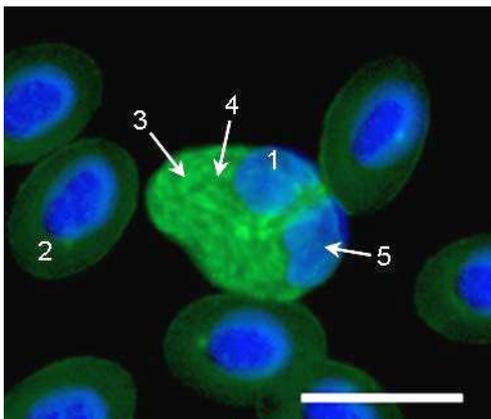


Bild 95: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) reagiert deutlich bis stark positiv. Die Granula (4) zeigen sich deutlich positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

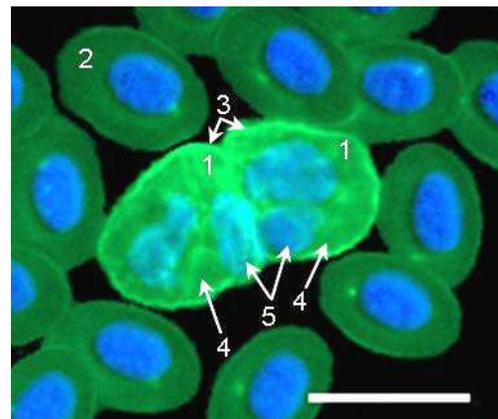


Bild 96: Blut Huhn, heterophile Granulozyten. WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Hier wird deutlich, dass WGA-FITC mit starker Affinität an die Membran (3) der heterophilen Granulozyten (1) bindet. Das Zytoplasma und die Granula (4) reagieren deutlich positiv. Zellkerne (5). SB = 10 µm.

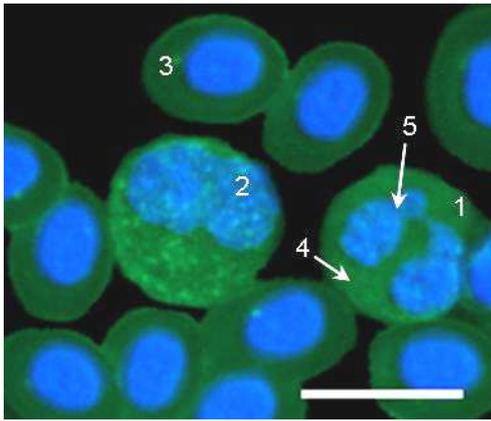


Bild 97: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt und Monozyt. WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1), Monozyt (2) und Erythrozyten (3). Das Zytoplasma (4) des eosinophilen Granulozyten (1) reagiert schwach positiv. Die Membran dieser Zelle bindet WGA-FITC nicht. Zellkern (5). SB = 10 µm.

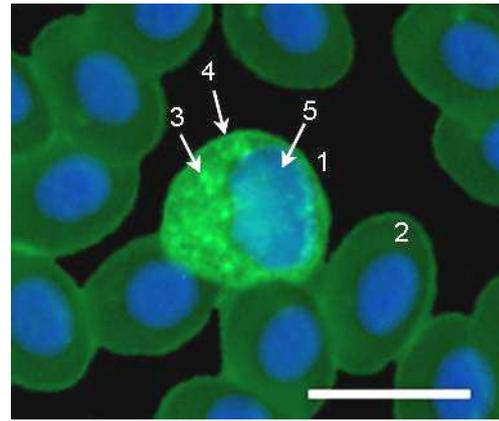


Bild 98: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula (3) und die Membran (4) des basophilen Granulozyten (1) weisen eine starke Fluoreszenz auf. Zellkern (5). SB = 10 µm.

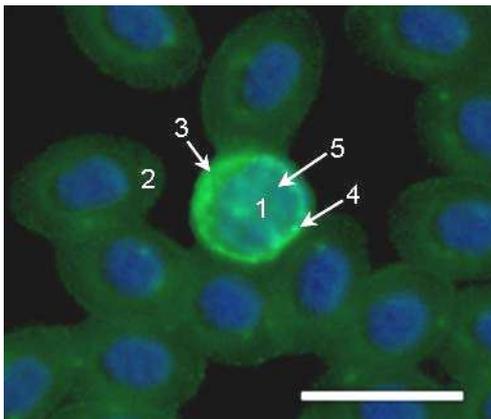


Bild 99: Blut Huhn, Lymphozyt. WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) und die zytoplasmatischen Granula (4) des Lymphozyten (1) reagieren stark positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

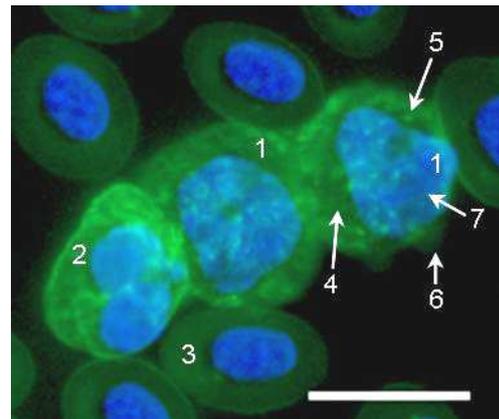


Bild 100: Blut Huhn, Monozyten und heterophiler Granulozyt. WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyten (1), heterophiler Granulozyt (2) und Erythrozyten (3). Das schwach positive Zytoplasma (4) des Monozyten (1) enthält deutlich positive Granula (5). Zytoplasmatischer Ausläufer (6) des Monozyten (1). Zellkern (7). SB = 10 µm.

4.6. N-Acetyl-D-Glukosamin spezifische Lektine

4.6.1. Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs)

Die Zellmembran der Erythrozyten weist in einem Großteil der Präparate keine Fluoreszenz auf. Das Zytoplasma reagiert ebenfalls WGAs-negativ. Das Lektin bindet überwiegend schwach an das Zytoplasma der Thrombozyten, wobei die Fluoreszenz in erster Linie um den Zellkern lokalisiert ist. Die Membran und die Granula reagieren nicht mit WGAs. Bei den heterophilen Granulozyten zeigt sich die Membran deutlich bis stark positiv, das Zytoplasma überwiegend stark positiv und die Granula in wenigen Fällen schwach positiv. Das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten bindet WGAs meist schwach bis deutlich und in der Zellmembran ist in manchen Ausstrichen eine schwache Fluoreszenz zu erkennen. Die eosinophilen Granula reagieren negativ. Die basophilen Granulozyten binden WGAs in der Zellmembran mit deutlicher bis starker Affinität, das Zytoplasma zeigt sich überwiegend deutlich positiv und die Granula weisen eine starke bis sehr starke Fluoreszenz auf. Bei den Lymphozyten reagiert das Zytoplasma bei den meisten Präparaten schwach WGAs-positiv. Die Granula stellen sich überwiegend deutlich WGAs-positiv dar, während in der Zellmembran der Lymphozyten keine Reaktion zu erkennen ist. In Membran und Granula der Monozyten ist eine meist deutliche Fluoreszenz vorhanden. Das Monozytenzytoplasma reagiert schwach bis deutlich WGAs-positiv.

Tabelle 32: Ergebnis WGAs

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	75%	25%				25%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma		87,5%	12,5%			100%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran			50%	50%		100%
Zytoplasma			12,5%	75%	12,5%	100%
Granula	75%	25%				25%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	62,5%	37,5%				37,5%
Zytoplasma	25%	37,5%	37,5%			75%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran			50%	50%		100%
Zytoplasma		25%	75%			100%
Granula				50%	50%	100%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma		62,5%	37,5%			100%
Granula		12,5%	75%	12,5%		100%
Monozyten						
Membran		37,5%	62,5%			100%
Zytoplasma		50%	50%			100%
Granula		12,5%	75%	12,5%		100%

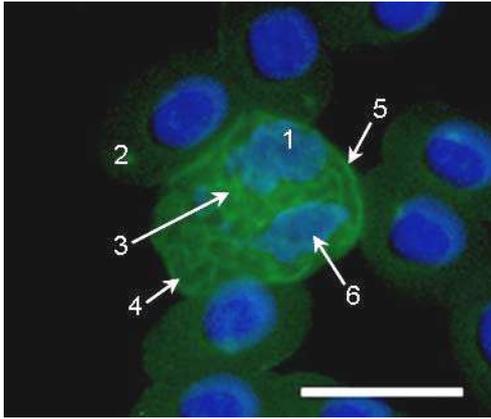


Bild 101: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. WGAs-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 1, LSL, männlich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das stark positive Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) enthält schwach positive Granula (4). Die Zellmembran (5) reagiert stark positiv. Zellkern (6). SB = 10 µm.

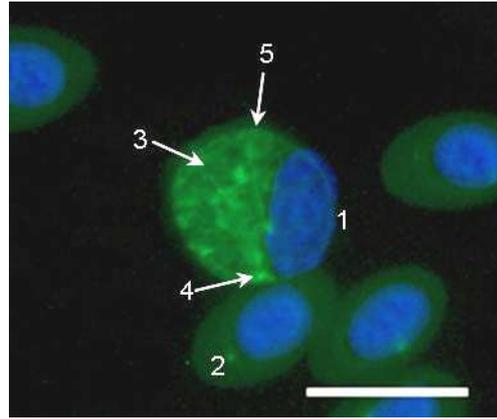


Bild 102: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. WGAs-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das deutlich positive Zytoplasma (3) des basophilen Granulozyten (1) enthält sehr stark positive Granula (4). Die Zellmembran (5) reagiert deutlich positiv. Zellkern. SB = 10 µm.

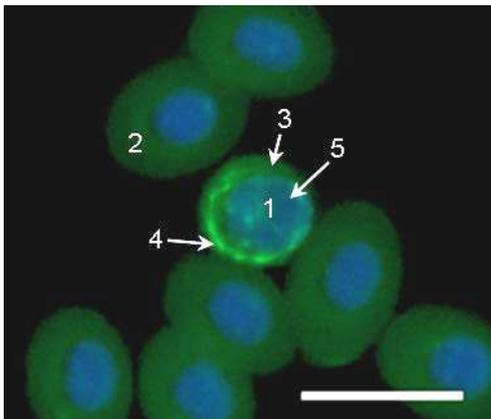


Bild 103: Blut Huhn, Lymphozyt. WGAs-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). WGAs-FITC bindet mit deutlicher Affinität an die zytoplasmatischen Granula (4) des Lymphozyten (1). Das Zytoplasma (3) reagiert schwach positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

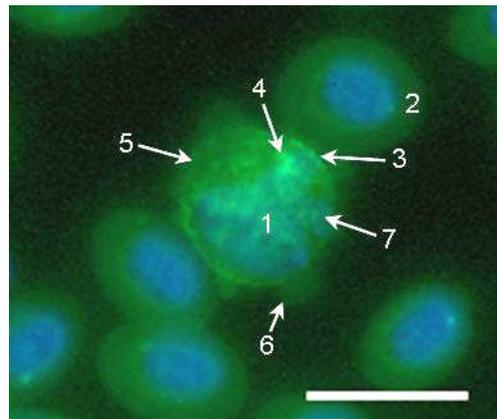


Bild 104: Blut Huhn, Monozyt. WGAs-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) des Monozyten (1) reagiert deutlich positiv. Die Granula (4) zeigen eine deutliche Fluoreszenz. Das Zytoplasma (5) und die zytoplasmatischen Ausläufer (6) reagieren schwach positiv. Zellkern (7). SB = 10 µm.

4.7. L-Fukose spezifische Lektine

4.7.1. Bindung von Ulex europaeus Agglutinin I (UEA I)

Es kann keine Bindung von UEA I an die Blutzellen festgestellt werden.

4.8. Für Oligosaccharide spezifische Lektine

4.8.1. Bindung von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)

Die Erythrozyten, Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten reagieren nicht mit PHA-E. Bei den Thrombozyten zeigt sich das Zytoplasma zum einen negativ und zum anderen in Zellkernnähe schwach positiv. Die Granula der Thrombozyten weisen selten eine schwache Fluoreszenz auf. Die heterophilen Granulozyten reagieren im Zytoplasma und in den Granula in wenigen Fällen schwach PHA-E-positiv und in der Membran PHA-E-negativ. Das Lektin bindet mit meist schwacher Affinität an das Zytoplasma und mit überwiegend starker Affinität an die Granula der basophilen Granulozyten, während die Zellmembran keine Fluoreszenz aufweist.

Tabelle 33: Ergebnis PHA-E

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	50%	50%				50%
Granula	90%	10%				10%
Heterophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	70%	30%				30%
Granula	90%	10%				10%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	10%	70%	20%			90%
Granula	10%		10%	80%		90%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%

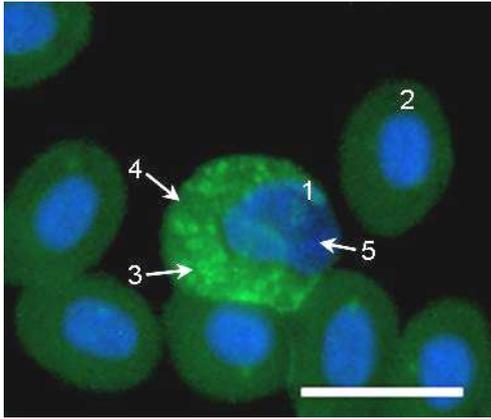


Bild 105: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. PHA-E-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die zytoplasmatischen Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) reagieren stark positiv. PHA-E-FITC bindet mit schwacher Affinität an das Zytoplasma (4). Zellkern (5). SB = 10 µm.

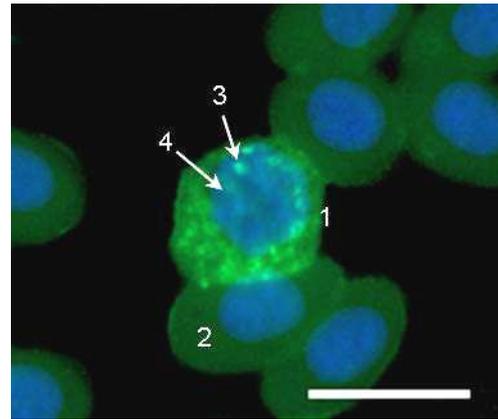


Bild 106: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. PHA-E-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Einzelne stark positive Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) überlagern den Zellkern (4). SB = 10 µm.

4.8.2. Bindung von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L)

Die heterophilen Granulozyten reagieren in der Membran überwiegend negativ, zum Teil aber auch schwach bis deutlich positiv. Im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten ist eine meist schwache Fluoreszenz zu erkennen. Bei den basophilen Granulozyten reagieren die Granula sehr selten schwach positiv. Alle anderen Strukturen binden PHA-L nicht.

Tabelle 34: Ergebnis PHA-L

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran	60%	30%	10%			40%
Zytoplasma	10%	80%	10%			90%
Granula	100%					0%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	90%	10%				10%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%

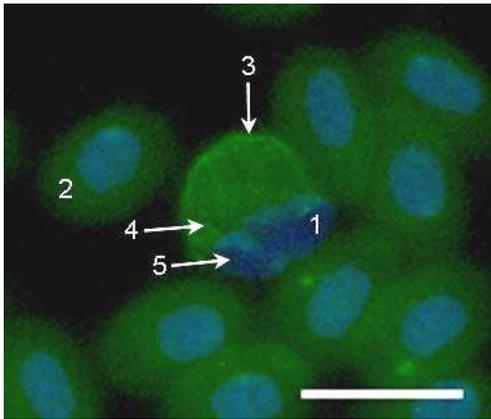


Bild 107: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. PHA-L-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 18, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Membran (3) des heterophilen Granulozyten (1) weist eine deutliche Bindung von PHA-L-FITC auf. Das Zytoplasma (4) reagiert schwach positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

4.8.3. Bindung von *Maackia amurensis* Agglutinin I - Leukoagglutinin (MAA I)

PHA-L bindet vereinzelt mit schwacher bis deutlicher Affinität an das Zytoplasma und die Granula der basophilen Granulozyten. Die anderen Blutzellen weisen keine Fluoreszenz auf.

Tabelle 35: Ergebnis MAA I

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Heterophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Basophile Granulozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	80%	10%	10%			20%
Granula	60%	30%	10%			40%
Lymphozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%
Monozyten						
Membran	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Granula	100%					0%

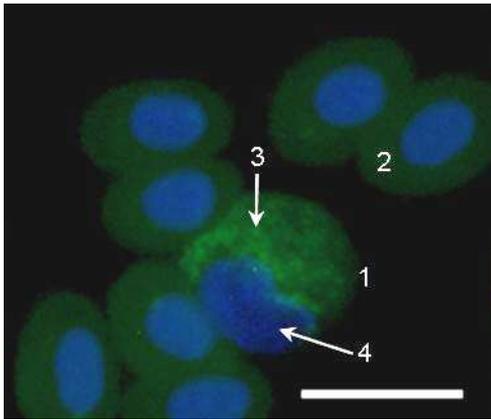


Bild 108: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. MAA I-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 3, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) binden mit schwacher Affinität das MAA I-FITC. Zellkern (4). SB = 10 µm.

4.9. Ergebnisse der Vorbehandlung mit Hemmzuckern

Nach der Vorbehandlung der stark positiv reagierenden Lektine mit ihren jeweils spezifischen Hemmzuckern ist die Bindungsfähigkeit der Lektine an die Blutzellen sehr stark abgeschwächt oder unterbleibt vollständig. Die Negativkontrollen zeigen eine unverändert stark positive Reaktion. Im Folgenden soll dies am Beispiel des Lektins WGA gezeigt werden.

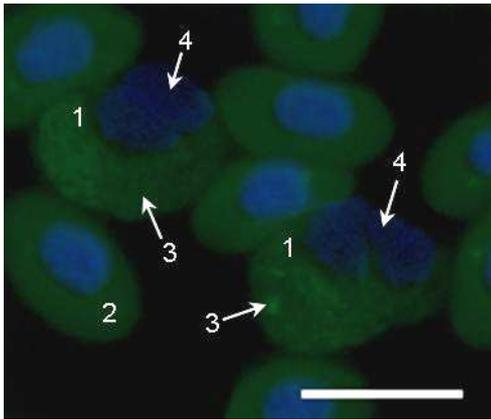


Bild 109: Blut Huhn, heterophile Granulozyten. WGA-FITC mit Hemmzucker-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) der heterophilen Granulozyten (1) ist eine unspezifische, sehr schwache Reaktion erkennbar. Zellkerne (4). SB = 10 µm.

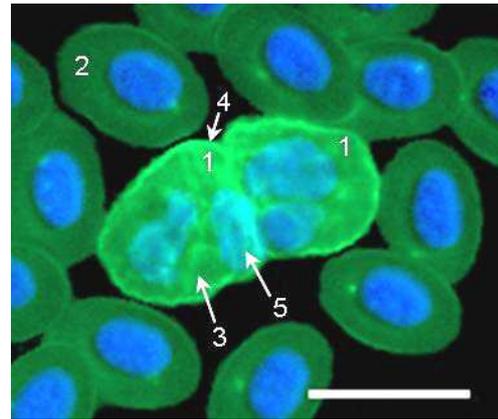


Bild 110: Blut Huhn, heterophile Granulozyten. WGA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 6, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) reagiert deutlich positiv. WGA-FITC bindet mit starker Affinität an die Membran (4). Zellkern (5). SB = 10 µm.

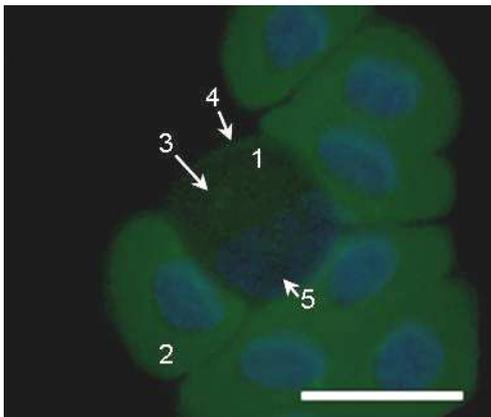


Bild 111: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. WGA-FITC mit Hemmzucker-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) und die Membran (4) des basophilen Granulozyten (1) reagieren negativ. Zellkern (5). SB = 10 µm.

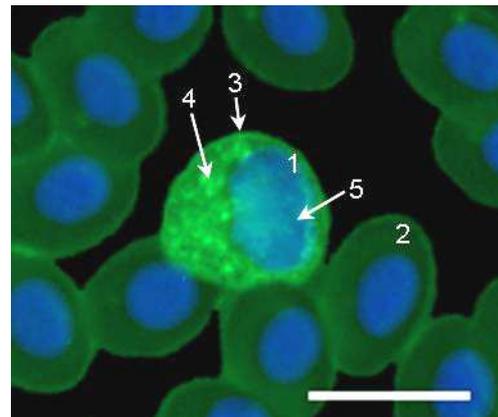


Bild 112: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. WGA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 9, LSL, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Membran (3) und die Granula (4) des basophilen Granulozyten (1) weisen eine starke Fluoreszenz auf. Zellkern (5). SB = 10 µm.

4.10. Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase

Nach der Vorbehandlung der Blutausstriche mit Neuraminidase weist ausschließlich das Lektin SBA eine schwache Bindung an die Granula der heterophilen Granulozyten auf. Die Lektine VAA, DBA, SJA und GSL I zeigen keine Veränderung in ihrem Bindungsverhalten an die Blutzellen des Huhnes.

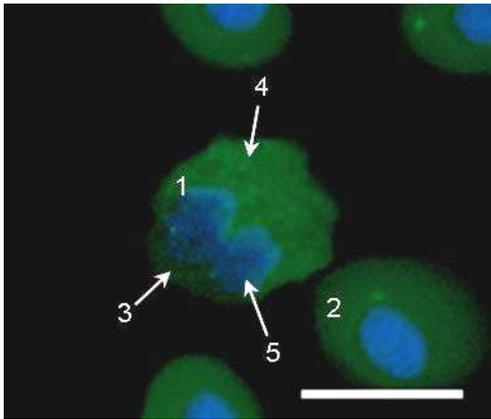


Bild 113: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. SBA-FITC mit Neuraminidase-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 5, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyt (2). Im negativen Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) ist eine schwache Reaktion der Granula (4) zu erkennen. Zellkern (5). SB = 10 µm.

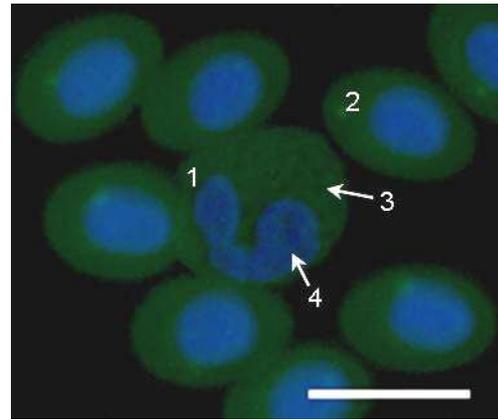


Bild 114: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. SBA-FITC ohne Neuraminidase-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 5, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula und das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) reagieren negativ. Zellkern (4). SB = 10 µm.

5. Ergebnisse der Immunhistochemie

Es wurden verschiedene FITC-markierte Antikörper auf ihre Bindung an die Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und zytoskelettalen Elemente untersucht. Der Nachweis von Aktin erfolgte anhand des an TRITC gekoppelten Toxins Phalloidin. Die Stärke der grünen (im Falle von FITC) oder roten (im Falle von TRITC) Fluoreszenz wird in eine negative (-), schwach positive (+/-), deutlich positive (+), stark positive (++) oder sehr stark positive (+++) Reaktion eingeteilt. Die Zellkerne können unter Verwendung der Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI differenziert werden.

5.1. Nachweis spezifischer Antigene der T-Lymphozyten

In den mit Methanol fixierten Ausstrichen bindet der CD4-Antikörper mit schwacher bis deutlicher Affinität an die Granula der Lymphozyten. Das Zytoplasma der CD4-Lymphozyten fluoresziert schwach positiv, zum Teil sind zytoplasmatische Ausläufer in die Umgebung zu erkennen.

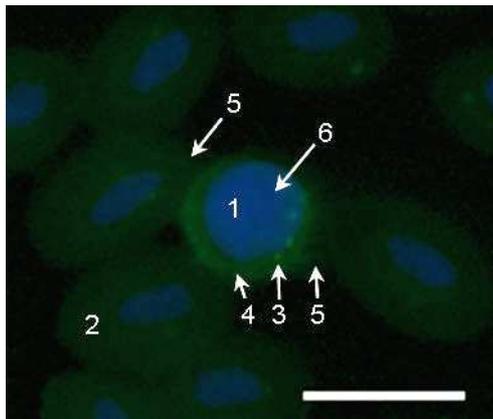
Der Antikörper gegen die CD8 α -Lymphozyten zeigt in den fixierten Ausstrichen eine überwiegend deutliche Bindung an die Granula und eine schwache Bindung an das Zytoplasma der Lymphozyten.

Die unfixierten Ausstriche sind nur sehr schwach oder nicht angefärbt. Bei den positiven Präparaten kann man in den CD4- und CD8 α -Lymphozyten stets ein granuläres Muster erkennen. In wenigen unfixierten Ausstrichen zeigt sich eine schwache bis deutliche Bindung des CD4-Antikörpers an das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten.

Das Ergebnis der Bindung der CD4- und CD8 α -Antikörper an die Lymphozyten in den fixierten Blutausstrichen ist in folgender Tabelle aufgeführt.

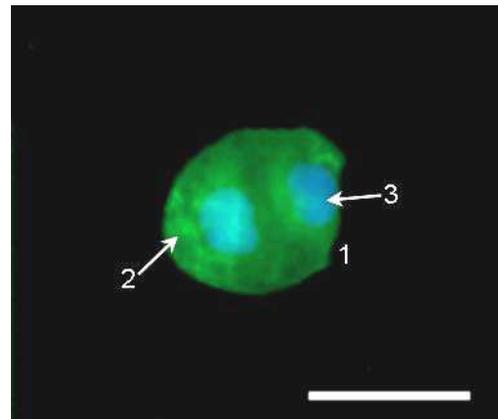
Tabelle 36: Ergebnis CD4- und CD8 α -Antikörperbindung an die Lymphozyten

Zellart	Stärke der Reaktion in den Lymphozyten				
	-	+/-	+	++	+++
CD4-Lymphozyten					
Membran	100%				
Zytoplasma		100%			
Granula		60%	40%		
CD8α- Lymphozyten					
Membran	100%				
Zytoplasma		100%			
Granula		20%	80%		

**Bild 115:** Blut Huhn, Lymphozyt. Anti-CD4-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 26, LB, weiblich, 18 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Der CD4-Antikörper bindet mit deutlicher Affinität an die Granula (3) des Lymphozyten (1). Das Zytoplasma (4) reagiert schwach positiv, es sind zytoplasmatische Ausläufer (5) zu erkennen. Zellkern (6). SB = 10 μ m.

**Bild 116:** Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Anti-CD4-FITC, DAPI-Kernfärbung. Keine Fixierung mit Methanol.

Huhn 27, LB, weiblich, 18 Monate.

Der CD4-Antikörper bindet das Zytoplasma (2) des heterophilen Granulozyten (1) mit deutlicher Affinität. Zellkern (3). SB = 10 μ m.

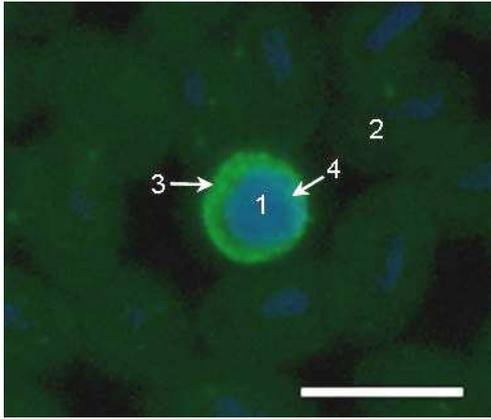


Bild 117: Blut Huhn, Lymphozyt. Anti-CD8 α -FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 26, LB, weiblich, 18 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasmasaum des Lymphozyten (1) sind deutlich positive granuläre Strukturen (3) erkennbar. Zellkern (4). SB = 10 μ m.

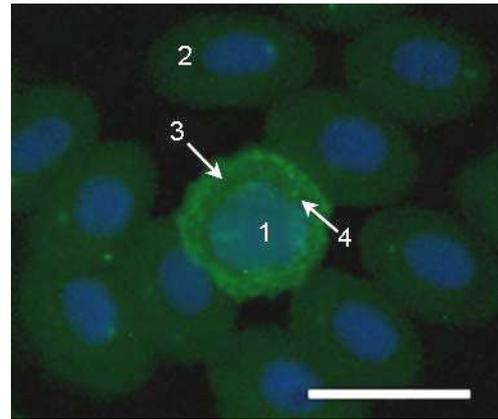


Bild 118: Blut Huhn, Lymphozyt. Anti-CD8 α -FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 28, LSL, weiblich, 18 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das schwach positive Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) enthält deutlich positive Granula (4). Zellkern (5). SB = 10 μ m.

5.2. Nachweis spezifischer Antigene der eosinophilen Granulozyten

Der EMBP-Antikörper zeigt eine unspezifische Reaktion. Er bindet in wenigen fixierten Ausstrichen mit sehr schwacher Affinität an die Granula der eosinophilen Granulozyten. Bei den unfixierten Ausstrichen ist keine Fluoreszenz zu erkennen.

5.3. Ergebnisse der Untersuchungen des Zytoskeletts

5.3.1. Nachweis von Aktin

Aktin kann in allen Blutzellen nachgewiesen werden. Phalloidin-TRITC bindet in den Erythrozyten mit deutlicher Affinität an den submembranösen Bereich und mit schwacher Affinität an das Zytoplasma. In den Thrombozyten kann eine sehr stark positive Reaktion direkt unter der Zellmembran und im Zytoplasma festgestellt werden, wobei hier zum Teil eine filamentöse bis netzartige Struktur zu erkennen ist. Die Aktinfilamente werden bis in die zytoplasmatischen Ausläufer der Thrombozyten sichtbar. Die heterophilen Granulozyten reagieren überwiegend stark positiv im submembranösen Bereich und das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten zeigt eine deutliche Affinität gegenüber Phalloidin-TRITC. Bei den eosinophilen Granulozyten reagiert der Bereich unter der Zellmembran negativ bis stark positiv und das Zytoplasma weist eine deutliche bis starke Fluoreszenz auf. Hier wird eine granuläre Verteilung des Aktins sichtbar. Die basophilen Granulozyten zeigen zum Teil eine diffuse bis granuläre Anfärbung des Zytoplasmas, während an den submembranösen Bereich Phalloidin-TRITC nicht bindet. Die Lymphozyten reagieren direkt unter der Membran negativ oder deutlich positiv und im Zytoplasma deutlich positiv, wobei hier diffuse und granuläre Muster zu erkennen sind. Die Monozyten zeigen im Zytoplasma eine deutliche Bindung des Phalloidin-TRITC mit einer diffus-granulären Struktur, wobei sich die Aktinfilamente bei manchen Monozyten bis in die Pseudopodien hinein darstellen. Der submembranöse Bereich der Monozyten reagiert dagegen überwiegend negativ.

Die Bindung von Phalloidin-TRITC an filamentöses Aktin in den Blutzellen kann nur in den unfixierten Blutaussstrichen nachgewiesen werden. Die mit Methanol fixierten Präparate zeigen sich dagegen negativ.

Tabelle 37: Ergebnis Aktin

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Submembranös			100%			100%
Zytoplasma	20%	80%				80%
Thrombozyten						
Submembranös				20%	80%	100%
Zytoplasma					100%	100%
Heterophile Granulozyten						
Submembranös			20%	80%		100%
Zytoplasma			80%	20%		100%
Eosinophile Granulozyten						
Submembranös	40%		20%	40%		60%
Zytoplasma			20%	80%		100%
Basophile Granulozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma	60%		40%			40%
Lymphozyten						
Submembranös	60%		40%			40%
Zytoplasma			100%			100%
Monozyten						
Submembranös	60%		40%			40%
Zytoplasma			100%			100%

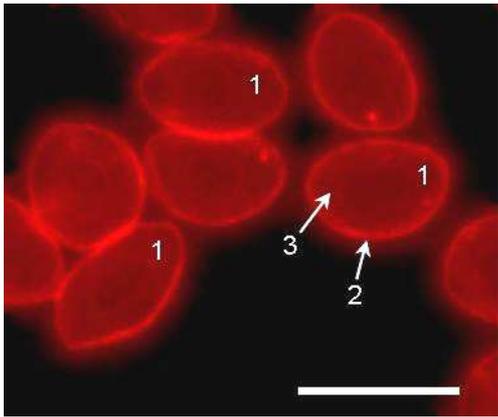


Bild 119: Blut Huhn, Erythrozyten. Phalloidin-TRITC.

Huhn 17, LB, weiblich, 12 Monate.

Phalloidin-TRITC bindet mit deutlicher Affinität an den Bereich direkt unter der Membran (2) der Erythrozyten (1). Das Zytoplasma (3) reagiert schwach positiv. SB = 10 µm.

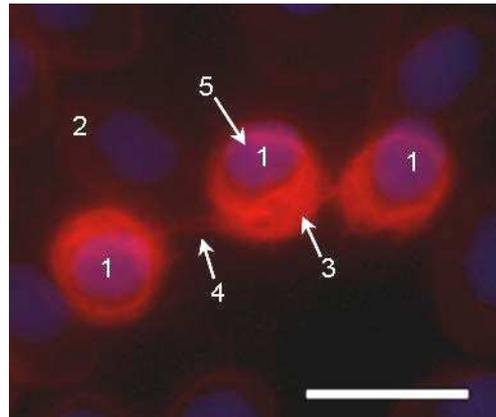


Bild 120: Blut Huhn, Thrombozyten. Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 12, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyten (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des Thrombozyten (1) reagiert sehr stark positiv. Die Aktinfilamente werden bis in die zytoplasmatischen Ausläufer (4) sichtbar. Zellkern (5). SB = 10 µm.

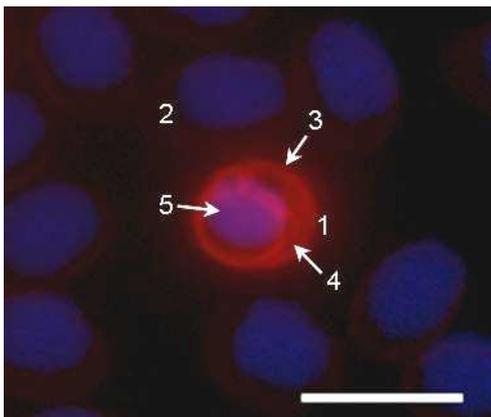


Bild 121: Blut Huhn, Thrombozyt. Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 25, LSL, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Der submembranöse Bereich (3) und das Zytoplasma (4) des Thrombozyten (1) reagieren sehr stark positiv. Zellkern (5). SB = 10 µm.

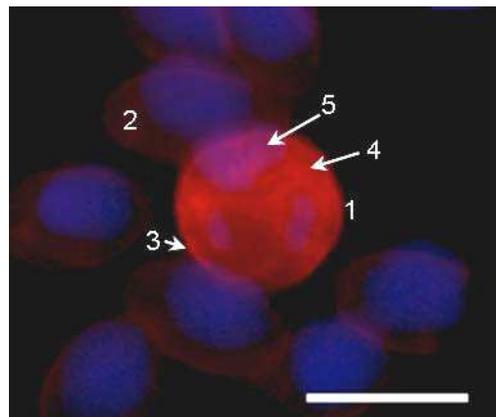


Bild 122: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 18, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Der Bereich direkt unter der Membran (3) des heterophilen Granulozyten (1) reagiert stark positiv. Das Zytoplasma (4) stellt sich deutlich positiv dar. Zellkern (5). SB = 10 µm.

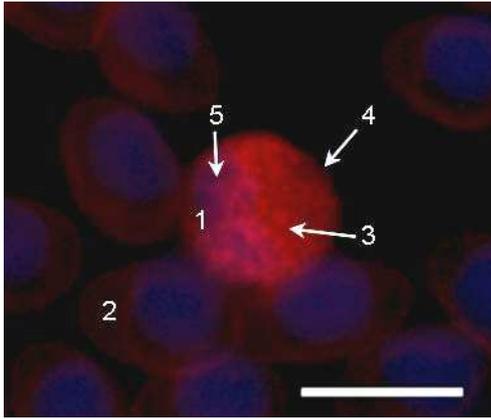


Bild 123: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 16, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (1) zeigen sich stark positive granuläre Strukturen (3). Der submembranöse Bereich (4) reagiert bei dieser Zelle negativ. Zellkern (5). SB = 10 µm.

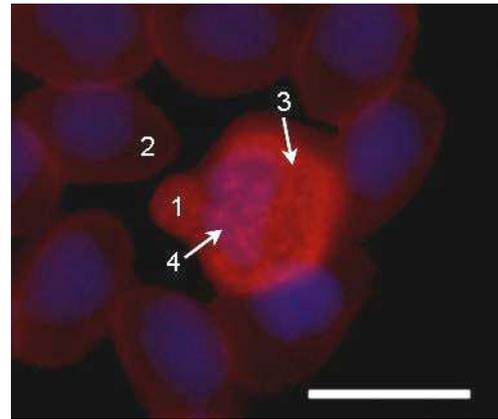


Bild 124: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 12, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) des basophilen Granulozyten (1) zeigt sich eine diffuse-granuläre Reaktion. Randständiger Zellkern (4). SB = 10 µm.

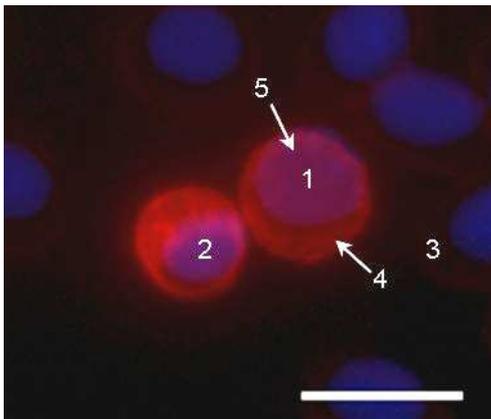


Bild 125: Blut Huhn, Lymphozyt und Thrombozyt. Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 25, LSL, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1), Thrombozyt (2) und Erythrozyten (3). Phalloidin-TRITC bindet mit deutlicher Affinität an das Zytoplasma (4) des Lymphozyten (1). Zellkern (5). SB = 10 µm.

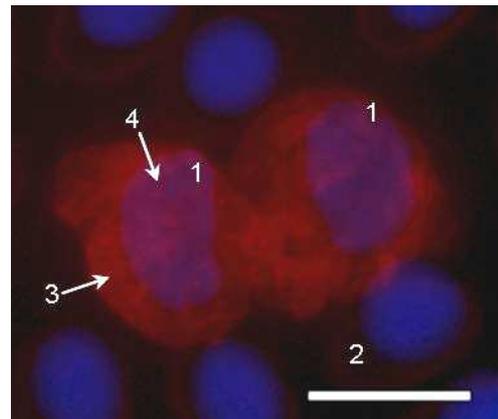


Bild 126: Blut Huhn, Monozyten. Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 25, LSL, weiblich, 12 Monate.

Monozyten (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des Monozyten (1) reagiert deutlich positiv. Zellkern (4). SB = 10 µm.

5.3.2. Nachweis von Vimentin

Beim immunhistochemischen Nachweis von Vimentin kann in allen Blutzellen, mit Ausnahme der Erythrozyten, eine positive Reaktion im Zytoplasma festgestellt werden. Der Antikörper bindet mit schwacher Affinität an die Thrombozyten, wobei ein granuläres Reaktionsmuster im Zytoplasma sichtbar wird. Die heterophilen Granulozyten zeigen eine überwiegend deutliche granuläre Reaktion in Zellkernnähe. Die eosinophilen Granulozyten reagieren negativ bis deutlich positiv mit ebenfalls granulärem Muster. Das Zytoplasma der basophilen Granulozyten zeigt eine schwache Bindung des Vimentinantikörpers, dabei werden feingranuläre Strukturen sichtbar. In den Lymphozyten stellen sich schwach bis deutlich positive diffuse und granuläre Strukturen dar. Die Monozyten weisen eine starke Fluoreszenz auf, hier wird eine netzartige Verteilung des Vimentins über die ganze Zelle sichtbar.

Vimentin stellt sich in den mit Methanol fixierten Ausstrichen besonders deutlich dar. Die unfixierten Ausstriche sind aufgrund einer nicht ausreichenden Qualität nicht auswertbar.

Tabelle 38: Ergebnis Vimentin

	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma		100%				100%
Heterophile Granulozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma			80%	20%		100%
Eosinophile Granulozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma	40%	20%	40%			60%
Basophile Granulozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma		60%	40%			100%
Lymphozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma		60%	40%			100%
Monozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma				100%		100%

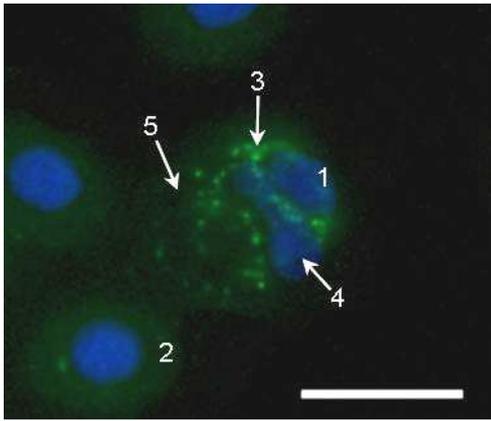


Bild 127: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 24, LSL, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im heterophilen Granulozyten (1) ist um den Zellkern (4) eine deutlich positive granuläre Reaktion (3) erkennbar. Das Zytoplasma (5) reagiert negativ. SB = 10 µm.

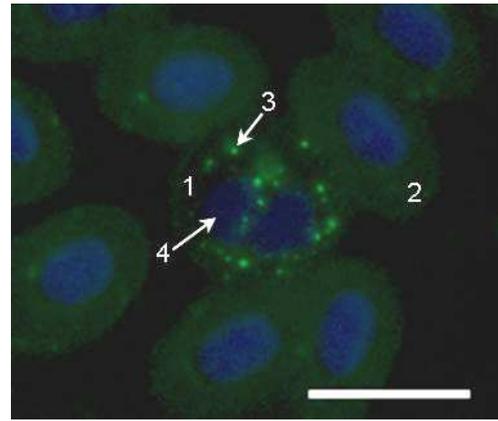


Bild 128: Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt. Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 13, LB, weiblich, 12 Monate.

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im eosinophilen Granulozyten (1) stellt sich eine deutlich positive granuläre Fluoreszenz (3) dar. Zellkern (4). SB = 10 µm.

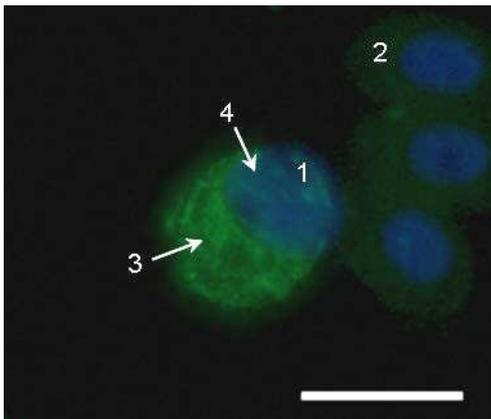


Bild 129: Blut Huhn, basophiler Granulozyt. Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 12, LB, weiblich, 12 Monate.

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) des basophilen Granulozyten (1) zeigt sich eine feingranuläre Reaktion. Zellkern (4). SB = 10 µm.

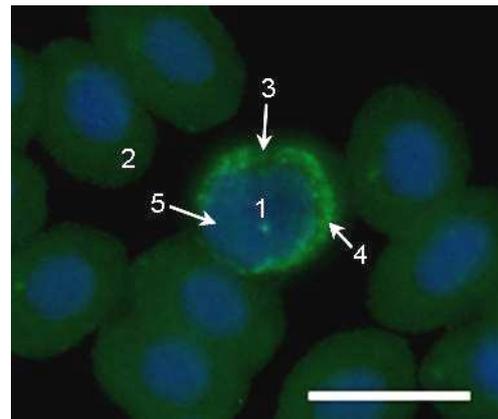


Bild 130: Blut Huhn, Lymphozyt. Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 20, LSL, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) stellen sich schwach positive granuläre bis diffuse Strukturen (4) dar. Zellkern (5). SB = 10 µm.

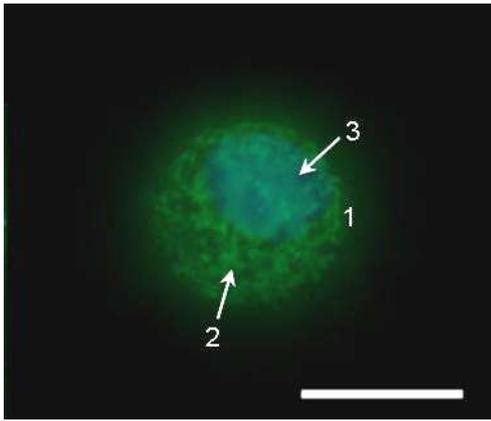


Bild 131: Blut Huhn, Monozyt. Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 29, LSL, weiblich, 18 Monate.

Im Zytoplasma (2) des Monozyten (1) wird eine netzartige Fluoreszenz erkennbar. Zellkern (3). SB = 10 µm.

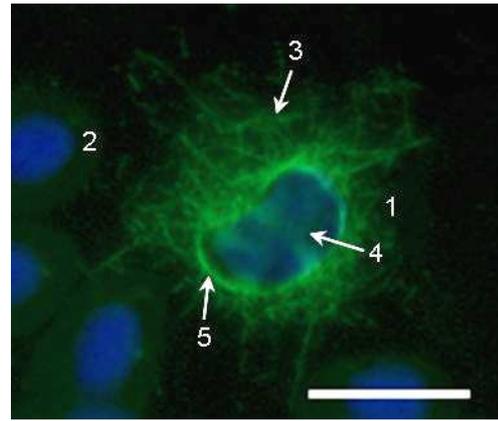


Bild 132: Blut Huhn, Monozyt. Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 13, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Der Vimentin-Antikörper bindet mit starker Affinität an eine netzartige Struktur (3) im Zytoplasma des Monozyten (1). Hier wird deutlich, dass sich ein Netzwerk aus Filamenten über die gesamte Zelle erstreckt, welches sich um den Zellkern (4) herum verdichtet (5). SB = 10 µm.

5.3.3. Nachweis von Tubulin

Tubulin kann in allen Hühnerblutzellen, außer den Erythrozyten und basophilen Granulozyten, nachgewiesen werden. Der submembranöse Bereich der Thrombozyten zeigt eine negative bis stark positive Reaktion und das Zytoplasma reagiert schwach bis deutlich positiv. Dabei ist unterhalb der Membran und im Zytoplasma ein granuläres bis diffuses Verteilungsmuster der Fluoreszenz zu erkennen. Im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten und der eosinophilen Granulozyten zeigen sich vereinzelte punktförmige, schwach positive Reaktionen. Der Tubulinantikörper bindet mit schwacher bis deutlicher Affinität an die Lymphozyten. Im Bereich der Zellperipherie sind granuläre Strukturen erkennbar, von denen aus Filamente zu einem Punkt in der Zelle verlaufen, so dass sich ein sternförmiges Muster ergibt. Die Immunfluoreszenz im Zytoplasma der Monozyten zeigt sich überwiegend schwach bis deutlich positiv, wobei eine feingranuläre bis netzartige Anfärbung zu sehen ist.

In den unfixierten Ausstrichen lässt sich Tubulin nicht darstellen.

Tabelle 39: Ergebnis Tubulin

Zellart	Stärke der Reaktion					Anteil der positiven Strukturen
	-	+/-	+	++	+++	
Erythrozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Thrombozyten						
Submembranös	40%	20%	20%	20%		60%
Zytoplasma		40%	60%			100%
Heterophile Granulozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma	20%	80%				80%
Eosinophile Granulozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma	40%	60%				60%
Basophile Granulozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma	100%					0%
Lymphozyten						
Submembranös		60%	40%			100%
Zytoplasma		60%	40%			100%
Monozyten						
Submembranös	100%					0%
Zytoplasma		40%	40%	20%		100%

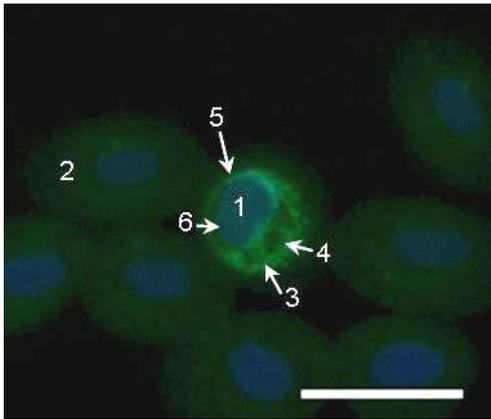


Bild 133: Blut Huhn, Thrombozyt. Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 12, LB, weiblich, 12 Monate.

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des Thrombozyten (1) reagiert deutlich positiv. Anti-Tubulin-FITC bindet mit schwacher Affinität an den submembranösen Bereich (5). Dabei ist im Zytoplasma und in der Membran ein granuläres Reaktionsmuster zu erkennen. Vakuole (4) im Zytoplasma. Zellkern (6). SB = 10 µm.

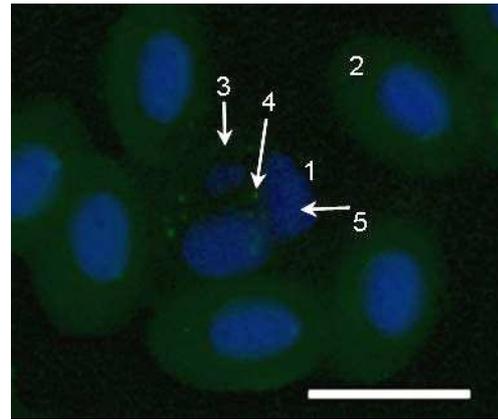


Bild 134: Blut Huhn, heterophiler Granulozyt. Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 15, LB, weiblich, 12 Monate.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im negativen Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten (1) befinden sich sehr vereinzelt punktförmige, schwach positive Reaktionen (4). Zellkern (5). SB = 10 µm.

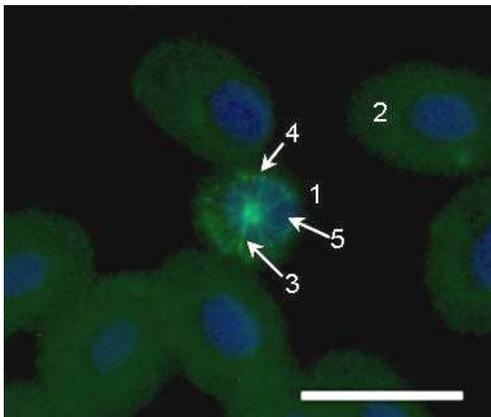


Bild 135: Blut Huhn, Lymphozyt. Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 12, LB, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). In der Zellperipherie sind schwach positive, granuläre Strukturen (4) erkennbar, von denen Mikrotubuli (3) zu einem Punkt in der Zelle verlaufen. Zellkern (5). SB = 10 µm.

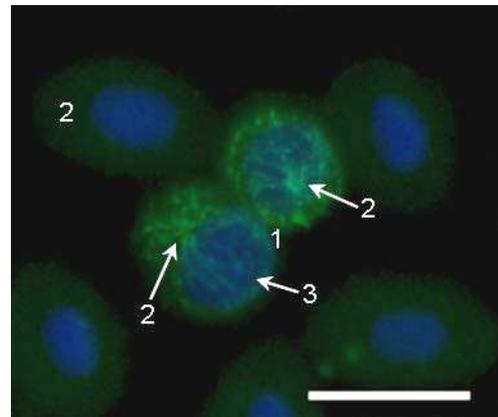


Bild 136: Blut Huhn, Lymphozyten. Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 12, LB, weiblich, 12 Monate.

Lymphozyten (1) und Erythrozyten (2). Auch hier wird deutlich, dass die Mikrotubuli zu einem Punkt in der Zelle verlaufen (2), der sich bei diesen Zellen gegenüber des Zellkernes (3) befindet. SB = 10 µm.

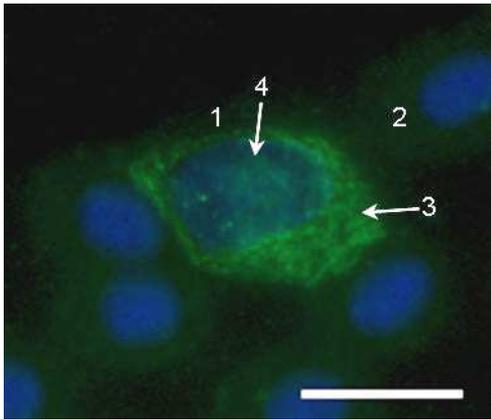


Bild 137: Blut Huhn, Monozyt. Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung.

Huhn 19, LB, weiblich, 12 Monate.

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Anti-Tubulin-FITC bindet mit deutlicher Affinität an feingranuläre-netzartige Strukturen im Zytoplasma (3) des Monozyten (1). Zellkern (4). SB = 10 μ m.

5.3.4. Nachweis von Myosin

Weder bei den fixierten noch bei den unfixierten Blutausstrichen kann eine positive Reaktion beim Nachweis von Myosin festgestellt werden.

5.3.5. Nachweis von Zytokeratin

Zytokeratin kann in keinem der untersuchten fixierten und unfixierten Ausstriche nachgewiesen werden.

V. DISKUSSION

1. Blutproben

Die Blutproben für die lichtmikroskopischen, elektronenmikroskopischen, glykohistochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden von männlichen und weiblichen Tieren der Rasse Lohmann Brown (LB, braune Legehybride) und Lohmann Selected Leghorn (LSL, weiße Legehybride) entnommen. Beim Vergleich beider Hühnerrassen fallen keine signifikanten Unterschiede bei den Blutwerten auf. Die Ergebnisse der kleinen Blutbilder zeigen jedoch, dass bei den männlichen Tieren die Mittelwerte der Erythrozytenzahlen und Hämatokritwerte über den Durchschnittswerten der weiblichen Tiere liegen, was mit verschiedenen Angaben in der Literatur übereinstimmt (Hodges, 1977; Prinzing und Misovic, 1994). Dies steht im Zusammenhang mit dem blutbildenden Effekt von Testosteron und dem die Knochenmarksaktivität hemmenden Effekt von Östrogen (Hebert et al., 1989). Die Leukozytenzahlen hingegen sind, wie auch von Prinzing (1994) beschrieben, im Mittel bei den weiblichen Tieren höher als bei den männlichen (Prinzing und Misovic, 1994). Trotz der geschlechtsspezifischen Unterschiede im Blutbild der Hühner sind bei den Untersuchungen in vorliegender Arbeit keine Unterschiede in der Morphologie und Histochemie der Blutzellen zwischen männlichen und weiblichen Tieren zu erkennen.

2. Lichtmikroskopische Färbungen

Für die lichtmikroskopische Differenzierung und morphologische Untersuchung der Hühnerblutzellen wurden die Blutausstriche verschiedenen Übersichtsfärbungen (Diff-Quick-, H.E.-, May-Grünwald-, Giemsa- und Pappenheim-Färbung) unterzogen. Außerdem wurden die Blutzellen anhand der Periodic acid Schiff (PAS)-Reaktion, Sirius-Red-Färbung, Toluidinblau-Färbung und Alcianblau-Färbung substrathistochemisch untersucht.

Die Erythrozyten der Hühner zeigen sich, wie in der Literatur beschrieben, unter dem Lichtmikroskop als ovale Zellen mit einem zentralen, spindelförmigen Zellkern (Prinzinger und Misovic, 1994) und sind in allen angewendeten Übersichtsfärbungen sehr gut darstellbar. Sie färben sich im Zytoplasma überwiegend rosa, während der Zellkern je nach Färbung eine violette bis dunkelblaue Farbe annimmt. In der Diff-Quick- und Toluidinblau-Färbung stellt sich im sonst gleichmäßigen Zytoplasma ein kleiner basophiler granulärer Einschluss dar. Auch Forkner (1929) beschrieb rötlich-braune Körperchen im Zytoplasma der Erythrozyten (Forkner, 1929). Dabei könnte es sich um die von verschiedenen Autoren elektronenmikroskopisch dargestellten Mitochondrien im Zytoplasma der Erythrozyten handeln (Schumacher, 1965; Harris und Brown, 1971; Barrett und Dawson, 1974; Hodges, 1977). Für die genaue Charakterisierung der granulären Einschlüsse sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig. In den Blutausstrichen der Hühner sind des Weiteren vereinzelt stärker abgerundete Erythrozyten mit einem graublauen Zytoplasma und einem rundlichen, wenig kondensierten Zellkern zu erkennen. Dabei handelt es sich um unreife Erythrozyten, die mit einem Anteil von bis zu 5% der Gesamterythrozytenzahl im zirkulierenden Blut gesunder Vögel zu finden sind (Campbell und Dein, 1984; Campbell, 1988; Campbell 2004; Campbell und Ellis, 2007). Sehr vereinzelt zeigen sich außerdem Dakryozyten (tränenförmige Erythrozyten) in den Blutausstrichen der Hühner. In einem geringen Anteil sind abweichende Zellformen der Erythrozyten (Poikilozyten) im Blut gesunder Vögel physiologisch (Clark et al., 2009). In den Erythrozyten sind bei der PAS-Reaktion sowie bei der Alcianblau-Färbung keine spezifischen positiven Reaktionsprodukte nachweisbar. Sie enthalten demnach keine PAS-positiven komplexen Kohlenhydrate oder saure Glykoproteine.

Die Thrombozyten des Huhnes erscheinen lichtmikroskopisch als ovale bis runde Zellen mit vakuolisiertem Zytoplasma und einem kompakten, rundlichen Zellkern. Diese Morphologie wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Lucas und

Jamroz, 1961; Grecchi et al., 1980; Campbell, 1984; Prinzing und Misovic, 1994). Die Hühnerthrombozyten liegen in den Ausstrichen einzeln oder in Aggregaten vor, was mit den Aussagen von Forkner (1929) und Jain (1993) übereinstimmt (Forkner, 1929; Jain, 1993). Sie lassen sich in allen hier angewendeten Übersichtsfärbungen darstellen, besonders gut geeignet ist jedoch die Diff-Quick-Färbung. Das Zytoplasma zeigt sich mit den verschiedenen Färbemethoden von farblos über hellblau bis rosa-rot und der Zellkern erscheint violett bis blau. Anhand der hellen Färbung ihres Zytoplasmas können die aviären Thrombozyten von den kleinen Lymphozyten differenziert werden, die ein stärker basophiles Zytoplasma besitzen (Maxwell, 1974; Campbell und Ellis, 2007). Bei einzelnen Hühnerthrombozyten sind Pseudopodien oder zytoplasmatische Granula zu erkennen. Bei letzteren handelt es sich um die von Campbell und Ellis (2007) beschriebenen spezifischen eosinophilen Granula an den Zellpolen der aviären Thrombozyten (Campbell und Ellis, 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch darüber hinaus, dass sich beispielsweise in der May-Grünwald- und Pappenheim-Färbung neben den eosinophilen auch basophile Granula zeigen. Eine Aggregation der Thrombozyten, zytoplasmatische Vakuolen und Pseudopodien deuten auf eine Aktivierung dieser Zellen hin (Fox und Solomon, 1981; Latimer und Bienzle, 2000; Campbell und Ellis, 2007). Bei der PAS-Reaktion können in einzelnen Thrombozyten positive granuläre Reaktionsprodukte beobachtet werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Swayne und Mitarbeiter (1986), die ebenfalls eine positive PAS-Reaktion in den Thrombozyten der Vögel nachweisen konnten (Swayne et al., 1986). Die PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung zeigt hingegen keine Färbung. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass im Zytoplasma einzelner Thrombozyten Glykogengranula enthalten sind. Dies stimmt auch mit elektronenmikroskopischen Befunden von verschiedenen Autoren überein, die in Hühnerthrombozyten einzelne elektronendichte glykogenhaltige Granula erkennen konnten (Schumacher, 1965; Carlson et al., 1968; Sweeny und Carlson, 1968; Maxwell, 1974).

Die heterophilen Granulozyten sind in den Blutausrichen der Hühner die am häufigsten vorkommenden Granulozyten. Sie zeigen sich lichtmikroskopisch als rundliche Zellen mit zahlreichen spindelförmigen Granula. Ihr Zellkern ist mehrfach gelappt und besitzt mäßig kondensiertes, grobkörniges Chromatin. Dies stimmt mit den morphologischen Befunden verschiedener Autoren überein (Prinzing und Misovic, 1994; Campbell und Ellis, 2007). Das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten färbt sich bei den Übersichtsfärbungen von farblos

über hellblau bis rosa und der Zellkern nimmt verschiedene Blautöne an. Die zytoplasmatischen Granula zeigen sich überwiegend rosa bis rot. Die heterophilen Granulozyten sind mit allen Färbemethoden, außer mit der Giemsa-Färbung, gut darstellbar. In der Giemsa-Färbung wird der Inhalt der Granula vollständig ausgewaschen, die verbleibenden Reste erscheinen farblos. Aber auch in den anderen Färbungen sind die Granula gelegentlich wenig angefärbt oder teilweise herausgelöst. Dies ist vermutlich durch den Färbevorgang bedingt. In diesem Fall zeigen sich in den stäbchenförmigen Granula runde Strukturen. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um die elektronenmikroskopisch darstellbaren runden elektronendichten Körper in den primären Granula (Campbell und Ellis, 2007). Auch Kelenyi und Nemeth (1969) sowie Latimer und Mitarbeiter (1988) legen dar, dass bei einer partiellen oder vollständigen Degranulation der Inhalt der heterophilen Granula herausgelöst wird, so dass die runden zentralen Körper der primären Granula zum Vorschein kommen. Ist dies der Fall, erinnern sie an die runden Granula der eosinophilen Granulozyten und können mit diesen verwechselt werden (Kelenyi und Nemeth, 1969; Latimer et al., 1988). Bei der Sirius-Red-Färbung kann im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten der Hühner eine schwache Reaktion festgestellt werden. Dies weist auf das Vorhandensein von basischen Polyaminosäuren hin (Nielsen et al., 1998), steht jedoch im Widerspruch zu den Angaben in der Literatur, nach denen bei der Sirius-Red-Färbung ausschließlich eine Färbung der eosinophilen Granulozyten erfolgt. Diese Angaben beruhen jedoch auf Untersuchungen von Gewebeproben von Rindern, Pferden und Schafen (Wehrend et al., 2004) und sind nicht spezifisch für das Huhn. Des Weiteren reagieren die heterophilen Granulozyten des Huhnes bei der Alcianblau-Färbung (pH 2,5) im Zytoplasma positiv, während bei der Alcianblau-Färbung (pH 1,0) keine positiven Reaktionsprodukte zu erkennen sind. Diese Ergebnisse zeigen das Vorhandensein von stark carboxylierten sauren Glykoproteinen im Zytoplasma der Zellen (Mulisch und Welsch, 2010). Auch bei der PAS-Reaktion reagiert das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten deutlich positiv. Nach vorheriger Amylasebehandlung ist die PAS-Reaktion abgeschwächt. Daraus lässt sich folgern, dass im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten komplexe Kohlenhydrate wie Glykogen vorhanden sind. Dies stimmt mit elektronenmikroskopischen Befunden überein, die das Vorhandensein von Glykogengranula im Zytoplasma heterophiler Granulozyten von Hühnern nachweisen (Kriesten und Enbergs, 1969; Maxwell, 1973).

Die eosinophilen Granulozyten des Huhnes zeigen sich unter dem

Lichtmikroskop als rundliche Zellen mit runden Granula, die meist das Zytoplasma nicht ganz ausfüllen. Sie enthalten einen zweifach gelappten Zellkern mit mäßig kondensiertem Chromatin, wobei die Zellkernsegmente meist gleich groß sind. Bei manchen Zellen ist noch ein drittes, kleineres Segment zu erkennen. Eine besonders gute Darstellung der eosinophilen Granulozyten ist mit der May-Grünwald-, Giemsa- und Pappenheim-Färbung möglich. Die Granula färben sich mit den angewendeten Übersichtsfärbungen meist rosarot. Der Zellkern färbt sich nach Campbell und Ellis (2007) im Vergleich zu den heterophilen Granulozyten bei den aviären eosinophilen Granulozyten dunkler an. Dies wird in vorliegenden Ergebnissen bei der Giemsa- und Pappenheim-Färbung deutlich. Ein bläulicheres Zytoplasma, wie es Campbell und Ellis (2007) beschreiben, weisen die eosinophilen Granulozyten jedoch nur in der Diff-Quick-Färbung auf (Campbell und Ellis, 2007). Gemäß den Angaben von Santos und Mitarbeiter (2003) reagieren die eosinophilen Granulozyten bei der Sirius-Red-Färbung und der PAS-Reaktion positiv (Santos et al., 2003). Bei der Durchführung der Sirius-Red-Färbung war jedoch eine sehr lange Inkubationszeit in der Färbelösung notwendig, um eine Anfärbung der Granula zu erreichen. Außerdem ist die Färbung beim Huhn nicht spezifisch für die eosinophilen Granulozyten, da es auch zu einer Anfärbung des Zytoplasmas der heterophilen Granulozyten kommt. Bei der PAS-Reaktion zeigt sich das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten positiv, die PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung fällt dagegen negativ aus. Diese Ergebnisse der substrathistochemischen Färbungen belegen das Vorhandensein von Glykogen im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten der Hühner.

Die basophilen Granulozyten der Hühner sind typischerweise rund, weisen oft aber auch eine langgestreckte Form auf. Der ungelappte, mäßig kondensierte Zellkern ist rund bis oval, liegt meist exzentrisch in der Zelle und wird oft von den zytoplasmatischen Granula überlagert. Dies deckt sich mit den Literaturangaben verschiedener Autoren (Maxwell, 1973; Latimer und Bienzle, 2000; Campbell und Ellis, 2007). Die runden Granula sind in der Diff-Quick-, H.E.-, und Giemsa-Färbung bedingt durch den Färbevorgang ausgewaschen und erscheinen gemäß den Angaben in der Literatur als runde Vakuolen im Zytoplasma (Campbell und Ellis, 2007). Die charakteristischen basophilen Granula sind in der May-Grünwald-, Pappenheim- und Toluidinblau-Färbung darstellbar und färben sich dunkellila. Bei der Alcianblau-Färbung (pH 2,5) sind in den Granula stark positive Reaktionsprodukte zu erkennen. Bei einem pH-Wert von 1,0 wird die Reaktion leicht abgeschwächt sichtbar. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass

die Granula der basophilen Granulozyten sulfatierte und carboxylierte saure Glykoproteine enthalten.

In den Blutausstrichen der Hühner sind lichtmikroskopisch kleine, mittelgroße und große Lymphozyten zu erkennen, was mit den Angaben von Bonous und Stedman (2000) übereinstimmt (Bounous und Stedman, 2000). Die großen Lymphozyten sind gemäß den Angaben von Prinzinger und Misovic (1994) nur selten zu finden (Prinzinger und Misovic, 1994). Im Allgemeinen zeigen sich die Lymphozyten als kugelfunde Zellen mit wenig Zytoplasma. Vereinzelt weisen sie zytoplasmatische Ausläufer auf, was auf eine Aktivierung dieser Zellen hindeutet. Sie besitzen einen runden, exzentrisch gelegenen kompakten Zellkern, der gelegentlich an einer Stelle leicht eingezogen ist. Diese Morphologie wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Campbell und Ellis, 2007). Eine gute Darstellung der Lymphozyten ist mit der Diff-Quick- und Pappenheim-Färbung möglich. Das Zytoplasma stellt sich mit den verschiedenen Übersichtsfärbungen überwiegend blau dar und der Zellkern färbt sich blau bis violett. Im basophilen Zytoplasmasaum sind in den meisten Lymphozyten kleine kräftig blaue Granula enthalten. Darüber hinaus sind gemäß den Aussagen von Campbell und Ellis (2007) vereinzelt deutliche eosinophile Granula zu erkennen (Campbell und Ellis, 2007). Diese können in vorliegender Arbeit vor allem in den mittelgroßen und großen Lymphozyten beobachtet werden. Reaktive Lymphozyten besitzen ein stark basophiles Zytoplasma und weisen auf eine Antigenstimulation hin, können aber auch im normalen Vogelblut vorkommen (Campbell und Ellis, 2007). Vermutlich deuten auch die roten bis lila Granula im Zytoplasma auf eine Aktivierung dieser Lymphozyten hin. Die mittelgroßen und großen Lymphozyten besitzen im Gegensatz zu den kleinen Lymphozyten etwas mehr Zytoplasma und der Zellkern der großen Lymphozyten kann nach Angaben von Bonous und Stedman (2000) eine ovale bis abgewinkelte Form aufweisen oder an einer Stelle abgeflacht sein (Bounous und Stedman, 2000). So können sie leicht mit den Monozyten verwechselt werden (Campbell und Ellis, 2007). Bei der PAS-Reaktion reagieren wenige Lymphozyten deutlich PAS-positiv, was die Ergebnisse von Raskin und Valenciano (2000) bestätigt (Raskin und Valenciano, 2000). Dabei ist eine granuläre Reaktion zu erkennen, die nach der Amylase-Vorbehandlung negativ ausfällt. Diese Untersuchungen zeigen, dass einzelne Lymphozyten zytoplasmatische glykogenhaltige Granula besitzen.

Die Monozyten des Huhnes sind neben den großen Lymphozyten die größten Blutzellen in den untersuchten Ausstrichen. Sie stellen sich gemäß den Befunden verschiedener Autoren (Maxwell, 1974; Campbell und Ellis, 2007)

lichtmikroskopisch als große, runde oder unregelmäßig geformte Zellen mit einem pleomorphen, wenig kondensierten Zellkern dar. Das umfangreiche Zytoplasma enthält in den meisten Monozyten zahlreiche Vakuolen unterschiedlicher Größe. Dies könnte auf eine Aktivierung dieser Zellen hindeuten oder auch durch den Färbeprozess bedingt sein. Die Monozyten sind in allen angewendeten Übersichtsfärbungen darstellbar, besonders deutlich zeigen sie sich jedoch in der Diff-Quick-Färbung. Das Zytoplasma erscheint mit den verschiedenen Färbungen überwiegend bläulich, der Zellkern färbt sich in der Diff-Quick-Färbung lila und in den anderen Färbungen blau. Das Vorhandensein feiner eosinophiler zytoplasmatischer Granula, wie sie Campbell und Ellis (2007) beschreiben, kann in den durchgeführten Übersichtsfärbungen nicht beobachtet werden (Campbell und Ellis, 2007). Nach Sinowatz und Hees (2000) nehmen die Azurgranula der Monozyten im Alter ab (Sinowatz und Hees, 2000). Beobachtungen von Campbell und Ellis (2007) zeigen außerdem, dass im Zytoplasma der Monozyten oft eine hellere Zone um den Zellkern und eine dunklere periphere Zone erkennbar ist (Campbell und Ellis, 2007). Vorliegende Ergebnisse können dies jedoch nicht bestätigen. Bei den substrathistochemischen Färbungen zeigen sich schwach PAS-positive zytoplasmatische Reaktionsprodukte. Nach der Amylase-Vorbehandlung fällt die PAS-Reaktion negativ aus, was darauf hindeutet, dass im Zytoplasma der Hühnermonozyten geringe Mengen an Glykogen vorhanden sind.

3. Elektronenmikroskopie

Für die Darstellung der Ultrastruktur wurden die Hühnerblutzellen elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterzogen. Dabei konnten außer den basophilen Granulozyten alle Blutzellen charakterisiert werden. In den Hühnerblutzellen können nicht immer alle in der Literatur beschriebenen Strukturen dargestellt werden. Diese Divergenz zwischen den erhobenen Befunden und den Angaben in der Literatur ist auch darauf zurückzuführen, dass die 60 nm dünnen Schnitte immer nur einen bestimmten Querschnitt der Zellen darstellen.

Die Erythrozyten des Huhnes stellen sich elektronenmikroskopisch als langgestreckte Zellen dar, Querschnitte der Erythrozyten weisen hingegen eine ovale Form auf. Ihre Zellmembran ist glatt und zeigt keine Pseudopodienbildung. Die Erythrozyten enthalten einen zentralen Zellkern, der sich oft durch einen weiten Spalt vom Zytoplasma abgrenzt. Dieser weite perinukleäre Raum wurde auch von Schumacher (1965) beschrieben. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein durch die Fixierung bedingtes Artefakt, der perinukleäre Spalt könnte aber auch durch die starke Chromatinkondensation bei den letzten Schritten der Erythropoiese verursacht sein. Vereinzelt ist in den zentralen Zellkernen ein amorpher Bereich erkennbar. Auch Pearson und Davies (1982) konnten in einem sehr geringen Teil der Erythrozyten elektronenmikroskopisch amorphe Bereiche erkennen, die einige große Granula enthalten (Pearson und Davies, 1982). Die Granula können in vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Aufgabe dieser so genannten granulären Komplexe ist vermutlich die Speicherung von Stoffen, die in den Erythrozytenzellkernen nicht mehr gebraucht werden (Pearson und Davies, 1982). Das homogene Zytoplasma der Hühnererythrozyten enthält, bis auf vereinzelte Anschnitte von Mitochondrien, keine Zellorganellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden zahlreicher Autoren, die ebenfalls das Vorkommen von Mitochondrien in den aviären Erythrozyten beschreiben, überein (Schumacher, 1965; Harris und Brown, 1971; Barrett und Dawson, 1974; Hodges, 1977). Die Mitochondrien sind in den Erythrozyten der Hühner meist in Zellkernnähe zu finden. Vermutlich handelt es sich dabei um die lichtmikroskopisch erkennbaren basophilen granulären Einschlüsse, die ebenfalls um den Zellkern lokalisiert sind (siehe Kapitel IV.2.1.). Im Zytoplasma können elektronenmikroskopisch keine Mikrotubuli bzw. kein marginales Band aus Mikrotubuli dargestellt werden. Auch immunhistochemisch sind die Mikrotubuli in vorliegender Arbeit nicht nachweisbar (siehe Kapitel IV.5.3.3.). Dies deckt sich mit den Befunden von

Schumacher (1965), der in Hühnererythrozyten elektronenmikroskopisch ebenfalls keine Mikrotubuli finden konnte (Schumacher, 1965).

Die Thrombozyten des Huhnes zeigen sich unter dem Elektronenmikroskop als rundliche Zellen. Die Zellorganellen im Zytoplasma sind, wie von Maxwell (1974) beschrieben, meist in Zellkernnähe lokalisiert (Maxwell, 1974). In den Thrombozyten sind große zytoplasmatische Einschlüsse zu erkennen. Diese enthalten einen mäßig elektronendichten Inhalt, der zum Teil vakuolisiert ist. Dabei handelt es sich um die bereits von Sweeny und Carlson (1968) beschriebenen elektronendichten bläschenförmigen Körperchen (Sweeny und Carlson, 1968). Vermutlich sind dies die lichtmikroskopisch erkennbaren spezifischen eosinophilen Granula (Sweeny und Carlson, 1968). Auch andere Angaben in der Literatur legen dar, dass diese elektronenmikroskopisch nicht homogen erscheinen, sondern als Ansammlung von mehreren Granula zu interpretieren sind. Nach ihrer Degranulation hinterlassen sie die bläschenförmigen Gebilde im Zytoplasma (Sweeny und Carlson, 1968; Kuruma et al., 1970; Campell und Ellis, 2007). Das Zytoplasma der Thrombozyten enthält darüber hinaus Ansammlungen von elektronendichten Glykogenpartikeln. Bereits Maxwell (1974) beschrieb das Vorkommen von Glykogen im Zytoplasma (Maxwell, 1974). Die positive PAS-Reaktion in vorliegender Arbeit deutet ebenfalls darauf hin, dass es sich bei den elektronendichten Partikeln um Glykogen handelt. Außerdem sind in den Thrombozyten, wie bereits von Maxwell (1974) beschrieben, zytoplasmatische Granula mit elektronendichtem Inhalt zu erkennen (Maxwell, 1974). Dabei könnte es sich um die im Zytoplasma der Thrombozyten lichtmikroskopisch erkennbaren basophilen Granula handeln (siehe Kapitel IV.2.2.). Für die genaue Charakterisierung dieser elektronendichten Granula sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig. Befunde von Schumacher (1965) und Maxwell (1974) ergeben, dass der Zellkern aufgrund des hohen Anteils an Heterochromatin elektronendicht erscheint und in den Heterochromatin-Bereichen vereinzelt runde Aufhellungen zu erkennen sind (Schumacher, 1965; Maxwell, 1974). Dies kann anhand der vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden.

Die heterophilen Granulozyten des Huhnes erscheinen unter dem Elektronenmikroskop als runde bis ovale Zellen. Wie bereits von Maxwell (1973) beschrieben, weisen sie zum Teil Pseudopodien auf (Maxwell, 1973). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die heterophilen Granulozyten drei verschiedene Arten von Granula enthalten. Am häufigsten sind die spindelförmigen elektronendichten Granula mit einer Größe von 1-1,3 x 0,5 µm

vertreten, in denen ein runder elektronendichterer Bereich erkennbar ist. Daneben kommen die mäßig elektronendichten, ca. 0,7 µm großen Granula mit einem inhomogenen Inhalt und die 0,1-0,3 µm kleinen elektronendichten Granula vor. Dabei handelt es sich um die von Daimon und Caxton-Martins (1977) in den aviären heterophilen Granulozyten beschriebenen primären, sekundären und tertiären Granula (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Untersuchungen von Maxwell (1973) zeigen ebenfalls einen regelmäßig vorkommenden runden elektronendichten Körper in der Mitte der primären Granula (Maxwell, 1973). Die kleinen tertiären Granula haben nach Daimon und Caxton-Martins (1977) einen elektronendichten Kern, der von einem elektronendurchlässigen Bereich umgeben wird (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Diese Unterscheidung zwischen Kern und Hülle kann in den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten des Huhnes sind außerdem Glykogenpartikel zu erkennen, was mit den Befunden von Maxwell (1973) übereinstimmt (Maxwell, 1973). Auch die Ergebnisse der PAS-Reaktion in vorliegender Arbeit bestätigen das Vorkommen von Glykogen im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten.

Die eosinophilen Granulozyten zeigen sich ultrastrukturell als runde Zellen mit runden bis ovalen Granula mit einer Größe von 0,3-1 µm. Diese enthalten einen elektronendichten und homogenen Inhalt. Dies stimmt mit Angaben in der Literatur überein, nach denen die eosinophilen Granulozyten der Hühner nur einen Granulatyp enthalten (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Maxwell, 1978). Die Befunde anderer Autoren, nach denen ultrastrukturell zwei Arten von Granula erkennbar sind (Campbell und Ellis, 2007), können hier nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den heterophilen Granulozyten liegen die Granula der eosinophilen Granulozyten weniger dicht im Zytoplasma. Dies ist in vorliegender Arbeit auch lichtmikroskopisch erkennbar (siehe Kapitel IV.2.4.). Im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten des Huhnes sind außerdem, wie bereits in der Literatur beschrieben (Hodges, 1977; Santos et al., 2003), raues endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, Mitochondrien, Vesikel und Glykogenpartikel zu erkennen. Einzig die Glykogenpartikel werden in der Literatur bisher nicht erwähnt. Die positive PAS-Reaktion in vorliegender Arbeit bestätigt jedoch das Vorkommen von Glykogen im Zytoplasma der Zellen.

Die Lymphozyten der Hühner erscheinen unter dem Elektronenmikroskop als runde Zellen mit relativ wenigen Organellen. Charakteristisch ist auch ihr hohes Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis. Bei manchen Lymphozyten sind ultrastrukturell Pseudopodien erkennbar, was mit den Ergebnissen von Maxwell (1974)

übereinstimmt (Maxwell, 1974). Das Zytoplasma enthält vereinzelt Granula mit mäßig elektronendichtem Inhalt. Auch Maxwell (1974) konnte Granula mit einem Durchmesser von 0,1-1,0 μm im Zytoplasma feststellen (Maxwell, 1974). Vermutlich handelt es sich hierbei um die auch lichtmikroskopisch erkennbaren zytoplasmatischen Granula. Im Zytoplasma zeigen sich außerdem elektronendichte Glykogenpartikel. Dies wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, deckt sich jedoch mit den positiven Ergebnissen der PAS-Reaktion in vorliegender Arbeit (siehe Kapitel IV.2.6.). Außerdem sind, wie bereits von Maxwell (1974) dargestellt, raues endoplasmatisches Retikulum und kleine Vakuolen mit einem Durchmesser bis zu 0,1 μm zu erkennen.

Die Monozyten des Huhnes stellen sich ultrastrukturell als unregelmäßig geformte Zellen mit umfangreichem Zytoplasma dar. Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigen außerdem, dass die zahlreichen Zellorganellen gleichmäßig über das gesamte Zytoplasma verteilt sind und sich nicht, wie von Maxwell (1974) beschrieben, häufig in Zellkernnähe befinden (Maxwell, 1974). Im gesamten Zytoplasma ist raues endoplasmatisches Retikulum zu erkennen, welches sich zum Teil stark dilatiert zeigt. Dies könnte auf eine hohe Stoffwechselaktivität dieser Zelle zurückzuführen sein. Ultrastrukturell werden außerdem zytoplasmatische Granula sichtbar. Auch Untersuchungen von Maxwell (1974) zeigen kleine elektronendichte Granula mit einem Durchmesser von 0,1-0,5 μm im Zytoplasma (Maxwell, 1974). Im Gegensatz dazu sind in den Monozyten des Huhnes Granula mit unterschiedlicher Elektronendichte zu erkennen. Bei den Granula handelt es sich um Lysosomen (Liebich, 2010). Vermutlich stellen diese die nach Clark und Mitarbeiter (2009) gelegentlich lichtmikroskopisch erkennbaren feinen zytoplasmatischen eosinophilen Granula dar (Clark et al., 2009), die jedoch anhand der hier durchgeführten lichtmikroskopischen Färbungen nicht feststellbar waren (siehe Kapitel IV.2.7.). Die positive PAS-Reaktion in vorliegender Arbeit bestätigt das Vorkommen der elektronenmikroskopisch erkennbaren Glykogenpartikel.

4. Glykohistochemie

Anhand glykohistochemischer Untersuchungen wurden die verschiedenen Kohlenhydratstrukturen auf den Hühnerblutzellen dargestellt. Hierfür dienten die Pflanzenlektine ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, VAA, GSL I, SJA, DBA, SBA, SNA, WGA, WGAs, UEA I, PHA-E, PHA-L und MAA I. Bei den Ergebnissen der glykohistochemischen Untersuchungen können keine Unterschiede in Abhängigkeit von Rasse, Alter oder Geschlecht der Hühner festgestellt werden.

Im Allgemeinen wird die Lektinbindung von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen. Zum einen können die Qualität der Lektine und methodische Faktoren, wie der pH-Wert, die Affinität eines Lektins beeinflussen (Moraes und Mello, 2006). Zum anderen spielen bei der Lektinbindung beispielsweise hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Glykan sowie die Art der Bindung und die folgenden Zuckerreste in dem Oligosaccharid eine Rolle (Wu et al., 2009; Roth, 2011). So können Lektine an verschiedene Oligosaccharidketten, die mit dem für das Lektin spezifischen Zucker enden, mit unterschiedlicher Affinität binden (Wu et al., 2009). In vorliegender Arbeit wurde zur Interpretation der Ergebnisse die Klassifikation der Lektine nach ihrer nominalen Zuckerspezifität herangezogen. Da diese Klassifikation jedoch auf Ergebnissen aus Agglutinationsversuchen mit Hemmzuckern (Monosacchariden) basiert, gilt sie als stark vereinfacht (Roth, 2011). Außerdem ist zu beachten, dass die Auswertung der Reaktionsstärke der Lektine auf einer subjektiven Bewertung der Fluoreszenz beruht.

Die Erythrozyten der Hühner weisen eine Affinität der Lektine ConA, SNA, WGA und WGAs auf. Die Lektine LCA, PSA, PNA, RCA, VAA, GSL I, SJA, DBA, SBA, UEA I, PHA-E, PHA-L und MAA I binden hingegen nicht an die Hühnererythrozyten. Bei den meisten positiv reagierenden Lektinen sind im Zytoplasma der Erythrozyten zellkernnah kleine Granula mit einer gelblichen Eigenfluoreszenz zu erkennen. Dabei könnte es sich um die auch lichtmikroskopisch erkennbaren basophilen granulären Einschlüsse handeln. Die positiv reagierenden Lektine ConA, SNA und WGA binden überwiegend deutlich bis stark an die Membran, lediglich SNA reagiert außerdem schwach positiv mit dem Zytoplasma der Erythrozyten. Das succinylierte WGA (WGAs) bindet im Gegensatz zu dem deutlich positiven WGA nur in wenigen Präparaten mit schwacher Affinität an die Membran. Negativ geladenes WGAs bindet im Gegensatz zu positiv geladenem WGA nicht an N-Acetyl-D-Neuraminsäure, sondern nur an N-Acetyl-D-Glukosamin. WGA ist dagegen für beide

Zuckerstrukturen spezifisch (Monsigny et al., 1980). Aus der abgeschwächten Affinität des succinylierten WGA an die Erythrozytenmembran der Hühner lässt sich folgern, dass die Glykokonjugate in der Membran viel N-Acetyl-D-Neuraminsäure und nur wenig N-Acetyl-D-Glukosamin enthalten. Die Ergebnisse der Lektinbindungen zeigen außerdem, dass die Glykokalyx der Erythrozyten einen großen Anteil an D-Galaktose, N-Acetyl-D-Galaktosamin, D-Mannose und D-Glukose enthaltenden Kohlenhydraten besitzt. Im Zytoplasma befinden sich geringe Mengen an D-Galaktose- und N-Acetyl-D-Galaktosaminhaltigen Glykokonjugaten. Die positive Reaktion der Hühnererythrozyten mit ConA deckt sich zumindest teilweise mit den Ergebnissen von Vidal (1997) sowie von Moraes und Mello (2006), die eine starke Affinität von ConA an die Plasmamembran und die Kernhülle beschreiben (Vidal, 1997; Moraes und Mello, 2006). Die fehlende Bindung von ConA an die Kernhülle der Hühnererythrozyten in der vorliegenden Arbeit lässt sich durch die pH-Wert abhängige Affinität des Lektins erklären. Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurde der pH-Wert des Puffers auf 7,4 eingestellt. Bei einem pH-Wert von 7,2 ist laut Moraes und Mello (2006) mit einer starken ConA-Affinität an die Glykokalyx zu rechnen. Eine stärkere Bindung des ConA an die Kernhülle findet jedoch bei einem pH-Wert von 6,5 statt (Moraes und Mello, 2006). Der hohe Gehalt an D-Mannose in der Erythrozytenmembran und die negative Bindung der meisten N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifischen Lektine stimmen mit den Untersuchungen von Duk (2000) überein. Duk (2000) stellte fest, dass die Glykophorine in der Erythrozytenmembran der Hühner viel D-Mannose und wenig N-Acetyl-D-Galaktosamin enthalten, was auf ein relativ hohes Verhältnis von N-Glykanen zu O-Glykanen hinweist. Die Glykophorine der Säugetiere besitzen hingegen einen nur sehr geringen Gehalt an N-Glykanen (Duk, 2000). Sasmal und Mitarbeiter (2002) stellten fest, dass *Vibrio cholerae* (Serogruppe O1) ein N-Acetyl-D-Glukosamin spezifisches Hämagglutinin besitzt, welches an die Erythrozytenmembran der Hühner bindet (Sasmal et al., 2002). In vorliegender Arbeit können jedoch nur bei wenigen Tieren N-Acetyl-D-Glukosamin-Reste in der Erythrozytenmembran nachgewiesen werden. Bei den meisten Tieren bleibt eine Bindung des N-Acetyl-D-Glukosamin spezifischen Lektins WGAs aus. Die Erythrozyten im zirkulierenden Blut der Hühner zeigen keine Affinität des D-Galaktose spezifischen Lektins PNA. Sorrell (1988) stellte fest, dass PNA auch an die erythroiden Zellen im Hühnerknochenmark bindet (Sorrell, 1988).

Die Thrombozyten des Huhnes zeigen eine schwache bis deutliche Bindung der Lektine ConA, LCA, PSA, SNA, WGA, WGAs und PHA-E. RCA bindet nur selten

an die Thrombozyten. Die Lektine PNA, VAA, GSL I, SJA, SBA, DBA, UEA I, PHA-L und MAA I weisen keine Affinität an die Hühnerthrombozyten auf. Die positiv reagierenden Lektine binden in erster Linie an das Zytoplasma der Thrombozyten. Hier fällt auf, dass die Fluoreszenz im Zytoplasma meist am stärksten um den Zellkern und weniger stark in der Peripherie des Zytoplasmas zu erkennen ist. Demnach sind die meisten Glykokonjugate um den Zellkern lokalisiert. Dies könnte mit der hohen Zellorganellendichte in diesem Bereich zusammenhängen, die Maxwell (1974) elektronenmikroskopisch feststellte (Maxwell, 1974). Die Membran der Hühnerthrombozyten reagiert einzig mit dem Lektin SNA in wenigen Fällen schwach positiv. An die Granula binden vor allem die Lektine ConA und LCA schwach bis deutlich. Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass im Zytoplasma der Thrombozyten überwiegend D-Glukose- und D-Mannosereste vorkommen. Daneben sind auch D-Galaktose- und N-Acetyl-D-Galaktosaminhaltige Glykane und durch PHA-E nachgewiesene komplexe Oligosaccharide vorhanden. Das succinylierte WGA (WGAs) bindet im Vergleich zu WGA mit leicht reduzierter Affinität an das Zytoplasma. Folglich enthält das Thrombozytenzytoplasma außerdem N-Acetyl-D-Glukosaminreste und eine geringe Menge an N-Acetyl-D-Neuraminsäurehaltigen Glykanen. Auch die Granula der Thrombozyten weisen vor allem D-Mannose- und D-Glukosereste auf. In der Glykokalyx der Thrombozyten können in wenigen Fällen D-Galaktose- und N-Acetyl-D-Galaktosaminreste nachgewiesen werden. Die fehlende Affinität von PNA an die Thrombozyten stimmt mit den Ergebnissen von Sorrell (1988) überein. Das Lektin bindet ebenfalls nicht an Thrombozyten aus dem Knochenmark von Hühnern (Sorrell, 1988). Da Matta und Mitarbeiter (1998) beschrieben jedoch bei kultivierten Hühnerthrombozyten eine steigende Affinität von PNA und UEA I an die Zelloberfläche (DaMatta et al., 1998). Auch die Bindung des L-Fukose spezifischen Lektins UEA I kann in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Da Matta und Mitarbeiter (1998) konnten bei den kultivierten Thrombozyten in den ersten 24 Stunden eine Zellkernkondensation, einen Schwund des Zytoplasmas und das Zerfallen der Thrombozyten beobachten (DaMatta et al., 1998). Diese Vorgänge führen möglicherweise zu einer veränderten Kohlenhydratzusammensetzung der Zelloberfläche und zu einer daraus resultierenden Bindung von UEA I und PNA.

Die heterophilen Granulozyten der Hühner weisen eine überwiegend deutliche Bindung der Lektine ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, SNA, WGA, WGAs und PHA-L auf. Sorrell (1988) stellte ebenfalls fest, dass PNA an die heterophilen

Granulozyten im Knochenmark der Hühner bindet (Sorrell, 1988). Auch in vorliegender Arbeit konnten D-Galaktosereste in den zirkulierenden heterophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Die heterophilen Granulozyten sind die einzigen Blutzellen, an die die Lektine VAA und DBA binden. Diese Affinität ist jedoch nur schwach sichtbar. PHA-E reagiert ebenfalls nur schwach positiv. Die Pflanzenlektine GSL I, SJA, SBA, UEA I und MAA I besitzen keine Affinität an die heterophilen Granulozyten des Huhnes. Die Lektine ConA, WGA und WGAs binden am deutlichsten an die Membran der heterophilen Granulozyten, wobei die Bindung von WGAs im Gegensatz zu WGA leicht abgeschwächt sichtbar ist. PNA bindet hingegen weniger stark. Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Membran der heterophilen Granulozyten der Hühner vor allem bestimmte D-Glukose-, D-Mannose- und N-Acetyl-D-Glukosaminreste sowie geringe Mengen an N-Acetyl-D-Neuraminsäure enthält. D-Galaktosehaltige Zuckerstrukturen sind ebenfalls in geringem Umfang in der Glykokalyx vorhanden. An das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten binden die Pflanzenlektine ConA, LCA, PSA, RCA, WGA, WGAs und PHA-L mit unterschiedlicher Affinität. Diese Ergebnisse legen dar, dass in erster Linie D-Mannose- und D-Glukosereste im Zytoplasma vorhanden sind. Die starke Bindung des WGAs zeigt weiterhin, dass N-Acetyl-D-Glukosaminreiche Glykokonjugate vorkommen. D-Galaktosereste und PHA-L spezifische Oligosaccharide sind in geringerem Umfang vorhanden. Die heterophilen Granula zeigen eine schwache bis deutliche Bindung der Lektine ConA, LCA, PSA, PNA und WGA. WGAs reagiert hingegen nur sehr vereinzelt schwach positiv. SNA bindet mit schwacher bis starker Affinität an eine Struktur, die die Granula umgibt, während das Innere der Granula nicht fluoresziert. Bei dieser Struktur könnte es sich um die Membran handeln, die die heterophilen Granula umgibt. Diese konnte auch elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Daimon und Caxton-Martins, 1977) und enthält aufgrund der vorliegenden Untersuchungen D-Galaktose- und N-Acetyl-D-Galaktosaminreste. Die Ergebnisse der Lektin histochemie zeigen außerdem, dass die heterophilen Granula vorwiegend D-Glukose-, D-Mannose-, D-Galaktose- und N-Acetyl-D-Neuraminsäurereiche Kohlenhydrate enthalten.

Die eosinophilen Granulozyten der Hühner reagieren mit den Lektinen LCA, PNA, SNA, WGA und WGAs schwach bis deutlich positiv. Bei den Lektinen ConA und PSA ist eine überwiegend negative Reaktion zu erkennen, während die Lektine RCA, VAA, GSL I, SJA, SBA, DBA, UEA I, PHA-E, PHA-L und MAA I nicht an die eosinophilen Granulozyten der Hühner binden. Die Lektine SNA und

WGA binden schwach bis deutlich an die Membran. WGAs besitzt hingegen keine Affinität an die Membran. Aufgrund dieses Bindungsverhaltens kann auf das Vorhandensein einiger D-Galaktose-, N-Acetyl-D-Galaktosamin- und N-Acetyl-D-Neuraminsäurereste in der Membran geschlossen werden. Das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten zeigt eine schwache bis deutliche Bindung von LCA, SNA und WGAs. Daraus lässt sich schließen, dass vor allem D-Glukose-, D-Mannose-, D-Galaktose-, N-Acetyl-D-Galaktosamin- und N-Acetyl-D-Glukosaminhaltige Glykokonjugate im Zytoplasma vorkommen. An die eosinophilen Granula bindet einzig das Lektin PNA, was zeigt, dass die Granula vor allem D-Galaktosereste enthalten. Bei den anderen Lektinen ist in den Granula der eosinophilen Granulozyten häufig eine gelbe Eigenfluoreszenz zu beobachten. Untersuchungen von Lee und Mitarbeiter (1987) sowie Eguchi und Mitarbeiter (1989) zeigen, dass die Granula der humanen eosinophilen Granulozyten reich an N-Acetyl-D-Galaktosamin sind (Lee et al., 1987; Eguchi et al., 1989). Die N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifischen Lektine GSL I, DBA und SBA gelten als spezifische Marker für die eosinophilen Granulozyten der Menschen (Lee et al., 1987; Eguchi et al., 1989). Dies stimmt aufgrund der andersartigen Kohlenhydratzusammensetzung der Granula nicht mit dem Huhn überein.

Die basophilen Granulozyten der Hühner weisen eine überwiegend starke Affinität von ConA, LCA, PSA, RCA, SNA, WGA, WGAs und PHA-E auf, wobei WGAs insgesamt stärker bindet als WGA. Die Lektine PNA, PHA-L und MAA I reagieren überwiegend negativ und nur vereinzelt schwach positiv. VAA, die N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifischen Lektine GSL I, SJA, SBA und DBA sowie das L-Fukose spezifische Lektin UEA I binden nicht an die basophilen Granulozyten. An die Membran der basophilen Granulozyten binden vor allem die Lektine ConA, WGA und WGAs mit sehr unterschiedlicher Affinität. Die Reaktionen reichen von negativ bis sehr stark positiv. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Membran D-Glukose-, D-Mannose- und N-Acetyl-D-Glukosaminhaltige Glykane in unterschiedlicher Menge enthält. Das Zytoplasma der basophilen Granulozyten reagiert mit den Lektinen ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs und PHA-E mit überwiegend schwacher Affinität. Diese Ergebnisse der lektinhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass im Zytoplasma überwiegend D-Glukose-, D-Mannose- und N-Acetyl-D-Glukosaminreiche Zuckerstrukturen und PHA-E bindende Oligosaccharide enthalten sind. Die Granula zeigen bei den meisten positiven Lektinen (ConA, LCA, PSA, SNA, WGA, WGAs und PHA-E) eine überwiegend starke bis sehr starke Reaktion. Sorrell (1988) beschrieb eine

Bindung von PNA an die basophilen Granulozyten im Knochenmark der Hühner und wies damit das Vorkommen von D-Galaktose nach (Sorrell, 1988). Auch in vorliegender Arbeit können D-Galaktosereste anhand einer schwachen bis deutlichen Bindung von RCA in den basophilen Granulozyten aufgezeigt werden. PNA bindet jedoch nur sehr vereinzelt schwach an die Granula. Das Bindungsverhalten der Lektine an die basophilen Granula lässt auf das Vorhandensein zahlreicher D-Mannose-, D-Glukose-, N-Acetyl-D-Glukosamin-, D-Galaktose- und N-Acetyl-D-Galaktosaminhaltiger Glykane sowie auf das Vorkommen PHA-E spezifischer Oligosaccharide schließen.

Die Lymphozyten der untersuchten Hühner zeigen eine Bindung von ConA, LCA, PSA, RCA, SNA, WGA und WGAs. Das succinylierte WGA (WGAs) besitzt im Vergleich zu WGA eine leicht reduzierte Affinität. Die Lektine PNA, VAA, GSL I, SJA, SBA, DBA, UEA I, PHA-E, PHA-L und MAA I reagieren negativ. Eine eindeutige Bindung an die Lymphozytenmembran ist nur bei SNA zu erkennen, was auf das Vorhandensein von D-Galaktose- und N-Acetyl-D-Galaktosaminhaltigen Zuckerstrukturen hindeutet. Das Zytoplasma der Lymphozyten zeigt sich bei ConA, LCA, PSA, RCA, SNA und WGAs schwach bis deutlich positiv und im Falle von WGA auch deutlich bis stark positiv. Diese Ergebnisse zeigen das Vorkommen von N-Acetyl-D-Neuraminsäure-, N-Acetyl-D-Glukosamin-, D-Mannose-, D-Glukose-, D-Galaktose- und N-Acetyl-D-Galaktosaminhaltigen Glykokonjugaten im Lymphozytenzytoplasma. Die zytoplasmatischen Granula reagieren mit den Lektinen ConA, PSA, RCA und WGAs schwach bis deutlich positiv und mit WGA stark positiv. Aufgrund dieses Lektinbindungsmusters kann darauf geschlossen werden, dass N-Acetyl-D-Neuraminsäure-, N-Acetyl-D-Glukosamin-, D-Galaktose-, D-Glukose- und D-Mannosereiche Kohlenhydrate in den Granula der Lymphozyten enthalten sind. In Untersuchungen konnten Schauenstein und Mitarbeiter (1983), Sorrell (1988) sowie Jörns und Mitarbeiter (2003) beim Huhn eine Bindung des Galaktose-spezifischen Lektins PNA an 70% der Blutlymphozyten, an die Lymphozyten im Knochenmark und an die B-Lymphozyten und T-Lymphozyten in der Milz nachweisen (Schauenstein et al., 1983; Sorrell, 1988; Jörns et al., 2003). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der fehlenden Bindung von PNA an die Lymphozyten der untersuchten Hühner in vorliegender Arbeit. Die ebenfalls Galaktose-spezifischen Lektine RCA und SNA binden hingegen an die Lymphozyten. Die fehlende Bindung von PNA könnte mit einer starken Sialylierung der Glykokonjugate in Zusammenhang stehen. Auch in den Untersuchungen von Schauenstein und Mitarbeiter (1983) kam es nach der

Abspaltung endständiger Sialinsäure zu einer Bindung des Lektins an die zuvor negativen Zellen (Schauenstein et al., 1983). Die Ergebnisse der Lektinbindungen von ConA, LCA und WGA decken sich mit den Untersuchungsergebnissen von Flower und Wilcox (1981) sowie von Jörns und Mitarbeiter (2003). Letztere beschrieben bei Hühnern eine Bindung von ConA und WGA an die peripheren Blutlymphozyten (Flower und Wilcox, 1981), eine Affinität von ConA, LCA und WGA an die T-Lymphozyten im Thymus und an die B- und T-Lymphozyten in der Milz sowie die Bindung von ConA an die B-Lymphozyten in der Bursa Fabricii (Jörns et al., 2003).

Die Monozyten zeigen eine Bindung der Lektine ConA, LCA, PSA, SNA, WGA und WGAs. Die Pflanzenlektine PNA, RCA, VAA, GSL I, SJA, SBA, DBA, UEA I, PHA-E, PHA-L und MAA I reagieren negativ. Bei SNA, WGA und WGAs ist eine schwache bis deutliche Fluoreszenz der Membran zu beobachten, wobei WGAs etwas stärker reagiert als WGA. Dieses Ergebnis der lektinhistochemischen Untersuchungen zeigt, dass die Glykokonjugate der Glykokalyx überwiegend N-Acetyl-D-Glukosamin, D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin enthalten. Im Monozytenzytoplasma weist die etwas stärkere Bindung von WGAs im Gegensatz zu WGA auf das Vorhandensein N-Acetyl-D-Glukosamin-reicher Kohlenhydrate hin. Außerdem belegt die Bindung der Lektine LCA, PSA und SNA das Vorkommen von D-Galaktose-, N-Acetyl-D-Galaktosamin-, D-Glukose- und D-Mannoseresten im Zytoplasma der Monozyten. Die zytoplasmatischen Granula können substrathistochemisch nicht dargestellt werden. Bei den glykohistochemischen Untersuchungen reagieren sie jedoch mit den Lektinen ConA, LCA, PSA, SNA, WGA und WGAs schwach bis stark positiv, wobei die Reaktion mit ConA am stärksten ist. Daraus lässt sich folgern, dass die Granula der Monozyten in erster Linie D-Glukose- und D-Mannosereiche Zuckerstrukturen enthalten. Außerdem kommen N-Acetyl-D-Glukosamin-, N-Acetyl-D-Galaktosamin- und D-Galaktosereste in den zytoplasmatischen Granula vor. Jörns und Mitarbeiter (2003) beschrieben beim Huhn ebenfalls das Vorkommen von N-Acetyl-D-Glukosamin in Thymus-Makrophagen (Jörns et al., 2003). Auch bei der Bindung von LCA und WGA stimmen die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen von Jörns und Mitarbeiter (2003) überein, die eine Affinität dieser Lektine an Makrophagen in der Bursa Fabricii feststellten (Jörns et al., 2003). Lediglich die Affinität von PNA an die Monozyten, die Sorrell (1988) im Knochenmark von Hühnern zeigen konnte (Sorrell, 1988), kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dies könnte auf eine Maskierung subterminaler Galaktosereste mit Sialinsäure

zurückzuführen sein.

Anhand von Hemmzuckern wurde die Spezifität der stark bindenden Lektine ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs überprüft. Die Bindungsfähigkeit der Lektine an die Blutzellen des Huhnes ist nach der Vorbehandlung mit den spezifischen Hemmzuckern bei allen Lektinen stark abgeschwächt oder nicht mehr vorhanden, während die Negativkontrollen eine unverändert starke Fluoreszenz aufweisen. Das zeigt eine hohe Spezifität der oben genannten Lektine an ihre jeweilige Kohlenhydratstruktur.

Die Galaktose bzw. N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifischen Lektine VAA, SBA, DBA, SJA und GSL I zeigen im Allgemeinen keine oder eine nur sehr schwache Affinität an die Blutzellen des Huhnes. Bei diesen Lektinen wurde eine Vorbehandlung der Blutausrüche mit Neuraminidase durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Bindungsstellen der Lektine von Sialinsäure maskiert werden. Neuraminidase von *Vibrio cholerae* spaltet eventuell vorhandene endständige Sialinsäure von den Glykanen der Blutzellen ab, so dass eine Bindung der Lektine an die zuvor maskierten Kohlenhydratstrukturen möglich wird. Sialinsäure geht in der Regel glykosidische Bindungen mit D-Galaktose, N-Acetyl-D-Glukosamin und N-Acetyl-D-Galaktosamin ein (Lehmann et al., 2006). Nach der Neuraminidasevorbehandlung weist lediglich das N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifische Lektin SBA eine sehr schwache Affinität an die Granula der heterophilen Granulozyten auf. Die Lektine VAA, DBA, SJA und GSL I zeigen hingegen keine Veränderung in ihrem Bindungsverhalten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bestimmte subterminale N-Acetyl-D-Galaktosaminreste in den Granula der heterophilen Granulozyten von Sialinsäure maskiert werden. Die unterschiedliche Bindungsaffinität der verschiedenen N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifischen Lektine an die subterminalen Kohlenhydratstrukturen kann durch verschiedene Faktoren, die diese Bindung beeinflussen (Wu et al., 2009; Roth, 2011), erklärt werden.

5. Immunhistochemie

Anhand der immunhistochemischen Untersuchungen wurden spezifische Antigene der T-Lymphozyten und der eosinophilen Granulozyten sowie die zytoskelettalen Elemente der Hühnerblutzellen nachgewiesen. Bei den Ergebnissen der Immunhistochemie können keine Unterschiede in Abhängigkeit von Rasse, Alter oder Geschlecht der Hühner festgestellt werden.

5.1. Immunhistochemische Untersuchungen spezifischer Antigene der T-Lymphozyten und der eosinophilen Granulozyten

Für den immunhistochemischen Nachweis spezifischer Antigene der T-Lymphozyten wurden für das Huhn spezifische, FITC-markierte CD4- und CD8 α -Antikörper auf ihr Bindungsverhalten untersucht. Hierfür wurden unfixierte und mit Methanol fixierte Blutausstriche verwendet.

In den fixierten Ausstrichen bindet der CD4- und der CD8 α -Antikörper jeweils schwach bis deutlich an die Granula der Lymphozyten. Auch im Zytoplasma ist bei beiden Antikörpern eine schwache diffuse Fluoreszenz zu erkennen. Eine Bindung an andere Blutzellen findet in den fixierten Ausstrichen nicht statt. Diese Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen zeigen das Vorkommen des CD4- und CD8 α -Moleküls in den Granula und im Zytoplasma der Lymphozyten.

In den unfixierten Ausstrichen kann bei dem CD4- und CD8 α -Antikörper jeweils nur vereinzelt eine schwache Bindung an die Lymphozyten festgestellt werden, wobei in den positiven Zellen ebenfalls ein granuläres Reaktionsmuster zu erkennen ist. Interessant ist jedoch, dass der CD4-Antikörper in wenigen unfixierten Ausstrichen vereinzelt auch an das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten bindet. In der Literatur gibt es bisher keine Angaben zur Expression von CD4 in den heterophilen Granulozyten des Huhnes. Beim Menschen beschrieben Biswas und Mitarbeiter (2003) hingegen das Vorkommen von CD4 auf den neutrophilen Granulozyten. Dabei konnten sie in 12% der untersuchten Blutproben bei einigen neutrophilen Granulozyten das Vorkommen von CD4 auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma der humanen neutrophilen Granulozyten nachweisen (Biswas, 2003).

Nach Angaben von Chan und Mitarbeiter (1988) wird das CD4-Molekül auf ca. 45% der Lymphozyten und das CD8-Molekül auf ca. 15% der Blutlymphozyten der Hühner exprimiert (Chan et al., 1988). Auch in der vorliegenden Arbeit ist

eine selektive Anfärbung der Lymphozyten und ein geringeres Vorkommen der CD8-positiven Lymphozyten zu erkennen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nur die CD8 α -positiven Lymphozyten nachgewiesen wurden. Die CD8 β -Lymphozyten, die nach Ratcliffe und Mitarbeiter (1993) die Mehrzahl der CD8-Lymphozyten ausmachen (Ratcliffe et al., 1993), sind in diese Auswertung nicht miteinbezogen.

Das Blut des Huhnes wurde anhand immunzytochemischer Methoden außerdem auf das Bindungsverhalten des *Major basic protein* (MBP)-Antikörpers an die eosinophilen Granulozyten untersucht. Dabei kommt es in den eosinophilen Granulozyten nur vereinzelt zu einer unspezifischen, sehr schwachen Bindung des Antikörpers an die Granula. Wang und Mitarbeiter (2012) konnten das *Major basic protein* beim Huhn nachweisen (Wang et al., 2012). Dieser Antikörper, der beim Menschen als Marker für eosinophile Granulozyten eingesetzt wird, eignet sich jedoch beim Huhn aufgrund der nur unspezifischen Reaktion nicht für die Detektion der eosinophilen Granulozyten im Blut.

5.2. Untersuchungen des Zytoskeletts

Die Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten des Huhnes wurden auf das Vorkommen der zytoskelettalen Elemente Aktin, Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin untersucht. Hierfür dienten mit Methanol fixierte und unfixierte Ausstriche. Vimentin und Tubulin können nur in den fixierten Ausstrichen deutlich dargestellt werden, während Aktin lediglich in den unfixierten Ausstrichen nachweisbar ist. Das Vorkommen von Zytokeratinen und Myosin in den Hühnerblutzellen kann weder in den fixierten noch in den unfixierten Ausstrichen gezeigt werden.

In den Erythrozyten des Huhnes können Aktinfilamente nachgewiesen werden. Phalloidin-TRITC zeigt eine deutliche Bindung an den submembranösen Bereich der Zelle und eine schwache Bindung an das Zytoplasma der Erythrozyten, was das Vorkommen von Aktinfilamenten in diesem Bereich zeigt. Auch Moon und Lazarides (1984) beschreiben in den aviären Erythrozyten ein Membranskelett aus Spektrin- und Aktinfilamenten, welches auch in den Erythrozyten der Menschen vorkommt (Branton et al., 1981; Moon und Lazarides, 1984). Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit weisen außerdem darauf hin, dass die Aktinfilamente nicht nur unterhalb der Membran der Hühnererythrozyten, sondern auch in geringerem Umfang im Zytoplasma vorkommen. In den Erythrozyten findet keine Bindung des Vimentin-Antikörpers statt. Dieses Ergebnis steht im

Widerspruch zu Untersuchungen von Granger und Lazarides (1982), die zeigen, dass Vimentin und Synemin in den Hühnererythrozyten ein dreidimensionales Netzwerk im Zytoplasma bilden, welches den Zellkern mit dem Membranskelett verbindet (Granger und Lazarides, 1982). Auch bei dem Nachweis von Tubulin in den Erythrozyten ist keine Reaktion nachweisbar und ein marginales Band aus Mikrotubuli unterhalb der Zellmembran ist nicht zu erkennen. Auch elektronenmikroskopisch ist kein marginales Band aus Mikrotubuli darstellbar (siehe Kapitel IV.3.1.). Schumacher (1965) konnte diese Struktur in Hühnererythrozyten elektronenmikroskopisch ebenfalls nicht finden (Schumacher, 1965). Andere Autoren beschreiben jedoch das Vorkommen dieses marginalen Bandes aus Mikrotubuli („Randstreifen“) in den kernhaltigen Erythrozyten der Vögel, Fische, Amphibien und Reptilien (Meves, 1911; Fawcett und Wittebsky, 1964; Maser und Philpott, 1964; Behnke, 1970; Joseph-Silverstein und Cohen, 1984). Die Divergenz der Befunde hängt möglicherweise damit zusammen, dass die Anzahl und Anordnung der Mikrotubuli während eines Zellzyklus stark variieren kann (Swan und Solomon, 1984). So zeigen Untersuchungen von Barrett und Dawson (1974), dass die Anzahl der Mikrotubuli mit fortschreitendem Zellalter der Erythrozyten sinkt (Barrett und Dawson, 1974). Außerdem sind Mikrotubuli sehr labil und können schnell und dynamisch auf- und abgebaut werden (Liebich, 2010).

Auch in den Thrombozyten des Huhnes sind die drei wesentlichen Zytoskelettelemente, Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli vertreten. Dabei bilden die Aktinfilamente die Hauptkomponente, während Vimentin in einem nur geringen Anteil vorkommt. Dies deckt sich mit der Verteilung der Zytoskelettproteine in den Blutplättchen der Säugetiere. Auch hier macht Aktin den Hauptanteil aus (Spangenberg, 1990; Tablin, 2000; Fox, 2001). Beim Nachweis von Aktin sind im submembranösen Bereich und im Zytoplasma der Zellen jeweils stark positive Reaktionsprodukte zu erkennen. Die Aktinfilamente weisen eine netzartige Verteilung auf und erstrecken sich in den aktivierten Thrombozyten bis in die zytoplasmatischen Ausläufer. Untersuchungen von Lee und Mitarbeiter (2004) zeigen ebenfalls, dass die kernhaltigen Thrombozyten ein Membranskelett aus F-Aktin besitzen und sich die Aktinfilamente bei einer Aktivierung der Thrombozyten im gesamten Zytoplasma bis in die Pseudopodien hinein ausbreiten (Lee et al., 2004). Vimentinfilamente sind in geringer Menge im Zytoplasma der Hühnerthrombozyten nachweisbar. Die kernhaltigen Thrombozyten besitzen ein submembranöses, marginales Band aus Mikrotubuli (Fawcett und Wittebsky, 1964; Behnke, 1970). Dieses ist bei den

Thrombozyten der Hühner für die Erhaltung der Zellform entscheidend (Fawcett und Wittebsky, 1964; Behnke, 1970). Auch in vorliegender Arbeit kann bei dem immunhistochemischen Nachweis von Tubulin das marginale Band in den Thrombozyten dargestellt werden. Der submembranöse Bereich reagiert negativ bis stark positiv mit dem Tubulin-Antikörper und im Zytoplasma sind überwiegend deutlich positive Reaktionen zu beobachten. Dieses divergierende Verteilungsmuster der Mikrotubuli ist auf einer Aktivierung mancher Thrombozyten begründet. In aktivierten Thrombozyten geben die Mikrotubuli ihre ursprüngliche submembranöse Organisation auf und orientieren sich in den zentralen Bereich der Zelle (Lee et al., 2004).

In den heterophilen Granulozyten können Aktin, Vimentin und Tubulin nachgewiesen werden, wobei sich die Aktinfilamente am deutlichsten darstellen. In der Literatur finden sich bisher keine Angaben zum Zytoskelett der heterophilen Granulozyten der Hühner. Untersuchungen zum Zytoskelett der neutrophilen Granulozyten der Säugetiere zeigen jedoch, dass auch hier Aktin zu den Hauptkomponenten gehört (Bengtsson et al., 2006). Phalloidin-TRITC bindet an das F-Aktin unterhalb der Membran und im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten der Hühner. Dabei ist im Zytoplasma eine deutliche Reaktion zu erkennen, die sich diffus darstellt. Die stark positive Reaktion im Bereich direkt unter der Zellmembran deutet darauf hin, dass die heterophilen Granulozyten, wie auch die aviären Erythrozyten und Thrombozyten, ein Membranskelett aus Aktinfilamenten enthalten. Vimentinfilamente sind im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten überwiegend in Zellkernnähe nachweisbar. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die heterophilen Granulozyten nicht aktiviert sind. Denn auch in den nichtaktivierten neutrophilen Granulozyten der Menschen ist Vimentin eher perinukleär zu finden, während die Vimentinfilamente in den aktivierten, migrierenden Zellen im hinteren Zellpol lokalisiert sind (Olins et al., 2000). In den heterophilen Granulozyten der Hühner ordnen sich die Vimentinfilamente fokal an, so dass immunhistochemisch ein deutlich granuläres Reaktionsmuster zu erkennen ist. Sie bilden demnach, entgegen ihrer Anordnung in den Monozyten der Hühner, kein zytoplasmatisches Netzwerk. Der Tubulin-Antikörper bindet mit schwacher Affinität an die heterophilen Granulozyten des Huhnes. Diese Reaktion ist jedoch nur vereinzelt punktförmig im Zytoplasma sichtbar. Dabei könnte es sich um die aus Mikrotubuli bestehenden Zentriolen handeln, die bei den aviären heterophilen Granulozyten eine zentrale Position im Zytoplasma einnehmen (Maxwell, 1973).

Die eosinophilen Granulozyten des Huhnes reagieren im submembranösen

Bereich und in den Granula überwiegend stark positiv mit Phalloidin-TRITC. Dies deutet auf das Vorkommen von Aktinfilamenten unterhalb der Membran und in den eosinophilen Granula hin. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Befunden von Maxwell (1978), der zwar bei anderen Vogelarten dichte Bündel von Aktinfilamenten in den eosinophilen Granula nachweisen konnte, nicht jedoch bei Hühnern. In den eosinophilen Granula des Kuhreihers konnte er darüber hinaus Mikrotubuli darstellen (Maxwell, 1978). Auch in den eosinophilen Granula der Hühner findet vereinzelt eine schwache Bindung des Tubulin-Antikörpers statt. Beim Nachweis von Vimentin zeigen sich im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten deutlich granuläre fluoreszierende Reaktionsprodukte. Bei Amphibien konnten über die gesamte Zelle verlaufende Intermediärfilamente festgestellt werden (Koonce et al., 1984).

In den basophilen Granulozyten sind zytoplasmatische Aktin- und Vimentinfilamente enthalten, während in dem Bereich unter der Membran keine zytoskelettalen Elemente nachweisbar sind. Der Tubulin-Antikörper bindet nicht an die basophilen Granulozyten der Hühner. In den humanen basophilen Granulozyten konnte gezeigt werden, dass Tubulin und Aktin eine wichtige Rolle bei der Histaminfreisetzung spielen. Nielsen und Mitarbeiter (2004) beschreiben die netzartige Anordnung der Aktinfilamente um die Granula der Mastzellen (Nielsen et al., 2004). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die ebenfalls das Vorkommen von Aktinfilamenten im Zytoplasma der aviären basophilen Granulozyten zeigen. Beim Nachweis von Vimentin sind regelmäßig verteilte positive feingranuläre Reaktionen im Zytoplasma zu beobachten. Vimentin scheint folglich auch in den basophilen Granulozyten globulär vorzuliegen.

Das Zytoskelett der Lymphozyten des Huhnes ist ebenfalls aus Aktin, Vimentin und Tubulin aufgebaut. Beim Nachweis von Aktin zeigt sich eine positive Reaktion des submembranösen Bereichs und des Zytoplasmas, wobei diffuse und granuläre Reaktionsmuster sichtbar werden. Daraus lässt sich schließen, dass Aktin ein Netzwerk im Zytoplasma und unter der Membran bildet. Bei den granulären Reaktionen handelt es sich vermutlich um quer angeschnittene Aktinfilamente des zytoplasmatischen Netzwerks. In den humanen Lymphozyten sind die Aktinfilamente vor allem in der submembranösen Region lokalisiert, während Vimentin ein Geflecht im Zytoplasma bildet (Brown et al., 2001). Vimentin ist auch in den Lymphozyten des Huhnes im Zytoplasma lokalisiert. Beim immunhistochemischen Nachweis von Tubulin wird in den Hühnerlymphozyten ein sternförmiges Verteilungsmuster erkennbar. Diese

Befunde zeigen deutlich den von den Zentriolen ausgehenden radiären Verlauf der Mikrotubuli in die Peripherie der Zelle. Auch beim Menschen besitzen die Mikrotubuli in den Lymphozyten einen vom Zentrosom ausgehenden strahlenförmigen Verlauf (Brown et al., 2001). Maxwell (1974) beschreibt, dass die Zentriolen und Mikrotubuli in den aviären Lymphozyten meist gegenüber des Zellkernes lokalisiert sind (Maxwell, 1974). Dies wird zum Teil auch in den vorliegenden Ergebnissen sichtbar.

Die Monozyten des Huhnes reagieren im Zytoplasma deutlich positiv mit Phalloidin-TRITC. Dabei erstrecken sich die Aktinfilamente teilweise bis in die Pseudopodien. Auch Untersuchungen von Meloni (2011) bei humanen Monozyten zeigen ein Aktinnetzwerk im Zytoplasma bis in die Filopodien hinein (Meloni, 2011). Die vorliegenden Ergebnisse belegen außerdem, dass auch Vimentinfilamente in den Hühnermonozyten ein deutliches zytoplasmatisches Netzwerk bilden, welches sich über die gesamte Zelle erstreckt. Beim immunhistochemischen Nachweis von Tubulin zeigt sich ebenfalls ein netzartiges Reaktionsmuster. Darüber hinaus sind granuläre Reaktionen zu erkennen, die vermutlich quer angeschnittene Mikrotubuli des zytoplasmatischen Netzwerks darstellen. Maxwell (1974) konnte in den aviären Monozyten elektronenmikroskopisch ebenfalls Mikrotubuli darstellen (Maxwell, 1974).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich bei dem Verteilungsmuster der zytoskelettalen Elemente lediglich um eine Momentaufnahme handelt. Das Zytoskelett besitzt eine hohe Wandlungsfähigkeit, die auf dem reversiblen Auf- und Abbau der Zytoskelettproteine beruht (Strukov et al., 1983). Vor allem die Mikrotubuli sind sehr labil und können schnell und dynamisch auf- und abgebaut werden (Liebich, 2010). Aber auch die eher stabilen Intermediärfilamente unterliegen dynamischen Veränderungen (Muszbek, 1987; Gyoeva und Gelfand, 1991; Tablin, 2000). Eine Divergenz zwischen den vorliegenden Befunden und den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen kann außerdem auf verschiedenen Fixierungs- und Nachweismethoden beruhen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit dient der umfassenden Charakterisierung der Blutzellen des Haushuhnes (*Gallus gallus domesticus*) anhand von ultrastrukturellen, glykohistochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen. Hierbei können die genaue Morphologie und Ultrastruktur, die Kohlenhydratstrukturen, spezifische Antigene der T-Lymphozyten und die zytoskelettalen Elemente der Hühnerblutzellen nachgewiesen und dargestellt werden. Für die Untersuchungen wurden Blutproben von insgesamt dreißig weiblichen und männlichen Hühnern der Legelinien Lohmann Brown und Lohmann Selected Leghorn herangezogen. Es können keine geschlechts- oder rassespezifischen Unterschiede in der Morphologie und Histochemie der Blutzellen festgestellt werden.

Mittels verschiedener lichtmikroskopischer Färbungen, wie der Diff-Quick-Färbung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, May-Grünwald-Färbung, Giemsa-Färbung, Pappenheim-Färbung, Sirius-Red-Färbung, Toluidinblau-Färbung, PAS-Reaktion und Alcianblau-Färbung wurden die Hühnerblutzellen lichtmikroskopisch und substrathistochemisch untersucht. Für die Darstellung der Erythrozyten, heterophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten sind alle angewandten Übersichtsfärbungen ähnlich gut geeignet, wobei sich die Thrombozyten mit ihren zytoplasmatischen Ausläufern und basophilen bzw. eosinophilen Granula und die Monozyten in der Diff-Quick-Färbung besonders deutlich zeigen. Auch die Lymphozyten unterschiedlicher Größe, die lichtmikroskopisch ebenfalls eosinophile und basophile zytoplasmatische Granula aufweisen, sind mit der einfach durchführbaren Diff-Quick-Färbung gut darstellbar. Die beim Säugetier zur gezielten Anfärbung der eosinophilen Granulozyten eingesetzte Sirius-Red-Färbung ist beim Huhn weniger gut geeignet. Vielmehr bewähren sich beim Huhn die May-Grünwald-, Giemsa- und Pappenheim-Färbung für die deutliche Darstellung der eosinophilen Granula. Die Granula der basophilen Granulozyten werden durch den Färbevorgang meist ausgewaschen. Die Identifizierung und Anfärbung der charakteristischen basophilen Granula gelingt lediglich mit der May-Grünwald-, Pappenheim- und Toluidinblau-Färbung. Die positive Alcianblau-Färbung in den heterophilen und basophilen Granulozyten zeigt, dass diese carboxylierte und sulfatierte saure Glykoproteine enthalten. Durch die PAS-Reaktion können in den Thrombozyten, heterophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten komplexe Kohlenhydrate bzw. Glykogen nachgewiesen werden.

Die Ultrastruktur der Hühnerblutzellen wurde mittels transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchungen dargestellt und analysiert. So ist in den Erythrozyten das oft beschriebene marginale Band aus Mikrotubuli nicht enthalten. Die Thrombozyten weisen charakteristischerweise spezifische Granula auf, die sich als teils vakuolisierte zytoplasmatische Einschlüsse darstellen. Im Gegensatz zu den heterophilen Granulozyten, in denen primäre, sekundäre und tertiäre Granula zu differenzieren sind, ist in den eosinophilen Granulozyten nur ein Granulatyp erkennbar. Außerdem liegen die Granula der eosinophilen Granulozyten weniger dicht im Zytoplasma. Die Lymphozyten zeichnen sich durch ihr hohes Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis und die wenigen Zellorganellen aus und unterscheiden sich dadurch von den zellorganellen- und zytoplasmareichen Monozyten.

Anhand glykohistochemischer Methoden wurden die Zuckerstrukturen auf den Blutzellen des Huhnes charakterisiert. Hierfür wurden die Pflanzenlektine Concanavalin Agglutinin (ConA), Lens culinaris Agglutinin (LCA), Pisum sativum Agglutinin (PSA), Peanut Agglutinin (PNA), Ricinus communis Agglutinin (RCA), Viscum album Agglutinin (VAA), Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSL I), Sophora japonica Agglutinin (SJA), Dolichos biflorus Agglutinin (DBA), Soybean Agglutinin (SBA), Sambucus nigra Agglutinin (SNA), Wheat germ Agglutinin (WGA), Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs), Ulex europaeus Agglutinin I (UEA I), Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E), Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L) und Maackia amurensis Agglutinin I (MAA I) auf ihr Bindungsverhalten an die verschiedenen Blutzellen untersucht. Die Lektine ConA, LCA, PSA, SNA, WGA und WGAs binden mit starker Affinität an die Blutzellen des Huhnes, insbesondere an die heterophilen und basophilen Granulozyten. Bei PNA, RCA, PHA-E, PHA-L, MAA I, VAA und DBA ist eine moderate bis schwache Bindung zu beobachten, während die Lektine GSL I, SJA, SBA und UEA I nicht an die Hühnerblutzellen binden. Die Ergebnisse der lektinhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass die Glykokonjugate der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten der Hühner regelmäßig D-Mannose, D-Glukose und N-Acetyl-D-Glukosamin enthalten. Des Weiteren sind einige N-Acetyl-D-Neuraminsäure-haltige Glykane vorhanden, was sich durch die insgesamt abgeschwächte Bindung des succinylierten WGA (WGAs) im Gegensatz zu WGA manifestiert. Die stark positive Reaktion des D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifischen Lektins SNA lässt außerdem auf ein vermehrtes Vorkommen von D-Galaktoseresten schließen, da die N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifischen Lektine (GSL I, SJA, SBA, DBA) überwiegend nicht

an zelluläre Strukturen der Hühnerblutzellen binden. L-Fukose kann in den Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten der Hühner nicht nachgewiesen werden.

Die immunhistochemische Darstellung spezifischer Antigene der T-Lymphozyten und der eosinophilen Granulozyten ergibt, dass das CD4- und CD8 α -Antigen in den Lymphozyten überwiegend granulär vorliegt. Außerdem zeigt sich, dass das CD4-Antigen außerdem in manchen heterophilen Granulozyten exprimiert wird. Der in dieser Arbeit angewandte EMBP-Antikörper ist beim Huhn zur Identifizierung der eosinophilen Granulozyten nicht geeignet.

Ferner wurde mit Phalloidin-TRITC und FITC-markierten spezifischen Antikörpern der Aufbau des Zytoskeletts der Hühnerblutzellen untersucht. Dabei wird deutlich, dass in den Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten der Hühner die drei wesentlichen Zytoskelettelemente, wie Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli vertreten sind. Direkt unter der Zellmembran lassen sich Aktinfilamente lokalisieren, während Vimentin und Tubulin überwiegend im Zytoplasma der Blutzellen vorkommen. In den Erythrozyten ist kein marginales Band aus Mikrotubuli nachweisbar. Für den Nachweis der zytoskelettalen Elemente ist die Vorbehandlung der Ausstriche von Bedeutung. So können Vimentin und Tubulin nur in den mit Methanol fixierten Ausstrichen deutlich dargestellt werden, während Aktin lediglich in den unfixierten Ausstrichen nachweisbar ist. Zytokeratin und Myosin sind in den Hühnerblutzellen nicht vorhanden.

VII. SUMMARY

Ultrastructural, glycohistochemical and immunohistochemical studies of chicken blood cells

This thesis aims to comprehensively characterize chicken blood cells using ultrastructural, glycohistochemical and immunohistochemical techniques. In this study, the morphology, ultrastructure, carbohydrates, specific antigens of T-lymphocytes and the cytoskeleton components of the chicken blood cells are analyzed. In order to obtain representative results, blood samples of thirty female and male chickens from the laying hen strains Lohmann Brown and Lohmann Selected Leghorn were used within this study. No morphological or histochemical differences of the blood cells based on sex or breed were found.

For the lightmicroscopical and substrate-histochemical characterization of the chicken blood cells, several light microscopical staining methods (Diff-Quick, Hematoxylin and Eosin, May-Grünwald, Giemsa, Pappenheim, Sirius-Red, Toluidine blue, PAS-reaction and Alcian blue) were applied. Erythrocytes, heterophilic granulocytes, monocytes and thrombocytes can be equally well characterized by any of the conventional blood staining techniques. However, the thrombocytes, monocytes and lymphocytes stain most clearly when using the Diff-Quick staining method. Staining with May-Grünwald, Giemsa and Pappenheim is particularly well suited for the visualization of eosinophilic granulocytes. The granules of the basophilic granulocytes were mostly lost during the staining process. Identification and staining of the characteristic basophilic granules was usually successful with the May-Grünwald-, Pappenheim- and Toluidine blue- staining. Using substrate-histochemical stainings, carboxylated and sulphated acidic glycoproteins could be identified in heterophilic and basophilic granulocytes. Furthermore, thrombocytes, heterophilic granulocytes, eosinophilic granulocytes, lymphocytes and monocytes contain complex carbohydrates or glycogen.

The ultrastructure of chicken blood cells was examined by transmission electron microscopy. Different to several former studies no marginal band of microtubules could be identified in the erythrocytes. Thrombocytes typically exhibit specific granules, which have been identified as partly vacuolated cytoplasmic inclusions. In heterophilic granulocytes, primary, secondary and tertiary granules can clearly be differentiated, whereas only one type of granules is present in the eosinophilic granules. Furthermore, the number of granules is smaller in the eosinophilic

granulocytes compared to heterophilic granulocytes. Lymphocytes are characterized by a big round nucleus and a small rim of cytoplasm containing only few cellular organelles. Therefore they differ considerably from the monocytes, which are rich in cell organelles and cytoplasm.

For the characterization of glycoconjugates of chicken blood cells, the lectins concanavalin agglutinin (ConA), lens culinaris agglutinin (LCA), pisum sativum agglutinin (PSA), peanut agglutinin (PNA), ricinus communis agglutinin (RCA), viscum album agglutinin (VAA), griffonia simplicifolia agglutinin I (GSL I), sophora japonica agglutinin (SJA), dolichos biflorus agglutinin (DBA), soybean agglutinin (SBA), sambucus nigra agglutinin (SNA), wheat germ agglutinin (WGA), wheat germ agglutinin succinylated (WGAs), ulex europaeus agglutinin I (UEA I), phaseolus vulgaris erythroagglutinin (PHA-E), phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) and maackia amurensis agglutinin I (MAA I) were used. The lectins ConA, LCA, PSA, SNA, WGA and WGAs exhibit a strong affinity to the chicken blood cells, especially to the heterophilic and basophilic granulocytes. The lectins GSL I, SJA, SBA and UEA I do not bind to any cellular structures of the chicken blood cells. The results of the lectine-histochemical studies demonstrate that the chicken blood cells usually contain D-mannose, D-glucose and N-acetyl-D-glucosamine, as well as some D-galactose- and N-acetyl-D-neuraminic acid containing glycans. No evidence was found for the presence of L-fucose in erythrocytes, thrombocytes and leukocytes.

The immunohistochemical characterization reveals the presence of the CD4- and CD8 α -antigen in lymphocytes. In addition, the CD4-antigen is expressed in some heterophilic granulocytes.

To investigate the cytoskeleton of the chicken blood cells, phalloidin-TRITC and FITC-labeled antibodies were used. It was shown that the three basic cytoskeletal components, actin filaments, intermediate filaments and microtubules, are present in the chickens' erythrocytes, thrombocytes and leukocytes. Immediately beneath the cell membrane actin filaments could be localized, whereas vimentin and tubulin are primarily found in the cytoplasm of the chicken blood cells. Regarding the erythrocytes, there is no evidence of a marginal band of microtubules. For the detection of the cytoskeletal elements, the pretreatment of the blood smears is of great importance. After fixation with methanol, for example, vimentin and tubulin can clearly be identified, whereas actin can be detected only in unfixed smears. Neither cytokeratin nor myosin are present in the chicken blood cells.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; KOPITZ, J.; SIEBERT, H.-C. (2006): Wie der Zuckerkode entschlüsselt wird. *Biospektrum*. 12: S. 706–709.
- ANDREASEN, C.; LATIMER, K. (1990): Cytochemical staining characteristics of chicken heterophils and eosinophils. *Veterinary Clinical Pathology*. 19: S. 51–54.
- AUB, J.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. (1963): Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 50: S. 613-619.
- AUGER, M.J.; ROSS, J.A. (1992): The biology of the macrophage. In: *The Natural Immune System. The Macrophage*. Lewis, C.E.; Mc Gee, J.O. (Hrsg.). Oxford University Press, New York. S. 3–74.
- BARRETT, L.A.; DAWSON, R.B. (1974): Avian erythrocyte development: microtubules and the formation of the disk shape. *Developmental Biology*. 36: S. 72–81.
- BAUMANN, R.; DRAGON, S. (2005): Erythropoiesis and red cell function in vertebrate embryos. *European Journal of Clinical Investigation*. 35 Suppl 3: S. 2-12.
- BEHNKE, O. (1970): A comparative study of microtubules of disk-shaped blood cells. *Journal of Ultrastructure Research*. 31: S. 61-75.
- BELLEVILLE, J.; CORNILLON, B.; PAUL, J.; BAGUET, J.; CLENDINNEN, G.; ELOY, R. (1982): Haemostasis, blood coagulation and fibrinolysis in the japanese quail. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 71: S. 219–230.
- BENGTSSON, T.; ORSELIUS, K.; WETTERO, J. (2006): Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. *Cell Biology International*. 30: S. 154-163.
- BENNETT, H. (1963): Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 11: S. 14–23.
- BILLADEAU, D.; NOLZ, J.; GOMEZ, T. (2007): Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nature Reviews Immunology*. 7: S. 131–143.
- BISWAS, P. (2003): Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils. *Blood*. 101: S. 4452–4456.
- BOND, C.; GILBERT, P. (1958): Comparative study of blood volume in representative aquatic and nonaquatic birds. *American Journal of Physiology*. 194: S. 519–521.
- BONNEY, R.J.; DAVIES, P. (1984): Possible autoregulatory functions of the secretory products of mononuclear phagocytes. *Contemporary Topics in Immunobiology*. 14: S. 199–223.
- BOUNOUS, D.I.; STEDMAN, N.L. (2000): Normal avian haematology: Chicken and Turkey. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (Hrsg.). 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- BOYD, W.; SHAPLEIGH, E. (1954): Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*. 119: S. 419-419.

- BRANTON, D.; COHEN, C.; TYLER, J. (1981): Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell and Tissue Research*. 24: S. 24–32.
- BROOKS, R.; BOUNOUS, D.; ANDREASEN, C. (1996): Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. *Comparative Haematology International*. 6: S. 153–159.
- BROWN, M.; HALLAM, J.; COLUCCI-GUYON, E.; SHAW, S. (2001): Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *The Journal of Immunology*. 166: S. 6640–6646.
- BRUNE, K.; SPITZNAGEL, J. (1973): Peroxidaseless chicken leukocytes: isolation and characterization of antibacterial granules. *Journal of Infectious Diseases*. 127: S. 84–94.
- BRUNE, K.; SPITZNAGEL, J.; LEFFELL, M. (1972): Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophil leukocytes. *Infection and Immunity*. 5: S. 283–287.
- BURTON, A.L.; HIGGINBOTHAM, R.D. (1966): Response of blood basophils to Rous sarcoma virus infection in chicks and its significance. *Journal of the Reticuloendothelial Society*. 3: S. 314–326.
- CAHYANINGSIH, U.; KONDO, Y.; ABE, A.; TANABE, A. (1990a): Presence of the diurnal rhythms of granulocyte counts and heterophil activities in chicks. *Japanese Poultry Science*. 27: S. 281–290.
- CAHYANINGSIH, U.; KONDO, Y.; ABE, A.; TANABE, A. (1990b): The diurnal rhythms in lymphocyte counts and antibody formation in chicks. *Japanese Poultry Science*. 27: S. 29–37.
- CAMPBELL, T.W. (1988): *Avian Hematology and Cytology*. 1. Aufl. Iowa State University Press, Ames.
- CAMPBELL, T.W. (1994): Hematology. In: *Avian medicine: Principles and application*. Ritchie, B.W.; Harrison, G.J.; Harrison, L.R. (Hrsg.). Wingers Publishing, Lake Worth.
- CAMPBELL, T.W. (1995): *Avian Hematology and Cytology*. 2. Aufl. Iowa State University Press, Ames.
- CAMPBELL, T.W. (2004): Hematology of birds. In: *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Thrall, M.A. (Hrsg.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- CAMPBELL, T.W.; ELLIS, C.K. (2007): *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3. Aufl. Blackwell Publishing Professional, Ames.
- CAMPBELL, T.W.; DEIN, F.J. (1984): Avian hematology. The basics. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 14: S. 223–248.
- CANFIELD, P. (1998): Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Australian Veterinary Journal*. 76: S. 793–800.
- CARLSON, H.; ALLEN, J. (1969): The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian Diseases*. 13: S. 817–833.
- CARLSON, H.; SWEENEY, P.; TOKARYK, J. (1968): Demonstration of phagocytic and trephocytic activities of chicken thrombocytes by microscopy and vital staining techniques. *Avian Diseases*. 12: S. 700–715.
- CHAN, M.; CHEN, C.-L.; AGER, L.; COOPER, M. (1988): Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *The Journal of Immunology*. 140: S. 2133–2138.

- CHEN, C.-L.; AGER, L.; GARTLAND, G.; COOPER, M. (1986): Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *The Journal of Experimental Medicine*. 164: S. 375–380.
- CHEN, C.-L.; CHANH, T.C.; COOPER, M.D. (1984): Chicken thymocyte-specific antigen identified by monoclonal-antibodies: ontogeny, tissue distribution and biochemical-characterization. *European Journal of Immunology*. 14: S. 385–391.
- CLARK, P.; BOARDMAN, W.; RAIDAL, S. (2009): *Atlas of Clinical Avian Hematology*. 1. Aufl. Wiley-Blackwell, West Sussex.
- CLAVER, J.; QUAGLIA, A. (2009): Comparative morphology, development and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 18: S. 87–97.
- COATES, M.L. (1975): Hemoglobin function in the vertebrates: an evolutionary model. *Journal of Molecular Evolution*. 6: S. 285–307.
- CORBEL, C.; LACOSTE-ELEAUME, A.S.; BLEUX, C.; QUERE, P. (1995): Platelet integrin GPIIb-IIIa homologue identified on chicken thrombocytes. In: *Advances in Avian Immunology Research*. Davison, T.; Bumstead, N.; Kaiser, P. (Hrsg.). Carfax Publishing Company, Abingdon.
- CRAY, C. (2000): Blood and chemistry tables. In: *Manual of Avian Medicine*. Olsen, G.; Orosz, S. (Hrsg.). Mosby, St. Louis.
- DAIMON, T.; CAXTON-MARTINS, A. (1977): Electron-microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leukocytes. *Journal of Anatomy*. 123: S. 553–562.
- DAIMON, T.; UCHIDA, K. (1978): Electron microscopic and cytochemical observations on the membrane systems of the chicken thrombocyte. *Journal of Anatomy*. 125: S. 11–21.
- DA MATTA, R.; MANHAES, L.; SEABRA, S.; DE SOUZA, W. (1998): Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. *Biocell*. 22: S. 45–52.
- DAVIES, H. (1961): Structure in nucleated erythrocytes. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 9: S. 671–687.
- DESMIDT, M.; VAN NEROM, A.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; YSEBAERT, M. (1996): Oxygenation activity of chicken blood phagocytes as measured by luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 53: S. 303–311.
- DHODAPKAR, B.; VEGAD, J.; KOLTE, G. (1982): Demonstration of the phagocytic-activity of chicken basophils in the reversed arthus reaction using colloidal carbon. *Research in Veterinary Science*. 33: S. 377–379.
- DIETERIEN-LIEVRE, F. (1988): Birds. In: *Vertebrate Blood Cells*. Rowley, A.F.; Ratcliffe, N.A. (Hrsg.). Cambridge University Press, Cambridge. S. 257–336.
- DJILALI, S.; BOULOUIS, H.; MONTAGUTELLI, X. (1987): Lymphocyte markers in domestic animals. 1. Mitogenic lectins and non-mitogenic lectins. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 10: S. 187–204.
- DOBŠINSKÝ, O.; DOBŠINSKÁ, E. (1976): Seasonal changes in the blood picture of adult pheasants. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*. Reihe A. 23: S. 609–615.

- DRI, P.; BISIACCHI, B.; CRAMER, R.; BELLAVITE, P.; NICOLA, G.; PATRIARCA, P. (1978): Oxidative metabolism of chicken polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 22: S. 159–166.
- DUK, M. (2000): Isolation and characterization of glycophorin from nucleated (chicken) erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 375: S. 111–118.
- DUSBABEK, F.; SKARKOVASPAKOVA, V.; VITOVEC, J.; STERBA, J. (1988): Cutaneous and blood leucocyte response of pigeons to larval *Argas polonicus* feeding. *Folia Parasitologica*. 35: S. 259–268.
- EDMONDS, R. (1968): Electron microscope studies on the hemostatic process in bird embryos: I. The Initial Plug. *Journal of Ultrastructure Research*. 24: S. 295–310.
- EDMONDS, R. (1970): Electron microscope studies on the hemostatic process in bird embryos: II. In vivo phagocytosis by nucleated thrombocytes. *Journal of Ultrastructure Research*. 30: S. 184–194.
- EGUCHI, M.; OZAWA, T.; SUDA, J.; SUGITA, A.; FURUKAWA, T. (1989): Lectins for electron-microscopic distinction of eosinophils from other blood-cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 37: S. 743–749.
- ERF, G.; BOTTJE, W.; BERSI, T. (1998): CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 62: S. 339–348.
- ERICSSON, J.; NAIR, M. (1973): Electron microscopic demonstration of acid phosphatase activity in the developing and mature heterophils of the chicken. *Histochemie*. 37: S. 97–105.
- ESPADA, Y. (2000): Avian hemostasis. In: Schalm's *Veterinary Hematology*. Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (Hrsg.). 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- EVANS, E.; BEACH, G.; WUNDERLICH, J.; HARMON, B. (1994): Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 56: S. 661–665.
- FAWCETT, D.; WITTEBSKY, F. (1964): Observations on the ultrastructure of nucleated erythrocytes and thrombocytes, with particular reference to the structural basis of their discoidal shape. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 62: S. 785–806.
- FERRER, M.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, T.; CARRILLO, J.C.; CASTROVIEJO, J. (1987): Hematocrit and blood-chemistry values in captive raptors (*Gyps fulvus*, *Buteo buteo*, *Milvus migrans*, *Aquila heliaca*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 87: S. 1123–1127.
- FERRIS, M.; BACHA, W.J. (1986): Response of leukocytes in chickens infected with the avian schistosome *Austrobilharzia variglandis* (Trematoda). *Avian Diseases*. 30: S. 683–686.
- FLOWER, R.; WILCOX, G. (1981): Identification of a subpopulation of chicken B lymphocytes by the lectin from *Lotus tetragonolobus*. *Journal of Immunological Methods*. 46: S. 347–352.
- FORKNER, C. (1929): Blood and bone marrow cells of the domestic fowl. *The Journal of Experimental Medicine*. 50: S. 121–141.
- FOX, A.J.; SOLOMON, J.B. (1981): Chicken non-lymphoid leukocytes. In: *Avian Immunology*. Rose, L.; Payne, L.; Freeman, M. (Hrsg.). British Poultry Science Limited, Edinburgh.

- FOX, J. (2001): Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thrombosis and Haemostasis*. 86: S. 198–213.
- FRANZ, H. (1990): 100 Jahre Lektinforschung- eine Bilanz. *Naturwissenschaften*. 77: S. 103–109.
- GABIUS, H.-J. (2008): Glycans: bioactive signals decoded by lectins. *Biochemical Society Transactions*. 36: S. 1491–1496.
- GABIUS, H.-J. (2009): *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- GABIUS, H.-J.; ANDRÉ, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; SOLÍS, D. (2011): From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences*. 36: S. 298–313.
- GOLDSTEIN, I.J.; PORETZ, R.D. (1986): Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: *The Lectins - Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Liener, I.E.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. (Hrsg.). Academic Press, Orlando. S. 35-250.
- GRANGER, B. (1980): Synemin: a new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle. *Cell and Tissue Research*. 22: S. 727–738.
- GRANGER, B.; LAZARIDES, E. (1982): Structural associations of synemin and vimentin filaments in avian erythrocytes revealed by immunoelectron microscopy. *Cell and Tissue Research*. 30: S. 263–275.
- GRANGER, B.; LAZARIDES, E. (1984): Membrane skeletal protein 4.1 of avian erythrocytes is composed of multiple variants that exhibit tissue-specific expression. *Cell and Tissue Research*. 37: S. 595–607.
- GRANGER, B.; REPASKY, E.; LAZARIDES, E. (1982): Synemin and vimentin are components of intermediate filaments in avian erythrocytes. *The Journal of Cell Biology*. 92: S. 299–312.
- GRECCHI, R.; SALIBA, A.; MARIANO, M. (1980): Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. *The Journal of Pathology*. 130: S. 23-31.
- GYOEVA, F.K.; GELFAND, V.I. (1991): Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature*. 353: S.445-448.
- HABERMANN, F.A.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; KUEBLER, D.; SINOWATZ, F.; GABIUS, H.-J. (2011): Galectins as tools for glycan mapping in histology: comparison of their binding profiles to the bovine zona pellucida by confocal laser scanning microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*. 135: S. 539-552.
- HARMON, B. (1990): Disassociation of bactericidal and fungistatic activities from the oxidative burst of avian macrophages. *American Journal of Veterinary Research*. 51: S. 71–75.
- HARMON, B. (1998): Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science*. 77: S. 972–977.
- HARRIS, J.R.; BROWN, J.N. (1971): Fractionation of the avian erythrocyte: an ultrastructural study. *Journal of Ultrastructure Research*. 36: S. 8-23.
- HAURY, M.; KASAHARA, Y.; SCHAAL, S.; BUCY, R.P.; COOPER, M.D. (1993): Intestinal T-lymphocytes in the chicken express an integrin-like antigen. *European Journal of Immunology*. 23: S. 313-319.
- HAZELWOOD, R.L. (1986): Carbohydrate metabolism. In: *Avian Physiology*. Sturkie, P.D. (Hrsg.). 4. Aufl. Springer-Verlag, New York.

- HEBERT, R.; NANNEY, J.; SPANO, J.; PEDERSOLI, W. (1989): Erythrocyte distribution in ducks. *American Journal of Veterinary Research*. 50: S. 958–960.
- HODGES, R.D. (1977): Normal Avian (Poultry) Haematology. In: *Comparative Clinical Haematology*. Archer, R.K.; Jeffcott, L.B. (Hrsg.). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- HOLMES, K.C.; POPP, D.; GEBHARD, W.; KABSCH, W. (1990): Atomic model of the actin filament. *Nature*. 347: S. 44-49.
- HOWLETT, J.; BAILEY, T.; SAMOUR, J.; NALDO, J.; D'ALOIA, M. (2002): Age-related hematologic changes in captive-reared houbara, white-bellied, and rufous-crested bustards. *Journal of Wildlife Diseases*. 38: S. 804–816.
- ISAACKS, R.E.; KIM, C.Y.; LEGATO, T.J.; JOHNSON, A.E.; GOLDMAN, P.H.; HARKNESS, D.R.; COSTA, A. (1980): Studies on avian erythrocyte metabolism. IX. Relationship of changing organic phosphate composition to whole blood oxygen affinity during development of the ostrich (*Struthio camelus camelus*). *Developmental Biology*. 75: S. 485-491.
- JAIN, N.C. (1993): *Essentials of Veterinary Hematology*. 1. Aufl. Lea & Febiger, Philadelphia.
- JANZARIK, H. (1981): Nucleated thrombocytoid cells 2. Phase- and interference-contrast microscopic studies on blood cells of the domestic fowl. *Cell and Tissue Research*. 219: S. 497–510.
- JÖRNS, J.; MANGOLD, U.; NEUMANN, U.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; PFÜLLER, U.; SCHUMACHER, U. (2003): Lectin histochemistry of the lymphoid organs of the chicken. *Anatomy and Embryology*. 207: S. 85–94.
- JOSEPH-SILVERSTEIN, J.; COHEN, W. (1984): The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. 3. Marginal band function in mature cells. *The Journal of Cell Biology*. 98: S. 2118–2125.
- KELENYI, G.; NEMETH, A. (1969): Comparative histochemistry and electron microscopy of eosinophil leucocytes of vertebrates. 1. A study of avian, reptile, amphibian and fish leucocytes. *Acta biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 20: S. 405–422.
- KIMBALL, J.W. (1990): *Introduction to Immunology*. Macmillan Publishing, New York.
- KONDO, Y.; CAHYANINGSIH, U.; ABE, A.; TANABE, A. (1992): Presence of the diurnal rhythms of monocyte count and macrophage activities in chicks. *Poultry Science*. 71: S. 296–301.
- KOONCE, M.; CLONEY R.A.; BERNS M.W. (1984): Laser irradiation of centrosomes in newt eosinophils: evidence of centriole role in motility. *The Journal of Cell Biology*. 98: S. 1999–2010.
- KRIESTEN, K.; ENBERGS, H. (1969): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den heterophilen Granulozyten des Haushuhns. *Experientia*. 25: S. 307–308.
- KUNICKI, T.; NEWMAN, P. (1985): Synthesis of analogs of human-platelet membrane glycoprotein-IIb-IIIa complex by chicken peripheral-blood thrombocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82: S. 7319–7323.
- KURUMA, I.; OKADA, T.; KATAOKA, K.; SORIMACHI, M. (1970): Ultrastructural observation of 5-hydroxytryptamine-storing granules in the domestic fowl thrombocytes. *Cell and Tissue Research*. 108: S. 268–281.

- LAM, K.M. (1997): Activation, adhesion, migration and death of chicken thrombocytes. *Comparative Haematology International*. 7: S. 81–87.
- LAM, K.M.; KABBUR, M.B.; EISERICH, J.P. (1996): Newcastle disease virus-induced functional impairments and biochemical changes in chicken heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 53: S. 313-327.
- LATIMER, K.; BIENZLE, D. (2000): Determination and interpretation of the avian leukogram. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (Hrsg.). 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. S. 417-432.
- LATIMER, K.; TANG, K.; GOODWIN, M.; STEFFENS, W.; BROWN, J. (1988): Leukocyte changes associated with acute inflammation in chickens. *Avian Diseases*. 32: S. 760–772.
- LAZARIDES, E. (1980): Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*. 283: S. 249–256.
- LEE, K.; MILLER, T.; ANASTASSOV, I.; COHEN, W. (2004): Shape transformation and cytoskeletal reorganization in activated non-mammalian thrombocytes. *Cell Biology International Reports*. 28: S. 299–310.
- LEE, T.H.; TEMPELIS, C.H. (1992): A possible 110-kDa receptor for interleukin-2 in the chicken. *Developmental & Comparative Immunology*. 16: S. 463-472.
- LEE, M.; TURCINOV, D.; DAMJANOV, I. (1987): Lectins as markers for eosinophilic leukocytes. *Histochemistry*. 86: S. 269–273.
- LEHMANN, F.; TIRALONGO, E.; TIRALONGO, J. (2006): Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63: S. 1331–1354.
- LIEBICH, H.-G. (2010): *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. 5.Aufl. Schattauer, Stuttgart.
- LINDHORST, T. (2000): Wenn Zucker-Attrappen Bakterien zum Narren halten. *Spektrum der Wissenschaft*. März: S. 16–21.
- LIS, H.; SHARON, N. (1973): The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Annual Review of Biochemistry*. 42: S. 541–574.
- LÖSCH, U.; CIHAK, J.; ERHARD, M.; KASPERS, B. (2000): Blut und Abwehr. In: *Physiologie der Haustiere*. Engelhardt, W.; Breves, G. (Hrsg.). Enke, Stuttgart.
- LUCAS, A.M.; JAMROZ, C. (1961): *Atlas of Avian Hematology*. United States Department of Agriculture, Washington.
- LUHTALA, M.; SALOMONSEN, J.; HIROTA, Y.; ONODERA, T.; TOIVANEN, P.; VAINIO O. (1993): Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species. *Hybridoma*. 12: S. 633–646.
- LUMEIJ, J.T. (1987): A contribution to clinical investigative methods for birds with special reference to the racing pigeon, *Columba livia domestica*. PhD thesis. University of Utrecht, Utrecht. S. 3-17.
- MASER, M.; PHILPOTT, C. (1964): Marginal bands in nucleated erythrocytes. *The Anatomical Record*. 150: S. 365-381.
- MAXWELL, M. (1973): Comparison of heterophil and basophil ultrastructure in 6 species of domestic birds. *Journal of Anatomy*. 115: S. 187–202.

- MAXWELL, M. (1974): Ultrastructural comparison of mononuclear leukocytes and thrombocytes in 6 species of domestic bird. *Journal of Anatomy*. 117: S. 69–80.
- MAXWELL, M. (1978): Fine-structure of granules in eosinophil leukocytes from aquatic and terrestrial birds. *Tissue & Cell*. 10: S. 303–317.
- MAXWELL, M. (1981): Leukocyte diurnal rhythms in normal and pinealectomized juvenile female fowls. *Research in Veterinary Science*. 31: S. 113–115.
- MAXWELL, M. (1984): Histochemical identification of tissue eosinophils in the inflammatory response of the fowl (*Gallus domesticus*). *Research in Veterinary Science*. 37: S. 7–11.
- MAXWELL, M. (1986): Fine-structural and cytochemical studies of eosinophils from fowls and ducks with eosinophilia. *Research in Veterinary Science*. 41: S. 135–148.
- MAXWELL, M.; BURNS R.B. (1986): Experimental stimulation of eosinophil production in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *Research in Veterinary Science*. 41: S. 114–123.
- MAXWELL, M.; ROBERTSON, G. (1995): The avian basophilic leukocyte: a review. *World's Poultry Science Journal*. 51: S. 307–325.
- MAXWELL, M.; ROBERTSON, G. (1998): The avian heterophil leucocyte: a review. *World's Poultry Science Journal*. 54: S. 155–178.
- MAXWELL, M.; SILLER, W. (1972): Ultrastructural characteristics of eosinophil granules in 6 species of domestic bird. *Journal of Anatomy*. 112: S. 289–303.
- MC COY, J. (1987): The application of lectins to the characterization and isolation of mammalian cell populations. *Cancer and Metastasis Reviews*. 6: S. 595–613.
- MELONI, M.A.; GALLERI, G.; PANI, G.; SABA, A.; PIPPIA, P.; COGOLI-GREUTER, M. (2011): Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111. *Cytoskeleton*. 68: S. 125–137.
- MEVES, F. (1911): Gesammelte Studien an den roten Blutkörperchen der Amphibien. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 77: S. 465–540.
- MONSIGNY, M.; ROCHE, A.; SENE, C.; MAGET-DANA, R.; DEL MOTTE, F. (1980): Sugar-lectin Interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *European Journal of Biochemistry*. 104: S. 147–153.
- MOON, R.T.; LAZARIDES, E. (1983): Synthesis and post-translational assembly of intermediate filaments in avian erythroid cells: vimentin assembly limits the rate of synemin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80: S. 5495–5499.
- MOON, R.T.; LAZARIDES, E. (1984): Biogenesis of the avian erythroid membrane skeleton: receptor-mediated assembly and stabilization of ankyrin (goblin) and spectrin. *The Journal of Cell Biology*. 98: S. 1899–1904.
- MORAES, A.; MELLO, M. (2006): The Con-A-peroxidase method for tissue localization of glucosyl and mannosyl groups applied to mouse hepatocytes and chicken erythrocytes. *Acta Histochemica*. 108: S. 475–479.
- MULISCH, M.; WELSCH, U. (2010): *Romeis Mikroskopische Technik*. 18. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- MUSZBEK, L.; ADANY, R.; GLUKHOVA, M.A.; FRID, M.G.; KABAKOV, A.E.; KOTELIANSKY, V.E. (1987): The identification of vimentin in human blood platelets. *European Journal of Cell Biology*. 43: 501–504.

- NIELSEN, H.V.; JOHNSEN, A.H.; SCHIOTZ, P.O. (2004): Expression of actin and tubulins in purified human basophil leukocytes upon stimulation with IL-3. *International Archives of Allergy and Immunology*. 133: S. 340-347.
- NIELSEN, L.F.; MOE, D.; KIRKEBY, S.; GARBARSCHE, C. (1998): Sirius red and acid fuchsin staining mechanisms. *Biotechnic & Histochemistry*. 73: S. 71-77.
- NIEMINEN, M.; HENTTINEN, T.; MERINEN, M.; MARTTILA-ICHIHARA, F.; ERIKSSON, J.; JALKANEN, S. (2006): Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nature Cell Biology*. 8: S. 156-162.
- NOWAK, J.; KAI, O.; PECK, R.; FRANKLIN, R. (1982): The effects of cyclosporin A on the chicken immune system. *European Journal of Immunology*. 12: S. 867-876.
- OLINS, A.L.; HERRMANN, H.; LICHTER, P.; OLINS, D.E. (2000): Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization. *Experimental Cell Research*. 254: S. 130-142.
- OSCOLATI, F. (1970): Fine structural localization of acid phosphatase and arylsulfatase in the chick heterophil leucocytes. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 109: S. 398-406.
- O'TOOLE, E.T.; HANTGAN, R.R.; LEWIS, J.C. (1994): Location of fibrinogen during aggregation of avian thrombocytes. *Experimental and Molecular Pathology*. 61: S. 175-190.
- PASSANTINO, L.; MASSARO, M.; JIRILLO, F.; DI MODUGNO, D.; RIBAUD, M.; DI MODUGNO, G.; PASSANTINO, G.; JIRILLO, E. (2007): Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: a conserved phylogenetic function discovered in fish. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 29: S. 141-152.
- PEARSON, E.; DAVIES, H. (1982): Electronmicroscopic observations on the development and cytochemistry of the large granule complexes in chicken erythrocyte nuclei. *Journal of Cell Science*. 55: S. 157-187.
- PLOUCHA, J.; SCOTT, J.; RINGER, R. (1981): Vascular and hematologic effects of hemorrhage in the chicken. *American Journal of Physiology*. 240: S. H9-H17.
- POLLACK, C.; CARPENTER, J.W.; ANTINOFF, N. (2005): Birds. In: *Exotic Animal Formulary*. Carpenter, J. (Hrsg.). 3. Aufl. Elsevier Saunders, St. Louis.
- PRINZINGER, R.; MISOVIC, A. (1994): Vogelblut, eine allometrische Übersicht der Bestandteile. *Journal für Ornithologie*. 135: S. 133-165.
- QURESHI, M.; MILLER, L. (1991): Signal requirements for the acquisition of tumoricidal competence by chicken peritoneal macrophages. *Poultry Science*. 70: S. 530-538.
- QURESHI, M.; DIETERT, R.; BACON, L. (1986): Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 181: S. 560-566.
- RASKIN, R.E.; VALENCIANO, A. (2000): Cytochemistry of normal leukocytes. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (Hrsg.). 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- RATCLIFFE, M.; BOYD, R.; CHEN, C.; VAINIO, O. (1993): Avian CD nomenclature workshops, Montreal, June 1991, Budapest, August 1992 and Tours, September 1992. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 38: S. 375-386.

- RICHELME, F.; BENOLIEL, A.M.; BONGRAND, P. (1996): The leukocyte actin cytoskeleton. *Bulletin de l'Institut Pasteur*. 94: S.257-284.
- ROSE, M.E.; HESKETH, E.P.; OGILVIE, B.M. (1979): Peripheral blood leucocyte response to coccidial infection: a comparison of the response in rats and chickens and its correlation with resistance to reinfection. *Immunology*. 36: S. 71-79.
- ROTH, J. (2011): Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochemistry and Cell Biology*. 136: S. 117–130.
- RÜDIGER, H. (1978): Lectine, pflanzliche zuckerbindende Proteine. *Naturwissenschaften*. 65: S. 239–244.
- RÜDIGER, H. (1981): Lectine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. *Chemie in unserer Zeit*. 15: S. 155–162.
- RÜDIGER, H. (1982): Phythemagglutinins. *Planta Medica*. 46: S. 3–9.
- RÜDIGER, H.; GABIUS, H.-J. (2001): Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*. 18: S. 589–613.
- RÜDIGER, H.; GABIUS, H.-J. (2009): Plant lectins. In: *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Gabius, H.-J. (Hrsg.). Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- RYDER, M.; NIEDERMAN, R.; TAGGART, E. (1982): The cytoskeleton of human polymorphonuclear leukocytes: phagocytosis and degranulation. *The Anatomical Record*. 203. S.317-327.
- SANTOS, A.A.; DA SILVA, A.M.; SILVA, M.R.; SEGRETO, H.R.; EGAMI, M.I. (2003): Structural, cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural characterization of blood granulocytes of the Roadside hawk. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. 35: S. 351-357.
- SASMAL, D.; GUHATHAKURTA, B.; BHATTACHARYA, S.; PAL, C.; DATTA, A. (2002): N-Acetyl-D-glucosamine specific hemagglutinin receptor of *Vibrio cholerae* O1 in chicken erythrocyte membranes. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 32: S. 187–189.
- SCHAUENSTEIN, K.; GLOBERSON, A.; ROSENBERG, M.; SHARON, N.; WICK, G. (1983): Characterization of chicken lymphocyte subsets separated by peanut agglutinin. *Cellular Immunology*. 80: S. 288–300.
- SCHAUENSTEIN, K.; KRÖMER, G.; HÁLA, K.; BÖCK, G.; WICK, G. (1988): Chicken-activated-T-lymphocyte-antigen (CATLA) recognized by monoclonal antibody INN-CH 16 represents the IL-2 receptor. *Developmental & Comparative Immunology*. 12: S. 823-831.
- SCHRÖDER, B.; DIENER, M. (2000): Grundlagen der Zellphysiologie. In: *Physiologie der Haustiere*. Engelhardt, W.; Breves, G. (Hrsg.). Enke, Stuttgart.
- SCHUMACHER, A. (1965): Zur submikroskopischen Struktur der Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten des Haushuhnes. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 66: S. 219-232.
- SHARON, N.; LIS H. (2004): History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14: S. 53R–62R.
- SINOWATZ, F.; HEES, H. (2006): Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 4.Aufl. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- SMITH, F.M.; WEST, H.H.; JONES, D.R. (2000): The cardiovascular system. In: *Sturkie's Avian Physiology*. Whittow, G. (Hrsg.). 5. Aufl. Academic Press, San Diego.

- SORRELL, J. (1988): Ultrastructural localization of peanut lectin binding to extravascular white blood cells in the bone marrow of embryonic chicks. *Cell and Tissue Research*. 251: S. 301–305.
- SOWDER, J.; CHEN, C.-L.; AGER, L.; CHAN, M.; COOPER, M. (1988): A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *The Journal of Experimental Medicine*. 167: S. 315–322.
- SPANGENBERG, P. (1990): Cytoskeleton of thrombocytes. *Acta Histochemica*. 39: S. 385-395.
- STABLER, J.; MC CORMICK, T.; POWELL, K.; KOGUT, M. (1994): Avian heterophils and monocytes - phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Veterinary Microbiology*. 38: S. 293–305.
- STOPFORTH, A. (1970): A study of coagulation mechanisms in domestic chickens. *Journal of Comparative Pathology*. 80: S. 525–533.
- STRUKOV, A.; PAUKOV, V.; KAUFMAN, O. (1983): Leukocyte cellular skeleton under normal and pathological conditions. *Arkhiv Patologii*. 45: S. 81–87.
- STURKIE, P.D. (1976): Blood: physical characteristics, formed elements, haemoglobin and coagulation. In: *Avian Physiology*. Sturkie, P.D. (Hrsg.). 3. Aufl. Springer-Verlag, New York.
- STURKIE, P.D.; GRIMINGER, P. (1986): Body fluids: blood. In: *Avian Physiology*. Sturkie, P.D. (Hrsg.). 4. Aufl. Springer-Verlag, New York.
- SUNG, Y.J.; HOTCHKISS, J.H.; AUSTIC, R.E.; DIETERT, R.R. (1991): L-arginine dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *Journal of Leukocyte Biology*. 50: S. 49-56.
- SWAN, J.A.; SOLOMON, F. (1984): Reformation of the marginal band of avian erythrocytes in vitro using calfbrain tubulin: peripheral determinants of microtubule form. *The Journal of Cell Biology*. 99: S. 2108-2113.
- SWAYNE, D.; STOCKHAM, S.; JOHNSON, G. (1986): Cytochemical properties of chicken blood cells resembling both thrombocytes and lymphocytes. *Veterinary Clinical Pathology*. 15: S. 17–24.
- SWEENEY, P.; CARLSON, H. (1968): Electron microscopy and histochemical demonstration of lysosomal structures in chicken thrombocytes. *Avian Diseases*. 12: S. 636-644.
- TABER, E.; DAVIS, D. (1943): Effect of sex hormones on the erythrocyte number in the blood of the domestic fowl. *American Journal of Physiology*. 138: S. 479–487.
- TABLIN, F. (2000): Platelet structure and function. In: *Schalm`s Veterinary Hematology*. Feldman, B.F. (Hrsg.). 5. Aufl. Williams & Wilkins, Philadelphia. S. 448-452.
- TAFFAREL, M.; OLIVEIRA, M. (1993): Cytochemical analysis of the content of chicken thrombocytes vacuoles. *Cell Biology International Reports*. 17: S. 993–1000.
- TOPP, R.; CARLSON, H. (1972): Studies on avian heterophils III. Phagocytic properties. *Avian Diseases*. 16: S. 374-380.
- VAINIO, O.; RIWAR, B.; BROWN, M.H.; LASSILA, O. (1991): Characterization of the putative avian CD2 homologue. *The Journal of Immunology*. 147: S. 1593-1599.

- VICENTE-MANZANARES, M.; SANCHEZ-MADRID, F. (2004): Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Reviews Immunology*. 4: S. 110–122.
- VICENTE-MANZANARES, M.; SANCHO, D.; YANEZ-MO, M.; SANCHEZ-MADRID, F. (2002): The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions. *International Review of Cytology*. 216: S. 233–289.
- VIDAL, B.C.; MARIA, S.S.; KLACZKO, L.B. (1997): Concanavalin A - reactive nuclear matrix glycoproteins. *Brazilian Journal of Genetics*. 20: S. 631–638.
- VIRTANEN, I.; KURKINEN, M.; LEHTO, V. (1979): Nucleus-anchoring cytoskeleton in chicken red blood cells. *Cell Biology International Reports*. 3: S. 157–162.
- WANG, D.; JIA, X.; SHE, R.; LIU, Y. (2012): Acute hypersensitive-like injury in specific-pathogen-free chickens after infection with very virulent infectious bursal disease virus. *Poultry Science*. 91: S. 334–339.
- WEHREND, A.; HETZEL, U.; HUCHZERMEYER, S.; KLEIN, C.; BOSTEDT, H. (2004): Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 33: S. 180-182.
- WHITE, J.; CLAWSON, C. (1980): The surface-connected canalicular system of blood platelets - a fenestrated membrane system. *The American Journal of Pathology*. 101: S. 353–364.
- WIGLEY, P.; HULME, S.; BARROW, P. (1999): Phagocytic and oxidative burst activity of chicken thrombocytes to *Salmonella*, *Escherichia coli* and other bacteria. *Avian Pathology*. 28: S. 567–572.
- WIRTH, D. (1950): *Grundlagen einer klinischen Hämatologie der Haustiere*. Urban & Schwarzenberg, Wien.
- WU, A.; LISOWSKA, E.; DUK, M.; YANG, Z. (2009): Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconjugate Journal*. 26: S. 899–913.
- YOUNG, J.; DAVISON, T.; TREGASKES, C.; RENNIE, M.; VAINIO, O. (1994): Monomeric homolog of mammalian CD28 is expressed on chicken T-cells. *The Journal of Immunology*. 152: S. 3848–3851.
- ZAULI, D.; GOBBI, M.; CRESPI, C.; TAZZARI, P.; MISEROCCHI, F.; TASSINARI, A. (1988): Cytoskeleton organization of normal and neoplastic lymphocytes and lymphoid cell lines of T and B origin. *British Journal of Haematology*. 68: S. 405–409.
- ZHOU, W.; FUJITA, M.; YAMAMOTO, S. (1998): Effects of food and water withdrawal and high temperature exposure on diurnal variation in blood viscosity of broiler chickens. *British Poultry Science*. 39: S. 156–160.
- ZINKL, J.G. (1986): Avian hematology. In: *Schalm`s Veterinary Hematology*. Jain, N.C. (Hrsg.). 4. Aufl. Lea & Febiger, Philadelphia. S. 256-273.
- ZON, L.I. (1995): Developmental biology of hematopoiesis. *Blood*. 86: S. 2876-2891.

IX. ANHANG

1. Verzeichnis der Gebrauchslösungen

1.1. Lichtmikroskopie

- Haema-Schnellfärbesatz (LABOR + TECHNIK, Berlin)

- Saures Hämalan nach Mayer:

Hämatoxylin krist. (MERCK, Darmstadt)	1g
in Aqua dest. lösen	1000ml
+ Natriumjodat (MERCK, Darmstadt)	0,2g
+ Kaliumaluminiumsulfat = Kalialan (MERCK, Darmstadt)	50g
+ Chloralhydrat (MERCK, Darmstadt)	50g
+ Zitronensäure (MERCK, Darmstadt)	1g

- Eosinlösung:

Eosin-Stammlösung:

Eosin gelblich (MERCK, Darmstadt)	1g
in Aqua dest. lösen	99ml
+ Formaldehyd 37% (ROTH, Karlsruhe)	2 Tropfen

Eosin-Gebrauchslösung:

Eosin-Stammlösung	1Teil
mit Aqua dest. vermischen	10 Teile
+ Essigsäure 100% (MERCK, Darmstadt)	5 Tropfen/ 100ml Lösung

- May-Grünwald-Lösung (MERCK, Darmstadt)

- Giemsa-Lösung (Verdünnung 1:20):

Giemsa-Stammlösung (MERCK, Darmstadt)	1ml
Aqua dest.	19ml

- Sirius-Red-Färbelösung:

Siriusrot F3B (WALDECK, Münster)	500mg
in Aqua dest.	45ml
und Ethanol absolut (MERCK, Darmstadt) lösen	50ml
+ NaOH (MERCK, Darmstadt) 1%	1ml
+ NaCl (MERCK, Darmstadt) 20%	4ml

- Toluidinblau-Färbelösung:

Toluidinblau O (ROTH, Karlsruhe)	1g
Methanol (ROTH, Karlsruhe)	100ml

- 0,5% α -Amylase:

α -Amylase (MERCK, Darmstadt)	10mg
Aqua dest.	2ml

- 0,5% wässrige Perjodsäurelösung:

Perjodsäure (MERCK, Darmstadt)	1g
Aqua dest.	200ml

- Schiff's Reagenz (ROTH, Karlsruhe)

- SO₂-Wasser (Sulfitwasser):

N-Salzsäure:	30ml
3ml Salzsäure konz. (MERCK, Darmstadt)	
27ml Aqua dest.	
10% wässrige Natriumdisulfitlösung:	30ml
3g Natriumdisulfit (MERCK, Darmstadt)	
30ml Aqua dest.	
Leitungswasser	600ml

- Alcianblaulösung pH 1,0/ pH 2,5:

pH 1,0:

Alcianblau 8GX (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	5g
0,1N Salzsäure (MERCK, Darmstadt)	500ml

pH 2,5:

Alcianblau 8GX (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	5g
3% Essigsäure:	500ml
15ml Essigsäure 100% (MERCK, Darmstadt)	
485ml Aqua dest.	

- Kernechtrotlösung:

Aluminiumsulfat (MERCK, Darmstadt)	5g
in Aqua dest. lösen und Lösung erhitzen	100ml
Kernechtrot (MERCK, Darmstadt) einrühren	0,1g

1.2. Elektronenmikroskopie

- 10% Paraformaldehydlösung:

Paraformaldehyd (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	10g
in Aqua dest. bei 60-70°C lösen	100ml
+ 1N NaOH (ROTH, Karlsruhe)	1-2 Tropfen

- Karnovsky-Stammlösung:

10% Paraformaldehydlösung	20ml
0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH7,2)	50ml
Calciumchlorid wasserfrei (SERVA, Heidelberg)	0,05g

- Karnovsky-Gebrauchslösung:

Karnovsky-Stammlösung	10ml
Glutaraldehyd 25% (POLYSCIENCES, Warrington, USA)	1,37ml
→ erst kurz vor Gebrauch anmischen	

- 0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2):

Stammlösung:

Natriumcacodylat (POLYSCIENCES, Warrington, USA) 18,26g

in Aqua dest. lösen 200ml

0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2):

Stammlösung 50ml

0,2M Salzsäure (MERCK, Darmstadt) pH 7,2 einstellen

Aqua dest. auf 100ml auffüllen

- 0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2):

0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) 50ml

Aqua dest. 50ml

- Vorkontrastierungslösung:

3% Kaliumferrocyanid-Stammlösung:

Kaliumferrocyanid (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim) 0,3g

0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) 10ml

2% Osmiumtetroxid-Stammlösung:

4% Osmiumtetroxid (POLYSCIENCES, Warrington, USA) 2ml

0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) 2ml

1,5% Kaliumferrocyanid+1% Osmiumtetroxid

in 0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2):

Kaliumferrocyanid-Stammlösung 4ml

Osmiumtetroxid-Stammlösung 4ml

- Ethanol (MERCK, Darmstadt)
- Propylenoxid (POLYSCIENCES, Warrington, USA)

- Epon:

Poly/Bed[®] 812-BDMA Embedding Kit (POLYSCIENCES, Warrington, USA):

Poly/Bed 812	10ml
DDSA	
8ml	
NMA	5ml
BDMA	0,7ml

- Färbelösung nach Richardson:

1% Methylenblau: 100ml

1g Methylenblau (MERCK, Darmstadt)

100ml Aqua dest.

1% Borax: 100ml

1g Natriumtetraboratdecahydrat (SERVA, Heidelberg)

100ml Aqua dest.

→ Methylenblau-Borax-Lösung 1:1 mit Azurlösung mischen

1% Azur II: 200ml

1g Azur II (WALDECK, Münster)

100ml Aqua dest.

- Uranylacetat (AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England)

- Bleicitrat nach Reynolds:

Bleinitrat (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim) 1,33g

Natriumcitrat (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim) 1,76g

Aqua dest. 30ml

→ 30 Minuten regelmäßig schütteln, bis eine milchige Lösung entsteht

NaOH-Plätzchen (MERCK, Darmstadt)

→ einzeln nacheinander lösen, bis zum Erreichen einer klaren Lösung

Aqua dest. auf 50ml auffüllen

1.3. Glykohistochemie

- FITC markierte Lektine (VECTOR, Burlingame, USA)
- MAA I, SNA, VAA (Lehrstuhl für physiologische Chemie, Veterinärwissenschaftliches Department, LMU München)
- Methanol (MERCK, Darmstadt)

- PBS-Puffer (pH 7,4):

Natriumchlorid (MERCK, Darmstadt)	42,5g
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (MERCK, Darmstadt)	6,35g
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat (MERCK, Darmstadt)	1,95g
→ in Aqua dem. lösen	5 Liter
→ pH 7,4 einstellen mit 1N NaOH und 0,1N HCl (ROTH, Karlsruhe)	

- VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame, USA)
- Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg)
- Streptavidin-FITC (DAKO, Hamburg)
- Methyl- α -Mannopyranosid (E- Y LABS, San Mateo, USA)
- Chitin Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)

- Natrium-Acetatpuffer (pH 5,5):

Natrium-Acetat wasserfrei (MERCK, Darmstadt)	13,6g
In Aqua dem. lösen	1 Liter
→ pH 5,5 mit 10% Essigsäure (ROTH, Karlsruhe) einstellen	

- Natrium-Acetat-Calcium-Chlorid-Puffer (pH 5,0):

Natrium-Acetat wasserfrei (MERCK, Darmstadt)	8,2g
In Aqua dem. lösen	1 Liter
Calcium-Chlorid (MERCK, Darmstadt)	0,294g
→ pH 5,0 mit 1M HCl (ROTH, Karlsruhe) einstellen	
→ Auf Wärmeplatte auf 37°C bis 40°C erwärmen	

- Neuraminidase-Gebrauchslösung:

Neuraminidase von <i>Vibrio cholerae</i> (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	3µl
Natrium-Acetat-Calcium-Chlorid-Puffer (pH 5,0)	1ml
→ Die Temperatur muss zwischen 37°C und 40°C liegen!	

1.4. Immunhistochemie

- Methanol (MERCK, Darmstadt)
- Antibody-Diluent (DAKO, Hamburg)
- CD8 α -Antikörper: Ms mAb to CD8 alpha (FITC) (ABCAM, Cambridge)
- CD4-Antikörper: Ms mAb to CD4 (CT-4) (FITC) (ABCAM, Cambridge)
- PBS-Puffer (pH 7,4): siehe Kapitel Glykohistochemie
- Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg)
- Mouse anti-human Eosinophil Major Basic Protein (EMBP) (AbD SEROTEC, Kidlington)
- Rabbit anti-mouse-IgG-FITC (DAKO, Hamburg)
- VECTASHIELD[®] Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame, USA)
- Phalloidin-TRITC (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)
- Mouse anti-vimentin (DAKO, Hamburg)
- Pancytokeratin plus (BIOCARTA, Hamburg)
- Rabbit anti-non muscle myosin (ABCAM, Cambridge)
- Fluorescein Anti-Rabbit IgG (Made in Goat) (VECTOR, Burlingame)
- Mouse anti-tubulin (ABCAM, Cambridge)

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	Einteilung ausgewählter Pflanzenlektine	30
<i>Tabelle 2:</i>	Übersicht über die untersuchten Hühner und die Untersuchungsmethoden	42
<i>Tabelle 3:</i>	Übersicht über die verwendeten FITC markierten Lektine	51
<i>Tabelle 4:</i>	Übersicht über die verwendeten biotinylierten Lektine	53
<i>Tabelle 5:</i>	Hemmszucker für die Lektinhistochemie	54
<i>Tabelle 6:</i>	Antikörper zum Nachweis von CD4- und CD8-Lymphozyten ...	56
<i>Tabelle 7:</i>	Antikörper zum Nachweis des Major Basic Protein der Eosinophilen Granulozyten	57
<i>Tabelle 8:</i>	Nachweis von F-Aktin mit Phalloidin-TRITC	59
<i>Tabelle 9:</i>	Antikörper zur Untersuchung des Zytoskeletts	60
<i>Tabelle 10:</i>	Kleines Blutbild der einzelnen Hühner	62
<i>Tabelle 11:</i>	Übersichtsfärbungen der Erythrozyten	64
<i>Tabelle 12:</i>	Übersichtsfärbungen der Thrombozyten	66
<i>Tabelle 13:</i>	Substrathistochemie der Thrombozyten	69
<i>Tabelle 14:</i>	Übersichtsfärbungen der heterophilen Granulozyten	70
<i>Tabelle 15:</i>	Substrathistochemie der heterophilen Granulozyten	73
<i>Tabelle 16:</i>	Übersichtsfärbungen der eosinophilen Granulozyten	74
<i>Tabelle 17:</i>	Substrathistochemie der eosinophilen Granulozyten	76
<i>Tabelle 18:</i>	Übersichtsfärbungen der basophilen Granulozyten	78
<i>Tabelle 19:</i>	Substrathistochemie der basophilen Granulozyten	80
<i>Tabelle 20:</i>	Übersichtsfärbungen der Lymphozyten	81
<i>Tabelle 21:</i>	Substrathistochemie der Lymphozyten	84

<i>Tabelle 22:</i>	Übersichtsfärbungen der Monozyten	85
<i>Tabelle 23:</i>	Substrathistochemie der Monozyten	87
<i>Tabelle 24:</i>	Ergebnis ConA	96
<i>Tabelle 25:</i>	Ergebnis LCA	100
<i>Tabelle 26:</i>	Ergebnis PSA	103
<i>Tabelle 27:</i>	Ergebnis PNA	106
<i>Tabelle 28:</i>	Ergebnis RCA	108
<i>Tabelle 29:</i>	Ergebnis DBA	111
<i>Tabelle 30:</i>	Ergebnis SNA	113
<i>Tabelle 31:</i>	Ergebnis WGA	117
<i>Tabelle 32:</i>	Ergebnis WGAs	121
<i>Tabelle 33:</i>	Ergebnis PHA-E	124
<i>Tabelle 34:</i>	Ergebnis PHA-L	126
<i>Tabelle 35:</i>	Ergebnis MAA I	128
<i>Tabelle 36:</i>	Ergebnis CD4- und CD8 α -Antikörperbindung an die Lymphozyten	133
<i>Tabelle 37:</i>	Ergebnis Aktin	136
<i>Tabelle 38:</i>	Ergebnis Vimentin	140
<i>Tabelle 39:</i>	Ergebnis Tubulin	143

3. Bildverzeichnis

<i>Bild 1:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, Diff-Quick-Färbung	65
<i>Bild 2:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, HE-Färbung	65
<i>Bild 3:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, May-Grünwald-Färbung	65
<i>Bild 4:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, Giemsa-Färbung	65
<i>Bild 5:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, Pappenheim-Färbung	66
<i>Bild 6:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, Pappenheim-Färbung	66
<i>Bild 7:</i>	Blut Huhn, Thrombozyten, Diff-Quick-Färbung	67
<i>Bild 8:</i>	Blut Huhn, Thrombozyt, Diff-Quick-Färbung	67
<i>Bild 9:</i>	Blut Huhn, Thrombozyt, Diff-Quick-Färbung	67
<i>Bild 10:</i>	Blut Huhn, Thrombozyt, HE-Färbung	67
<i>Bild 11:</i>	Blut Huhn, Thrombozyten, May-Grünwald-Färbung	68
<i>Bild 12:</i>	Blut Huhn, Thrombozyt, Giemsa-Färbung	68
<i>Bild 13:</i>	Blut Huhn, Thrombozyt, Pappenheim-Färbung	68
<i>Bild 14:</i>	Blut Huhn, Thrombozyten, PAS-Reaktion	69
<i>Bild 15:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung	70
<i>Bild 16:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, H.E.-Färbung	70
<i>Bild 17:</i>	Blut Huhn, heterophile Granulozyten, May-Grünwald-Färbung	71
<i>Bild 18:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung	71
<i>Bild 19:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung	72
<i>Bild 20:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung	72
<i>Bild 21:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung	72
<i>Bild 22:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung (pH 2,5)	73
<i>Bild 23:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Sirius-Red-Färbung	73

<i>Bild 24:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, PAS-Reaktion	74
<i>Bild 25:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung	74
<i>Bild 26:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung	75
<i>Bild 27:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, H.E.-Färbung	75
<i>Bild 28:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung	75
<i>Bild 29:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung	75
<i>Bild 30:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung	76
<i>Bild 31:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, Sirius-Red-Färbung	77
<i>Bild 32:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, PAS-Reaktion	77
<i>Bild 33:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung	77
<i>Bild 34:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung	78
<i>Bild 35:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, H.E.-Färbung	78
<i>Bild 36:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung	79
<i>Bild 37:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung	79
<i>Bild 38:</i>	Blut Huhn, basophile Granulozyten, Pappenheim-Färbung	79
<i>Bild 39:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung	79
<i>Bild 40:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung	80
<i>Bild 41:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung (pH 1,0)	80
<i>Bild 42:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung (pH 2,5)	81
<i>Bild 43:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung	82
<i>Bild 44:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung	82
<i>Bild 45:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung	82
<i>Bild 46:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, H.E.-Färbung	82

<i>Bild 47:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung	83
<i>Bild 48:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Giemsa-Färbung	83
<i>Bild 49:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Pappenheim-Färbung	83
<i>Bild 50:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, PAS-Reaktion	84
<i>Bild 51:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung	84
<i>Bild 52:</i>	Blut Huhn, Monozyt, Diff-Quick-Färbung	85
<i>Bild 53:</i>	Blut Huhn, Monozyt, H.E.-Färbung	85
<i>Bild 54:</i>	Blut Huhn, Monozyt, May-Grünwald-Färbung	86
<i>Bild 55:</i>	Blut Huhn, Monozyt, Giemsa-Färbung	86
<i>Bild 56:</i>	Blut Huhn, Monozyt, Pappenheim-Färbung	86
<i>Bild 57:</i>	Blut Huhn, Monozyt, PAS-Reaktion	87
<i>Bild 58:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, elektronenmikroskopische Aufnahme ...	89
<i>Bild 59:</i>	Blut Huhn, Thrombozyten, elektronenmikroskopische Aufnahme	90
<i>Bild 60:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, elektronenmikroskopische Aufnahme	91
<i>Bild 61:</i>	Huhn, eosinophiler Granulozyt, elektronenmikroskopische Aufnahme	92
<i>Bild 62:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt und Erythrozyten, elektronenmikroskopische Aufnahme	93
<i>Bild 63:</i>	Blut Huhn, Monozyt und heterophiler Granulozyt, elektronenmikroskopische Aufnahme	94
<i>Bild 64:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung	97
<i>Bild 65:</i>	Blut Huhn, Thrombozyten, ConA-FITC	97
<i>Bild 66:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung	97
<i>Bild 67:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung	97
<i>Bild 68:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung	98

<i>Bild 69:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung	98
<i>Bild 70:</i>	Blut Huhn, Monozyt, ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung	98
<i>Bild 71:</i>	Blut Huhn, Monozyt, ConA-FITC, DAPI-Kernfärbung	98
<i>Bild 72:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, LCA-FITC, DAPI-Kernfärbung	101
<i>Bild 73:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, LCA-FITC, DAPI-Kernfärbung	101
<i>Bild 74:</i>	Blut Huhn, Monozyt, LCA-FITC, DAPI-Kernfärbung	101
<i>Bild 75:</i>	Blut Huhn, Thrombozyten, PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung	104
<i>Bild 76:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung	104
<i>Bild 77:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung	104
<i>Bild 78:</i>	Blut Huhn, basophile Granulozyten, PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung	104
<i>Bild 79:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung	105
<i>Bild 80:</i>	Blut Huhn, Monozyt, PSA-FITC, DAPI-Kernfärbung	105
<i>Bild 81:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, PNA-FITC, DAPI-Kernfärbung	107
<i>Bild 82:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, PNA-FITC, DAPI-Kernfärbung	107
<i>Bild 83:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, RCA-FITC, DAPI-Kernfärbung	109
<i>Bild 84:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, RCA-FITC, DAPI-Kernfärbung	109
<i>Bild 85:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, RCA-FITC, DAPI-Kernfärbung	109
<i>Bild 86:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, DBA-FITC, DAPI-Kernfärbung	112
<i>Bild 87:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung	114
<i>Bild 88:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung	114
<i>Bild 89:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung	114

<i>Bild 90:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung	114
<i>Bild 91:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung	115
<i>Bild 92:</i>	Blut Huhn, Monozyt, SNA-FITC, DAPI-Kernfärbung	115
<i>Bild 93:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung	118
<i>Bild 94:</i>	Blut Huhn, Thrombozyten, WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung	118
<i>Bild 95:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung	118
<i>Bild 96:</i>	Blut Huhn, heterophile Granulozyten, WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung	118
<i>Bild 97:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt und Monozyt, WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung	119
<i>Bild 98:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung	119
<i>Bild 99:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung	119
<i>Bild 100:</i>	Blut Huhn, Monozyten und heterophiler Granulozyt, WGA-FITC, DAPI-Kernfärbung	119
<i>Bild 101:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, WGAs-FITC, DAPI-Kernfärbung	122
<i>Bild 102:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, WGAs-FITC, DAPI-Kernfärbung	122
<i>Bild 103:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, WGAs-FITC, DAPI-Kernfärbung	122
<i>Bild 104:</i>	Blut Huhn, Monozyt, WGAs-FITC, DAPI-Kernfärbung	122
<i>Bild 105:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, PHA-E-FITC, DAPI-Kernfärbung	125
<i>Bild 106:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, PHA-E-FITC, DAPI-Kernfärbung	125
<i>Bild 107:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, PHA-L-FITC, DAPI-Kernfärbung	127
<i>Bild 108:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, MAA I-FITC, DAPI-Kernfärbung	129
<i>Bild 109:</i>	Blut Huhn, heterophile Granulozyten, WGA-FITC mit Hemmsucker-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung	130

<i>Bild 110:</i>	Blut Huhn, heterophile Granulozyten, WGA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung	130
<i>Bild 111:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, WGA-FITC mit Hemmzucker-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung	130
<i>Bild 112:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, WGA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung	130
<i>Bild 113:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, SBA-FITC mit Neuraminidase-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung	131
<i>Bild 114:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, SBA-FITC ohne Neuraminidase-Vorbehandlung, DAPI-Kernfärbung	131
<i>Bild 115:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Anti-CD4-FITC, DAPI-Kernfärbung	133
<i>Bild 116:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Anti-CD4-FITC, DAPI-Kernfärbung, Keine Fixierung mit Methanol	133
<i>Bild 117:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Anti-CD8 α -FITC, DAPI-Kernfärbung	134
<i>Bild 118:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Anti-CD8 α -FITC, DAPI-Kernfärbung	134
<i>Bild 119:</i>	Blut Huhn, Erythrozyten, Phalloidin-TRITC	137
<i>Bild 120:</i>	Blut Huhn, Thrombozyten, Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung	137
<i>Bild 121:</i>	Blut Huhn, Thrombozyt, Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung	137
<i>Bild 122:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung	137
<i>Bild 123:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung	138
<i>Bild 124:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung	138
<i>Bild 125:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt und Thrombozyt, Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung	138
<i>Bild 126:</i>	Blut Huhn, Monozyten, Phalloidin-TRITC, DAPI-Kernfärbung	138
<i>Bild 127:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung	141
<i>Bild 128:</i>	Blut Huhn, eosinophiler Granulozyt, Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung	141
<i>Bild 129:</i>	Blut Huhn, basophiler Granulozyt, Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung	141

<i>Bild 130:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung ...	141
<i>Bild 131:</i>	Blut Huhn, Monozyt, Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung	142
<i>Bild 132:</i>	Blut Huhn, Monozyt, Anti-Vimentin-FITC, DAPI-Kernfärbung	142
<i>Bild 133:</i>	Blut Huhn, Thrombozyt, Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung	144
<i>Bild 134:</i>	Blut Huhn, heterophiler Granulozyt, Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung	144
<i>Bild 135:</i>	Blut Huhn, Lymphozyt, Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung	144
<i>Bild 136:</i>	Blut Huhn, Lymphozyten, Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung	144
<i>Bild 137:</i>	Blut Huhn, Monozyt, Anti-Tubulin-FITC, DAPI-Kernfärbung	145

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. F. Sinowatz für die Möglichkeit zu dieser Dissertation danken. Vor allem für die jederzeitige, freundliche und geduldige Betreuung, die fachliche Beratung, die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und das Korrekturlesen dieser Arbeit bin ich sehr dankbar.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie. Dabei gilt ein ganz besonderer Dank Frau W. Scholz und Frau C. Neumüller für ihre große Hilfsbereitschaft und ihr Engagement bei der Anfertigung der Proben für die Elektronenmikroskopie. Außerdem möchte ich Herrn Y. Gök, Frau G. Rußmeier und Frau M. Settles für ihre Hilfe bei Fragen zu Laborarbeiten herzlich danken.

Ich bedanke mich des Weiteren bei der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische sowie dem Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der Ludwig-Maximilians-Universität für die Möglichkeit der Probenentnahme und die Bereitstellung der Hühner. Dabei gilt ein ganz besonderer Dank Frau K. Stein und Frau Dr. S. Bergmann, die mir bei der Blutentnahme überaus tatkräftig und hilfsbereit zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner ganzen Familie bedanken. Insbesondere danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, die mir stets helfen meine Wünsche zu verwirklichen und in allen Lebenslagen eine großartige Stütze sind. Meiner Schwester danke ich für ihr jederzeit offenes Ohr, ihre unendliche Geduld und ihre uneingeschränkte Unterstützung. Ganz besonders danke ich meinem Lebensgefährten Ferdinand, der immer für mich da ist und so auf seinem Wege zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.