

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

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

**Histochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen an der
Leber des Rindes**

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

von Eva Susanne Wislsperger

aus Dingolfing

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

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:.....	VIII
I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Anatomie der Leber des Rindes	2
2. Embryologie der Leber des Rindes.....	3
3. Histologie der Leber des Rindes.....	4
3.1. Elemente des Leberläppchens.....	4
3.1.1. Leberzellplatten mit Gallecanaliculi und Ductuli biliferi.....	4
3.1.2. Sinusoide	6
3.1.3. Disse Raum.....	16
3.2. Versorgungssysteme des Leberläppchens	17
3.3. Metabolische Zonierung des Leberläppchens	18
4. Physiologie der Leber des Rindes.....	20
4.1. Rolle der Leber im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel	21
4.1.1. Rolle der Leber im Kohlenhydratstoffwechsel.....	21
4.1.2. Rolle der Leber im Protein- und Fettstoffwechsel.....	22
4.2. Rolle der Leber bei Entgiftungs- und Abbauprozessen.....	24
5. Histochemische Untersuchungen an der Leber des Rindes.....	25
5.1. Grundlagen immunhistochemischer Untersuchungen.....	25
5.2. Grundlagen glykohistochemischer Untersuchungen - Lektine.....	25
III. MATERIALIEN UND METHODEN.....	29
1. Untersuchungsmaterial	29
2. Herstellung der Präparate für die Lichtmikroskopie	29
2.1. Probenentnahme	29
2.2. Probenverarbeitung zu Präparaten.....	33
2.3. Konventionelle Färbetechniken	37
2.3.1. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin	37

2.3.2.	Trichromfärbung nach Masson-Goldner	37
2.3.3.	Färbung mit Alcianblau 8GX	38
2.3.4.	Perjod-Säure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus.....	39
2.4.	Immunhistochemische Untersuchungstechniken.....	40
2.5.	Glykohistochemische Untersuchungstechniken - Lektine.....	44
3.	Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie	47
IV.	AUSWERTUNG	52
1.	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen.....	52
1.1.	Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner	52
1.2.	Färbung mit Alcianblau 8GX	54
1.3.	Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus.....	55
2.	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	57
2.1.	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen.....	57
2.1.1.	Zytokeratin 8-Nachweis.....	58
2.1.2.	Zytokeratin 14-Nachweis.....	58
2.1.3.	Zytokeratin 18-Nachweis.....	58
2.1.4.	Zytokeratin 19-Nachweis.....	58
2.2.	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....	61
3.	Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen	63
3.1.	Glukose-und Mannose-spezifische Lektine.....	63
3.1.1.	Bindungsverhalten von Concanavalin A (Con A)	63
3.1.2.	Bindungsverhalten von Lens culinaris Agglutinin (LCA).....	63
3.1.3.	Bindungsverhalten von Pisum sativum Agglutinin (PSA)	63
3.2.	Galaktose-spezifische Lektine	64
3.2.1.	Bindungsverhalten von Peanut Agglutinin (PNA)	64
3.2.2.	Bindungsverhalten von Ricinus communis Agglutinin (RCA).....	64
3.2.3.	Bindungsverhalten von Viscum album Agglutinin (VAA)	64
3.2.4.	Bindungsverhalten von Soybean Agglutinin (SBA).....	64
3.2.5.	Bindungsverhalten von Sambucus nigra Agglutinin (SNA)	64
3.3.	N-Acetylglukosamin-spezifische Lektine	64
3.3.1.	Bindungsverhalten von Wheat Germ Agglutinin (WGA)	64
3.3.2.	Bindungsverhalten von Wheat Germ Agglutinin succinyliert (WGAs)....	65
3.4.	N-Acetylgalaktosamin-spezifische Lektine.....	65

3.4.1.	Bindungsverhalten von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA).....	65
3.4.2.	Bindungsverhalten von Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL)	65
3.4.3.	Bindungsverhalten von Soybean Agglutinin (SBA).....	65
3.4.4.	Bindungsverhalten von Saphora japonica Agglutinin (SJA).....	65
3.4.5.	Bindungsverhalten von Sambucus nigra Agglutinin (SNA)	65
3.5.	Fukose-spezifische Lektine	66
3.5.1.	Bindungsverhalten von Ulex europeus Agglutinin I (UEA-I).....	66
3.6.	Oligosaccharid-spezifische Lektine.....	66
3.6.1.	Bindungsverhalten von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) ..	66
3.6.2.	Bindungsverhalten von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L)	66
3.6.3.	Bindungsverhalten von Maackia amurensis Agglutinin I (MAA-I).....	66
4.	Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchungen.....	71
4.1.	Hepatozyten	71
4.2.	Sinusoidale Endothelzellen.....	73
4.3.	Disse-Raum.....	73
4.4.	Ito-Zellen	74
4.5.	Von Kupffer-Zellen	74
4.6.	Gallengangsepithelzellen.....	75
V.	DISKUSSION.....	80
1.	Konventionelle Lichtmikroskopie	80
2.	Immunhistochemie	82
3.	Glykohistochemie.....	87
4.	Elektronenmikroskopie.....	94
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	104
VII.	SUMMARY	107
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	109
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	123
X.	TABELLENVERZEICHNIS	124
XI.	ANHANG.....	125
1.	Lösungen für die Lichtmikroskopie.....	125

1.1.	Fixierungsmittel.....	125
1.2.	Lösungen für histologische Färbungen.....	125
1.2.1.	Hämalaun-Eosin (HE) nach Meier	125
1.2.2.	Trichromfärbung nach Masson und Goldner.....	126
1.2.3.	Alcianblau.....	127
1.2.4.	PAS-Reaktion nach Mc Manus	127
2.	Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen.....	128
3.	Lösungen für die glykohistochemischen Untersuchungen.....	128
4.	Lösungen für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen.....	129
4.1.	Fixierungsmittel.....	129
4.2.	Puffer	129
4.3.	Kontrastierungslösungen	129
4.4.	Einbettmedien	130
4.5.	Färbelösungen.....	130
4.6.	Nachkontrastierungsmedien	130
XII.	DANKSAGUNG	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

BM	Basalmembran	m	männlich
bzw.	beziehungsweise	Mi	Mitochondrium
ca.	circa	MAA-I	Maackia amurensis Agglutinin I
CK	Zytokeratin	Mo	Monate
CK 5	Zytokeratin 5	Mv	Mikrovilli
CK 8	Zytokeratin 8	Mm	Mikrometer
CK 14	Zytokeratin 14	MZ	Mastzelle
CK 18	Zytokeratin 18	N	Nukleus
CK 19	Zytokeratin 19	Nu	Nucleolus
cm	Zentimeter	nm	Nanometer
Con A	Concanavalia ensiformis Agglutinin	PAS	Periodic-Acid-Schiff-Reaction
DAB	Diaminobenzidin	PBS	phosphate buffered saline solution
DAPI	Diamidinophenylindol- dihydrochlorid	PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin	PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PHLy	Phagolysosom
Essigsre.	Essigsäure	PNA	Peanut Agglutinin
E	Endothel	PSA	Pisum sativum Agglutinin
Fb	Fibroblast	PVA	Polyvinyl Alkohol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	R	Ribosom
FK	Feuchtkammer	rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
Fz	Fibrozyt	RCA	Ricinus communis Agglutinin
GE	Gallengangsepithelzelle	RT	Raumtemperatur
gER	Glattes Endoplasmatisches Retikulum	SB	Scale bar
Go	Golgi-Apparat	SBA	Soybean Agglutinin
Gr	Granulum	sek	Sekunden

GSL-I	Griffonia simplicifolia Agglutinin I	SJA	Saphora japonica Agglutinin
H	Hepatozyt	SNA	Sambucus nigra Agglutinin
IR	Interzellularraum	UEA-I	Ulex europeus Agglutinin I
IZ	Ito-Zelle	V	Vesikel
K5	Keratin 5	V*	Brizzle coated Micropinozytosevesikel
K8	Keratin 8	VAA	Viscum album Agglutinin
K14	Keratin 14	vKZ	Von Kupffer-Zelle
K18	Keratin 18	WGA	Wheat Germ Agglutinin
K19	Keratin 19	WGAs	Wheat Germ Agglutinin succinyliert
L	Lumen	z.T.	zum Teil
LCA	Lens culinaris Agglutinin		
Ly	Lysosom		

I. EINLEITUNG

Kaum ein Haustier bringt dem Menschen so großen und so vielfältigen Nutzen wie das Rind. Es hat nicht nur die Rolle des wichtigsten Milch- und Fleischlieferanten inne, sondern dient auch der Gewinnung von Leder und stellt Talg als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Schmier- und Brennstoffen zur Verfügung. Darüber hinaus findet getrockneter Rinderdung als Heiz- und Brennstoff Verwendung. Nicht zuletzt können die Rinder aufgrund ihrer erheblichen Muskelkraft hervorragend als Zug- und Arbeitstier eingesetzt werden. Selbstverständlich ist die große Leistungsfähigkeit der Tiere an gewisse Voraussetzungen geknüpft. Neben optimaler Haltung und Fütterung ist ein einwandfrei funktionierender Stoffwechsel sehr wichtig. Für den letzteren spielt die Leber als zentrales Stoffwechselorgan eine entscheidende Rolle, was insbesondere dann deutlich wird, wenn sie bei der Erfüllung ihrer vielfältigen Aufgaben durch primäre Erkrankungen oder sekundär im Rahmen der Erkrankung anderer Organe beeinträchtigt wird. Diese sekundären Störungen, auch als „Leberschaden“ oder „Leberbeteiligung“ bezeichnet, sind weitaus häufiger anzutreffen als Primärkrankheiten der Leber und treten besonders häufig bei laktierenden Kühen mit gestörter Futteraufnahme auf. Generell äußern sich Lebererkrankungen, gleich welcher Genese, meist mit unspezifischen und nicht selten nur geringgradig ausgeprägten Symptomen wie Fressunlust, Verstopfung, sekundär intermittierender Durchfall, durch Kapseldehnung und -läsion verursachte, schmerzbedingte Bewegungsunlust, aufgekrümmter Rücken, Hepatoenzephalisches Syndrom und gelegentlich sogar Koma. Diagnostiziert werden Lebererkrankungen daher meist anhand der Erhöhung der Aktivität spezifischer Leberenzyme sowie der Bilirubinkonzentration im Blut. Ein gutes Beispiel dafür, wie die Leber sekundär im Rahmen der Erkrankung anderer Organe mitbetroffen werden kann, liefert die Ketose, bei der es aufgrund einer, vor allem bei Hochleistungskühen zu Laktationsbeginn zu beobachtenden, unausgeglichene Energiebilanz, letztlich zur Anhäufung von Ketonkörpern in der extrazellulären Flüssigkeit und insbesondere im Harn kommt. Obwohl die Leber offensichtlich auch beim Rind sowohl in der Physiologie als auch in der Pathologie des Stoffwechsels eine zentrale Rolle einnimmt, ist ihre Morphologie noch vergleichsweise wenig untersucht worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit modernen morphologischen Methoden dieses wichtige Organ näher zu charakterisieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Anatomie der Leber des Rindes

Die Leber des Rindes befindet sich gemäß KÖNIG et al. (2011) aufgrund des umfangreichen Platzbedarfs des Pansens ausschließlich in der rechten Hälfte der Bauchhöhle. Sie lässt eine auffallend konvexe Facies diaphragmatica und eine dem Magen zugewandte, konkave Facies visceralis unterscheiden. Auf der Visceralfläche der Leber befinden sich nach SCHUMMER und NICKEL (2004) mehrere Impressionen, die auf dem engen Kontakt der Leber zu den ihr in der Bauchhöhle benachbarten Organen beruhen: Die von der Haube hervorgerufene Impressio reticularis, weiter caudal die durch den Blättermagen erzeugte Impressio omasica und auf der rechten, lateralen Fläche die durch den kranialen Pol der rechten Niere verursachte Impressio renalis. Unter Verwendung dreier von SCHUMMER und NICKEL (2004) definierter, imaginärer Hilfslinien kann die Leber in vier Segmente, die Leberlappen, Lobi hepatici, gegliedert werden: Eine dieser Hilfslinien verläuft zwischen der Impressio oesophagea und der Incisura ligamenti teretis. Sie grenzt den Lobus hepatis sinister von der übrigen Leber ab. Eine weitere Hilfslinie wird durch die Vena cava caudalis und die Fossa vesicae fellae festgelegt. Sie trennt den Lobus hepatis dexter von der übrigen Leber. Senkrecht zu diesen beiden, parallel verlaufenden Hilfslinien verläuft quer durch die Leberpforte eine dritte Hilfslinie, die den Bereich zwischen dem Lobus hepatis dexter und dem Lobus hepatis sinister in zwei weitere Lappen teilt und zwar in den ventral der Leberpforte gelegenen Lobus quadratus und den dorsal der Leberpforte befindlichen Lobus caudatus, der beim Rind in den gegen die Leberpforte vorstoßenden Processus papillaris und in den Processus caudatus unterteilt ist. Dieser vergleichsweise große und stumpfrandige Processus caudatus ragt über den freien Rand des Lobus hepatis dexter hinaus. Von den bei KÖNIG et al. (2011) beschriebenen Fissuren, die ausgehend vom ventrolateralen, scharfen Rand der Leber, dem Margo acutus, und dem dorsalen, stumpfen Rand, dem Margo obtusus, tierartlich unterschiedlich weit ins Lebergewebe hineinziehen, ist beim Rind lediglich am Margo ventralis auf der Eingeweideseite mit Übergriff auf die Zwerchfellseite die Incisura ligamenti teretis ausgebildet (SCHUMMER & NICKEL, 2004). Das Leberparenchym wird von einer bindegewebigen Kapsel, der Glisson-Kapsel umgeben, die wiederum außen von Peritoneum überzogen ist (KÖNIG et al., 2011).

2. Embryologie der Leber des Rindes

SINOWATZ (2008) sowie SCHNORR und KRESSIN (2006) geben einen kurzgefassten Überblick über die embryologische Entwicklung der Leber: Den Ursprung der Leber stellt eine ventrale Epithelknospe des hepatopankreatischen Ringes des Duodenum dar. Sie dringt als Leberdivertikel oder Leberbucht weiter in das zum Mesogastricum ventrale zählende Septum transversum vor. Nachfolgend lässt sich an der Anlage eine kraniale Pars hepatica und eine kaudale Pars cystica unterscheiden. Die Pars hepatica fungiert als eigentliche Leberanlage. Sie dehnt sich im Zuge ihrer Entwicklung im kraniodorsalen Bogen immer weiter nach ventral aus. Gleichzeitig proliferieren zahlreiche Leberzellsprosse. Der proximale Teil dieser Leberzellsprosse entwickelt sich zu den Zellsträngen des Leberparenchyms, der distale Teil stellt die epitheliale Auskleidung der intrahepatischen Gallengänge dar. Für die Ausdifferenzierung des Leberparenchyms ist die Wechselwirkung zwischen den entodermalen Leberzellsprossen und den mesenchymalen Leberanteilen, vor allem den Blutgefäßen, von großer Bedeutung. Leberkapillaren bilden ein dichtes Maschenwerk um die vordringenden Leberzellstränge. Sie leiten sich sowohl von den Dottersackvenen, als auch von den Nabelvenen ab und werden später zu den Lebersinusoiden. Die in die Leberanlage eindringenden Dottersackvenen werden als Venae afferentes hepatis, die von der Leberanlage abführenden Dottersackvenen als Venae efferentes hepatis bezeichnet. Schon bald obliteriert die linke Vena afferens hepatis, die rechte verbindet sich mit der Vena intestinalis zur Pfortader. Auch die linke Vena efferens hepatis bildet sich zurück, die rechte wird zur Vena hepatica. Die Leberkapillaren innerhalb der Leberanlage und teilweise auch die Nabelvenen differenzieren sich zu Lebersinusoiden. Während die rechte Nabelvene schon bald funktionslos wird, verbindet sich die linke mit der Vena afferens hepatis, so dass Plazentablut durch die Leber fließen kann. Später anastomosiert die Vena umbilicalis sinister aber mit der Vena cava caudalis über den Ductus venosus Arantii. Dieser bleibt als eine, das Blut an der Leber vorbeileitende Anastomose, beim Wiederkäuer während der gesamten fetalen Entwicklung funktionstüchtig. Der sich zusehends vergrößernde, nahezu den kompletten Bauchraum einnehmende Leberwulst dient während der fetalen Entwicklung der Hämatopoese. Im Rahmen der histologischen Differenzierung entstehen durch ständige Zellvermehrung Leberzellplatten, die sich radiär um die Zentralvene anordnen. Anschließend vereinigen sie sich zu Leberläppchen, die von Bindegewebe umgeben werden. Die weitere Vermehrung der Leberläppchen erfolgt durch Aufspaltung der Zentralvene und durch Aufzweigung der Bindegewebssepten, die von der Peripherie hereinwachsen. Aus der kleineren Pars cystica gehen die Gallenblase und der Gallengang hervor. Aus ihrer

Verbindung zur Pars hepatica entsteht der spätere Ductus hepaticus communis und aus der Verbindung zum Duodenum der Ductus choledochus.

3. Histologie der Leber des Rindes

3.1. Elemente des Leberläppchens

Die Leberläppchen, Lobuli hepatici, setzen sich als kleinste, funktionelle Einheit der Leber laut WELSCH (2011) aus den von Gallekanälchen und kleinen Gallengängen durchzogenen Leberzellplatten, Laminae hepatici, und den Sinusoiden zusammen. Zwischen beiden Strukturen, auf deren Elemente nachfolgend näher eingegangen werden soll, befindet sich der Disse Raum.

3.1.1. Leberzellplatten mit Gallecanaliculi und Ductuli biliferi

a) Hepatozyten

Die Hepatozyten, die ca. 78% der Zellen des Leberparenchyms ausmachen (BLOUIN et al., 1977), lassen sich nach KOLLER (1994) in drei verschiedene, von ihm sehr ausführlich charakterisierte Zonen gliedern: Die, den Sinusoiden unmittelbar benachbarte „sinusoidale“ oder „vaskuläre“ Zone; die, direkt neben den Galle-Canaliculi befindliche „Gallekanälchen-nahe“ Zone und die, den verbleibenden Zellraum einnehmende „laterale“ Zone. Die vaskuläre Zone zeichnet sich durch eine gegenüber dem Rest der Zelle stark erhöhte Anzahl runder oder ovaler Mitochondrien aus. Sie schließt hingegen aber nur wenige Peroxisomen ein. Auch der, aus bis zu 50 Dictyosomen bestehende Golgi-Apparat ist nur selten in der sinusoidalen Zone, sondern überwiegend in der Gallekanälchen-nahen Zone lokalisiert. Die sinusoidale Zellzone verfügt über die umfangreichsten Lipideinschlüsse, während die laterale und Gallekanälchen-nahe Zone überwiegend Lipofuszingranula beinhalten. Die Stapel des rauhen Endoplasmatischen Retikulums, die teilweise mit glattem Endoplasmatischen Retikulum, das dreidimensionale Netzwerke anastomosierender Tubuli bildet, in Verbindung stehen, sind ebenso wie Polyribosomen und freie Ribosomen überall im Zytoplasma in größerer Menge anzutreffen. In den Zellen treten gehäuft zwei polyploide Kerne auf, wobei die Anzahl der Zellen mit zwei Kernen in der unmittelbar der Zentralvene benachbarten Hepatozytenlage signifikant höher ist als in der Peripherie (HILDEBRAND & KARCHER, 1984). Das Zytoplasma enthält ferner Lysosomen, sekretorische Vesikel, unterschiedlich große alpha-Glykogen Partikel und ein gut entwickeltes Zytoskelett. An der aus drei Schichten aufgebauten Zellmembran der Hepatozyten fassten MEIER et al. (1984) den lateralen und den vaskulären Abschnitt als basolateralen Pol zusammen und stellten ihm den Galle-Canaliculi

nahen Bereich als apikalen Pol gegenüber. Für die Erfüllung der vielfältigen Zellfunktionen ist nun von entscheidender Bedeutung, dass der, dem Disse Raum anliegende Bereich des basolateralen Pols als funktionell aktivster Teil des Hepatozyten von einer großen Anzahl dichter, langer Mikrovilli besetzt ist, was zu einer Oberflächenvergrößerung um den Faktor 2-3 führt (KOLLER, 1994). Die von KOLLER (1994) eingehend beschriebenen Mikrovilli dienen dem Austausch von Ionen, Proteinen und Makromolekülen. Ihre Zahl, Länge und Breite schwankt in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffwechselsituation. Zudem sind die Mikrovilli, genauso wie die Hepatozytenmembran selbst, so speziesspezifisch für den Hepatozyten, dass ihre Gestaltung eine Zuordnung des Hepatozyten zu einer bestimmten Tierart möglich macht: Maus, Ratte, Goldhamster, Meerschwein und Kaninchen verfügen über stark ausgebildete Mikrovilli, während Taube und Goldfisch nur wenige, kleine Mikrovilli besitzen. In allen Bereichen der Zellmembran, jedoch besonders stark in der sinusoidalen Zone, sind Rezeptoren für viele verschiedene, zirkulierende Substanzen, wie Glykoproteine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Antikörper, Metabolite, Lipoproteine und Toxine zu finden. Der Hepatozyt weist aufgrund der Differenzierung seiner Außenmembran und der intrazellulären Anordnung seiner Organellen eine gewisse Polarität auf.

GRISHAM (1994) spricht sich eindeutig gegen die weit verbreitete Annahme aus, dass die Hepatozyten während ihrer durchschnittlichen Lebensdauer von 300 Tagen begleitet von einem altersabhängigen Funktionswandel, ausgehend von der Läppchenperipherie entlang der Leberzellbalken zum Läppchenzentrum wandern und dort apoptotisch zu Grunde gehen. Seiner Meinung nach ist die Beobachtung, dass die ortsfesten Hepatozyten eines Leberläppchens in Abhängigkeit von ihrer Topographie verschiedene Funktionen wahrnehmen, als Anpassung ihrer Enzymausstattung an die zwischen der periportalen und zentrolobulären Zone stark schwankenden Gehalte an Nährstoffen, Sauerstoff, Hormonen, Wachstumsfaktoren und Mediatoren, die mit dem sinusoidalen Blut in die Lobuli hepatici einströmen, zu sehen. Trotz dieser eindeutigen Aussprache gegen das Model der Hepatozytenmigration bekräftigt GRISHAM (1994), dass es in der Leber Stammzellen gibt, die im periportalen Bereich der Lobuli hepatici liegen, unter bestimmten, bisher noch wenig bekannten Bedingungen proliferieren und unter Veränderung ihrer Funktion entlang der Laminae hepatici auf die Zentralvene zu wandern.

b) Gallengangsepithelzellen

Beim Gallengangsepithel handelt es sich laut HEES (2006b) um ein einschichtig, isoprismatisches Epithel: Die Zellen sind annähernd gleich breit wie hoch und wirken in der Aufsicht dicht aneinandergedrängt. Der auffallend große, runde Kern nimmt eine zentrale

Position ein. Embryologisch leiten sich die Gallengangsepithelienzellen von Hepatoblasten ab (NISHIKAWA et al., 1996): Während der physiologischen Entwicklung der Leber kommt es ständig zum Übergang von periportalen Hepatoblasten in Gallengangsstrukturen. Wichtig hierfür ist die mesenchymale und epitheliale Interaktion. Insulin ist dabei der bedeutendste morphogenetische Faktor. Zudem sezernieren Fibroblasten lösliche Faktoren, welche die dentritische Morphogenese von Hepatoblasten verstärken. EGF und HGF haben jedoch nur einen geringen oder auch gar keinen Effekt auf die Umwandlung von Hepatoblasten in Gallengangsepithelzellen.

3.1.2. Sinusoide

Am Bau der Sinusoide sind sowohl azelluläre als auch zelluläre Elemente beteiligt (WELSCH, 2011): Bei den Zellen handelt es sich im Wesentlichen um die Endothelzellen, die von Kupffer-Zellen, die Ito-Zellen und die Pit-Zellen. Den azellulären Anteil stellt das aus Maschen von retikulären Fasern zusammengesetzte Netzwerk der Basalmembran dar. Als Besonderheit ist die Basalmembran bei Paarhufern im Gegensatz zur diskontinuierlichen Basalmembran aller übrigen Wirbeltiere kontinuierlich (WOOD, 1963; WELSCH, 2011). Der Erhalt dieser sehr zerbrechlichen, zusätzlich noch von Kollagenfasern vom Typ 3 unterlagerten Struktur (WELSCH, 2011), ist von großer Bedeutung für die Regenerationsfähigkeit der Leberzellbalken.

a) Endothelzellen

Die sinusoidalen Endothelzellen, die ein Anteil von 70% an der Gesamtzahl der Sinusoidalzellen haben (KNOOK & SLEYSTER, 1976; KNOOK et al., 1977), stellen die endotheliale Auskleidung der Sinusoidräume dar und wirken zugleich an Filtrationsvorgängen und metabolischen Prozessen mit (KOLLER, 1994). Um all diese Funktionen erfüllen zu können, sind die Endothelzellen der Sinusoide in besonderer Art und Weise gestaltet (KOLLER, 1994): Vom schmalen Zytoplasma, das in das Lumen der Sinusoide hineinragen kann, strahlen zahlreiche, dünnschichtige, fenestrierte, zytoplasmatische Fortsätze aus, die in der Peripherie mit den Ausläufern anderer Sinusoidendothelzellen in Kontakt treten, wobei sie sich gelegentlich dachziegelartig überlappen. Die von den Zytoplasmafortsätzen begrenzten, als Poren bezeichneten Räume bleiben frei, so dass letztlich aus diesem lockeren Zellverband ein diskontinuierliches Endothel resultiert. Die Poren vermitteln gemäß YOKOMORI et al. (2001) den Eindruck von labyrinthähnlichen, durch tiefe Einstülpungen der Plasmamembran entstandenen Strukturen, die von der luminalen Zelloberfläche ausgehend, quer durch das Zytoplasma hindurch bis zur abluminalen Oberfläche reichen. Sie stellen eine offene

Verbindung zwischen dem Sinusoidlumen und dem Disse Raum her. Der Durchmesser und die Anzahl, der von einem Aktomyosin-Calmodulin basierenden Zytoskelett umgebenen Poren (YOKOMORI, 2008) und (YOKOMORI et al., 2000) sind keine statischen Größen, sondern einem dynamischen Wandel unterworfen. So verschmelzen die Poren, deren mittlerer Durchmesser unter physiologischen Bedingungen ca. 100 nm beträgt (KOLLER, 1994), zu einer größeren Öffnung, einem sogenannten Fenster (auch Fenestration oder Fenestra), sobald der Perfusionsdruck ansteigt (KOLLER, 1994). Größe und Anzahl der Poren bzw. Fenster differieren aber auch noch intralobulär (YOKOMORI et al., 2001). So ist der Durchmesser der Poren in der zentrolobulären Zone geringer, ihre Anzahl pro Fläche und die daraus resultierende Porösität jedoch größer. In Verbindung mit einem größeren Durchmesser der Sinusoide selbst ergibt sich so im zentrolobulären Bereich ein fast doppelt so hoher Stoffaustausch wie in der periportal Zone. Tabelle 1 veranschaulicht die, im Bezug auf die Porengröße, zwischen der periportal und der zentrolobulären Zone herrschenden Unterschiede:

Tabelle 1: Vergleich zwischen den Poren des portalen und zentralen Sinusoidendothels

	Periportal	Zentrolobulär	Unterschied
Durchmesser (nm) \pm SD	105,8 \pm 0,3	101,3 \pm 0,3	4,4 %
Mittlere Anzahl/ μm^2 (*)	9,4 \pm 0,4	13,5 \pm 0,6	43,5%
Porösität, % der Fläche	5,5 \pm 0,2	7,4 \pm 0,4	34,6%

SD = Standardabweichung

Modifiziert nach WISSE et al. (1982); basierend auf rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen

Als sogenannte Siebplatte definierte WISSE (1970) die Ansammlung von 10 bis 50 Poren. Sowohl bei der Gestaltung der Siebplatten als auch der Poren selbst, lassen sich tierartliche Unterschiede feststellen: Die Anzahl der Poren pro Siebplatte ist bei Rind und Affe am größten, wobei die Poren der Siebplatten der Rinder besonders klein sind (SAUER, 1980). Weitere Details über die tierartlichen Besonderheiten der Poren, Fenestrations (Fenster, Fenestrae) und Siebplatten gehen aus Tabelle 2 hervor:

Tabelle 2: Siebplattenporen und Fenestrationsen im Speziesvergleich

Spezies	Anzahl von Poren pro Siebplatte	Durchmesser der Poren in μm	Durchmesser großer Fenestrationsen in μm	Autoren
Goldfisch	15-35	0,05-0,2	-----	NOPANITAYA et al. (1979)
Maus	10-20	0,1	1	NOPANITAYA und GRISHAM (1975)
Ratte	-----	0,05-0,2	-----	BROOKS und HAGGIS (1973)
	-----	0,1	1-3	MUTO (1975)
	-----	-----	1-2	MOTTA und PORTER (1974); MOTTA (1975)
	10-50	0,1	1-3	GRISHAM et al. (1975)
	10-50	-----	-----	FRENZEL et al. (1976)
Meerschweinchen	-----	0,1	0,5-3	ITOSHIMA et al. (1974)
Hamster	10-30	0,1	2,5	SAUER (1980)
Rind	40-150	0,05	0,1	SAUER (1980)
Schaf	10-40	0,5	1	SAUER (1980)
Ziege	20-50	0,5	1	SAUER (1980)
Affe	30-150	0,1-0,3	1-2	VONNAHME und MÜLLER (1980)
Mensch	25	0,1	0,5-2	MUTO et al. (1977)

Modifiziert nach SAUER (1980), basierend auf rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen

Eine ausführliche Darstellung der in großen Mengen im vergleichsweise kleinen, länglich gestalteten Endothelzellkörper eingeschlossenen Organellen findet sich bei KOLLER (1994): Der längliche, glattwandige, an Heterochromatin reiche, nicht selten einen gut zu

erkennenden Nukleolus aufweisende Kern befindet sich in der Nähe des dem Disse Raum zugewandten Abschnitts der Zellmembran, so dass die meisten der anderen Zellorganellen einen Platz zwischen dem Nukleus und dem luminalen Teil der Plasmamembran einnehmen, was der Zelle eine gewisse Polarität verleiht. Insbesondere perinukleär sind zahlreiche Dictyosomen zu sehen. Sie sind aus Stapeln von Zisternen zusammengesetzt und werden von Vakuolen und Vesikeln umringt. Das Endoplasmatische Retikulum liegt praktisch nur als raues Endoplasmatisches Retikulum, dessen Zisternen mit zahlreichen Ribosomen besetzt sind, vor. Als weitere Organellen kommen neben runden oder ovalen Mitochondrien, Mikrotubuli, Intermediär- und Mikrofilamente und die für die Endozytose unverzichtbaren Makro- und Mikropinozytosevesikel vor. Erstere sind der Zellmembran nur, letztere überwiegend im luminalen Abschnitt angelagert. Die ca. 200 nm großen Mikropinozytosevesikel liegen entweder als glattwandige, runde oder abgeplattete aber auch als von einem Saum bedeckte, mäßig dichtes Material enthaltende, sogenannte „brizze coated“ Mikropinozytosevesikel vor. Makropinozytosevesikel haben einen Durchmesser von 0,8 μm und sind mit dichtem, flockigen Material gefüllt. Ferner treten gelegentlich noch mäßig elektronendichte Vesikel, bezeichnet als „electron lucent bodies“ mit einem Durchmesser von 0,6 bis 0,8 μm auf. Die zytoplasmatischen Fortsätze verfügen ebenfalls über Makro- und Mikropinozytosevesikel, Endoplasmatisches Retikulum, Mikrotubuli, Intermediär- und Mikrofilamente und wenige Mitochondrien.

b) von Kupffer-Zellen

Die von Kupffer-Zellen, auch Kupffer Sternzellen genannt, machen nach KNOOK und SLEYSER (1976); KNOOK et al. (1977) ca. 20% der Sinusoidalzellen aus. Sie sind Teil des Mononukleären Phagozyten Systems (MPS) (DEMUTH, 2009). Da ca. 80-90% der vom Knochenmark gebildeten Monozyten zu von Kupffer-Zellen werden (DEMUTH, 2009), stellt die Leber das größte MPS-Organ des Körpers dar (GARCIA MARQUES et al., 2004). Die von Kupffer-Zellen sind kein Bestandteil der Sinusoidwand, sondern sie wandern vielmehr amöboid im Lumen der Sinusoide entlang deren endothelialer Auskleidung (WELSCH, 2011). KOLLER (1994) erläutert ausführlich die weiteren Eigenschaften dieses Zelltyps: Die Form der von Kupffer-Zellen variiert stark, von länglich und schmal bis dick und abgerundet. Eine Vielzahl von zytoplasmatischen Fortsätzen, bei denen es sich um Pseudopodien, Lamellopodien, d.h. undulierende Falten und Phylopodien handelt, verleiht der Zelle ihr typisch sternförmiges Erscheinungsbild und sorgt für die im Vergleich zu anderen Zellarten riesige Zelloberfläche von bis zu 50 μm^2 bei einem Längsdurchmesser von bis zu 12 μm und einem Querdurchmesser von 1,5 bis 4,5 μm . Im Gegensatz zu einer Zelle ohne Fortsätze

entspricht dies einer Oberflächenzunahme um 200%. Die zytoplasmatischen Fortsätze stellen zum einen eine Verbindung zu den sinusoidalen Endothelzellen her, zum anderen durchdringen aber auch einige Fortsätze die Poren zwischen den sinusoidalen Endothelzellen und erreichen so den Disse Raum, wo sie wiederum die Ito-Zellen und den vaskulären Pol der Hepatozyten kontaktieren. Andere zytoplasmatische Fortsätze durchqueren die Sinusoide und berühren die Endothelzellen der gegenüberliegenden Sinusoidwand. Es sind bisher aber keine Verknüpfungen zwischen den zytoplasmatischen Fortsätzen verschiedener von Kupffer-Zellen beobachtet worden. Der Zellkern der von Kupffer-Zellen, der von länglicher oder nierenförmiger Gestalt ist, nimmt eine exzentrische Position in der Zelle ein und weist einen Nukleolus mit flockiger Struktur auf. Der Kern lässt nur einen schmalen Rand von Heterochromatin erkennen, da sein fein disseminiertes Chromatin überwiegend an der Innenseite der Kernmembran fixiert ist. Das endoplasmatische Retikulum, das meist in Stapeln vorliegt, befindet sich zusammen mit dem gut entwickelten Golgi-Apparat stets in der Nähe des Nukleus. Des Weiteren finden sich im Zytoplasma der Zelle Mitochondrien, Polyribosomen, Mikrotubuli, Mikrofilamente und gelegentlich Zentriolen. Die große endozytotische Aktivität wird der Zelle durch drei verschiedene pinozytotische Strukturen ermöglicht. Dabei handelt es sich erstens um die stachelig umhüllten, „bristle coated“ Mikropinozytose Vesikel mit einem Durchmesser von bis zu 100 nm, die im Dienste der Mikropinozytose stehen, zweitens um die markant umhüllten, „thick fuzzy coated“ Vesikel für die Pinozytose und drittens um die wurmförmigen („worm-like“) Vesikel für die Pinozytosis verimiformis. Diese letztgenannten Strukturen entstehen während der Invagination der Zellmembran. Sie dienen der Pinozytose größerer Partikel von 3,5-7,5 nm und können auch gegen das sinusoidale Lumen geöffnet sein. Sämtliche pinozytotische Strukturen treten in der Zelle völlig unabhängig von der Bindung besonderer Stoffe an die, mit einer 50-70 nm dicken, filamentösen Glykokalix besetzten Zelloberfläche, unter physiologischen Bedingungen auf. Bei ansteigender Stoffwechselaktivität kann sich die Anzahl der zytoplasmatischen Oberflächenfortsätze sowie der lysosomalen Strukturen und Vakuolen stark erhöhen.

c) Ito-Zellen

Die Ito-Zellen machen nur 10% der Sinusoidalzellen aus (KNOOK & SLEYSER, 1976; KNOOK et al., 1977). KOLLER (1994) beschreibt diese weitere, zelluläre Komponente der Sinusoide sehr eingehend: Die auch als „fat storing cells“ oder „hepatocytic stellate cells“ bezeichneten Zellen sind im Disse Raum lokalisiert und daher stets durch die Endothelzellen vom Lumen des Sinusoids getrennt. Eines ihrer wesentlichen Charakteristika, die typisch

sternförmige Gestalt, wird durch lange, spinnenartige, zytoplasmatische Ausläufer erzeugt. Ausgehend vom kleinen Zell-Leib dringen diese unter die Endothelzellen vor und unterlagen letztere samt deren Fortsätzen, so dass sie als subendotheliale Ausläufer das sinusoidale Lumen nahezu vollständig umschließen. Dies führt dazu, dass stellenweise der Eindruck entsteht, die Sinusoide würden von einer doppelten Wand ausgekleidet. Die zytoplasmatischen Fortsätze der Ito-Zellen, die sich zur Peripherie hin verzüngen, schließen in ihrem dickeren Anteil Zisternen des rauen Endoplasmatischen Retikulums, Mitochondrien und freie Polysomen ein, während in ihrem dünnen Anteil nur freie Ribosomen zu finden sind. Im Gegensatz zu Perizyten von Blutkapillaren besitzen sie keine eigene Basalmembran, bestimmen aber dennoch, stimuliert durch Endothelin, Angiotensin, Prostaglandin und Thromboxan die Weite der Lebersinusoide und damit letztlich die gesamte Leberdurchblutung. Ein weiteres prägnantes Merkmal der Ito-Zellen sind die Vitamin A speichernden Fetttropfen, die in ihrem Zytoplasma enthalten sind. Die Fetttropfen leiten sich von multivesikulären Körperchen, als den Orten der Retinolveresterung ab und dienen als Speicher für Triacylglycerol- und Cholesterolester und das fettlösliche Vitamin A (UETSUKA et al., 2007). Die Fetttropfen weisen keine eigene Membran auf. Größe und Anzahl der zytoplasmatischen Fetttropfen variieren stark, sowohl in Abhängigkeit von der Kontinuität der Nahrungsaufnahme (TAKAHASHI et al., 1957; TAKAHASHI, 1959) als auch der Qualität der Nahrung (SUNAGA, 1955). So haben TAIRA und MUTOH (1981) zeigen können, dass Größe und Zahl der Fetttropfen während eines länger dauernden Hungerzustands abnimmt. Aber auch speziesspezifische Unterschiede sind festgestellt worden. So besitzen die Ito-Zellen von Mensch und Nager zahlreiche kleine und die von Ziege und Schwein nur einige große Fetttropfen (ITO, 1973; BARTOK et al., 1979). Die Anzahl und Größe der Fettvakuolen, die gehäuft in der periportalen als in der zentrolobulären Zone der Leberläppchen auftreten, ist bei den Rindern unabhängig vom Alter des Tieres und dem Fettgehalt der Leber (UETSUKA et al., 2007). Der weitgehend dem Sinusoidendothelzellkern gleichende Nukleus der Ito-Zellen ist von runder bis ovoider Gestalt und befindet sich häufig in der unmittelbaren Nachbarschaft der Zellmembran, wobei seine eigene Membran durch den im Zytoplasma lokalisierten Fetttropfen deformiert und komprimiert wird. Er verfügt über mehrere verschieden geformte Nukleoli und einen äußeren „electron-lucent“ Hof. Trotz seiner beträchtlichen Größe fällt das Kern:Zytoplasma-Verhältnis aufgrund des umfangreichen Zytoplasmas mit den langen Fortsätzen vergleichsweise gering aus. Unweit der Zisternen des rauen Endoplasmatischen Retikulums finden sich in geringer Zahl runde oder auch ovale Mitochondrien, die dicht beieinander liegend in Gruppen angeordnet sind. Das raue Endoplasmatische Retikulum ist aufgrund

seiner zentral erweiterten und mit flockigen Material gefüllten Zisternen, dem rauhen Endoplasmatischen Retikulum eines Fibroblasten vergleichbar. In der Nachbarschaft des rauhen Endoplasmatischen Retikulums liegt der Golgi-Apparat, der aus flachen Zisternen und zahlreichen dilatierten Bläschen aufgebaut ist. Daneben zählen auch Vakuolen und größere Vesikel zu seinen Bausteinen. Auch Lysosomen und multivesikuläre Körperchen können gelegentlich im Bereich um den Golgi-Apparat vertreten sein. Das Erscheinungsbild von Golgi-Apparat und rauem Endoplasmatischen Retikulum deutet auf die Synthese und Sekretion von Glykoproteinen hin. Nicht zuletzt sind überall im Zytoplasma zahlreiche freie Ribosomen und Polysomen anzutreffen, sowie Mikrotubuli und Mikrofilamente unterschiedlicher Orientierung, die aber in erster Linie parallel zur Zelloberfläche verlaufen. Die wenigen pinozytotischen Vesikel unterhalb der Zellmembran lassen auf eine geringe Pinozytoseaktivität schließen. An den Itozellen treten keine altersabhängigen Veränderungen auf (UETSUKA et al., 2007). Sie lassen jedoch einen ruhenden und einen aktivierten Zustand unterscheiden, deren morphologische Differenzen BUDNY et al. (2007) erläutern: Physiologischerweise liegen sie als die, von KÖRNER und RATH (1987) definierten, Vitamin A speichernden, hochspezialisierten, intralobulären Fibroblasten vor. Sie besitzen die höchste Vitamin A Speicherkapazität, haben jedoch nur eine geringe Proliferationsrate. Bei Verletzung der Leber kommt es zum Übergang in den aktivierten Zustand. Die Aktivierung bewirkt einen Verlust von Vitamin A. Außerdem wandern die Zellen aus dem Disse Raum aus und sammeln sich in zerstörten Arealen des Leberparenchyms um gefäßlos gewordene Hepatozyteninseln an, wo sie durch Synthese großer Mengen von extrazellulären Matrixkomponenten zur reparativen Narbenbildung beitragen.

d) Pit-Zellen

Nicht zuletzt stellen auch die Pit-Zellen Mitglieder des sinusoidalen Zellverbandes dar. Sie sind allerdings in nur so geringer Zahl vertreten, dass in Biopsien aus Ratten und Menschenlebern pro Gramm Gewebe nur eine Million Pit-Zellen gefunden werden und auf zehn von Kupffer-Zellen nur eine Pit-Zelle kommt (KOLLER, 1994). Die elektronenmikroskopisch entdeckten Pit-Zellen werden durch zwei morphologisch-ultrastrukturelle Besonderheiten definiert: Die auch als „Pits“ bezeichneten, elektronendichten Granula (WISSE et al., 1976) und die stabkernigen Vesikel „rod-cored vesicle“ (KANEDA et al., 1982). Wie Tabelle 3 anhand des Vergleichs der morphometrisch an den, in Pit-Zellen von Ratte und Mensch auftretenden, zytoplasmatischen Granula erhobenen Daten verdeutlicht, zeigen diese Charakteristika eine speziesspezifische Ausprägung:

Tabelle 3: Morphometrische Daten von Pit-Zell Granula

(Vergleich zwischen Ratte und Mensch)

Spezies	Anzahl der Granula pro Zelle +/- SD	Granulagröße (μm) +/- (SD)	Autor
Ratten	12,9 +/- 4,9	0,28 +/- 0,05	Wisse et al. 1976
Menschen	4,9 +/- 2,7	0,24 +/- 0,04	Bouwens et al. 1989

Modifiziert nach BOUWENS et al. (1989), basierend auf Messungen an Ultradünnschnitten unter Berücksichtigung der Standardabweichung

Außerdem lassen sich die Pit-Zellen anhand ihrer Dichte in drei verschiedene Kategorien, die „Low Density-Large Granular Lymphocytes“ (LD-LGL), die „High Density-Large Granular Lymphocytes“ (HD-LGL) und die „peripheren Blut-Large Granular Lymphocytes“ (PB-LGL) einordnen (KOLLER, 1994), wobei die Dichte der Zellen gemäß der soeben genannten Reihenfolge zunimmt. Die drei Kategorien von LGL differieren nicht nur bezüglich ihrer Dichte, sondern auch hinsichtlich ihrer Größe, Granulafläche sowie Vesikel- und Mikrovillizahl. Wie aus den Tabellen 4, 5 und 6 deutlich hervorgeht, sind die LD-LGL signifikant größer als die annähernd gleich großen HD- und PB-LGL. Die Größe der Granula nimmt, ausgehend von den LD-LGL über die HD-LGL bis zu den PB-LGL zu. Die peripheren Blut-LGL verfügen über weniger stabkernige Vesikel als HD- und LD-LGL, tragen dagegen aber deutlich mehr Mikrovilli (VANDERKERKEN et al., 1990).

Tabelle 4: Quantitative Daten von Pit-Zellen der Ratte

(erhoben an der Leber und im peripheren Blut)

	Sinusoidales Zellisolat	Buffy coat des peripheren Bluts
Zelldurchmesser (μm) +/- (SD)	7,2 +/- 0,54	6,71 +/- 0,84
Granulaanzahl je Zellschnitt +/- (SD)	12,9 +/- 4,9	6,60 +/- 2,50
Durchmesser der dichten Einschlüsse (μm) +/- (SD)	0,28 +/- 0,05	0,43 +/- 0,10
Mitochondrienanzahl je Zellschnitt +/- (SD)	5,4 +/- 2,90	7,0 +/- 4,6
Durchmesser der Mitochondrien (μm) +/- (SD)	0,41 +/- 0,08	0,30 +/- 0,04

SD: Standardabweichung

Modifiziert nach WISSE et al. (1976)

Tabelle 5: Vergleich des Granulavorkommens der verschiedenen LGL-Klassen

Zusammensetzung	Leber LD-LGL (%)	Leber HD-LGL(%)	periphere Blut-LGL (%)
< 25 Granula	10	55	85
> 25 Granula	90	45	15
große Granula	17	54	80
kleine Granula	83	46	20

Modifiziert nach VANDERKERKEN et al. (1990)

Tabelle 6: Morphometrischer Vergleich der verschiedenen LGL-Klassen

Parameter	Leber LD LGL	Leber HD LGL	periphere Blut LGL
Zellfläche (μm^2) +/- (SD)	27,70 +/- (0,5)	24,50 +/- (0,5)	24,80 +/- (0,5)
Granuladurchmesser in (μm) +/- (SD)	0,09 +/- (0,0)	0,10 +/- (0,0)	0,14 +/- (0,0)
Stabkernige Vesikel pro Zelle +/- (SD)	0,01	0,80 +/- (0,1)	0,50 +/- (0,1)
Mikrovilli pro Zelle +/- (SD)	5,20 +/- (0,03)	5,90 +/- (0,5)	7,10 +/- (0,4)

SD= Standardabweichung

Modifiziert nach VANDERKERKEN et al. (1990), basierend auf elektronenmikroskopischen Messungen

Eine umfassende Darstellung der Pit-Zellen findet sich bei KOLLER (1994): Mit Hilfe ihrer stark ausgebildeten Pseudopodien und Filopodien stellen die Pit-Zellen einen Kontakt zu den von Kupffer-Zellen und den sinusoidalen Endothelzellen her. Außerdem können sie die endothelialen Poren durchdringen und Parenchymzellen erreichen. Sie können aber auch ohne Beziehung zu anderen sinusoidalen Zellen frei im Lumen der Lebersinusoiden liegen. Dagegen werden sie nie im Disse Raum oder im portalen Bindegewebe angetroffen. Die Pit-Zellen zeigen eine den Lymphozyten ähnliche Erscheinung, weisen aber ein größeres Zytoplasmavolumen auf. Da sich die meisten Zellorganellen, darunter auch die Zentriolen und der Golgi-Apparat in unmittelbarer Nachbarschaft der einen oder mehreren Einkerbungen des runden oder nierenförmigen, exzentrisch gelagerten Kerns befinden, entsteht eine ausgeprägte Zellpolarität. Der Kern, der über dichtes Chromatin und einen gut entwickelten Nukleolus verfügt, ist im Vergleich zum hellen Zytoplasma klein, so dass ein geringes Kern:Zytoplasma-Verhältnis resultiert. Die Pit-Zellen können einen oder mehrere, stark ausgebildete Golgi - Apparate enthalten, die oft eng aneinanderliegen. Ferner treten zahlreiche kleine, durchsichtig anmutende Golgi-Vesikel auf, die über das gesamte Zytoplasma verstreut sind. Die elektronendichten Granula, einer der beiden Charakteristika der Pit-Zellen, präsentieren sich häufig als Zwischenform zwischen einem völlig kompakten Granulum und einem multivesikulären Körperchen. Sie schließen einen runden, ovalen oder halbmondförmigen, elektronendichten Kern ein und sind von einer glatten oder gewundenen Membran umgeben. Zusätzlich können membranähnliches Material und kleine Vesikel vorhanden sein. Die

multivesikulären Körperchen, die in großer Zahl in der Zelle auftreten, können mit den dichten Granula in Kontakt treten. Beim zweiten prägnanten Merkmal der Pit-Zellen, den stabkernigen Vesikeln, auch „rod-cored“ Vesikel genannt, handelt es sich um kleine, „electron lucent“ Vesikel, die meist eine stabähnliche Struktur einschließen. Bei kleineren Vesikeln kommt es zur Ausstülpung der Membran durch die stabähnliche Struktur, was dem Vesikel ein zitronenförmiges Aussehen verleiht. Da die stabkernigen Vesikel einen einheitlichen Bauplan aufweisen, können sie eindeutig von anderen Vesikeltypen, wie den größeren, kristalline Nukleotide enthaltenden Peroxisomen, sowie den ungefähr gleich großen, aber Nukleoid freien Mikroperoxisomen differenziert werden. Außerdem stehen sowohl Peroxisomen als auch Mikroperoxisomen häufig in engem Kontakt mit dem Endoplasmatischen Retikulum und ihre Membran ist mit 6,5-8 nm dünner als die Plasmamembran. Im Gegensatz dazu werden die stabkernigen Vesikel von einer Membran mit gleicher Dicke wie das Plasmalemm umhüllt und sind häufig in der Nähe des Golgi-Apparats und der subplasmalemalen Gebiete lokalisiert, was dafür spricht, dass sie vom Golgi-Apparat abstammen und über Exozytose ausgeschleust werden. Ferner kommen in den Pit-Zellen, die für die Großen Granulären Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen typischen, sonst aber bei keinem anderen Leukozytentyp anzutreffenden, parallel angeordneten, tubulären Strukturen, auch als „parallel tubular arrays“ bezeichnet, vor. Sie treten bei den 5-25 % der Pit-Zellen auf, die sich durch ein großes Zytoplasmavolumen mit zahlreichen kompakten Granula auszeichnen. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die parallel angeordneten, tubulären Strukturen von den dichten Granula ableiten. Ferner zählt zum Inhalt der Pit-Zellen eine mäßige Zahl von runden Mitochondrien mit deutlichen Cristae, die sich oft in der Nachbarschaft des wenigen, in parallelen Strängen angeordneten Endoplasmatischen Retikulums befinden sowie eine große Zahl freier Ribosomen und Polyribosomen, Mikrotubuli und Bündel von Mikrofilamenten.

3.1.3. Disse Raum

Gemäß HEES (2006b) nimmt der als Disse Raum bezeichnete, perikapilläre Spalt zwischen Sinusoidendothel und der Zellmembran der Leberzellen eine Breite von 0,5 bis 1 µm ein und ist aufgrund dieses geringen Ausmaßes im Lichtmikroskop normalerweise nicht darstellbar. Bei diesem Spaltraum, dessen Volumen 4,9% (BLOUIN et al., 1977) des gesamten Lebervolumens ausmacht, handelt es sich nach KOLLER (1994) um einen Funktionsraum wechselnder Weite, die vom sinusoidalen Blutstrom, dem Funktionszustand der Hepatozyten und dem Stoffaustausch bestimmt wird. Der Disse Raum setzt sich sowohl aus zellulären Bestandteilen als auch azellulärer Matrix zusammen (KOLLER, 1994): Die zellulären

Bausteine stellen die Ito-Zellen mit ihren zytoplasmatischen Fortsätzen sowie die Pseudopodien der von Kupffer-Zellen und einiger Pit-Zellen dar. Die azelluläre Matrix liegt in Form von Kollagenfibrillen von 30-79 nm Breite, Retikulinfilamenten, die häufig die Kollagenfibrillen umhüllen, sowie aus unstrukturierten Makromolekülen bestehenden Filamenten, die teilweise auch in Bündeln angeordnet sind, vor. Ferner sind im Disse Raum adrenerge Nervenfasern, die die Hepatozyten und die sinusoidalen Wandzellen beeinflussen zu finden.

3.2. Versorgungssysteme des Leberläppchens

Die, zur Versorgung der Lobuli hepatici notwendigen Strukturen erreichen die Läppchen über das Interstitium, das zugleich in Form tierartig unterschiedlich starker Bindegewebssepten die Lobuli gegeneinander abgrenzt (LIEBICH, 2010b). In den Bereichen, in denen die Ecken dreier benachbarter Leberläppchen aufeinandertreffen, verbreitern sich die Septen zu flächenhaften Arealen, den Areae interlobulares, auch Glisson-Dreiecke oder Portalfelder genannt (LIEBICH, 2010b). Innerhalb der Glisson-Dreiecke werden Arteria, Vena und Ductus interlobularis unter dem Begriff „Lebertrias“ oder auch „Glisson-Trias“ zusammengefasst (GLISSON, 1681). Die Areae interlobulares schließen in weitaus größerem Umfang als die Septen Nerven, Gallengänge sowie Lymph- und Blutgefäße ein. ILLIG (1960) erläutert ausführlich das Gefäßsystem der Leber: Die Leber erhält als Organ mit doppelter Blutversorgung Zuflüsse von zwei bedeutenden Gefäßen: Erstens von der Arteria hepatica, einem Ast der Arteria coeliaca, die als nutritives Gefäß Sauerstoff und Nährstoffe herantransportiert und zweitens der Pfortader, Vena portae, über welche die Stoffwechselprodukte sämtlicher unpaarer Organe der Bauchhöhle zur Leber gelangen. Beide Gefäße treten an der, auch als Hilus bezeichneten Leberpforte, in das Organ ein und zweigen sich in zahlreiche Äste, die Arteriae und Venae interlobulares, die in den Bindegewebssepten parallel entlang der Außenkanten der Leberläppchen zusammen mit Nerven, Lymphgefäßen und interlobulären Gallengängen verlaufen, auf. Von den Arteriae und Venae interlobulares gehen wiederum zahlreiche Arteriolen bzw. Venolen ab, die schließlich rechtwinklig als Kapillaren in die Leberläppchen eintreten. In den Leberläppchen vereinigt sich nun das arterielle und venöse Gefäßsystem zu den Sinuskapillaren, den Lebersinusoiden, die nachfolgend arteriovenöses Mischblut führen. Dieses strömt an den Leberzellplatten, den Laminae hepatici vorbei, ehe es wieder im Zentrum eines jeden Leberläppchens in der Zentralvene, der Vena centralis zusammenfließt. Durch die Vereinigung der Venae centralis mehrerer Leberläppchen entstehen über die Venae sublobulares, die Venae hepatici, die die Leber an der Zwerchfellseite verlassen und in die Vena cava caudalis einmünden. Das

Gallengangsystem, dessen Aufbau von LIEBICH (2010b) wie folgt zusammengefasst wird, nimmt in Form von Gallenkapillaren, die ohne eigene Wand, nur vom Plasmalemm benachbarter Hepatozyten begrenzt, entspringen, seinen Anfang. Noch innerhalb des Leberläppchens finden mehrere Gallenkapillaren zu kleinen Gallekanälchen, auch als Heringkanälchen oder Canaliculi biliferi bezeichnet, zusammen. Mehrere solcher Gallekanälchen schließen sich wiederum zu den kleinen intralobulären Gallengängen, den Ductuli biliferi, zusammen. Nachdem Austritt aus den Leberläppchen vereinigen sich die kleinen Gallengänge zu den größeren, in den Glisson-Trias verlaufenden Gallengängen, den Ductus interlobulares biliferi. Schließlich verbinden sich beim Wiederkäuer sämtliche Ductus interlobulares biliferi der rechten Leberhälfte zu einem einzigen Ductus hepaticus dexter, die der linken Hälfte zum Ductus hepaticus sinister. Aus dem Zusammenschluss dieser beiden großen Gefäße geht der Ductus hepaticus communis hervor. Dieser vereinigt sich mit dem Ductus cysticus zum Ductus choledochus, der auf der Papilla duodeni major im Anfangsteil des Duodenum mündet.

3.3. Metabolische Zonierung des Leberläppchens

Die Lobuli hepatici weisen im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Stoffwechselphysiologie eine Gliederung in zwei Bereiche mit unterschiedlichen metabolischen Funktionen, nämlich eine afferente, periportale und eine efferente, perivenöse, zentrolobuläre Zone auf (SANDEMANN & FUHRMANN, 2009). Die funktionelle Zweiteilung der Lobuli hepatici wird morphologisch anhand der verschiedenartigen Gestaltung der Sinusoide in beiden Arealen nachvollziehbar: Anzahl und Durchmesser der Sinusoide sind in der zentrolobulären Zone wesentlich größer als in der periportalen (WISSE et al., 1982). Aus der damit einhergehenden, deutlich größeren Gesamtquerschnittsfläche der zentrolobulären Kapillaren ergibt sich in Kombination mit der zugleich auch noch deutlich größeren Durchlässigkeit dieser Sinusoide ein doppelt so hoher Blutfluss durch die zentrolobuläre wie durch die periportale Zone. Dies wird in Tabelle 7 veranschaulicht:

Tabelle 7: Vergleich der portalen und zentralen Sinusoide

	periportal	zentrolobulär	%Unterschied
Durchmesser, μm (*)	4,15 +/- (0,11)	5,43	30,8
Anzahl/ μm^2 (*)	24,25 +/- (1,41)	35,64	47,0
Fläche, μm^2 (*)	36,57 +/- (3,89)	66,50	81,8

(*)= Standardabweichung

Modifiziert nach WISSE et al. (1982), basierend auf rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen

Diese Variation in der Stromstärke gleicht etwas die differierende Nähr- und Sauerstoffversorgung der periportalen und zentrolobulären Zone aus. Dennoch bleibt gemäß VOLBRACHT (2004) die periportale Zone die Zone mit dem höheren Sauerstoffpartialdruck und größeren Zustrom von Hormonen und Nährstoffen aus dem Pfortaderblut, während die perivenöse Zone vornehmlich der Glykogenspeicherung dient. Um trotz des unterschiedlichen Nähr- und Sauerstoffangebots in den beiden Läppchenarealen den maximal möglichen, metabolischen Wirkungsgrad der Leber zu erzielen, sind die Hepatozyten eines Lobulus hepaticus nicht mit denselben Enzymen ausgestattet (GRISHAM, 1994), sondern verfügen in der periportalen Zone vor allem über für Stoffwechselforgänge mit hohem Nähr- und Sauerstoffbedarf wichtige Enzyme und in der zentrolobulären über solche mit Bedeutung für Prozesse, die relativ wenig Sauerstoff und viel Glukose benötigen (SANDEMANN & FUHRMANN, 2009). Tabelle 8 stellt die wichtigsten der bevorzugt in der periportalen Zone des Leberläppchens durchschrittenen Stoffwechselprozesse einschließlich ihrer Schlüsselenzyme denjenigen, die bevorzugt in der den zentrolobulären Zone ablaufen gegenüber:

Tabelle 8: Wichtige, v.a. periportal bzw. zentrolobulär ablaufende Stoffwechselwege

Stoffwechselprozesse und Schlüsselenzyme	Peri-portal	Zentrolobulär
Glukoneogenese aus Aminosäuren und Laktat: Glukose-6-phosphatase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Phosphoenolpyruvatcarboxykinase	X	-
Glykolyse: Glukokinase, Hexokinase	-	X
Fettsäureoxidation, Ketogenese, Citratzyklus: Betahydroxy-betamethylglutaryl-CoA-Reduktase, Betahydroxy-butyryl-CoA-Dehydrogenase, Succinatdehydrogenase	X	-
Glykogensynthese: Glykogensynthetase	-	X
Synthese von Cholesterol und Gallensäuren: Betahydroxy-betamethylglutaryl-CoA-Reduktase	X	
Fettsäuresynthese: Acetyl-CoA-Dehydrogenase	-	X
Harnstoffzyklus: Carbamoylphosphatsynthetase	X	-
Glutaminsynthese: Glutaminsynthetase	-	X
Phase-II-Reaktion der Biotransformation (Gluthathionkonjugation, Glucuronidierung): UDP-Glucuronyl-Transferasen	X	-

Modifiziert nach SANDEMANN und FUHRMANN (2009)

4. Physiologie der Leber des Rindes

Die Leber nimmt gemäß VOLBRACHT (2004) als Hauptstoffwechselorgan eine zentrale Stellung bei der Metabolisierung der Nährstoffe, der Entgiftung exogener und endogen gebildeter Schadstoffe sowie der Bildung und Sezernierung der Galle ein. Aufgrund der letztgenannten Funktion ist sie auch eine sezernierende Drüse. Als Drehscheibe des

Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsels ist sie von außerordentlicher Bedeutung für die Verwertung der mit der Nahrung zugeführten Nährstoffe und die Bereitstellung von Energieträgern.

4.1. Rolle der Leber im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel

4.1.1. Rolle der Leber im Kohlenhydratstoffwechsel

Wichtige Bereiche des Kohlenhydratstoffwechsels, die in der Leber ablaufen, sind die Glukoneogenese, die Glykolyse sowie die Glykogensynthese und –speicherung (SANDEMANN & FUHRMANN, 2009). Die Glukoneogenese wird von HEPPEL (2003) folgendermaßen erläutert: Unter Glukoneogenese versteht man die Synthese von Glukose aus Nicht-Kohlenhydratvorstufen. Diese Substanzen werden mit dem Blut über die Pfortader in die Leber transportiert. Es handelt sich um glucoplastische Aminosäuren, Laktat, Propionat und Glycerin. Dieser Stoffwechselweg kann mit Ausnahme der Nierenrinde nur vom Leberparenchym vollzogen werden. Hier werden 80-85% der Glukose aus Glukoneogenese gebildet. Die Bedeutung dieses Stoffwechselweges liegt in der langfristigen Aufrechterhaltung eines konstanten Blutglukosespiegels unter Bedingungen des Nahrungsentzugs und einer unzureichenden Kohlenhydratversorgung. Eine ausreichende Versorgung mit Glukose ist von außerordentlicher Wichtigkeit für die Versorgung von Erythrozyten und Gehirn, da diese nur Glukose als Energiequelle nutzen können. Innerhalb der Leberzelle nehmen das Zytosol, die Mitochondrien und das Endoplasmatische Retikulum an der Glukoneogenese teil. Sie verläuft, wie bei BERG et al. (2007d) ausgeführt, nach dem Prinzip einer umgekehrten Glykolyse. Unter natürlich auftretenden Bedingungen sind drei enzymatische Schritte der Glykolyse mit einer stark negativen Änderung der freien Enthalpie verbunden, so dass keine Rückreaktion stattfindet. Der Umgehung dieser Reaktionsschritte dienen bei der Glukoneogenese drei Enzyme. Es handelt sich um zwei Phosphatasen und eine Carboxykinase. Die Phosphatasen, sprich die Glukose-6-phosphatase und die Fruktose-1,6-bisphosphatase setzen Glukose bzw. Fruktose aus den phosphorilierten Verbindungen (Glukose-6-phosphat bzw. Fruktose-1,6-bisphosphat) frei. Für die Reaktion von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat ist die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase unter Mitwirkung des Malat-Aspartat-Shuttles verantwortlich. Da im Vormagensystem des Wiederkäuers sämtliche, mit dem Futter zugeführten Kohlenhydrate durch die mikrobielle Pansenflora in kurzkettige Fettsäuren umgewandelt werden, stellt die Glukoneogenese die einzige Quelle des Wiederkäuers für Glukose dar (SANDEMANN & FUHRMANN, 2009). Bei Glukosemangel erfolgt die Energiebereitstellung wie von DRACKLEY (2012) dargelegt durch Ketogenese: Im

Hungerzustand setzen die glykolytisch wirkenden Hormone Glukagon und Wachstumshormon sowie die Katecholamine Fettsäuren aus dem Depotfett frei. Das in großer Menge bei der Betaoxidation der Fettsäuren gebildete und nicht in genügendem Umfang in den Citratzyklus einschleubare Acetyl-CoA dient als Ausgangssubstrat für die Ketonkörperbildung. Im Mitochondrium des Hepatozyten kondensieren die Moleküle und setzen sich schließlich zu Acetoacetat, Betahydroxybutyrat und Aceton um. Diese fungieren als Energiequelle für Herz, Skelettmuskulatur sowie Nierenrinde.

4.1.2. Rolle der Leber im Protein- und Fettstoffwechsel

Wie nachfolgend auf der Grundlage der ausführlichen Abhandlungen von SANDEMANN und FUHRMANN (2009) unter Einbeziehung weiterer Autoren dargelegt wird, ist die Leber Syntheseort zahlreicher, verschiedener Proteine: Darunter befindet sich neben den Gerinnungsfaktoren und Immunglobulinen unter anderem auch Albumin, das als Hauptbestandteil des Blutplasmas für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks in den Blutgefäßen und damit der Regulation der Homöostase des Gewebewassers von großer Bedeutung ist. Ferner synthetisiert sie mit Ausnahme von Apolipoprotein A und B48, sämtliche Apolipoproteine, die als wesentlicher Bestandteil der Lipoproteine erst den Transport der hydrophoben Fette im Blut ermöglichen. Die Lipoproteine können anhand ihrer Dichte, ihrer Lipidzusammensetzung, ihres Proteingehalts und der Art der Apolipoproteine, in die Klassen Chylomikronen, Very low density lipoproteins (VLDL), Low density lipoproteins (LDL) und High density lipoproteins (HDL) eingeteilt werden (SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1989). Die Chylomikronen werden im Darmlumen aus von Enterozyten resobierten Triacylglycerolen, Cholesterol, Phospholipiden und Apolipoprotein B48 zusammengefügt, und gelangen über das Lymphsystem und den Ductus thoracicus in den großen Kreislauf. Nach Aufnahme von Apolipoprotein C und E von HDL dienen die Chylomikronen als Substrat für die Lipoproteinlipase der Endothelien von Fettgewebe und quergestreifter Muskulatur. Durch Insulin aktiviert, spaltet die Lipoproteinlipase die, in den Chylomikronen enthaltenen Triacylglycerole in Glycerol und freie Fettsäuren. Die freien Fettsäuren werden im Fettgewebe mit Glycerol wieder zu Triacylglycerolen reverestert. In der Muskulatur werden die freien Fettsäuren in den Citratzyklus eingeschleust und dienen letztlich der Energiegewinnung. Durch die Abgabe der Triacylglycerole an die Lipoproteinlipase entstehen aus den Chylomikronen die cholesterolreichen Remnants, die von den Remnant-Rezeptoren auf der Oberfläche der Hepatozyten registriert und internalisiert werden. Im Gegensatz dazu werden die cholesterolreichen Lipoproteine sehr geringer Dichte kontinuierlich in Leber und Darm synthetisiert. Ihre Bestandteile sind Cholesterolester,

Phospholipide und Apolipoprotein B100. Auch sie nehmen Apolipoprotein C und E von HDL auf und werden analog den Chylomikronen durch die Lipoproteinlipase gespalten. In geringem Ausmaß werden die entstehenden VLDL Remnants von VLDL-Rezeptoren der Leber internalisiert. Sie dienen als Substrat für die hepatische Triacylglycerollipase unter deren Wirkung sie weiter zu den von HENRIKSEN et al. (1981) charakterisierten Lipoproteinen geringer Dichte schrumpfen. Diese sind reich an Cholesterolestern, enthalten Apolipoprotein B100 und werden von LDL-Rezeptoren in der Peripherie erkannt und aufgenommen. Die von ASSMANN et al. (1980) näher untersuchten HDL existieren in drei verschiedenen Formen: HDL1, HDL2 und HDL3. Zunächst werden HDL1 als scheibenförmige Partikel in Leber und Dünndarm aus Cholesterol, Apolipoprotein A1 und Phospholipiden aufgebaut. In den peripheren Geweben erhalten sie zusätzliches Cholesterol. Das Plasmaenzym Cholesterolester-Lecithin-Acyltransferase bewirkt eine Überführung in Cholesterolester. Diese verlassen aufgrund ihrer Hydrophobizität die periphere Lipiddoppelschicht und füllen das Innere der HDL auf, die nun als sphärische Partikel erscheinen. Es handelt sich um die HDL3. Durch die Wanderung der Cholesterolester von der Peripherie der HDL in deren Zentrum entsteht ein Cholesterolgradient, der die weitere Aufnahme von Cholesterol aus der Peripherie ermöglicht. Zur Aufrechterhaltung des Gradienten trägt auch das Cholesterolestertransferprotein bei, das den Wiederkäuern allerdings fehlt. Mit Hilfe dieses Enzyms werden Cholesterolester an Chylomikronen, VLDL und LDL abgegeben und im Tausch Triacylglycerole aufgenommen. So entstehen die an Triacylglycerol relativ reichen HDL2, die ein Substrat für die hepatische Triacylglycerollipase darstellen. Auch die Gallensäuren spielen, wie von SANDEMANN und FUHRMANN (2009) erklärt, eine entscheidende Rolle für das Funktionieren des Fettstoffwechsels. Sie werden in den Leberzellen ausgehend von Cholesterol synthetisiert. Dabei entsteht aus dem Cholesterol durch Hydroxilierung, Hydrierung und Abspaltung eines C3-Fragments zunächst Chenodesoxycholsäure. Diese wird schließlich durch Konjugation mit der Aminosäure Glycin beziehungsweise dem biogenen Amin Taurin zu einer wirklich wirksamen Gallensäure mit einem pK_a -Wert von 2 umgesetzt. Die Gallensäuren sind neben Cholesterol, Phospholipiden und Monoacylglycerolen Teil eines Monolayers, der Fetttröpfchen umgibt. Diese Gebilde werden insgesamt als Micellen bezeichnet. Der Monolayer ermöglicht durch Herabsetzung der Oberflächenspannung im Darmchymus den Zutritt der Pankreaslipase zu den Triacylglycerolen und zudem als Fett-Wasser-Grenzfläche am Übergang zum wässrigen Milieu des Darmlumens überhaupt erst die Resorption der hydrophoben Triacylglycerole durch die Enterozyten.

4.2. Rolle der Leber bei Entgiftungs- und Abbauprozessen

Einen der wichtigsten, in der Leber ablaufenden Entgiftungsprozesse stellt der von BERG et al. (2007c) erläuterte Harnstoffzyklus dar. Er dient der Beseitigung des endogen gebildeten, schon in niedrigster Konzentration als starkes Zellgift wirkenden Ammoniaks. Diese Entgiftung kann ausschließlich in der Leber erfolgen. Im Rahmen des Harnstoffzyklus wird Stickstoff, der entweder von Ammoniak direkt oder von der Aminosäure Aspartat stammt, in den für die Nieren leicht ausscheidbaren Harnstoff überführt. Dazu wird zu Beginn des Harnstoffzyklus innerhalb des Mitochondriums Carbamoylphosphat synthetisiert. Anschließend wird Carbamoylphosphat mit Ornithin zu Citrullin umgesetzt, das über ein spezifisches Transportprotein in das Cytosol ausgeschleust und über mehrere Zwischenschritte zu Arginin umgesetzt wird. Aus Arginin wird Harnstoff durch Hydrolyse freigesetzt. Das dabei anfallende Ornithin, gelangt über einen Transportmechanismus zurück in die Mitochondrien. Hämoglobin ist ein Beispiel für die zahlreichen, dem hepatischen Abbau unterliegenden, ungiftigen Substanzen. Das aus Hämoglobin in den retikuloendothelialen Zellen von Milz, Leber und Knochenmark gebildete, orange-rote, lipophile Billirubin I wird nach Kopplung an Albumin vom Blut zur Leber transportiert (BERG et al., 2007a). In den Hepatozyten entsteht daraus durch Konjugation mit der hydrophilen Glucuronsäure das gallefarbene, nun gut wasserlösliche Bilirubin II (BERG et al., 2007a), das mit der Galle in den Darm ausgeschieden werden kann.

Die Leber dient aber nicht nur der Entgiftung endogener, sondern auch exogen zugeführter Schadstoffe, wie Arznei-, Pflanzenschutz- und Düngemitteln (SANDEMANN & FUHRMANN, 2009). Die dafür zuständige Entgiftung durch Biotransformation läuft, wie von MUTSCHLER et al. (2001) erläutert, in zwei Schritten ab: Zunächst erfolgt die Biotransformation durch chemische Modifikation, die sogenannten Phase 1 Reaktion, bei der es sich um Oxidation, Reduktion oder hydrolytische Spaltung handelt. Eines der wichtigsten Enzyme ist hierbei die Cytochrom-P 450 abhängige Monooxygenase. Sie katalysiert die Hydroxylierung von zahlreichen Pharmaka und Giften. In der sich anschließenden Phase 2 Reaktion wird eine hydrophile Gruppe an die Moleküle angehängt, wodurch die Ausscheidung über die Nieren verbessert wird. Als hydrophile Gruppe können durch Ether- oder Esterbindung Glucuronsäure oder Schwefelsäure, durch Säureamidbildung Glycin oder Acetat und durch Mercaptursäurebildung Glutathion angekoppelt werden. Die beteiligten Enzyme sind UDP-Glucuronyl-Transferasen.

5. Histochemische Untersuchungen an der Leber des Rindes

5.1. Grundlagen immunhistochemischer Untersuchungen

Die Immunhistochemie, deren Grundlagen sich bei ROMEIS (2010c) finden, verfolgt das Ziel, nicht nur das bloße Vorhandensein antigener Strukturen, sondern auch deren exakte Lokalisation in der Zelle bzw. im Gewebeverband zu erfassen. Die Antigene werden mit Hilfe spezifischer, gegen sie gerichteter Antikörper aufgespürt und in einem Antigen-Antikörper-Komplex gebunden. Dieser kann durch vorhergehende Markierung des Antikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder die vorausgehende Kopplung mit einem Enzym, das bei Zugabe seines spezifischen Substrats dieses zu einem schwerlöslichen Farbstoff umsetzt, sichtbar gemacht werden. Bei indirekten immunhistochemischen Methoden wird anstatt des markierten Primärantikörpers ein markierter Sekundärantikörper eingesetzt, der sich an den unmarkierten Primärantikörper bindet. Von den antigenen Strukturen eignen sich für immunhistochemische Untersuchungen besonders die von WENDL (2012) und LIEBICH (2010a) umfassend charakterisierten Intermediärfilamente, die neben den Mikrotubuli und Mikrofilamenten die dritte Komponente des Zytoskeletts darstellen und sich gegenüber den beiden anderen, ständig im Umbau begriffenen Zellgerüstproteinen, durch eine außerordentliche Beständigkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Chemikalien auszeichnet. Da es sich bei den Intermediärfilamenten um Polypeptidketten handelt, besitzt jeder Zelltyp weitgehend eigene, für ihn individuelle Intermediärfilamente, so dass er anhand deren Nachweises näher charakterisiert werden kann. Die Intermediärfilamente lassen fünf Klassen unterscheiden, von denen in der vorliegenden Arbeit fünf Vertreter der ersten, als Zytokeratine, Tonofilamente oder auch Keratinfilamente bezeichneten Klasse sowie Vimentin aus der zweiten, Vimentin und vimentinähnliche Proteine genannten Klasse näher untersucht wurden. Die Zytokeratine, die 50 verschiedene, sowohl saure als auch basische Iso- und Subtypen umfassen, treten generell nur in Epithelzellen, Vimentin hingegen in Zellen mesenchymalen Ursprungs, Endothelzellen sowie Fibroblasten auf.

5.2. Grundlagen glykohistochemischer Untersuchungen - Lektine

Der Begriff „Lektin“ steht nach GOLDSTEIN et al. (1980) ursprünglich für ein Protein oder auch Glykoprotein pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, das spezifisch, an eine für jedes Lektin ganz bestimmte Kohlenhydratstruktur bindet. Ferner besitzen Lektine die Fähigkeit Glykokonjugate zu präzipitieren und Zellen zu agglutinieren (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986), wobei sich „Agglutination“ als die Verklumpung Antigen tragender Zellen (REICHE, 2003) und „Präzipitation“ als die Bildung eines Präzipitats (REICHE, 2003), sprich eines

Niederschlags durch Ausfällung (REICHE, 2003), definiert. GABIUS und GABIUS (1992) sprechen von „Zucker bindenden Proteinen ohne enzymatische Aktivität, die keine Homologie zu Antikörpern aufweisen“. Der Definition der Lektine wird heute weniger ihre biochemische Struktur, sondern primär die konsequente Bindung an nur ein, für jedes Lektin spezifisches Kohlenhydrat, zu Grunde gelegt.

Auf dieser sogenannten nominalen Bindungsspezifität basiert auch die Zuordnung der Lektine zu folgenden, sechs verschiedenen Klassen (GABIUS, 2009) modifiziert nach (MERTEN, 2011; SCHOLZ, 2012):

- I. Glukose- und Mannose-spezifische Lektine
- II. Galaktose-spezifische Lektine
- III. N-Acetylglukosamin-spezifische Lektine
- IV. N-Acetylgalaktosamin-spezifische Lektine
- V. Fukose-spezifische Lektine
- VI. Oligosaccharid-spezifische Lektine

Die Bindungsspezifität der Lektine wird im Rahmen glykohistochemischer Untersuchungen dazu benutzt, um die Struktur der als „Glykane“ bezeichneten Zuckerreste von Oligosacchariden, die N- oder O-glykosidisch mit einem Protein verknüpft sind (ROTH, 2011), zu analysieren. Diese Glykane fungieren als Liganden, die anhand der in ihrer Struktur enthaltenen, biologischen Information, dem sogenannten „Zuckercode“ (sugar code) (RÜDIGER & GABIUS, 2009) von den Lektinen rezeptorspezifisch erkannt werden (GABIUS & GABIUS, 1992). Die Grundlage dieses Zuckercodes bilden Monosaccharide, in der Regel Hexosen, die aufgrund der vielen verschiedenen Arten sowie von Isomerie, Anomerie, Epimerie und vieler verschiedener Substituenten (Sulfatierung, Phosphorylierung, Acetylierung) (RÜDIGER & GABIUS, 2009) als die „Buchstaben eines umfangreichen Alphabets“ (KOZAR et al., 2009) aus dem sich zahlreiche, verschiedene Di- und Oligosaccharide als „Codeworte“ zusammensetzen lassen (GABIUS & GABIUS, 1992; KOZAR et al., 2009), dienen. Daraus ergibt sich bedingt durch die vielen Kombinationsmöglichkeiten eine enorme Anzahl an verschiedenen Zuckerketten. Dieses breite Spektrum ermöglicht, dass die Glykane als endständiges Glied der, einen wesentlichen Bestandteil von im Organismus auftretenden Glykoproteinen- und lipiden ausmachenden Oligosaccharidketten, wie auch letztere selbst, sowohl für die verschiedenen Zell- und Gewebearten als auch für die verschiedenen Spezies relativ spezifisch sind. Daher leistet die,

mit Hilfe der spezifischen Lektine durchgeführte Analyse der Glykanstruktur einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung der Zellen und Gewebe verschiedener Spezies.

Die, in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lektine, sind ausschließlich pflanzlicher Herkunft und können anhand ihrer Zuckerspezifität folgenden Klassen zugeordnet werden (MERTEN, 2011; SCHOLZ, 2012):

Tabelle 9: Klassifizierung und Herkunft der verwendeten Lektine

	Lektin	Herkunft	Zuckerspezifität
Con A	Concanavalin A	<i>Canavalis ensiformis</i> (Schwertbohne)	Glukose, Mannose
LCA	Lens culinaris Agglutinin	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)	
PSA	Pisum sativum Agglutinin	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	
PNA	Peanut Agglutinin	<i>Arachis hypogea</i> (Erdnuß)	Galaktose
RCA	Ricinus communis Agglutinin	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)	
VAA	Viscum album Agglutinin	<i>Viscum album</i> (Mistel)	
SNA	Sambucus nigra Agglutinin	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	
SBA	Soybean Agglutinin	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	
WGA	Wheat Germ Agglutinin	<i>Tritium vulgare</i> (Weizen)	N-Acetyl- glukosamin
GSL-1	Griffonia simplicifolia Agglutinin-1	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)	N-Acetyl- galaktosamin
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikanische Pferdebohne)	
SBA	Soybean Agglutinin	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	
SJA	Saphora japonica Agglutinin	<i>Saphora japonicum</i> (Chines. Schnurbaum)	
SNA	Sambucus nigra Agglutinin	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	
UEA-1	Ulex europeus Agglutinin-1	<i>Ulex europeus</i> (Europ. Stechginster)	L-Fukose
PHA-E	Phaseolus vulgaris Agglutinin erythro	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	Oligosaccharide
PHA-L	Phaseolus vulgaris Agglutinin leuko	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	

MAA-1	Maackia amurensis Agglutinin-1	<i>Maackia amurensis</i> (Asiat. Gelbholz)	
-------	--------------------------------------	---	--

III. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten die Lebern von elf, frisch geschlachteten Rindern, die von den amtlichen Tierärzten des städtischen Schlachthofs München als gesund beurteilt worden waren. Auch die Organe selbst zeigten bei der amtlichen Fleischuntersuchung keine makroskopisch feststellbaren, pathologischen Befunde. Unter den Rindern, deren exakte, Daten in Tabelle 10 zusammengestellt sind, waren sowohl männliche als auch weibliche Tiere, sowie alle Altersstufen von 15 Monaten bis 10 Jahren vertreten.

Tabelle 10: Tierdaten

Rind	Geschlecht	Alter
A	männlich	16 Monate
B	männlich	15 Monate
C	männlich	17 Monate
D	männlich	15 Monate
E	männlich	18 Monate
F	männlich	16 Monate
G	weiblich	2 Jahre
H	weiblich	4,5 Jahre
I	weiblich	10 Jahre
J	weiblich	4,5 Jahre
K	männlich	2,5 Jahre

2. Herstellung der Präparate für die Lichtmikroskopie

2.1. Probenentnahme

Unmittelbar im Anschluss an die Fleischuntersuchung wurden von der Leber des ersten Tieres (A) von 15, und von denen der übrigen zehn Tiere (B-K) von neun verschiedenen Stellen Gewebewürfel mit ca. 1 cm Kantenlänge entnommen. Die Entnahmestellen der Proben sind in

den Abbildungen 1 und 2 dargestellt und in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt.

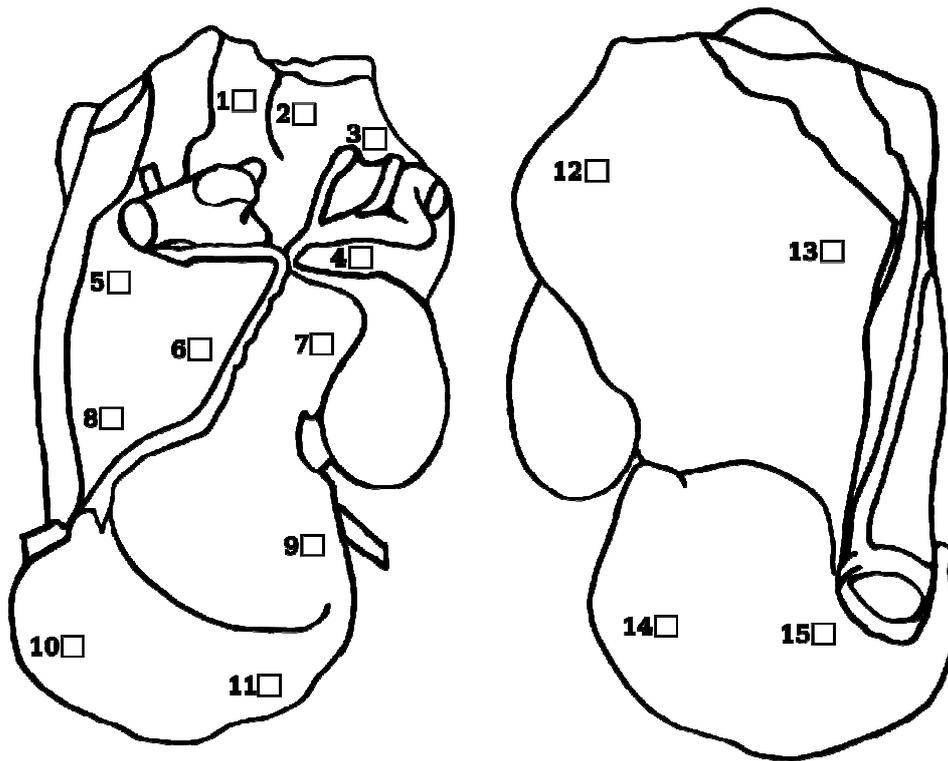


Abb. 1: Probenentnahmestellen auf der Leber A

Tabelle 11: Probenentnahmestellen auf der Leber A

Probennummer	Lokalisation auf der Leber
1	Zentrum des Processus caudatus, Facies visceralis
2	dorsal im Lobus dexter, Facies visceralis
3	rechts im Lobus dexter, Facies visceralis
4	ventral im Lobus dexter, Facies visceralis
5	links im Processus papillaris, Facies visceralis
6	rechts im Processus papillaris, Facies visceralis
7	dorsal im Lobus quadratus, Facies visceralis
8	ventral im Processus papillaris, Facies visceralis
9	rechter Rand des Lobus sinister, Facies visceralis
10	links unten im Lobus sinister, Facies visceralis
11	rechts unten im Lobus sinister, Facies visceralis
12	rechts im Lobus dexter, Facies diaphragmatica
13	links im Lobus dexter, Facies diaphragmatica
14	rechts im Lobus sinister, Facies diaphragmatica
15	links im Lobus sinister, Facies diaphragmatica

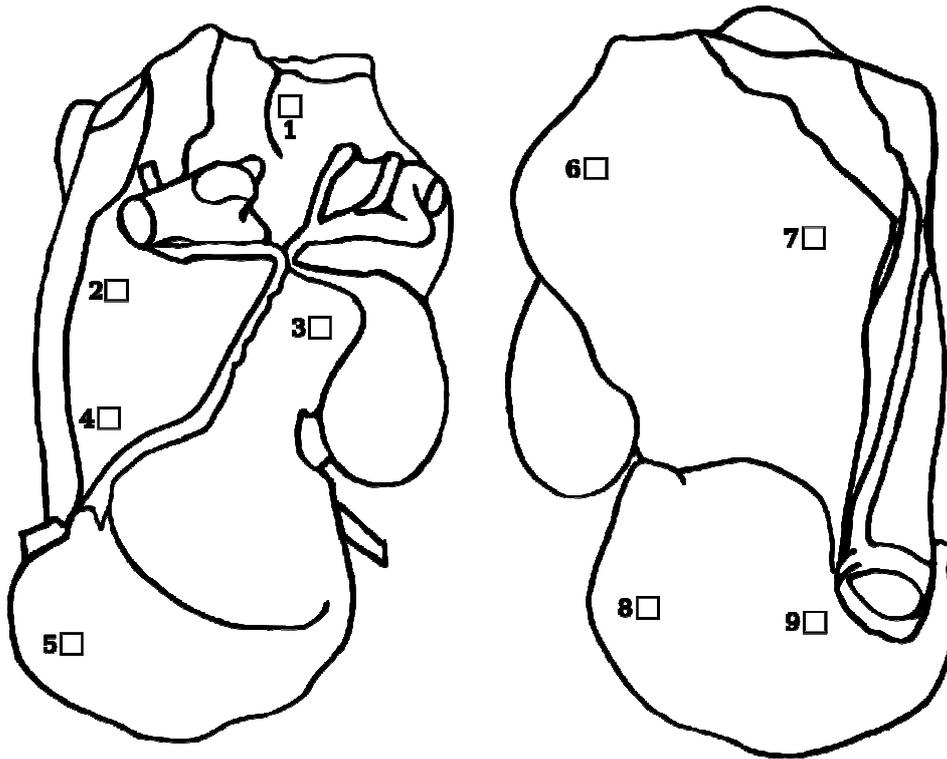


Abb. 2: Probenentnahmestellen auf den Lebern B-K

Tabelle 12: Probenentnahmestellen auf den Lebern B-K

Probennummer	Probenentnahmestelle auf der Leber
1	dorsal im Lobus dexter, Facies visceralis
2	ventral im Lobus dexter, Facies visceralis
3	dorsal im Lobus quadratus, Facies visceralis
4	ventral im Processus papillaris, Facies visceralis
5	links unten im Lobus sinister, Facies visceralis
6	rechts im Lobus dexter, Facies diaphragmatica
7	links im Lobus dexter, Facies diaphragmatica
8	rechts im Lobus sinister, Facies diaphragmatica
9	links im Lobus sinister, Facies diaphragmatica

Von jeder dieser Lokalisationen wurden bei allen Lebern je zwei Gewebewürfel mit einer Skalpellklinge herausgeschnitten und in 3,7%igem, gepufferten Formol bzw. in Bouin-Lösung fixiert.

2.2. Probenverarbeitung zu Präparaten

Die Fixierung in Bouin (gesättigte Pikrinsäure:Formalin:Eisessig wie 15:5:1) nahm beim Lebergewebe in Abhängigkeit von der Dicke der zu fixierenden Gewebestücke einen unterschiedlich langen Zeitraum in Anspruch und ließ folgende Arbeitsschritte unterscheiden:

1. Tag

- Gewinnung von Gewebematerial in Gestalt von Blöcken mit ungefähr 1 cm Kantenlänge auf dem Schlachthof
- unverzügliche Gabe der Gewebestücke in Probenröhrchen mit Bouin-Lösung nach der Entnahme
- im Labor: Belassen der Probenentnahmeröhrchen in den Proberöhrchenständern

2. Tag

- Zuschnitt der Probenblöcke so, dass jeder Block mindestens eine glatte Fläche aufweist
- Kontrolle der Durchsetzung des Probenmaterials mit Bouin-Lösung anhand der Gelbfärbung der Schnittfläche der dicksten Probestücke
- Ersatz der Bouin-Lösung durch 70%igen Alkohol, wenn auch die Schnittfläche der dicksten Blöcke vollständig gefärbt ist
- andernfalls: Belassen der Proben in der Bouin-Lösung bis auch dickere Proben vollständig gelb erscheinen.

ab dem 3. Tag:

- tägliche Erneuerung des 70%igen Alkohols in den Probenröhrchen
- Kontrolle der Entfärbung des Gewebes
- Einkapseln der Proben, wenn Gewebe nur noch schwach gelblich gefärbt ist
- Gabe der eingekapselten Proben in einen Erlenmeyerkolben mit frischem, 70%igen Alkohol
- Entfernung der restlichen, überschüssigen Bouin-Lösung aus dem Gewebe durch Schwenken auf dem Schüttler für eine Zeitspanne von vier bis fünf Stunden
- Verbringen der Kapseln in den Einbettautomaten (Shandon Duplex Processor der Firma Shandon, Frankfurt)

Die Fixierung in 3,7%igem, gepuffertem Formol wurde durch folgendes Vorgehen erreicht:

1. Tag

- Entnahme von Gewebeproben in Form von Würfeln mit ca. 1 cm Kantenlänge auf dem Schlachthof
- Einlegen der Gewebewürfel in frisches, PBS-gepuffertes, 3,7%iges Formol sofort nach der Gewinnung
- nach Ankunft im Labor:
- Umfüllen der Gewebewürfel aus den Proberöhrchen in kleine Glasgefäße
- Befüllen der Glasgefäße mit neuem, frischen, PBS-gepufferten, 3,7%igen Formol
- Schwenken der Gefäße über Nacht auf dem Schüttler

2. Tag

- Zuschnitt des Probenmaterials zu Blöckchen von ca. 0,5 cm Seitenlänge
- Einkapseln des Probenmaterials in Plastikkapseln
- Gabe der Kapseln in Erlenmeyerkolben mit frisch gewechseltem, 3,7 %igem Formol
- Schwenken des Erlenmeyerkolbens über Nacht auf dem Schüttler

3. Tag

- Morgens: Austausch des 3,7%igen Formols im Erlenmeyerkolben gegen 70%igen Alkohol
- Schwenken der Kapseln im 70%igen Alkohol auf dem Schüttler für eine Zeitspanne von zwei Stunden
- Erneuerung des 70%igen Alkohols während dieser Zeitspanne alle 30 Minuten
- Ersatz des 70%igen Alkohols durch DEPC-Wasser
- Zweistündiger Aufenthalt der Gewebestücke in DEPC-Wasser
- Wechsel des DEPC-Wassers innerhalb dieses Zeitraums alle 30 Minuten
- abschließendes Verbringen der Kapseln in den Einbettautomaten (Shandon Citadell 2000, Firma Shandon, Frankfurt)

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Gewebestücke eingebettet, wozu für die Formol und Bouin fixierten Proben jeweils eigene Einbettautomaten mit speziellen, aufsteigenden Alkoholreihen verwendet wurden:

a) Einbettung von Bouin fixierten Proben

Im Einbettautomaten (Shandon Duplex Processor der Firma Shandon, Frankfurt) erfolgte der Durchgang durch neun Stationen einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration, in denen die Kapseln jeweils für einen Zeitraum von zwei Stunden verblieben, ehe sie für eine Dauer

von zunächst drei, und später zwei Stunden in 56°C warmes Paraplast (Monoject Scientific Inc. Kildare, Irland) verbracht wurden. Tabelle 13 veranschaulicht, wie sich die im Einbettautomaten durchlaufene Alkoholreihe im Detail zusammensetzt:

Tabelle 13: Stationen der Alkoholreihe des Einbettautomaten

(Bouin fixierte Proben)

Stufe	Alkohol	Dauer
Stufe 1	80%iger Alkohol	2,0 Stunden
Stufe 2	80%iger Alkohol	2,0 Stunden
Stufe 3	96%iger Alkohol	2,0 Stunden
Stufe 4	96%iger Alkohol	2,0 Stunden
Stufe 5	Isopropanol	2,0 Stunden
Stufe 6	Isopropanol	2,0 Stunden
Stufe 7	Xylol	2,0 Stunden
Stufe 8	Xylol	2,0 Stunden
Stufe 9	Xylol	2,0 Stunden
Stufe 10	Paraplast	2,0 Stunden
Stufe 11	Paraplast	3,0 Stunden

b) Einbettung in Formol fixierter Proben

Bei der 24 Stunden dauernden Einbettung in Formol fixierter Proben durchliefen diese im Gewebeeinbettautomaten (Shandon Citadell 2000, Firma Shandon, Frankfurt) zehn verschiedene Stationen einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration, in denen sie jeweils unterschiedlich lange belassen wurden, bevor sie zwei Stationen mit 56°C heißen Paraplast erreichten. Tabelle 14 führt die Stationen der, im Einbettautomaten durchschrittenen Alkoholreihe im Einzelnen auf:

Tabelle 14: Stationen der Alkoholreihe des Einbettautomaten

(Formol-fixierte Proben)

Stufe	Alkohol	Dauer
-------	---------	-------

Stufe 1	80%iger Alkohol	1,5 Stunden
Stufe 2	80%iger Alkohol	1,5 Stunden
Stufe 3	96%iger Alkohol	1,5 Stunden
Stufe 4	96%iger Alkohol	1,5 Stunden
Stufe 5	Isopropanol	1,5 Stunden
Stufe 6	Isopropanol	2,0 Stunden
Stufe 7	Isopropanol	2,0 Stunden
Stufe 8	Xylol	1,0 Stunden
Stufe 9	Xylol	1,0 Stunden
Stufe 10	Xylol	1,0 Stunden
Stufe 11	Paraplast	2,0 Stunden
Stufe 12	Paraplast	3,0 Stunden

An den Durchgang durch die Stationen des Einbettautomaten schloss sich in beiden Fällen das Ausblocken der Probewürfelchen am Ausblockautomaten (Histostat Tissue Embedding Center der Firma Reichert-Jung, Wien) an:

- Zusammenstecken von quadratischen Plastikbehälterchen aus quadratischer Bodenplatte und quadratischem Rahmen
- Füllen der Plastikbehälterchen mit 56°C heißem Paraplast an der Füllstation des Ausblockautomaten
- Öffnen der Kapseln und Entnahme der Proben mit Pinzette
- Positionierung der Gewebestücke mit der glatten Seite nach unten am Boden der Kunststoffbehälterchen
- Abstellen der Plastikbehälterchen auf der Kühlplatte des Ausblockautomaten
- Ablösen der Plastikbehälterchen von den fertigen Paraffinblöcken nach Erstarren des Paraplasts

Danach erfolgte das Schneiden der Paraffinblöcke:

- Am Rotationsmikrotom (Firma Leitz, Typ 1516)
- Schnittdicke 5µm
- Auffangen der Schnitte auf unbeschichteten Objektträgern (SuperFrostR, Firma Menzel-

Gläser, Braunschweig) für konventionelle Färbungen

- Auffangen der Schnitte auf beschichteten Objektträgern (SupraFrostUltraPlusRadhäsic, Firma Menzel-Gläser, Braunschweig) für immun- und glykohistochemische Färbungen
- Kurze Antrocknungsphase auf dem Strecktisch
- Weitere Trocknung im Wärmeschrank für mindestens 24 Stunden bei ca. 37°C

2.3. Konventionelle Färbetechniken

2.3.1. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

In der HE-Färbung erscheinen die Zellkerne blauviolett und das Zytoplasma rosa, wodurch eine erste Übersicht über die Zusammensetzung und Organisation der zu untersuchenden Gewebe gewonnen werden kann. Im Einzelnen gliederte sich die Färbung in folgende Arbeitsschritte:

- Entparaffinierung der Schnitte durch zweimaliges Verbringen in Xylol für je zehn Minuten sowie anschließendes, kurzes Schwenken durch eine Alkoholreihe absteigender Konzentration (Diese besteht aus: Isopropanol, Isopropanol, 96%igem Alkohol, 70%igem Alkohol und Aqua.dest)
- 20-minütige Kernfärbung mit Hämalaun
- Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für eine Dauer von 30 Minuten
- Zytoplasmafärbung mit Eosin für zehn Minuten
- Entfernung der überschüssigen Färbelösung durch Spülen mit Aqua dest.
- Entwässerung der Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (bestehend aus 70%igem Alkohol, 96%igem Alkohol, Isopropanol und Isopropanol) sowie zweimaliges Einbringen in Xylol für eine Dauer von je fünf Minuten
- Eindecken mit Eukitt (Quick Hardening Mounting Medium Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

2.3.2. Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Die Trichromfärbung nach Masson-Goldner ermöglicht durch das Braunschwarz der Zellkerne, das Ziegelrot des Zytoplasmas, das Orangerot der Erythrozyten und das Grün von Schleim und Bindegewebe eine klare Differenzierung zwischen Bindegewebe, glatten Muskelzellen und Organparenchym. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Entparaffinierung der Schnitte durch zweimaliges Einbringen in Xylol für eine Dauer von je zehn Minuten sowie anschließendes, kurzes Schwenken durch eine Alkoholreihe absteigender Konzentration (Diese setzt sich wie folgt zusammen: Isopropanol, Isopropanol, 96%iger Alkohol, 70%iger Alkohol und Aqua.dest)
- Kernfärbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert für eine Minute
- Entfernung überschüssiger Färbelösung durch dreimaliges Spülen in Aqua dest. in drei separaten Küvetten
- Ermöglichung der Reaktion zwischen Zellkernmaterial und Farbstoff durch Verbringen unter fließendes Leitungswasser für zehn Minuten
- Färbung mit Azophloxin für fünf Minuten
- Spülung der Schnitte mit 1%iger Essigsäurelösung
- Färbung mit Phosphormolybdänsäureorange
- Bestimmung der Einwirkungszeit des Farbstoffs mittels mikroskopischer Kontrolle der Bindegewebsfärbung: Endpunkt der Färbung ist dann erreicht, wenn das Bindegewebe nicht mehr orange erscheint.
- Beseitigung nicht benötigter Farbstofflösung durch Spülung mit 1%iger Essigsäurelösung
- Fünfminütige Gegenfärbung mit Lichtgrün
- Waschen mit 1%iger Essigsäurelösung
- Entwässerung durch rasches Schwenken durch Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (bestehend aus zwei Küvetten mit 96%igem Alkohol und drei Küvetten mit Isopropanol) sowie zweimaligem Aufenthalt in Xylol für eine Dauer von je fünf Minuten
- Eindecken mit Eukitt (Quick Hardening Mounting Medium Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

2.3.3. Färbung mit Alcianblau 8GX

Die Färbung mit Alcianblau 8GX dient dem Nachweis von Carboxyl- und Sulfatgruppen in sauren Mucopolysacchariden. Zur weiteren Differenzierung zwischen Carboxyl- und Sulfatgruppen muss die Färbung zunächst bei pH 2,5 und nachfolgend noch einmal bei pH 1,0 durchgeführt werden, da bei einem pH-Wert von 2,5 sowohl Carboxyl- als auch Sulfatgruppen mit leuchtend blauer Farbe in Erscheinung treten, bei einem pH-Wert von 1,0 hingegen nur noch die Sulfatgruppen. Die Zellkerne stellen sich hellrot und der Hintergrund zartrosa dar. Die Färbung wurde durch Abfolge nachstehender Arbeitsschritte erreicht:

- Entparaffinierung der Schnitte durch zweimaliges Einbringen in Xylol für eine Dauer von zehn Minuten und anschließendes, kurzes Schwenken durch eine Alkoholreihe

absteigender Konzentration (Isopropanol, Isopropanol, 96%iger Alkohol, 70%iger Alkohol und Aqua dest.)

- Verbleib in 3%iger Essigsäure für drei Minuten zur pH-Einstellung auf 2,5
- Färbung mit 1%igem Alcianblau 8GX in 3%iger Essigsäure bei pH 2,5 für 30 Minuten
- Beseitigung der überschüssigen Farbstofflösung durch kurzes Spülen mit 3%iger Essigsäure
- Kurzes Spülen mit destilliertem Wasser
- Kernfärbung mit Kernechtrot für vier Minuten
- Beseitigung der überschüssigen Färbelösung durch kurzfristiges Spülen mit Aqua dest.
- Entwässerung durch rasches Schwenken der Schnitte durch Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70%iger Alkohol, 96%iger Alkohol, Isopropanol und Isopropanol) und anschließendem zweimaligem Aufenthalt in Xylol für je fünf Minuten
- Eindecken mit Eukitt (Quick Hardening Mounting Medium Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

Um die bereits oben erwähnte, für den selektiven Nachweis von sauren Mucopolysacchariden, die Sulfatgruppen tragen, notwendige pH-Absenkung auf 1,0 zu erreichen, wurde der Versuchsablauf wie folgt abgewandelt:

- 3-minütiges Verbringen der Schnitte in 1%ige Salzsäurelösung unmittelbar nach der Entparaffinierung
- Färben mit 1%igem Alcianblau 8GX in 1%iger Salzsäurelösung bei pH 1,0 für 30 Minuten
- Entfernung des nicht gebundenen Farbstoffs durch rasches Spülen mit 1%iger Salzsäurelösung
- Fortführung der übrigen Versuchsteile gemäß dem Vorgehen der Färbung bei pH 2,5 ab der ersten Spülung mit destilliertem Wasser

2.3.4. Perjod-Säure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus

Die Perjodsäure-Schiffreaktion nach Mc Manus dient dem Nachweis von Kohlenhydraten allgemein. Daher ist für den Nachweis des, im Zusammenhang mit der mikroanatomischen Untersuchung des Lebergewebes besonders interessanten Glykogens, ein zusätzlicher Versuchsdurchgang mit Kontrollpräparaten, die einer Amylasevorbehandlung unterzogen wurden, erforderlich. Das Enzym Amylase verdaut spezifisch Glykogen, das dann nicht mehr von dem PAS-Reagenz umgesetzt werden kann, so dass in den Kontrollpräparaten gegenüber denjenigen ohne Amylasevorbehandlung, die Orte der Glykogenspeicherung als ungefärbte

Stellen ausgespart bleiben. Die Umsetzung der Reaktion verlief in mehreren Stufen:

- Entparaffinierung der Schnitte durch zweimaliges Verbringen in Xylol für eine Dauer von je zehn Minuten und anschließendes, rasches Schwenken durch eine Alkoholreihe absteigender Konzentration (Isopropanol, Isopropanol, 96%iger Alkohol, 70%iger Alkohol und Aqua dest.)
- Fünfminütiges Einwirkenlassen von 0,5%iger, wässriger Perjodsäurelösung
- Beseitigung unverbrauchter Perjodsäurelösung durch kurzes Spülen mit Aqua dest.
- Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure (=Schiffsreagenz) über 15 Minuten
- Dreimaliges Einbringen in SO₂ für je drei Minuten zur Sichtbarmachung der Reaktionsprodukte
- Kernfärbung mit Hämalaun für vier Minuten
- Bläuen unter fließendem Wasser für 15 Minuten
- Entwässerung mittels schnellem Durchgang der Schnitte durch Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70%iger Alkohol, 96%iger Alkohol, Isopropanol und Isopropanol) und anschließende zweimalige Gabe in Xylol für je fünf Minuten
- Eindecken mit Eukitt (Quick Hardening Mounting Medium Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

Vorgehen bei Amylasevorbehandlung:

- Ablage der Objektträger in der Feuchtkammer
- Auftropfen von 100 µl 0,5%iger AmylaseLösung (Merck Darmstadt) auf jeden Schnitt
- Einwirkenlassen der Amylase auf das Gewebe im Brutschrank bei 37°C für eine Zeitspanne von zwei Stunden
- Entfernung der nicht benötigten AmylaseLösung durch kurzes Abspülen mit Aqua dest.
- Fortsetzung der übrigen Versuchsdurchführung wie bereits oben im Anschluss an die Entparaffinierung beschrieben

Sämtliche konventionell gefärbten, lichtmikroskopischen Präparate wurden am Mikroskop (Aristoplan Firma Leitz, Wetzlar) ausgewertet und mit der Kamera Lumenera USB Camera R Release 3,8 Firma Lumenera Corporations, Ontario, Kanada, fotografiert.

2.4. Immunhistochemische Untersuchungstechniken

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde folgendes Versuchsprotokoll verwendet:

- Entparaffinierung der Schnitte durch zweimaliges Einbringen in Xylol für eine Zeitdauer von 30 Minuten, rascher Durchgang durch eine Alkoholreihe absteigender Konzentration (Diese ist aus folgenden Elementen aufgebaut: Isopropanol, Isopropanol, 96 %iger Alkohol und 70 %iger Alkohol) sowie zweimaliger Aufenthalt in destilliertem Wasser für eine Zeitspanne von je fünf Minuten
- Dreimaliges Waschen in PBS-Puffer von pH 7,4 und je fünf Minuten Dauer
- Hemmung der endogenen Peroxidase durch Auftragen von Hydrogenperoxidlösung und anschließendem Einwirkenlassen für einen Zeitraum von 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Entfernung des nicht verbrauchten Hydrogenperoxids durch zehnminütiges Spülen mit fließendem Leitungswasser
- Dreimaliges Waschen mit stets frisch gewechseltem Puffer von pH 7,4 und je fünf Minuten Dauer
- Gewährleistung einer erfolgreichen Durchführung der ABC-Methode durch Blockade des endogen im Lebergewebe enthaltenen Biotins mittels folgendem Vorgehen:
 - Auftropfen und zehnminütiges Einwirkenlassen von Avidinlösung (=Lösung A)
 - Beseitigung der überflüssigen Avidinmoleküle, für deren Bindung kein endogenes, lebereigenes Biotin mehr zur Verfügung steht, durch dreimaliges Waschen mit frisch gewechseltem Puffer von pH 7,4 und je fünf Minuten Dauer
 - Auftragen und zehnminütiges Einwirkenlassen von Biotinlösung (=Lösung B) zur Blockade der drei übrigen, freien Biotinbindungsstellen, der am endogenen Biotin anhaftenden Avidinmoleküle, damit diese nicht vom Biotin der biotinylierten Sekundärantikörper besetzt werden können
 - Entfernung der überschüssigen Biotinlösung durch dreimaliges Waschen mit stets frisch gewechseltem Puffer von pH 7,4 und je fünf Minuten Dauer
- Reduzierung der Hintergrundfärbung durch Auftragen von Dako-Protein-Block-Serum-Free-Medium gefolgt von zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur
- Abgießen der Dako-Protein-Block-Serum-Free-Medium-Lösung
- Auftropfen des in Dako-Antibody-Diluent gelösten Primärantikörpers

Bezeichnungen, Konzentrationen, zur Antikörperisolation verwendete Tierarten sowie Hersteller der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 15 zusammengestellt:

Tabelle 15: Labortechnische Daten der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Primärantikörper Verdünnung	Tierart Primär- antikörper Hersteller	Sekundärantikörper Verdünnung	Tierart Sekundär- antikörper Hersteller
CK 5	Pab to Keratin K5 1:50	Meerschweinchen Progen	Anti guinea Pig IgG 1:300	Ziege Vector
CK 8	Ms-anti Cytokeratin 8 1:500	Maus Novus Biologicals	Anti-mouse IgG 1:300	Kaninchen Dako
CK 14	Pab to Keratin K14 1:100	Meerschweinchen Progen	Anti Guinea Pig IgG 1:300	Ziege Vector
CK 18	Pab to Keratin K18 (GP CK18.2) 1:200	Meerschweinchen Progen	Anti Guinea Pig IgG 1:300	Ziege Vector
CK 19	Pab to Keratin K19 1:200	Meerschweinchen Progen	Anti Guinea Pig IgG 1:300	Ziege Vector
Vimentin	Pab to Vimentin 1:500	Maus Dako	Anti Mouse IgG 1:300	Kaninchen Dako

CK: Zytokeratin; Pab: Primärantikörper

Die Sekundärantikörper kamen stets ausschließlich an Biotin gekoppelt zum Einsatz.

- Primärantikörperbindung an etwaige, im Gewebe enthaltene, korrespondierende, antigene Strukturen (CK 5, 8, 14, 18, 19 bzw. Vimentin) über einen Zeitraum von 24 Stunden im Kühlschrank bei 6°C
- Einstündige Nachinkubation bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer von pH 7,4 und je fünf Minuten Dauer
- Aufpipettieren der Sekundärantikörperlösung (siehe Tabelle 15)
- Anheftung der biotinylierten Sekundärantikörper an die, im Gewebe gebundenen Primärantikörper innerhalb einer Zeitspanne von 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Waschen mit stets frisch gewechseltem Puffer von pH 7,4 und je fünf Minuten Dauer
- Auftragen des im Komplex an Streptavidin gebundenen Enzyms Horseradish-Peroxidase
- Streptavidin vermittelte Anlagerung der Horseradish-Peroxidase an das Biotin der, im

Komplex mit den Primärantikörpern gebundenen, biotinylierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 15) während der nächsten 30 Minuten bei Raumtemperatur

- Beseitigung der nicht gebundenen Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Komplexe durch dreimaliges Waschen mit stets frisch gewechseltem Puffer von pH 7,4 und je fünf Minuten Dauer
- Sichtbarmachung der, von Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Komplexen besetzten, biotinylierten Sekundärantikörper und damit letztlich der Primärantikörperbindung, an im Gewebe enthaltene, korrespondierende Antigene (ZK 5, 8, 14, 18, 19 bzw. Vimentin) durch Zugabe des mit dem Farbstoff DAB markierten Substrats Hydrogenperoxid und dessen Umsatz durch die Horseradish-Peroxidase innerhalb von fünf Minuten bei Raumtemperatur
- Entfernung von nicht umgesetztem Hydrogenperoxid durch zehnmünütige Spülung mit Leitungswasser
- 30 sekundige Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
- Entwässerung mittels schnellem Schwenken durch Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70 %iger Alkohol, 96 %iger Alkohol, Isopropanol und Isopropanol) sowie zweimaliges Verbringen in Xylol für je fünf Minuten
- Eindecken mit Eukitt(Quick Hardening Mounting Medium Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

Für den Nachweis von Zytokeratin 8 und Vimentin waren nach der Entparaffinierung und Waschung mit dem PBS-Puffer zusätzlich zwei weitere Arbeitsschritte notwendig:

- Beseitigung endogen im Gewebe enthaltener, die Bindung der Primärantikörper an die korrespondierenden antigenen Strukturen (CK 8 bzw. Vimentin) störender Proteine durch Proteasevorbehandlung über 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Waschen mit stets frisch gewechseltem PBS-Puffer von pH 7,4 für je 5 Minuten Dauer
- Fortsetzung des gewöhnlichen Immunhistochemie-Versuchsprotokolls mit der Hemmung der endogenen Peroxidase

Die immunhistochemischen Präparate wurden am Mikroskop (Aristoplan Firma Leitz, Wetzlar) ausgewertet und mit der Kamera Lumenera USB Camera R Release 3,8 Firma Lumenera Corporations, Ontario, Kanada, fotografiert.

2.5. Glykohistochemische Untersuchungstechniken - Lektine

Die Anheftung der Lektine an ihre spezifischen Kohlenhydratstrukturen wurde teils direkt, durch die Markierung der Lektine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinthioisocyanat, und teils indirekt sichtbar gemacht. Bei der indirekten Methode wurden die Präparate mit einem Lektin inkubiert, an das ein Biotinmolekül gekoppelt war. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Schnitte mit einer FITC-markierten Streptavidinlösung versetzt. Die Avidinmoleküle banden an das Biotin der biotinylierten Lektine und zeigten durch das, vom Fluoreszeinthioisocyanat ausgehende Leuchten, die Bindungsstellen der Lektine im Gewebe an.

Vorgehen beim Nachweis der spezifischen Kohlenhydratbindung durch FITC-markierte Lektine:

- Entparaffinierung durch zweimaliges Verbringen der Schnitte in Xylol für eine Dauer von je 30 Minuten, gefolgt von raschem Schwenken durch eine Alkoholreihe absteigender Konzentration (Diese enthält Isopropanol, Isopropanol, 96%igen und 70%igen Alkohol) und letztendlich zweimaligem Aufenthalt in destilliertem Wasser für je fünf Minuten
- Dreimaliges Waschen von je fünf Minuten Dauer mit stets frisch gewechseltem PBS-Puffer von pH 7,4
- Herstellung einer Lösung des gewünschten Lektins (siehe Tabelle 9) mit der Konzentration 5 µg/ml während der letzten Waschung mit PBS-Puffer in völlig abgedunkelter Umgebung
- Ablage der Objektträger in Feuchtkammern
- Trocknen der Objektträger mit fusselfreiem Papier unter sorgfältiger Schonung der Präparate
- Aufpipettieren von je 100 µl der Lektinlösung auf jeden Schnitt
- Einwirkung der Lösung auf das Probengewebe für einen Zeitraum von 60 Minuten bei absoluter Dunkelheit und Raumtemperatur
- Beseitigung der überschüssigen Lektinlösung durch dreimaliges Waschen von je fünf Minuten Dauer mit stets frisch gewechseltem PBS-Puffer von pH 7,4 in absoluter Dunkelheit
- Kernfärbung und Eindecken der Präparate mit DAPI

Vorgehensweise beim Nachweis der spezifischen Kohlenhydratbindung durch biotinylierte Lektine:

- Entparaffinierung durch zweimaliges Einbringen in Xylol für eine Zeitspanne von je 30

Minuten, schnellen Durchlauf durch eine Alkoholreihe absteigender Konzentration (diese besteht aus Isopropanol, Isopropanol, 96%igem und 70%igem Alkohol) sowie zweimaligen Aufenthalt in Aqua dest. für je fünf Minuten

- Dreimaliges Waschen von je fünf Minuten Dauer mit stets frisch gewechseltem PBS-Puffer von pH 7,4
- Ablage der Objektträger in Feuchtkammern
- Trocknung der Objektträger mit fusselfreiem Papier mit Acht auf die Präparate
- Reduzierung der Hintergrundfärbung durch Auftropfen von Dako-Protein-Block-Serum-Free-Medium auf die Schnitte und Einwirkenlassen für eine Zeitspanne von 10 Minuten
- Herstellung einer Lösung des gewünschten Lektins (siehe Tabelle 9) mit der Konzentration 5 µg/ml während der letzten fünf Minuten der Inkubation mit Dako-Protein-Block-Serum-Free-Medium
- Abgießen des Dako-Protein-Block-Serum-Free-Medium
- Aufpipettieren von je 100 µl der Lektinlösung auf jeden Schnitt
- Bindung der Lektine an etwaige, im Probengewebe enthaltene, für sie spezifische Kohlenhydratstrukturen (siehe Tabelle 9) innerhalb eines Zeitraums von 60 Minuten bei Raumtemperatur
- Beseitigung der nicht gebundenen Lektinlösung durch dreimaliges Waschen von je fünf Minuten Dauer mit stets frisch gewechseltem PBS-Puffer von pH 7,4
- Auftragen von fluoreszenzmarkierter Streptavidinlösung
- Einwirkung dieser Lösung für eine Dauer von 30 Minuten bei absoluter Dunkelheit
- Sichtbarwerden der Lektinbindung an die, für sie spezifischen, im Gewebe enthaltenen Kohlenhydratstrukturen nach der Anlagerung des FITC-markierten Streptavidins an das Biotin der biotinylierten Lektine
- Beseitigung der überschüssigen, fluoreszenzmarkierten Streptavidin-Moleküle durch dreimaliges Waschen von je fünf Minuten Dauer mit stets frisch gewechseltem PBS-Puffer von pH 7,4
- Kernfärbung und Eindecken mit DAPI
- Aufbewahrung der Präparate im Kühlschrank, so dass keine Lichteinwirkung möglich ist

Negativkontrolle:

Um sicherstellen zu können, dass die Fluoreszenz tatsächlich von den fluoreszenzmarkierten Lektinen beziehungsweise Streptavidin-Molekülen ausgeht und es sich nicht um eine Autofluoreszenz des zu untersuchenden Gewebes handelt, wurde folgende Negativkontrolle

durchgeführt:

- Auftropfen von Pufferlösung statt Lektinlösung auf einen der Schnitte
- Übrige Behandlung dieses Schnitts wie beim Lektinnachweis

Positivkontrolle:

Zum Ausschluß einer falsch negativen Reaktion wurde nachstehende Positivkontrolle vollzogen:

- Auswahl eines Gewebes, an das die Bindung des zu testenden Lektins bereits nachgewiesen worden ist (Nebenhoden Hund für Con A, LCA, PSA, PNA, GSL-I, WGA, WGAs, UEA-I, PHA-E und PHA-L; Hoden Rind für RCA und SBA; Ovar Hund für MAA-I und SNA; Ovar Schwein für DBA; Niere Rind für SJA)
- Umsetzung des herkömmlichen Lektin-Versuchsprotokolls bei einem Schnitt dieses Gewebes zeitgleich zu den Versuchen mit den Schnitten des eigenen Gewebes

Hemmszuckertest:

Die Spezifität der Lektine wurde mit folgendem Hemmszuckertest bestätigt:

- Herstellung einer Lösung des zu untersuchenden Lektins mit der Konzentration 5 µg/ml
- Herstellung einer Lösung aus dem, für das jeweilige, zu testende Lektin spezifischen Zucker
- Zu überprüfende Lektine, zugehörige Hemmszucker, Konzentrationen der aus den Hemmszuckern hergestellten Zuckerlösungen sowie Kohlenhydrate, für deren spezifische Bindung die Lektine nach der Hemmszuckerbehandlung blockiert sind, sind im Einzelnen in Tabelle 16 zusammengestellt:

Tabelle 16: Hemmszuckerlösungen zur Prüfung der Zuckerspezifität der Lektine

Lektin	Hemmszucker	Konzentration der Hemmszuckerlösung	Kohlenhydrat, für dessen Bindung das Lektin blockiert ist
Con A	Methyl- α -Mannopyranosidose	84,8 mg/ml	Glukose, Mannose
LCA	Methyl- α -Mannopyranosidose	84,8 mg/ml	Glukose, Mannose
PSA	Methyl- α -Mannopyranosidose	84,8 mg/ml	Glukose, Mannose

VAA	Methyl- α -(D)-Galaktopyranosidose	84,8 mg/ml	Galaktose
WGA	Chitin-Hydrolysat	1:4	N-Acetyl-Glukosamin
WGAs	Chitin-Hydrolysat	1:4	N-Acetyl-Glukosamin
GSL	Methyl- α -(D)-Galaktopyranosidose	172,4 mg/ml	N-Acetyl-Galaktosamin
PHA-E	Essigsäure	24 μ l/ml	Oligosaccharide
PHA-L	Essigsäure	24 μ l/ml	Oligosaccharide

Die verwendeten Hemmzucker stammten von folgenden Herstellern:

Methyl- α -(D)-Galaktopyranosidose: Sigma-Aldrich, Deisenhofen; Chitin-Hydrolysat: VECTOR, Burlingame, USA; Methyl- α -Mannopyranosidose: E-Y Labs, San Mateo, USA; Essigsäure: ROTH, Karlsruhe

- Herstellung der Versuchslösung durch Mischung der Lektinlösung mit der zugehörigen Zuckerlösung im Verhältnis 1:1 und anschließende Inkubation der Lektin-Zucker-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur
- Vollzug des üblichen Lektin-Versuchsprotokolls, aber Auftropfen der Lektin-Zucker-Lösung anstelle der reinen Lektinlösung

Die Präparate der gesamten glykohistochemischen Versuchsreihe wurden am Auflichtfluoreszenzmikroskop (Dialux 20, Firma Leitz GmbH, Wetzlar) ausgewertet und mit der ProgRes Kamera (Firma Jenoptik, Jena) fotografiert.

3. Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie

Das Material für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen stammte von den Lebern A, B, C, D, G, H und I. Von der Leber A wurde an den gleichen Lokalisationen wie für die Lichtmikroskopie (siehe Abb. 1 und Tabelle 11) und von jeder der übrigen Lebern von jeweils einer Stelle aus den vier Hauptlappen Gewebe mit einer Skalpellklinge herausgeschnitten und in kleinste Würfel mit einer Kantenlänge von 1 mm zerkleinert. Die genauen Lokalisationen dieser, bei allen Lebern identischen Entnahmestellen, sind in Abbildung 3 und Tabelle 17 dargestellt.

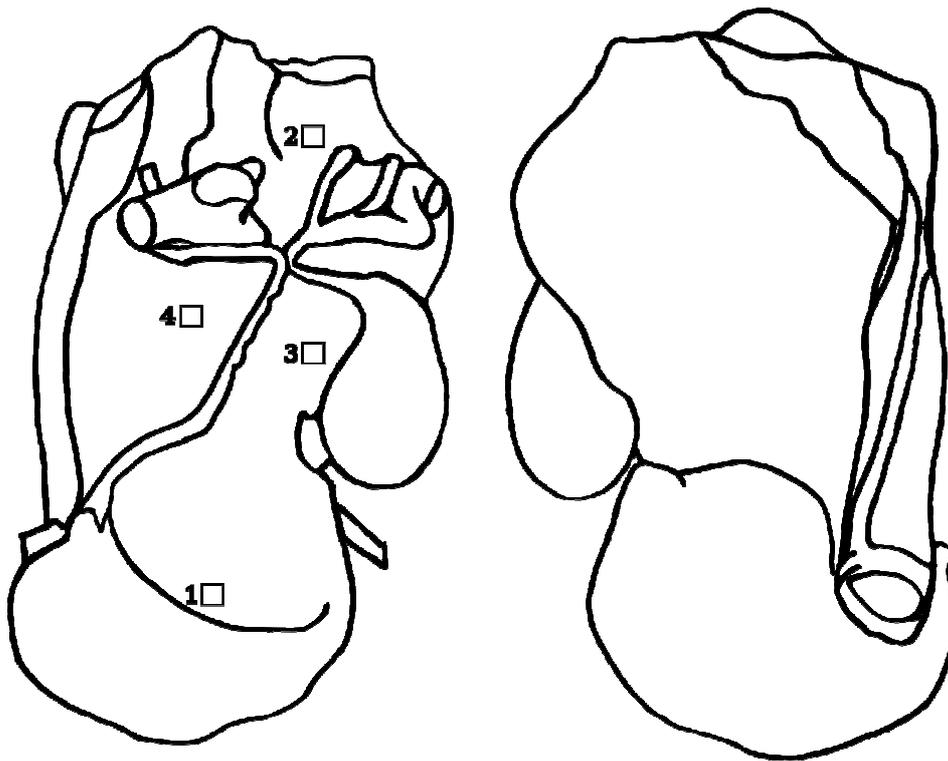


Abb. 3: Probenentnahmestellen auf den Lebern B, C, D, G, H und I

Tabelle 17: Probenentnahmestellen auf den Lebern B, C, D, G, H und I

Probennummer	Lokalisation auf der Leber
1	Lobus sinister, Facies visceralis
2	Lobus dexter, Facies visceralis
3	Lobus caudatus, Facies visceralis
4	Lobus quadratus, Facies visceralis

Die Gewebewürfel wurden sofort nach ihrer Gewinnung in mit Karnovsky-Lösung gefüllte Eppendorfgläser gegeben. Die weitere Präparation, deren erste vier Schritte Kühlungstemperaturen von 4°C erforderten, verlief folgendermaßen:

a.) Fixierung

- Zuschnitt des Probenmaterials auf Wachsplatten auf eine Größe von 1 mm³ umfassenden Würfelchen
- Versetzen der Würfelchen mit Fixierungslösung nach Karnovsky (1971) (ROMEIS, 2010a) (2% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 molarem

Natriumcacodylatpuffer, (pH 7,2)

- Einwirkung der Karnovskylösung über Nacht

b.) Waschen

- Entfernung überschüssiger Fixierungslösung durch dreimaliges Waschen mit 0,1 molarer Natriumcacodylatlösung von pH 7,2

c.) Vorkontrastieren

- Verbringen der Gewebewürfelchen in 1%ige Osmiumtetroxid- und 1,5%ige Kaliumhexacyanoferratlösung für zwei Stunden bei 4°C im Dunkeln

d.) Waschen

- Beseitigung der Osmiumtetroxid- und Kaliumhexacyanoferratlösung durch dreimaliges Waschen mit 0,1 molarer Natriumcacodylatlösung von pH 7,2

Nachdem Fixierung, Waschen, Vorkontrastieren und wiederholtes Waschen bei Kühlschranktemperaturen von 4°C erfolgten, wurden die übrigen Arbeitsschritte bei Raumtemperatur ausgeführt.

e.) Entwässerung

- Aufenthalt von je 30 Minuten Dauer in folgenden Stationen einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration: 30%iges, 50%iges, 70%iges und 90%iges Äthanol sowie dreimaliges Verbringen in Ethanol absolut
- Vorbereitung des Gewebes auf die Durchsetzung mit Epoxidmolekülen des Kunstharzeinbettmediums durch zweimaligen Aufenthalt von 15 Minuten Dauer im Zwischenmedium Propylenoxid (Merck, Darmstadt)

f.) Einbettung

- Erzielung der Durchsetzung des Probenmaterials mit Epoxidmolekülen durch drei Arbeitsschritte:
 - Verbringen in ein Gemisch aus Propylenoxid und Polyembed 812 nach Glauert im Verhältnis 2:1 für eine Stunde
 - Verbringen in ein Gemisch aus Propylenoxid und Polyembed 812 nach Glauert im Verhältnis 1:1 für 24 Stunden
 - abschließender Aufenthalt in reinem Polyembed auf dem Schüttler für die

Zeitspanne von einer Stunde

- Fassen der Gewebewürfelchen mit dem Igelstachel
- gleichmäßige Verteilung des Materials auf die Flacheinbettungsformen (Polysciences, Warrington, USA)
- Härtung des Kunstharzes im Wärmeschrank über mindestens 24 Stunden bei zunächst 45°C, und später 75°C
- Unterstützung der Härtung durch Verwendung von Katalysator (Beschleunigung der Härtung) und Härter (Vernetzung der Kunstharzmoleküle)
- Vorsichtige Entnahme der Blöcke aus den Einbettungsformen
- Aufbewahrung der Blöcke in Plastikboxen

g.) Herstellung von Semidünnschnitten

- am Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert -Jung, Wien)
- Schnittdicke 1µm
- Zurechtrimmen des Blocks zunächst unter Verwendung eines Glasmessers und später eines Diamantmessers
- Färbung der Semidünnschnitte mit der Färbelösung nach Richardson (1960) (ROMEIS, 2010a) (Herstellung siehe Anhang)
- Selektion von qualitativ hochwertigen und wissenschaftlich interessanten Blockteilen für die Anfertigung von Ultradünnschnitten

h.) Herstellung von Ultradünnschnitten

- Schneiden am Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) mit Diamantmesser
- Schnittdicke 40-60 nm
- Auffangen der Ultradünnschnitte auf Kupfernetzen (Grids mit Meshweite 200 µm)

i.) Nachkontrastieren

- Herausarbeitung der verschiedenen Zellorganellen sowie deren Bestandteile durch den Einsatz von Uranylacetat für die Darstellung von Membransystemen, insbesondere aber Kernchromatin und Bleicitrat für Ribosomen und Zytoplasmagrundsubstanz
- Nachkontrastieren mit Uranylacetat:
 - Aufpipettieren von 80-100 µl Uranylacetat auf Dentalwachs für jeden Schnitt
 - Auflegen der Grids auf das Dentalwachs so, dass deren matte Seite nach unten

zeigt

- Einwirkdauer des Uranylacetats mindestens 20 Minuten
 - Entfernung des nicht benötigten Uranylacetats durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. in drei separaten Bechergläsern
 - kurzzeitiges Trocknen der Grids auf Filterpapier
 - Positionierung der Grids mit der matten Seite nach unten auf Dentalwachs
- Nachkontrastieren mit Bleicitrat:
 - Aufpipettieren von 80-100 μl auf jeden Grid
 - Einwirkdauer des Bleicitrats: maximal 10 Minuten
 - Beseitigung des restlichen Bleicitrats durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. in drei separaten Bechergläsern
 - kurzzeitiges Trocknen der Grids auf Filterpapier
 - Einsortieren der fertigen Präparate in Gridboxen

j.) Auswertung der Präparate am Elektronenmikroskop

- Auswertung und Photodokumentation der Präparate am Transmissionselektronenmikroskops EM 902 der Firma Zeiss Oberkochen

IV. AUSWERTUNG

1. Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen

1.1. Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung vermittelt einen ersten Einblick in die Morphologie und Topographie der Lobuli hepatici, die sich als kleinste Einheiten in ihrer Summe zu den Leberlappen zusammenfügen. Der Zusammenhalt der kleinsten Bausteine zu einem einheitlichen, geschlossenen Leberparenchym wird durch das interstitielle Bindegewebe gewährleistet. Das Interstitium füllt zum einen in Form schmaler, interlobulärer Bindegewebssepten den engen Raum, den die Außenkanten zweier benachbarter Läppchen zwischen sich einschließen, aus (Abb. 4, C) und bildet zum anderen an den Stellen, an den die Ecken dreier benachbarter Lobuli hepatici zusammenstoßen größere Bindegewebsareale, die Areae interlobulares (Abb. 4, D), aus. In letztere sind neben der Glisson-Trias, Lymphgefäße und Nerven eingebettet. Zur Glisson-Trias zählen außer dem Ductus interlobularis bilifer die Arteria und Vena interlobularis (Abb. 4, D). Außen wird das Leberparenchym von einer bindegewebigen Kapsel, der Glisson-Kapsel umgeben, die aus geflechtartigem, straffem Bindegewebe besteht und außen von Peritoneum überzogen wird. Die Lobuli hepatici sind nach folgendem Prinzip aufgebaut: Im Zentrum eines jeden Läppchens liegt die Zentralvene (Vena centralis). Die bindegewebige Begrenzung der Vena centralis weicht etwas von der einer herkömmlichen Venenwand ab, da ihre Dicke an verschiedenen Stellen des Gefäßes deutliche Unterschiede zeigt (Abb. 4, B). Die Leberzellbalken, die von der bindegewebigen Begrenzung der Läppchen in Richtung zur Zentralvene ziehen, werden aus 9 bis 24 polygonalen, (in der Regel 10-14), meist sechs- oder achteckigen, hintereinandergeschalteten Hepatozyten (Abb. 4, A) zusammengesetzt. Die deutliche Variation in der Zahl, der die Leberzellbalken bildenden Hepatozyten, ist dadurch bedingt, dass die an und für sich polygonalen, normalerweise sechseckigen Lobuli hepatici, nicht sechs gleichlange Außenkanten aufweisen. Die Leberzellbalken werden durch Sinusoide getrennt (Abb. 4, A). Die Weite ihrer Lumina nimmt von der Zentralvene in Richtung Peripherie ab. Sie beträgt in der Peripherie ca 42, in unmittelbarer Nähe der Zentralvene ca.75 µm. In der vorliegenden Arbeit wurden Proben aus den verschiedenen Bereichen der bovinen Leber untersucht. Hinsichtlich der Ausbildung der Läppchen, der Glisson-Felder und der Ausbildung der Sinusoide konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Besonders gut kann die regionale Ausbildung des Bindegewebes mit der Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner beurteilt

werden. Auch mit dieser Färbung konnten keine auffälligen Unterschiede in der Ausbildung des Bindegewebes in den verschiedenen Bereichen der Leber festgestellt werden.

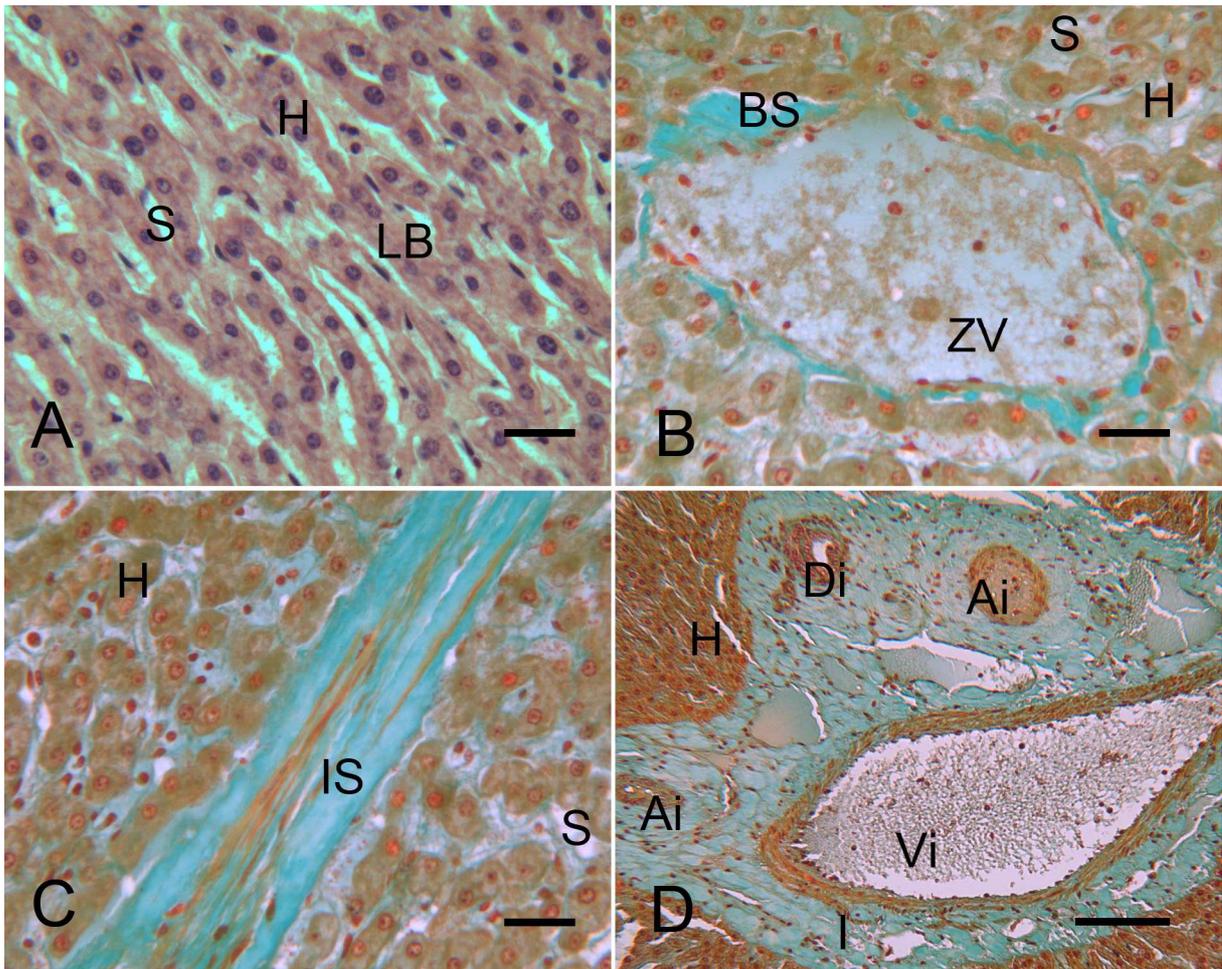


Abb. 4: Bausteine und Architektur des Leberparenchyms

(A): Leber Rind, HE. Durch Sinusoide voneinander getrennte Leberzellbalken, bestehend aus 9-24 hintereinander geschalteten, polygonalen Hepatozyten. (B): Leber Rind, Masson-Goldner. Zentralvene mit variierender Wandbreite als Mittelpunkt des Lobulus hepaticus. (C): Leber Rind, Masson-Goldner. Interstitium in Form eines schmalen, die Außenkanten zweier benachbarter Leberläppchen gegeneinander abgrenzenden, interlobulären Bindegewebssepten. (D): Leber Rind, Masson-Goldner. Flächenartig zur Area interlobularis erweitertes, die Elemente der Lebertrias (Ductus, Arteriae sowie eine größere und kleinere Venae interlobularis) einschließendes Interstitium.

H: Hepatozyt; S: Sinusoid; ZV: Vena centralis; Ai: Arteria interlobularis; Vi: Vena interlobularis; Di: Ductus interlobularis bilifer; LB: Leberzellbalken; BS: Bindegewebsschicht; I: Interstitium; SB (A, B, C) = 25µm; SB (D) = 100µm

1.2. Färbung mit Alcianblau 8GX

In den Präparaten, die mit Alcianblau 8GX bei einem pH-Wert von 2,5 gefärbt worden sind, verhalten sich die Hepatozyten negativ (Abb. 5; A, B), während die bindegewebigen Anteile der Leber schwach positiv reagieren (Abb. 5; A, B). Im Gegensatz zur lediglich schwach positiv reagierenden Matrix, erscheint das Bindegewebe in den dickeren Blutgefäß- und Gallengangswänden, insbesondere in der arteriellen Intima, etwas intensiver angefärbt. Ferner treten bei den Ductus interlobulares biliferi mit besonders geringem Durchmesser der apikale Abschnitt des Epithels und, sofern die Ganglumina noch mit Sekret gefüllt sind, auch diese, deutlich Alcianblau-positiv in Erscheinung (Abb. 5; C). Das Zytoplasma, der hauptsächlich in und um die Wände von Blutgefäßen, vor allem Venen (Abb. 5; A), sowie in dem, dem Leberparenchym zugewandten Teil der Glisson-Kapsel (Abb. 5; D), gelegenen Mastzellen reagiert ebenfalls deutlich positiv. Wird die Färbung mit Alcianblau 8GX bei pH 1,0 durchgeführt, reagiert das Zytoplasma der Mastzellen schwach bis deutlich positiv (Abb. 5; D)

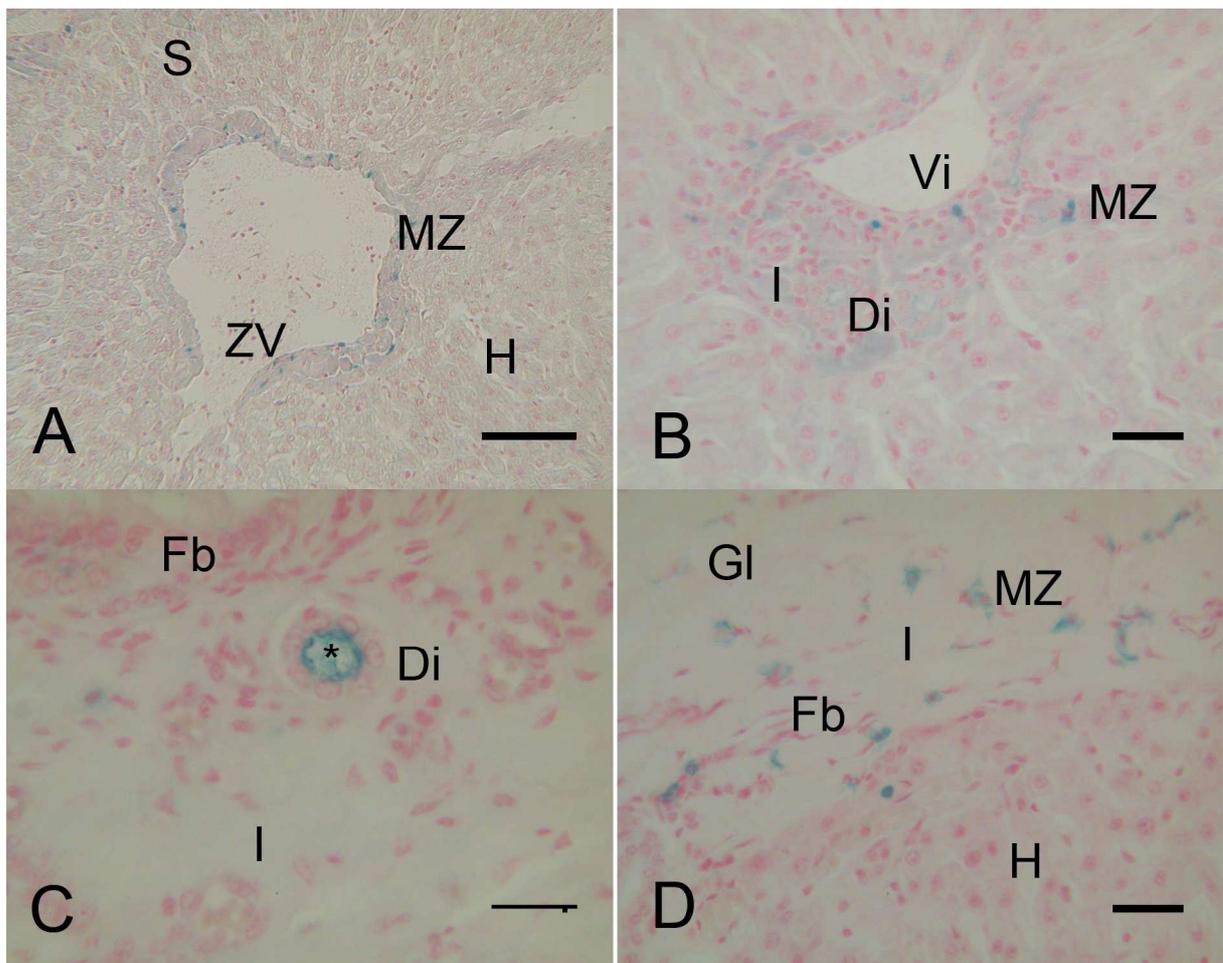


Abb. 5: Alcianblau-positive Strukturen des Lebergewebes

(A): Leber Rind; Alcianblau 8GX pH 2,5. Lobulus hepaticus: Schwach Alcianblau-positives

Bindegewebe in der und um die Zentralvenenwand mit eingelagerten Mastzellen deutlich positiven Zytoplasmas, umgeben von negativen Hepatozyten. **(B)**: Leber Rind; Alcianblau 8GX pH 2,5. Area interlobularis: Prinzipiell schwach Alcianblau-positives Bindegewebe nur in den Blutgefäß- und Gallengangswänden von etwas höherer Reaktionsintensität. **(C)**: Leber Rind; Alcianblau 8GX pH 2,5. Ductus interlobularis bilifer geringen Durchmessers: Apikaler Teil des Epithels sowie Lumen deutlich Alcianblau-positiv. **(D)**: Leber Rind; Alcianblau 8GX pH 1,0. Schwach bis deutlich Alcianblau-positives Zytoplasma der, vor allem unmittelbar entlang der Läppchengrenze zum Parenchym, im nahezu Alcianblau-negativen Interstitium der Glisson-Kapsel befindlichen Mastzellen.

MZ: Mastzellen; H: Hepatozyt; Fb: Fibroblast; S: Sinusoid; ZV: Vena centralis; Ai: Arteria interlobularis; Vi: Vena interlobularis; Di: Ductus interlobularis bilifer; Gl: Glisson-Kapsel; I: Interstitium; SB(A) = 100µm; SB(B, D) = 25µm; SB(C) = 20µm

1.3. Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus

Bei der Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus reagieren die verschiedenen Komponenten des Lebergewebes mit unterschiedlicher Intensität positiv. Am kräftigsten färbt sich das stark positiv reagierende Zytoplasma der Hepatozyten an. Außerdem fällt auf, dass die am stärksten positiv reagierenden Leberzellen vor allem um die Zentralvene anzutreffen sind (Abb. 6; A). Die weiter peripher gelegenen Hepatozyten reagieren bei der PAS-Reaktion deutlich schwächer (Abb. 6; A, C), wobei sich aber durchaus auch die, weit in der periportalen Zone, unter Umständen sogar die, an der Läppchenaußengrenze gelegenen Leberzellen stark positiv anfärben können (Abb. 6; B). Das Bindegewebe der Leber verhält sich bis auf die deutlich positiv reagierende Bindegewebsschicht der Gallengangs- und Blutgefäßwände, insbesondere der arteriellen Intima, nur schwach PAS-positiv (Abb. 6; B, C). Werden die Schnitte vor der PAS-Reaktion mit Amylase inkubiert, so bleiben die Hepatozyten gänzlich ungefärbt, die übrigen Strukturen reagieren unverändert (Abb. 6; D).

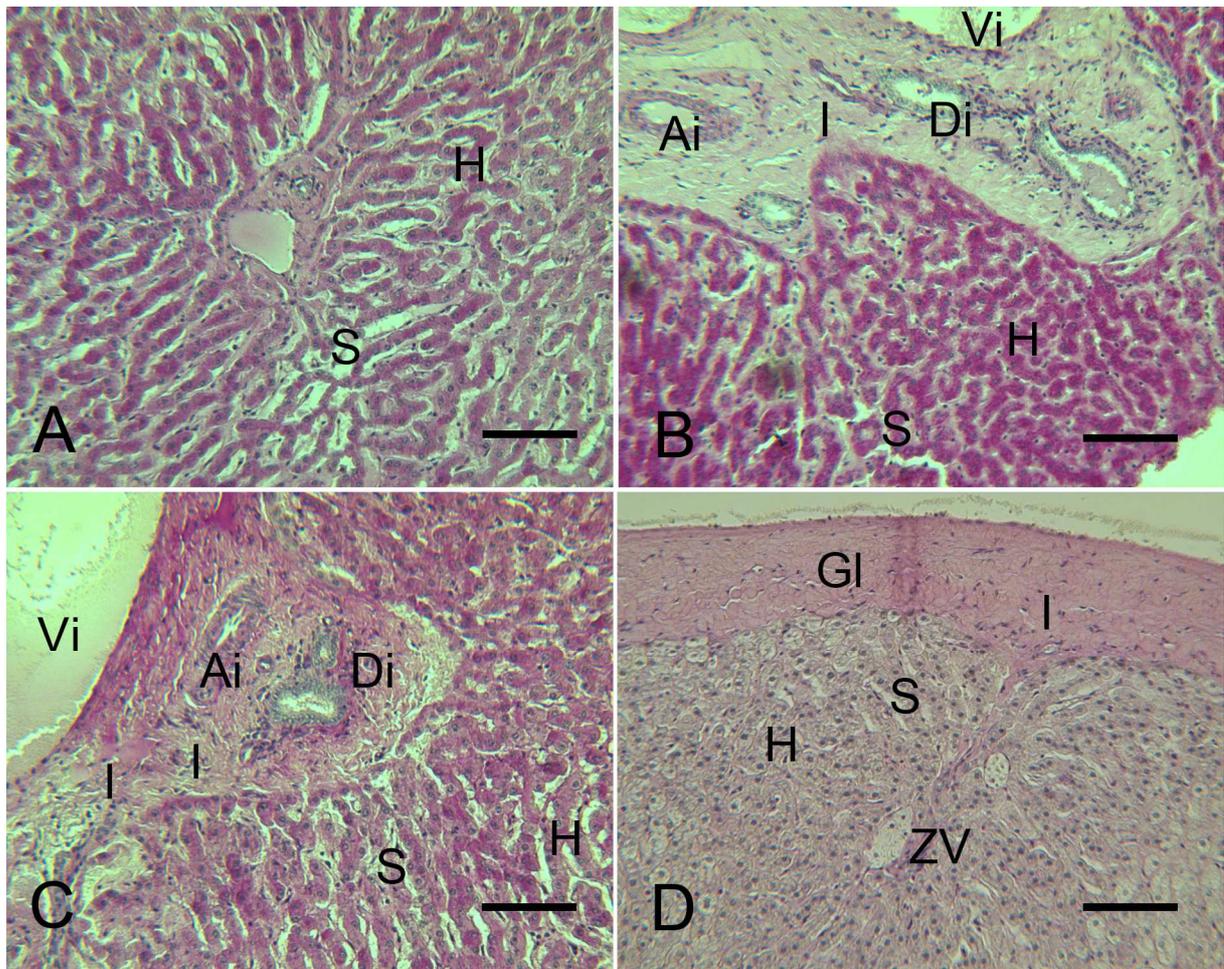


Abb. 6: PAS-positive Strukturen des Lebergewebes

(A): Leber Rind; PAS. Lobulus hepaticus: Hepatozyten im Zentrum deutlich stärker PAS-positiv als in der Peripherie. (B): Leber Rind; PAS. Area interlobularis: Subendo- bzw. epithelial deutlich PAS-positive Arterien- und Gallengangswände umgeben von schwach positivem Interstitium. Stark PAS-positive Hepatozyten bis zum Läppchenrand. (C): Leber Rind; PAS. Area interlobularis: Subendo- bzw. epithelial deutlich PAS-positive Arterien- und Gallengangswände umgeben von schwach positivem Interstitium. Hepatozyten der Läppchenperipherie im Gegensatz zu denen von (B) lediglich schwach bis deutlich PAS-positiv. (D): Leber Rind; PAS mit Amylasevorbehandlung. Von Glisson-Kapsel umgebener Lobulus hepaticus: Gänzlich PAS-negative Hepatozyten umgeben von schwach-positivem Bindegewebe.

H: Hepatozyt; S: Sinusoid; ZV: Vena centralis; Ai: Arteria interlobularis; Vi: Vena interlobularis; Di: Ductus interlobularis bilifer; I: Interstitium; SB (A, B, C, D) = 100µm

2. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

2.1. Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

Generell ist bei den Zytokeratin-Nachweisen festzustellen, dass im Falle einer positiven Reaktion, diese ausschließlich auf das Epithel des Gallengangssystems beschränkt bleibt. Sämtliche anderen Komponenten des Lebergewebes verhalten sich durchwegs negativ. Ferner reagiert ein nachweisbares Zytokeratin nicht in allen Bereichen des Gallengangssystems mit derselben Intensität positiv, sondern tritt in der Regel nur in ganz bestimmten, für das jeweilige Zytokeratin spezifischen Abschnitten besonders deutlich in Erscheinung. Wie aus Tabelle 18 hervorgeht, lassen sich anhand des Zytokeratin-Nachweismusters die bereits anatomisch vorgegebenen kleinen, intralobulären Gallengänge, Ductuli biliferi, wie auch die großen, interlobulären Gallengänge, Ductus interlobulares biliferi, unter topographischen, bei den extralobulären Gallengängen auch unter morphologischen Gesichtspunkten in weitere Abschnitte einteilen, die sich bei den einzelnen Zytokeratin-Nachweisen durch eine eigene, ganz spezifische Reaktionsintensität von den anderen Segmenten abgrenzen: Die Ductuli biliferi, gliedern sich in die unmittelbar neben der Zentralvene befindlichen, zentralen, und die am äußersten Rand der Lobuli hepatici gelegenen, peripheren, Ductuli biliferi. Bei den Ductus interlobulares biliferi, existieren neben solchen mit einschichtigem, isoprismatischem Epithel auch Gallengänge mit mehrschichtigem Epithel. Die Vertreter mit einschichtigem Epithel gehören entweder der, im Zentrum der Areae interlobulares positionierten, oder der, am peripheren Randsaum der Areae interlobulares bzw. den interlobulären Bindegewebssepten platzierten Gruppe an. Beide Gruppen zeichnen sich durch charakteristische, morphologische Merkmale aus. Die erste, nachfolgend als zentrale Ductus interlobulares biliferi bezeichnet, zeigt einen rundlich-ovalen, die zweite, im Weiteren, periphere Ductus interlobulares biliferi genannt, hingegen einen gelegentlich sehr engen, längs-elliptischen Querschnitt. Die großen Gallengänge mit dem mehrschichtigen Epithel können ebenfalls zwei Gruppen zugeordnet werden, wobei unter Mehrschichtigkeit generell zu verstehen ist, dass an einem Querschnitt durch den Gallengang auf dem direkten Weg von der Basis zum Lumen, also in basoapikaler Richtung, mindestens zwei hintereinander liegende Epithelzellen und nicht wie sonst beim kubischen Epithel üblich, nur eine, zu sehen sind. Das Epithel kann entweder, wie bei den Ductus interlobulares biliferi mit durchgehend-mehrschichtigem Epithel, entlang des gesamten Umrisses, des am Gallengangsquerschnitt erkennbaren Lumens (Abb. 8, D), oder aber, wie bei den Ductus interlobulares biliferi mit abschnittsweise-mehrschichtigem Epithel, nur an einzelnen Abschnitten des Umrisses, die voneinander durch Bezirke mit einschichtigem Epithel getrennt werden (Abb. 8, B, C), mehrschichtig sein.

2.1.1. Zytokeratin 8-Nachweis

Beim Zytokeratin 8-Nachweis verhält sich das Epithel der zentralen Ductuli biliferi stark positiv (Abb. 7, A), das der peripheren hingegen negativ. Die Epithelien der zentralen Ductus interlobulares biliferi färben sich deutlich, die der peripheren lediglich schwach bis deutlich an. Sowohl die Epithelzellen der großen Gallengänge mit durchgehend-mehrschichtigem Epithel (Abb. 8, D) als auch der mit abschnittsweise-mehrschichtigem Epithel (Abb. 8, C) zeigen eine stark positive Reaktion.

2.1.2. Zytokeratin 14-Nachweis

Beim Zytokeratin 14-Nachweis färbt sich das Epithel der peripheren Ductuli biliferi stark positiv (Abb. 7, B), das der zentralen dagegen gar nicht an. Das Epithel der zentralen, großen Gallengänge reagiert deutlich, das der peripheren, schwach bis deutlich positiv. Weder die durchgehend-, noch die abschnittsweise-mehrschichtigen Gallengangsepithelien zeigen eine positive Reaktion.

2.1.3. Zytokeratin 18-Nachweis

Beim Zytokeratin 18-Nachweis verhalten sich die Epithelien der zentralen Ductuli biliferi nur bei ganz vereinzelt Ausnahmen schwach positiv, die der peripheren durchwegs negativ. Die zentralen Ductus interlobulares biliferi, die häufig in Gruppen von drei oder mehr, unterschiedlich großen Vertretern von kleinem bis mittlerem Durchmesser auftreten, zeigen eine stark positive Reaktion (Abb. 7, C). Die peripheren färben sich nur schwach bis deutlich positiv an (Abb. 7, D). Sowohl das durchgehend-, als auch das abschnittsweise-mehrschichtige Epithel weist keine Färbung auf.

2.1.4. Zytokeratin 19-Nachweis

Beim Zytokeratin 19-Nachweis zeigt das Epithel der zentralen Ductuli biliferi in sehr wenigen Einzelfällen eine schwach positive Reaktion, bei den peripheren gar keine. Die zentralen und peripheren Ductus interlobulares biliferi reagieren schwach bis deutlich positiv, wobei die Intensität der Immunfärbung mit der Größe der Gänge zunimmt (Abb.8, A). Die Epithelzellen der großen Gallengänge mit abschnittsweise-mehrschichtigem Epithel färben sich deutlich bis stark positiv (Abb. 8, B), die mit durchgehend-mehrschichtigem dagegen überhaupt nicht an.

Tabelle 18 und die Abbildungen 7 und 8 fassen die, sich anhand des Zytokeratin-Nachweismusters unter morphologischen und topographischen Gesichtspunkten ergebende Aufgliederung des Gallengangssystems sowie die, für dessen einzelne Abschnitte typischen Arten von Epithelien, einschließlich der in ihnen nachweisbaren Zytokeratine, zusammen:

Tabelle 18: Zytokeratine der verschiedenen Abschnitte des Gallengangssystems

Zytokeratin	Ductuli biliferi		Ductus interlobulares biliferi			
			Einschichtiges Epithel		Mehrschichtiges Epithel	
	zentral	peripher	zentral	peripher	durchgehend	abschnittsweise
CK 5	0	0	0	0	0	0
CK 8	3	0	2	1-2	3	3
CK 14	0	3	2	1-2	0	0
CK 18	0-1	0	3	1-2	0	0
CK 19	0-1	0	1-2	1-2	0	2-3

0 = negativ; 1 = schwach positiv; 2 = positiv; 3 = stark positiv

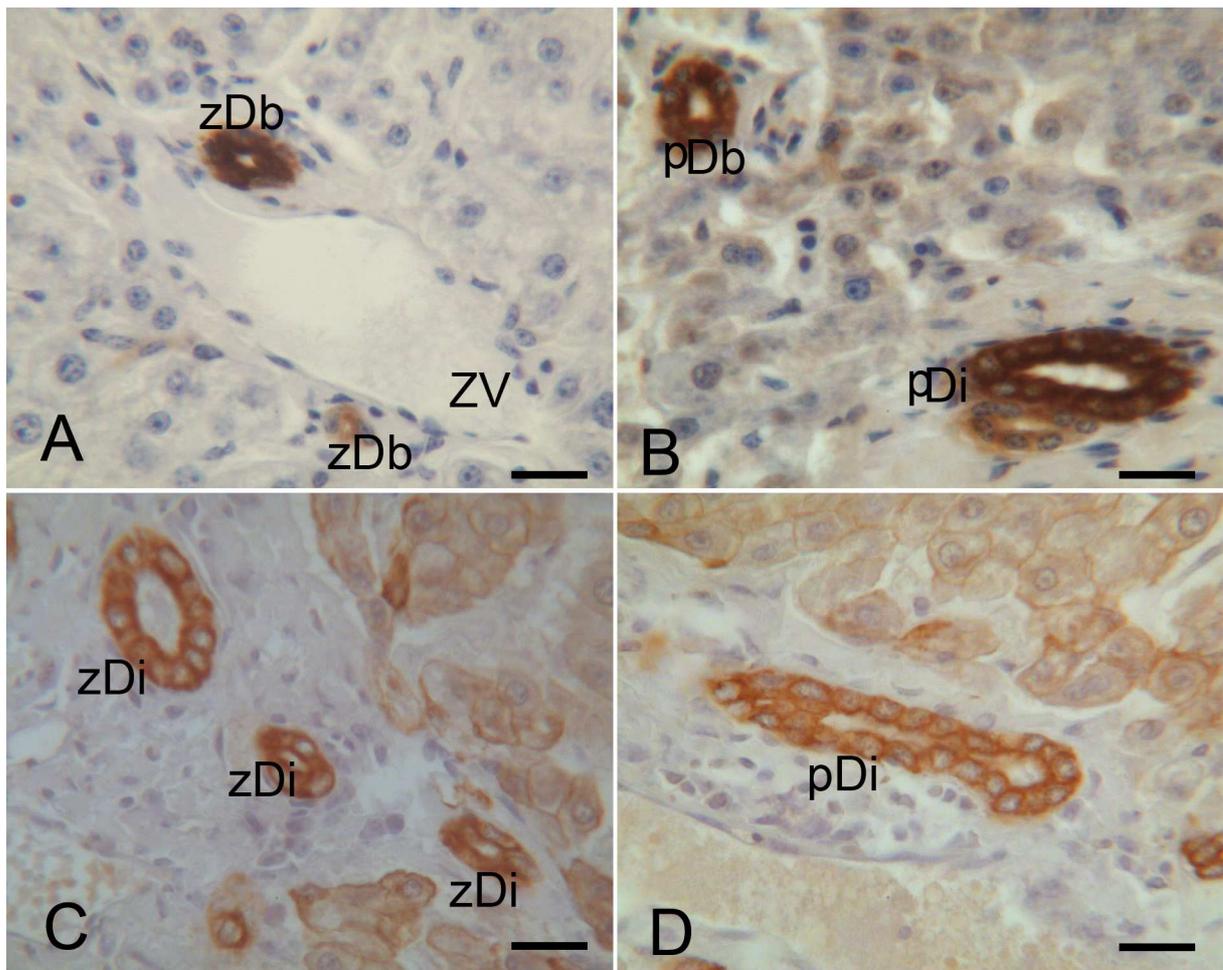


Abb. 7: Reihenfolge der verschiedenen Abschnitte des Gallengangssystems
Anordnung der Bilder gemäß der Entwicklung des Gangssystems, beginnend bei den

zentralen Ductuli biliferi bis hin zu den größten, in den Präparaten auftretenden Ductus interlobulares biliferi (siehe Fortsetzung Abb. 8). Die Aufnahmen zeigen die verschiedenen Abschnitte des Gallengangssystems jeweils mit dem Nachweis des gerade für ihre Epithelien typischen Zytokeratins.

(A): Leber Rind, Zytokeratin 8-Nachweis. Stark (oben) bzw. deutlich (unten) CK 8-positives Epithel der beiden direkt neben der Zentralvene befindlichen Ductuli biliferi. **(B):** Leber Rind, Zytokeratin 14-Nachweis. Stark CK 14-positives Epithel eines peripheren Ductulus bilifer (oben). Deutlich CK 14-positives Epithel der beiden peripheren Ductus interlobulares biliferi (unten) im angrenzenden Glisson-Dreieck. **(C):** Leber Rind, Zytokeratin 18-Nachweis. Stark CK 18-positives Epithel, insbesondere des größten, der zu einer Gruppe angeordneten, zentralen Ductus interlobulares biliferi. **(D):** Leber Rind, Zytokeratin 18-Nachweis. Schwach bis deutlich CK 18-positives Epithel des peripheren Ductus interlobularis bilifer.

zDb: zentraler Ductulus bilifer; pDb: peripherer Ductulus bilifer; zDi: zentraler Ductus interlobularis bilifer; pDi: peripherer Ductus interlobularis bilifer; ZV: Zentralvene;

SB = 20µm

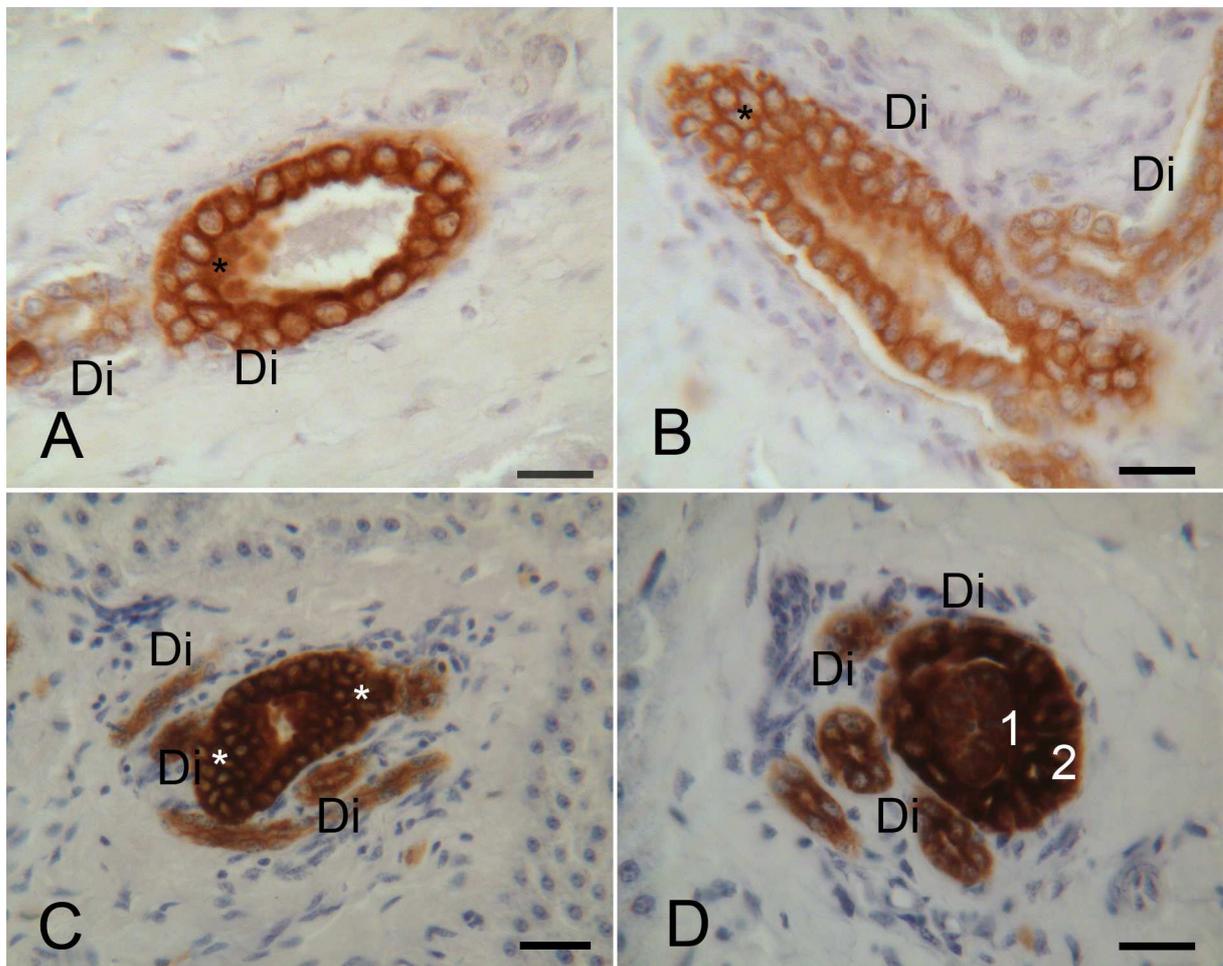


Abb. 8: Reihenfolge der verschiedenen Abschnitte des Gallengangssystems

(Fortsetzung von Abb.7)

(A): Leber Rind, Zytokeratin 19-Nachweis. Deutlich bis stark CK 19-positives Epithel des großen, schwach positives des kleinen Ductus interlobularis bilifer. **(B):** Leber Rind, Zytokeratin 19-Nachweis. Stark CK 19-positives, abschnittsweise-mehrschichtiges Epithel des auffallend großen Ductus interlobularis bilifer (links). Schwach CK 19-positives, typisch einschichtiges Epithel des benachbarten, durchschnittlich großen Ductus (rechts). **(C):** Leber Rind, Zytokeratin 8-Nachweis. Stark CK 8-positives, abschnittsweise-mehrschichtiges Epithel des großen, zentral gelegenen Ductus interlobularis bilifer. Schwach-deutlich CK 8-positives Epithel der sechs ihn umringenden Ductus. **(D):** Leber Rind, Zytokeratin 8-Nachweis. Stark CK 8-positives, durchgehend-mehrschichtiges Epithel eines großen Ductus interlobularis bilifer. Deutlich CK 8-positives Epithel der vier neben ihm gelegenen, kleineren Ductus.

Di: Ductus interlobularis bilifer; 1: apikale Lage des durchgehend-mehrschichtigen Epithels; 2: basale Lage des durchgehend-mehrschichtigen Epithels; *Epithelabschnitt bei dem in basoapikaler Richtung mehrere Zellen hintereinander liegen; SB (A, B, D) = 20µm; SB(C) = 25µm

2.2. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

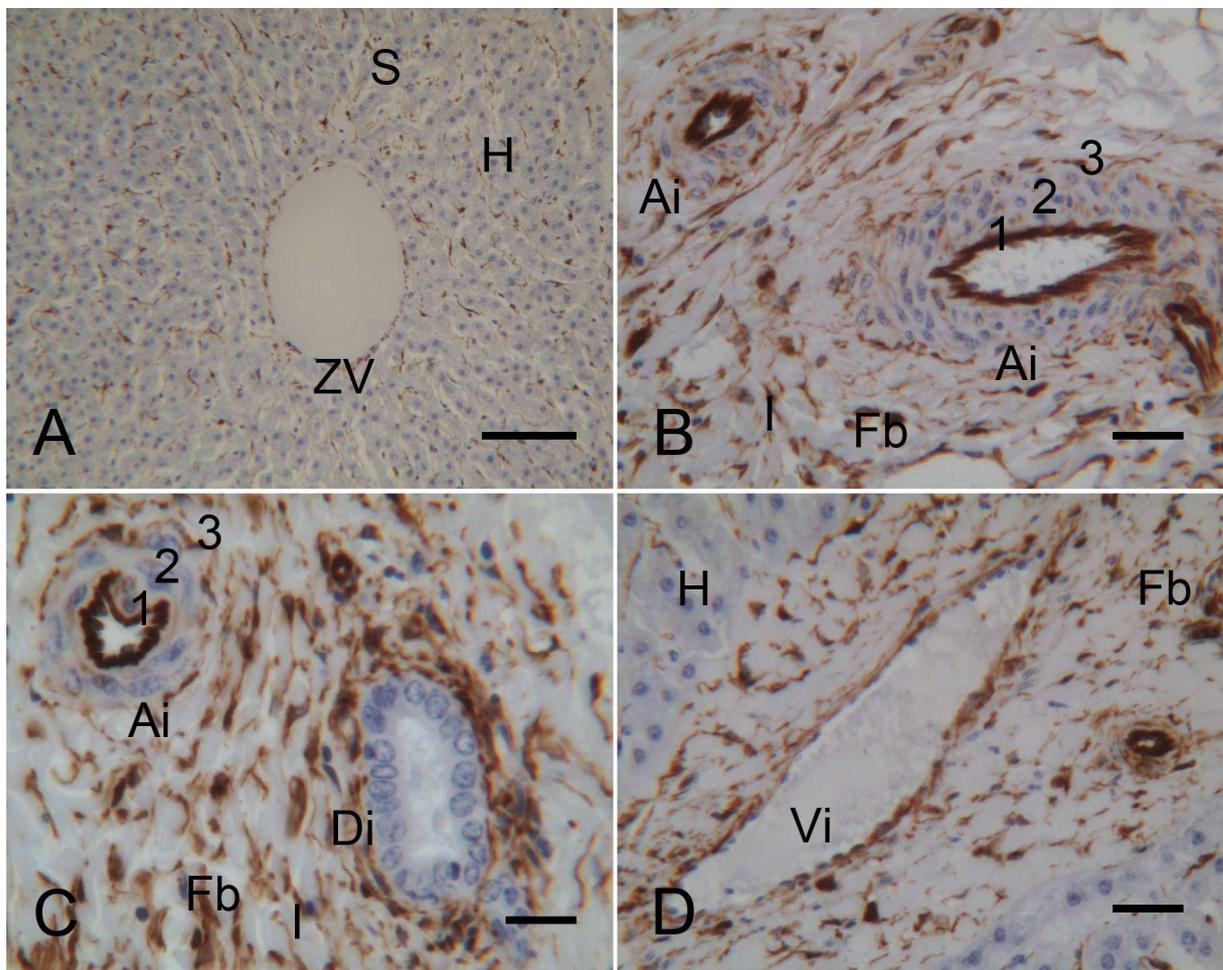
Beim Vimentinnachweis reagieren die Zellen des Interstitiums und der Glisson-Kapsel, wie auch deren Fasern, mit Ausnahme derjenigen, die sich deutlich positiv verhalten, stark positiv, wohingegen sich die Matrix stets nur schwach positiv anfärbt. An der arteriellen Tunica intima zeigen sowohl die Endothelzellen, als auch die Fibroblasten und Bindegewebsfasern, eine sehr stark positive Reaktion. Im Gegensatz dazu färben sich in der venösen Intima die Endothelzellen nur deutlich und die zarten Bindegewebsfasern kaum merklich an. Auch die feinen Bindegewebsfasern zwischen den Muskelzellen der arteriellen Tunica media treten nur schwach positiv in Erscheinung, während sich die umfangreiche Bindegewebslage der venösen Media deutlich positiv verhält. Die Adventitia der Arterien und Venen färbt sich in Abhängigkeit von ihrer Stärke schwach bis deutlich positiv. Von den Bestandteilen der Sinusoid- und Zentralvenenwände reagieren die Endothelzellen positiv, wobei die Reaktion im ersten Fall deutlich bis stark, im zweiten schwach bis deutlich positiv ausfällt. Die Lamina propria der Gallengänge weist eine deutlich bis stark positive Reaktion auf.

Tabelle 19 und Abbildung 9 veranschaulichen die Verbreitung von Vimentin in den Endothelien aller hepatischen Blutgefäße sowie in sämtlichen Bindegewebskomponenten.

Tabelle 19: Verbreitung von Vimentin im Bindegewebe und den Endothelien der Leber

Arterien u. Venen			Zentralvene u. Sinusoide		Gallen-gänge	Interstitium u. Glisson-Kapsel		
Intima *	Media	Adventitia	Endothel-zellen	Bindegewebe	Fasern	Zellen	Fasern	Matrix
A:3; V:1	A:1;V:2	A:1-2;V:1-2	Z:1-2; S:2-3	Z:1-2; S:2-3	2-3	2-3	2-3	1

A: Arteria interlobularis; V: Vena interlobularis; *:umfasst Endothel und Bindegewebe; ZV: Vena centralis; S: Sinusoid; 0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv

**Abb. 9:** Vimentinhaltige Komponenten des Lebergewebes

(A): Leber Rind, Vimentinnachweis. Deutlich bis stark Vimentin-positives Sinusoidendothel, schwach bis deutlich positives Zentralvenenendothel. (B): Leber Rind, Vimentinnachweis. Arteriae interlobulares: Sehr stark Vimentin-positives Bindegewebe und Endothelzellen in der Tunica intima. Vereinzelt, schwach Vimentin-positives Bindegewebsfasern zwischen den Muskelzellen der Media. Mit zunehmendem Gefäßdurchmesser steigende Anzahl und Dichte

überwiegend stark Vimentin-positiver Fasern in der Adventitia. Vornehmlich stark Vimentin-positiv Fibroblasten und Bindegewebsfasern im Interstitium. **(C):** Leber Rind, Vimentinnachweis. Arteria und Ductus interlobularis bilifer: Arterielle Intima und zur Bindegewebschicht des Ductus interlobularis bilifer verdichtete Septen und Fibroblasten als die am stärksten Vimentin-positiven Strukturen der Leber. **(D):** Leber Rind, Vimentinnachweis. Vena interlobularis: Deutlich Vimentin-positives Endothel und nur schwach positives, zartes Bindegewebe in der Intima. Stark Vimentin-positiv Bindegewebsfasern und Fibroblasten in der breiten Media, sowie der schmalen Adventitia. Überwiegend stark Vimentin-positiv Fibroblasten und Fasern im umgebenden Interstitium.

H: Hepatozyt; Fb: Fibroblast; I: Interstitium; ZV: Zentralvene; S: Sinusoid; Ai: Arteria interlobularis; Vi: Vena interlobularis; Di: Ductus interlobularis bilifer; 1: Tunica intima; 2: Tunica media; 3: Tunica adventitia; SB(A) = 100µm; SB(B, C, D) = 25µm

3. Ergebnisse der glykohochemischen Untersuchungen

3.1. Glukose-und Mannose-spezifische Lektine

3.1.1. Bindungsverhalten von Concanavalin A (Con A)

Nach Inkubation mit Concanavalin A (Con A) zeigt das Zytoplasma der Hepatozyten bis auf den äußersten Randbezirk eine stark positive Reaktion (Abb. 8; A). Das Zytoplasma der Gallengangsepithelzellen ist gleichfalls deutlich positiv (Abb. 8; A). Im Interstitium und in der Glisson-Kapsel fluoreszieren nur die stärksten Fasern schwach positiv.

3.1.2. Bindungsverhalten von Lens culinaris Agglutinin (LCA)

Das Lens culinaris Agglutinin (LCA) bindet, bis auf das deutlich positiv reagierende Sinusoidendothel, ausschließlich an die verschiedenen Komponenten des hepatischen Bindegewebes. So reagieren die Bindegewebssepten des Interstitiums (Abb. 8; C) und der Glisson-Kapsel, die bindegewebigen Anteile sämtlicher Arterien (Abb. 8; C)- und Venenwände, die Lamina subepitheliales der Gallengänge (Abb. 8; C) und das feine Bindegewebe unter den Sinusoiden (Abb. 8; B) überwiegend deutlich positiv. Daneben kommen in allen genannten Strukturen vereinzelt auch kollagene Fasern vor, die nur schwach positiv oder auch gar nicht reagieren.

3.1.3. Bindungsverhalten von Pisum sativum Agglutinin (PSA)

Das Lektin Pisum sativum Agglutinin (PSA) erzeugt ein Färbemuster, das nahezu völlig identisch zu dem von LCA ist: Auch hier reagiert das Sinusoidendothel und die Lamina

subepithelialis der Gallengänge deutlich positiv. Die Septen und Fasern des Interstitiums der Glisson-Kapsel, aber auch die retikulären Maschen und kollagenen Fasern des die Sinusoide umhüllenden, bindegewebigen Gerüstwerks (Abb. 8; D) sowie die bindegewebigen Anteile der Blutgefäßwände (Abb. 8; D) färben sich allerdings nur schwach positiv an.

3.2. Galaktose-spezifische Lektine

3.2.1. Bindungsverhalten von Peanut Agglutinin (PNA)

Das Lektin Peanut Agglutinin (PNA) bindet an keine Strukturen der Rinderleber.

3.2.2. Bindungsverhalten von Ricinus communis Agglutinin (RCA)

Das Lektin Ricinus communis Agglutinin (RCA) ruft an keiner der bovinen Leberstrukturen eine positive Reaktion hervor.

3.2.3. Bindungsverhalten von Viscum album Agglutinin (VAA)

Die Inkubation mit dem Lektin Viscum album Agglutinin (VAA) führt zu einer deutlich positiven Reaktion der arteriellen Endothelien. Dagegen reagieren die Endothelzellen der Venen nur schwach positiv, teilweise (wo Blutzellen mit den Endothelzellen in Kontakt treten) negativ.

3.2.4. Bindungsverhalten von Soybean Agglutinin (SBA)

Die Inkubation mit dem Lektin Soybean Agglutinin (SBA) zeigt keine positiven Strukturen in der Rinderleber.

3.2.5. Bindungsverhalten von Sambucus nigra Agglutinin (SNA)

In den, mit dem Lektin Sambucus nigra Agglutinin (SNA) behandelten Präparaten ist keine positive Reaktion erkennbar.

3.3. N-Acetylglukosamin-spezifische Lektine

3.3.1. Bindungsverhalten von Wheat Germ Agglutinin (WGA)

In den Schnitten, die mit Wheat Germ Agglutinin (WGA) inkubiert wurden, treten das Plasmalemm sowie der Golgi-Apparat der Hepatozyten durch eine sehr stark positive Reaktion in Erscheinung (Abb. 9; C, D u. Abb. 10; A). Darüber hinaus fluoreszieren die Maschen des die Sinusoide umspannenden, bindegewebigen Gerüstwerks deutlich (Abb. 9; C, D u. Abb. 10; A). Die Fasern des Interstitiums reagieren ebenfalls deutlich WGA-positiv, wohingegen sich die Bindegewebsschicht der Gefäßwände und das Endothel der Arterien nur

schwach positiv verhalten. Das Plasmalemm der Gallengangsepithelzellen, und zwar insbesondere der hochprismatischen Zellen reagiert deutlich positiv.

3.3.2. Bindungsverhalten von Wheat Germ Agglutinin succinyliert (WGAs)

Das, durch die succinylierte Form des Wheat Germ Agglutinins (WGAs) hervorgerufene Reaktionsmuster entspricht weitgehend dem, des unveränderten Typs, wobei jedoch die Intensität der Fluoreszenz weit hinter der durch WGA verursachten zurückbleibt. So reagieren das Plasmalemm und Golgi-Apparat der Hepatozyten nur schwach positiv (Abb. 10; B, D). Die Sinusoidwände fluoreszieren überhaupt nicht. Im Interstitium zeigen nur die kräftigsten Fasern eine schwach positive Reaktion (Abb. 10; C). Im Bereich des Gefäßwandbindegewebes kann nur ein extrem schwaches Grün wahrgenommen werden. Selbiges trifft auch auf das Endothel der Arterien zu (Abb. 10; C). Die Zellmembran der Gallengangsepithelzellen zeigt nur noch eine schwach positive Reaktion (Abb. 10; C).

3.4. N-Acetylgalaktosamin-spezifische Lektine

3.4.1. Bindungsverhalten von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

In den, mit dem Lektin Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) behandelten Präparaten, ist an keiner Struktur der bovinen Leber eine positive Reaktion zu beobachten.

3.4.2. Bindungsverhalten von Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL)

Das Lektin Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL) gibt nur am Endothel der Arterien eine stark positive Reaktion (Abb. 9; B).

3.4.3. Bindungsverhalten von Soybean Agglutinin (SBA)

Die Inkubation mit dem Lektin Soybean Agglutinin (SBA) zeigt keine positiven Strukturen in der Rinderleber.

3.4.4. Bindungsverhalten von Saphora japonica Agglutinin (SJA)

Die, mit dem Lektin Saphora japonicum Agglutinin (SJA) gefärbten Schnitte, sind immer negativ.

3.4.5. Bindungsverhalten von Sambucus nigra Agglutinin (SNA)

In den, mit dem Lektin Sambucus nigra (SNA) behandelten Präparaten, ist keine positive Reaktion erkennbar.

3.5. Fukose-spezifische Lektine

3.5.1. Bindungsverhalten von Ulex europeus Agglutinin I (UEA-I)

Die mit dem Lektin Ulex europeus Agglutinin-I (UEA-I) inkubierten Schnitte verhalten sich negativ.

3.6. Oligosaccharid-spezifische Lektine

3.6.1. Bindungsverhalten von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)

Das Lektin Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) bindet sich deutlich an die retikulären Maschen und an die kollagenen Fasern des Gerüstwerks der Sinusoidwände (Abb. 13; A). Ferner ist die Plasmamembran der Gallengangsepithelzellen schwach und das Endothel der Arterien deutlich positiv (Abb. 13; B). Das Interstitium reagiert nahezu negativ (Abb. 13; B).

3.6.2. Bindungsverhalten von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L)

Das Phaseolus vulgaris leukoagglutinin (PHA-L) bindet sich deutlich an das Endothel der Arterien (Abb. 13; C, D) und an die Zellmembran der Gallengangsepithelzellen. Venöse Endothelien verhalten sich negativ (Abb. 13; C, D). Die Grundsubstanz des Interstitiums ist deutlich positiv (Abb. 13; C, D). Das Zytoplasma, der hauptsächlich in den peripheren Sinusoiden gelegenen Lymphozyten reagiert deutlich positiv (Abb. 13; D).

3.6.3. Bindungsverhalten von Maackia amurensis Agglutinin I (MAA-I)

Die mit dem Lektin Maackia amurensis Agglutinin (MAA-I) inkubierten Schnitte reagieren durchwegs negativ.

Tabelle 20 und die Abbildungen 10, 11, 12 und 13 geben einen vergleichenden Überblick über die unterschiedliche Affinität der eingesetzten Lektine zu den verschiedenen Leberstrukturen.

Tabelle 20: Bindungsverhalten verschiedener Lektine in der Rinderleber

Lektin	Hepatozyten	Sinusoide		Blutgefäße			Gallengänge		Interstitium	
		Endothel	Binde- gewebe	Endothel	Binde- gewebe	Muskula- tur	Epithel	Binde- gewebe	Fibro- zyten	Fasern
Con A	3	0	0	0	A:0 V:1	0	2	0	0	1
LCA	0	2	2	0	A:2 V:2	0	0	2	2	2
PSA	0	2	1	0	A:1 V:1	0	0	2	1	1
PNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VAA	0	0	0	A:3 V:1	0	0	0	0	0	0
SBA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WGA	3	3	2	A:2 V:0	1	0	2	0	2	2
WGAs	1	0	0	A:1 V:0	0	0	1	0	0	1
DBA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GSL-1	0	0	0	A:3 V:0	0	0	0	0	0	0
SBA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UEA-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHA-E	0	2	2	A:1 V:0	0	0	2	0	0	1
PHA-L	0	0	0	A:2 V:0	0	0	2	0	1	1
MAA-I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A: Arterie; V: Vene; 0: negative Reaktion; 1: schwach positive Reaktion; 2: deutlich positive Reaktion; 3: stark positive Reaktion

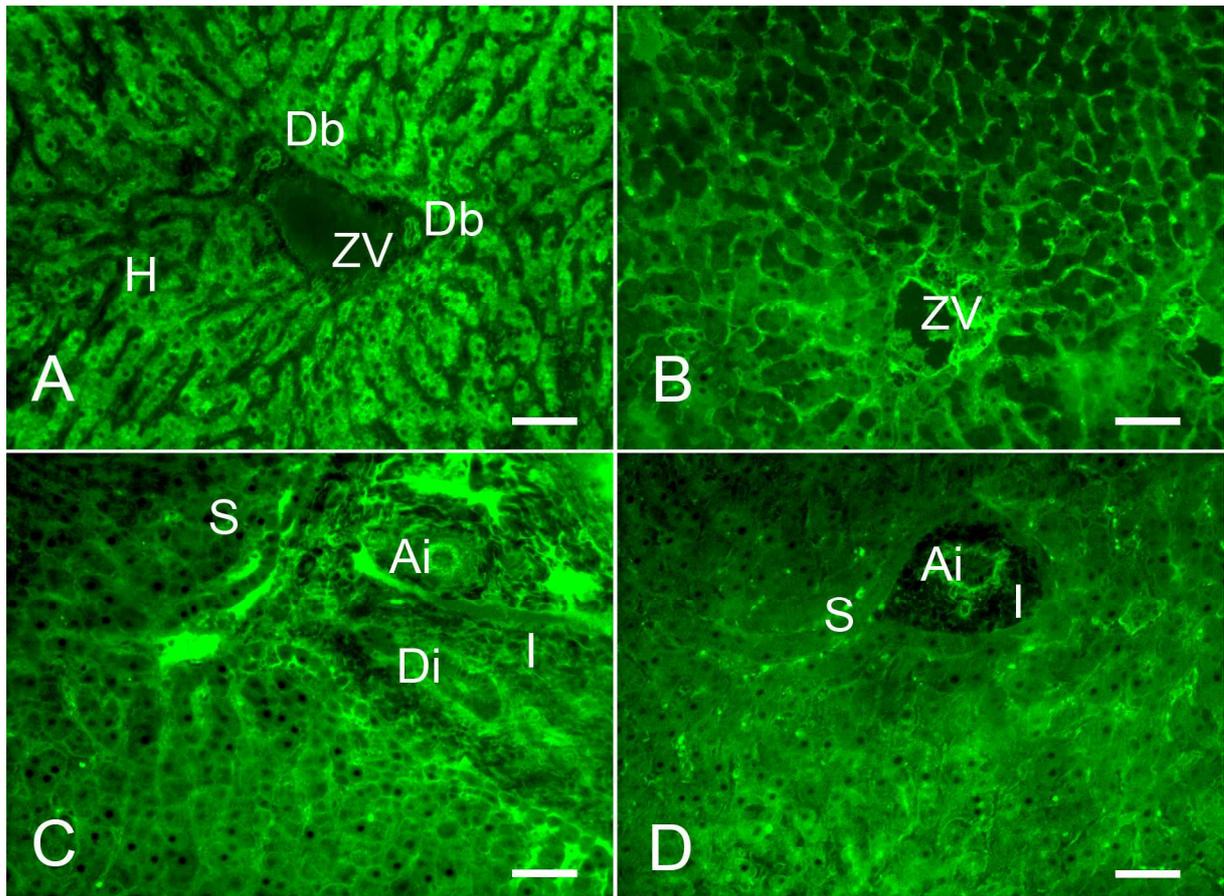


Abb. 10: Con A-, LCA- und PSA-positive Strukturen der Rinderleber

Alle LCA-positiven Strukturen reagieren, abgesehen von der nur etwas geringeren Intensität, genauso auch PSA-positiv, wohingegen es sich bei den Con A-positiven Strukturen um ganz andere Komponenten des Lebergewebes handelt.

(A): Leber Rind, Con A-Reaktion. Stark Con A positives Zytoplasma der Hepatozyten, deutlich positives der Gallengangsepithelzellen **(B):** Leber Rind, LCA-Reaktion. Deutlich LCA-positives Sinusoidendothel. Deutlich LCA-positives Bindegewebe der Sinusoid- und Zentralvenenwände. **(C):** Leber Rind, LCA-Reaktion. Deutlich LCA-positives Sinusoidendothel. Deutlich LCA-positives Bindegewebe der Sinusoid-, Arterien-, und Gallengangswände. Deutlich LCA-positives Interstitium. **(D):** Leber Rind, PSA-Reaktion. Deutlich PSA-positives Sinusoidendothel. Schwach PSA-positives Bindegewebe der Sinusoid- und Arterienwände. Schwach PSA-positives Interstitium.

H: Hepatozyt; S: Sinusoid; ZV: Vena centralis; Ai: Arteria interlobularis; Vi: Vena interlobularis; Db: Ductulus bilifer; Di: Ductus interlobularis bilifer; SB = 25µm

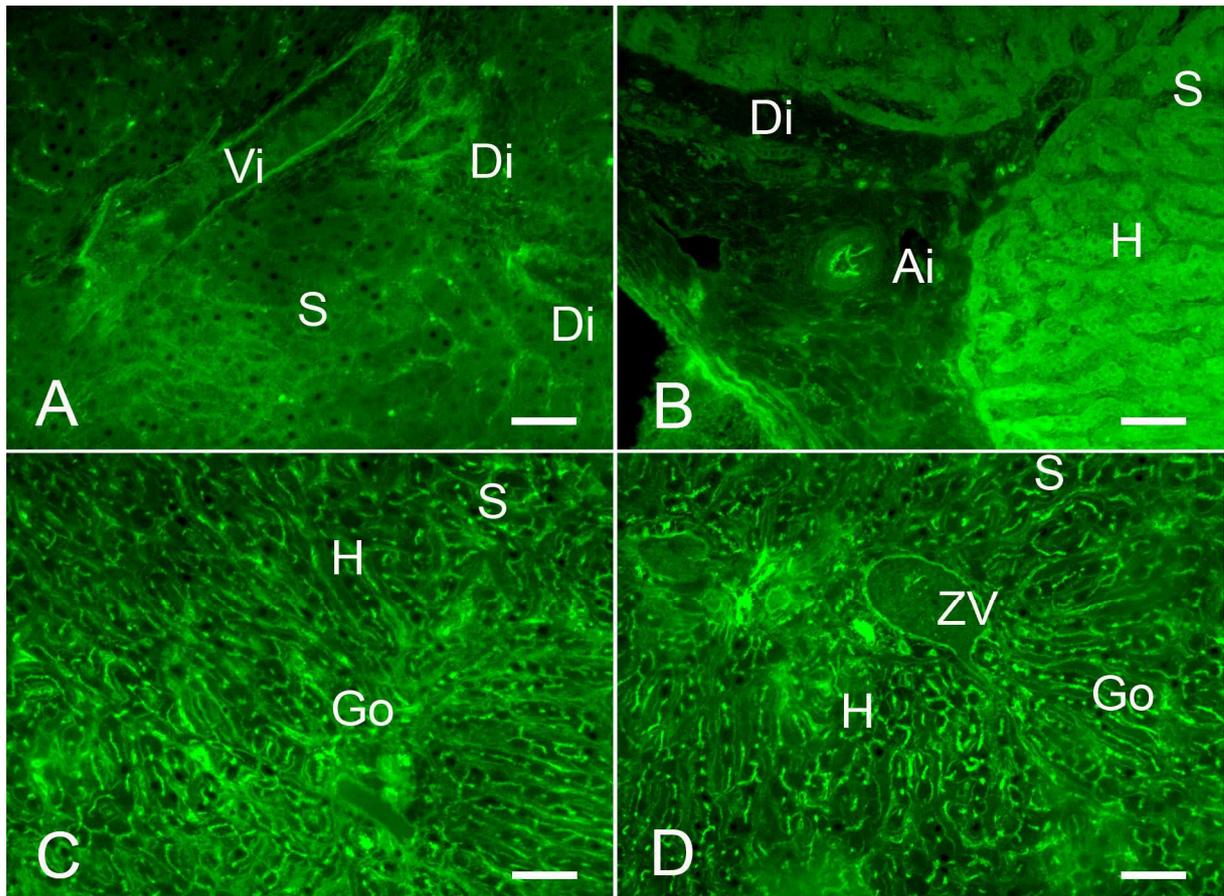


Abb. 11: PSA-, GSL-1 und WGA-positive Strukturen der Rinderleber

(A): Leber Rind, PSA-Reaktion. Deutlich PSA-positives Sinusoidendothel. Schwach PSA-positives Bindegewebe der Sinusoid-, Arterien-, Venen- und Gallengangswände. Schwach PSA-positives Interstitium. **(B):** Leber Rind, GSL-1-Reaktion. Deutlich GSL-1-positives Arterienendothel. **(C):** Leber Rind, WGA-Reaktion. Stark WGA-positiv Golgi-Apparate und Plasmalemm der Hepatozyten. Stark WGA-positives Sinusoidendothel. **(D):** Leber Rind, WGA-Reaktion. Stark WGA-positiv Golgi-Apparate und Plasmalemm der Hepatozyten. Stark WGA-positives Sinusoidendothel. Schwach bis deutlich WGA-positives Zentralvenenendothel.

H: Hepatozyt; S: Sinusoid; ZV: Vena centralis; Ai: Arteria interlobularis; Vi: Vena interlobularis; Db: Ductulus bilifer; Di: Ductus interlobularis bilifer; SB = 25µm

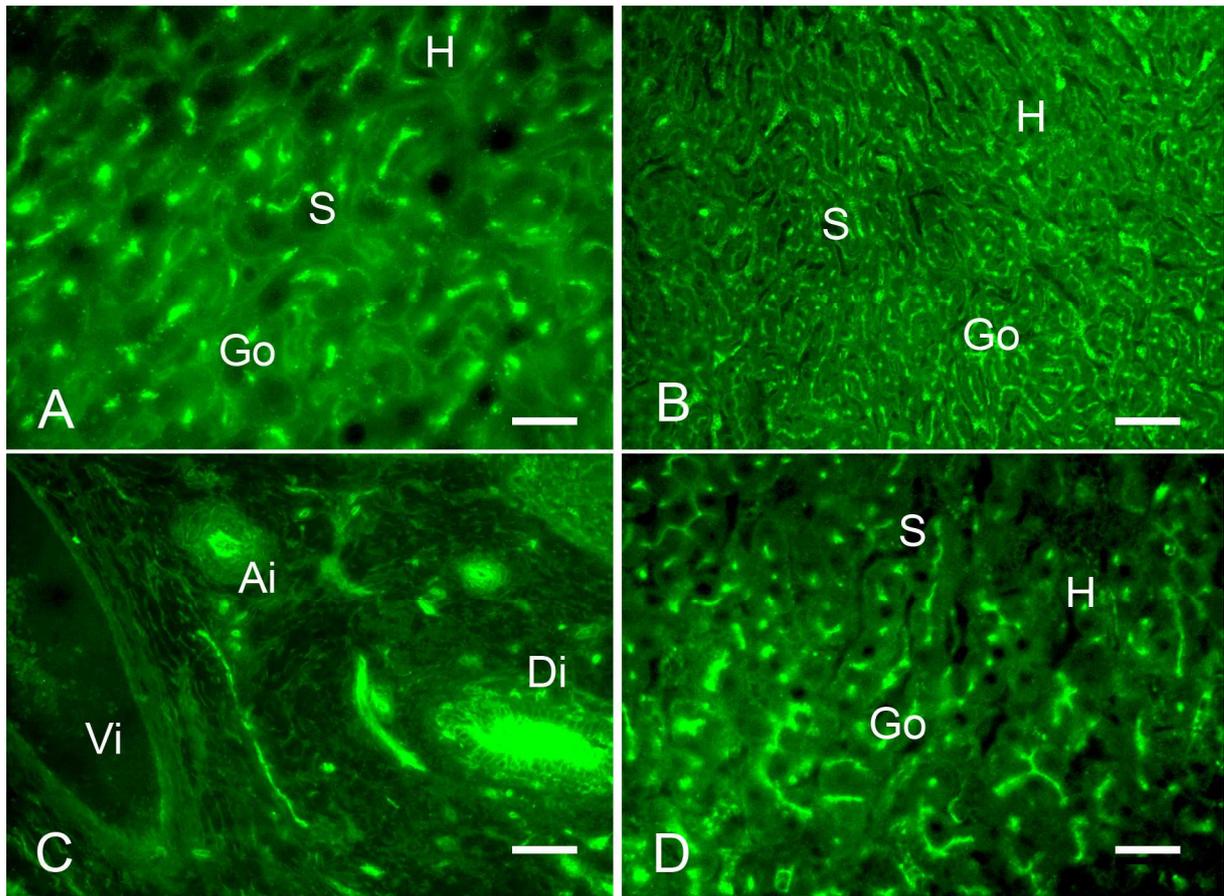


Abb. 12: WGA- und WGAs-positive Strukturen der Rinderleber

Die meisten WGA-positiven Strukturen mit deutlich geringerer Intensität auch WGAs-positiv. **(A):** Leber Rind, WGA-Reaktion. Stark WGA-positive Golgi-Apparate und Plasmalemm der Hepatozyten. Stark WGA-positives Sinusoidendothel. **(B):** Leber Rind, WGAs-Reaktion. Deutlich WGAs-positive Golgi-Apparate und Plasmalemm der Hepatozyten. **(C):** Leber Rind, WGAs-Reaktion. Schwach WGAs-positives Arterienendothel und Interstitium. **(D):** Leber Rind, WGAs-Reaktion. Deutlich WGAs-positive Golgi-Apparate und Plasmalemm der Hepatozyten.

H: Hepatozyt; S: Sinusoid; ZV: Vena centralis; Ai: Arteria interlobularis; Vi: Vena interlobularis; Db: Ductulus bilifer; Di: Ductus interlobularis bilifer; SB = 25 μ m.

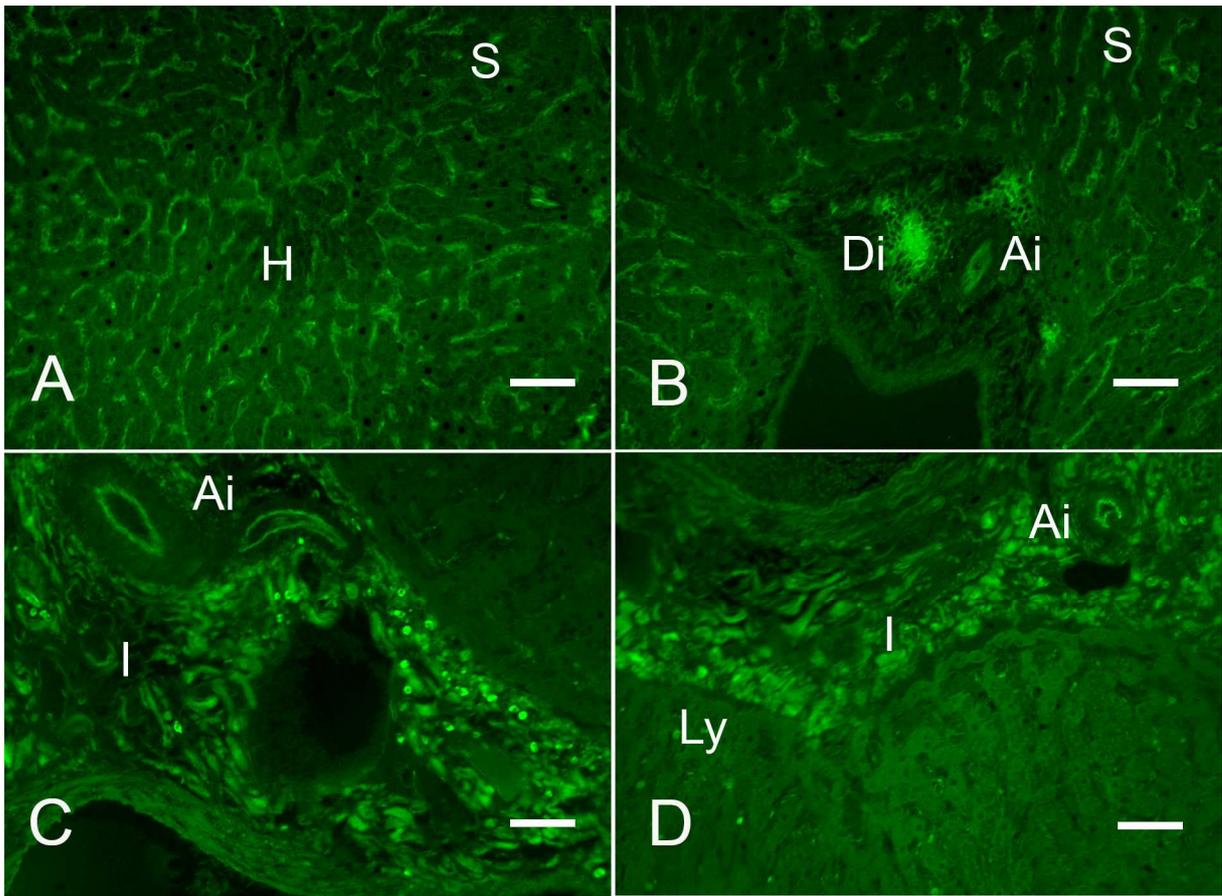


Abb. 13: PHA-E- und L-positive Strukturen der Rinderleber

(A): Leber Rind, PHA-E-Reaktion. Deutlich PHA-E-positives Sinusoidendothel. (B): Leber Rind, PHA-E-Reaktion. Deutlich PHA-E-positives Arterienendothel, schwach PHA-E-positives Gallengangsepithelzellmembran. (C): Leber Rind, PHA-L-Reaktion. Stark PHA-L-positives Arterienendothel. Deutlich PHA-L-positives interstitielle Matrix. (D): Leber Rind, PHA-L-Reaktion. Deutlich PHA-L-positives Lymphozytenzytoplasma. Stark PHA-L-positives Arterienendothel. Deutlich PHA-L- positive interstitielle Matrix.

H: Hepatozyt; Ly: Lymphozyt; S: Sinusoid; ZV: Vena centralis; Ai: Arteria interlobularis; Vi: Vena interlobularis; Di: Ductus interlobularis bilifer; SB= 25µm

4. Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchungen

4.1. Hepatozyten

Der Hepatozyt präsentiert sich als große, polygonale Zelle, deren Außenkanten nicht alle die gleiche Länge aufweisen. Nicht selten sind zwei gegenüberliegende Seiten parallel zueinander ausgerichtet (Abb. 14; A, C). Der große, rundliche, teilweise leicht ausgebuchtete Nukleus nimmt eine exzentrische Position in der sinusoidalen Zellzone ein (Abb. 14; A, C). Das, zu mindestens einem Drittel zu stark elektronendichtem Heterochromatin kondensierte

Chromatin, säumt in der Regel mit groben, aber auch feineren Flocken die Innenseite der Kernmembran oder bildet in seltenen Fällen äußerst große, aufgetriebene Ansammlungen im Zentrum des Kerns (Abb. 14 ; B, C). Dort sind zusätzlich mehrere, nicht selten vier bis fünf, gut entwickelte Nukleoli zu sehen. Sie setzen sich aus einer verhältnismäßig breiten, kompakt wirkenden, dichten, zu knäulartig gewundenen Strängen konfigurierten Matrix, die zwischen sich elektronenoptisch leere oder aber dem Kernplasma gleichende Räume einschließt, zusammen (Abb. 14; B u. Abb. 15; B,C). Rings um den Kern sowie entlang der gesamten Zellmembran der sinusoidalen Zone finden sich kleine runde, größere ovale und sehr große Mitochondrien (Abb. 14; B u. Abb. 15; B). In der direkten Nachbarschaft des Nukleus treten zudem mehrere kleine Zisternen von rauem endoplasmatischem Retikulum mit nur zwei oder drei Stapeln auf. Wesentlich umfangreichere, aus bis zu 14 parallel angeordneten Tubuli zusammengesetzte Einheiten von rauem endoplasmatischem Retikulum ordnen sich in regelmäßigen Abständen entlang der gesamten Zellmembran an (Abb. 14, B). Die langgestreckten, schmalen, mit amorphem, mäßig elektronendichtem Material gefüllten Tubuli werden von einer mit runden Ribosomen besetzten Membran begrenzt. Das glatte endoplasmatische Retikulum zeigt hingegen eine ganz andere Struktur: Seine zu kurzen, vom flockigen Inhalt aufgetriebenen, verzweigten Tubuli werden von einer zwar glatten, aber in sich stark Furchen bildenden Membran begrenzt. Diese Membranen durchziehen als zusammenhängendes System nahezu die gesamte Zelle (Abb. 14; B). In Assoziation mit dem glatten endoplasmatischen Retikulum finden sich bevorzugt in der Umgebung des Kerns Aggregate von Glykogenpartikeln. Die Dictyosomen des Golgi-Apparates sind bevorzugt nahe dem sinusoidalen Pol der Zelle lokalisiert. Nicht selten ist die Zelle im Besitz zweier, solcher einander diagonal gegenüberliegender Golgi-Felder. Nicht zuletzt finden sich häufig in der Nähe der Mitochondrien Fettvakuolen. Ihre Gestalt und Größe ist äußerst variabel, wobei kleine dominieren (Abb. 15; B, C). Die polymorphen Fettvakuolen können aber auch, und zwar insbesondere in Zellen, die viele Vakuolen enthalten, einen sehr großen Durchmesser erreichen. Oft liegen sie in Gruppen zusammen und verschmelzen teilweise miteinander. Ferner sind im Hepatozyten, vornehmlich in der Nähe der Gallenkapillaren, vereinzelt kugelige, homogene, mit einem deutlich elektronendichtem, kernähnlichem Körper, dem Nukleoid, versehene Microbodies sowie die ebenfalls runden, mit aber deutlich dichteren, teilweise sogar schwarzen Einschlüssen ausgestatteten Lysosomen zu sehen. Das Plasmalemm der sinusoidalen Zone weist häufig pinozytotische Vesikel auf. Diese Abschnitte des Plasmalemmes tragen einzelne, kurze, stachelartige Mikrovilli mit sehr breiter Basis (Abb. 14; B u. Abb. 15; B). In der Mitte der lateralen Zone weichen die Zellmembranen zweier benachbarter Hepatozyten etwas auseinander und formen so die Gallenkapillare mit ihrem

schmalen Querschnitt.

4.2. Sinusoidale Endothelzellen

Die Endothelzellen der Sinusoide mit ihren vornehmlich länglichen, dreieckigen oder leicht U-förmig gebogenen Zellkörpern (Abb. 14; D) und den davon in alle Richtungen ausstrahlenden Zytoplasmafortsätzen sorgen für die endotheliale Auskleidung der Leberkapillaren (Abb. 14; C). Die auf vielfältige Art und Weise gestalteten Ausläufer entwickeln sich übergangslos aus dem Zytoplasma des Zelleibs. Der längliche, stäbchen- oder spindelförmige, nicht selten einige Einkerbungen aufweisende Kern liegt meist exzentrisch, nahe der dem Disse Raum zugewandten Zellmembran (Abb. 15; A, B). Sein stark kondensiertes Heterochromatin liegt innen der Kernmembran an (Abb. 15; A, B, D). Im, den übrigen Kernraum ausfüllenden, vergleichsweise dichten Euchromatin, ist nicht selten ein Nukleolus zu beobachten. In jeder Zelle lässt sich mindestens ein Golgi-Apparat mittlerer Größe finden. Weiter können kurze Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums entdeckt werden. In der Nachbarschaft des Kerns sind wenige, kleine, ovale Mitochondrien lokalisiert. Weiter kommen zahlreiche unterschiedlich geformte Vesikel vor: Kleinste, helle, runde, stäbchen- oder auch reiskornartige, von einer Membran begrenzte Vesikel (Abb. 15; D u. Abb. 16; A), die zu großen Feldern vereinigt, die Zellmembran unterlagern, sich aber auch in die Basis der Zytoplasmaausläufer hinein sowie in tiefere Zytoplasmaschichten verbreiten (Abb. 15; D u. Abb. 16A). Ferner treten größere, helle, klare, spindelförmige „brizzle-coated“-Mikropinozytosevesikel mit geringem, mäßig elektronendichten Inhalt auf (Abb. 16; A). Als besonders große Vesikel präsentieren sich die von einer Membran umgebenen, kugeligen, oder auch oval bis bohnenförmigen Makropinozytosevesikel, die große Mengen flockigen Materials und teilweise auch einige, schwarze, granuläre Partikel zum Inhalt haben (Abb. 15; D).

4.3. Disse-Raum

Der schmale Disse Raum (Abb. 14; C) wird einerseits von den Sinusoidendothelzellen mit ihren trabekulären, strangartigen Zytoplasmaausläufern (Abb. 14; B), sowie andererseits von der Hepatozytenmembran der sinusoidalen Zone (Abb. 14, D u. 15, B) begrenzt. Das Sinusoidendothel wird von einer kontinuierlichen Basalmembran unterlagert (Abb. 15; A). Im Disse Raum befinden sich neben mäßig dichtem, amorphen Material, das zwischen den Engstellen in höherer Konzentration als in den übrigen Arealen vorliegt (Abb. 15; B), auch in kleinsten Spuren Fibrillen von Kollagenfaserbündeln und Mikrofilamenten (Abb. 15; B). Ferner ragen von der Hepatozytenmembran vereinzelt breite, kurze Mikrovilli in den

Spaltraum hinein (Abb. 14; B). Das auf der anderen Seite des Endothels befindliche Kapillarlumen, das nur über Endothelporen und -lücken direkt mit dem Disse Raum kommuniziert (Abb. 14; B u. Abb. 15; A), enthält ebenfalls, und zwar in noch etwas größeren Mengen amorph bis feingranuläres Material sowie Erythrozyten (Abb. 15; B).

4.4. Ito-Zellen

Die Ito-Zelle, die im Disse Raum üblicherweise einem Hepatozyten (Abb. 15; C), gelegentlich auch einer Sinusoidendothelzelle aufsitzt, ist entweder langgestreckt, flach, leicht kegel- oder keulenförmig oder aber eher dreieckig (Abb. 15; C) gestaltet und geht fließend in die sternförmig in den Disse Raum ausstrahlenden, sich kontinuierlich verjüngenden zytoplasmatischen Fortsätze über (Abb. 15; C). Die Bestandteile des Zytoskeletts finden sich im gesamten Zytoplasma, verlaufen jedoch bevorzugt parallel zur Zellmembran (Abb. 15; C). Der Nukleus ist entweder langgestreckt, schmal und stäbchenförmig oder rundlich-oval (Abb. 15; C) geformt. Er ist exzentrisch zu der dem Hepatozyten aufsitzenden Zellmembran hin orientiert. Der größte Teil des Zellkörpers wird jedoch von wenigen, eventuell sogar nur einer, großen homogenen Fettvakuole ohne eigene Membran eingenommen (Abb. 15; C). Die Form der Fetttropfen richtet sich an der Gestalt des Zellkörpers aus. Ihre Ausdehnung wird von den kräftigen, weit außen parallel zur Zellmembran verlaufenden Filamenten des Zytoskeletts festgelegt (Abb. 15; C) Deshalb nehmen sie bei Zellen mit länglichen, stäbchenförmigen Zelleibern annähernden zu einem Rechteck oder Trapez abgeflacht, den Abstand zwischen den beiden, parallel zur Membranoberfläche verlaufenden, zytoskelettalen Filamenten, sowie ein Drittel der Länge des Zellkörpers ein. Zudem sammeln sich direkt unterhalb der Membran viele kleine, rundlich-ovale Vakuolen an.

4.5. Von Kupffer-Zellen

Die morphologisch sehr variabel erscheinende von Kupffer-Zelle befindet sich innerhalb des Sinusoids in engem Kontakt mit dessen Wand. Der oval oder auch bohnenartig konfigurierte Nukleus, der sich nicht selten mehrfach ausbuchtet (Abb. 16; B), ist bevorzugt exzentrisch in der Zelle positioniert (Abb. 15; D). Im Zentrum des Kerns zeigt sich ein deutlicher, runder Nukleolus. Die Kernmembran setzt sich direkt in das Membransystem des rauen endoplasmatischen Retikulums fort. Um den Kern sammeln sich dicht gepackte, kleinere, rundliche, sowie größere, länglich ovale Mitochondrien des Cristae-Typs an (Abb. 15D; u. Abb. 16; B). Der eher in der Mitte des Zytoplasmas liegende, verhältnismäßig große Golgi-Apparat stellt sich als Stapel parallel angeordneter Zisternen dar, die zwischen sich zahlreiche, kleine Bläschen einschließen. Des Weiteren verteilen sich über die gesamte Zelle

die Organellen des lysosomalen Endozytosesystems: Dabei handelt es sich zum einen um zahlreiche lysosomale Vakuolen und Vesikel, die insbesondere in der Umgebung des Kerns liegen (Abb. 15; B u. Abb. 16; B), zum anderen befinden sich in den peripheren Zytoplasmaarealen „bristle coated“ Mikropinozytosevesikel (Abb. 15; D), als große, helle, spindelförmige Vakuolen, die in einigen Fällen mäßig elektronendichtes Material enthalten und auch miteinander verschmelzen können (Abb. 15; D). Außerdem existieren runde, von einer grobflockig aufgelockerten Membran behüllte („thick-fuzzy coated“, „dickflockig-behüllte“) Vesikel. Ferner sind Ausschnitte aus dem Phagozytoseprozess zu entdecken: Große, ovale Phagolysosomen, die phagozytierte Substanzen, wie pyknotische Zellkerne oder Fremdkörperpartikel enthalten (Abb. 16; B). Ferner existieren ovale Restkörper mit den stark kondensierten Abbauprodukten der lysosomalen Verdauung, die von einer homogenen, dunklen Matrix begrenzt werden (Abb. 16; B). Die üblicherweise mehrfach in der Zelle vorhandenen Dictyosomen des Golgi-Apparates sind bevorzugt in den Außenbezirken der Zelle lokalisiert und setzen sich aus parallel angeordneten Zisternen, die zwischen sich kleine Bläschen einschließen, zusammen.

4.6. Gallengangsepithelzellen

Die Gallengangsepithelzelle erweist sich als morphologisch sehr variable Zelle (Abb. 16; C). Apikal weist sie wenige oder keine Mikrovilli auf (Abb. 16; C). Basal unterlagert eine breite, gut entwickelte, Basalmembran die Zelle. Lateral stehen die Zellen in engem Kontakt mit der Nachbarzelle (Abb. 16; C), wobei die ohnehin größtenteils direkt aneinanderliegenden Membranen nur abschnittsweise von einem extrem schmalen, mit homogener Kittsubstanz gefülltem Interzellularspalt getrennt werden (Abb. 16; D). Zellen, die aufgrund der gelegentlichen, zweischichtigen Ausbildung des Epithels das Gallengangslumen nicht erreichen, verbinden sich in gleicher Weise zusätzlich auch noch apikal mit der Nachbarzelle. Der Kern liegt bevorzugt in den basalen Bereichen der Zelle. Unregelmäßig konfiguriert passt er sich der Form der Zelle an und wirkt dadurch länglich oval oder rundlich (Abb. 16; C). Der Gehalt an Heterochromatin schwankt ebenfalls stark (Abb. 16; C). Bei einem Drittel aller Kerne lässt sich ein randständiger Nukleolus mittlerer Größe beobachten. Das Gebiet um den Kern sowie der apikale Bereich der Zelle sind frei von Zellorganellen. Im Zytoplasma lassen sich einige ovale, längliche Mitochondrien geringer Größe finden. Ferner finden sich Polyribosomen (Abb. 16; D) sowie Lysosomen, Peroxisomen, Hämosiderinablagerungen und Fettkügelchen. Zudem ist in manchen Zellen ein zentral gelegener Golgi-Apparat zu beobachten. Dieser setzt sich aus mehreren Stapeln paralleler, sehr kurzer Zisternen und angelagerter Vesikel zusammen. Nicht selten versammeln sich mehrere Golgi-Apparate

nebeneinander, was die Entstehung umfangreicher Golgi-Felder zur Folge hat (Abb.16; D).

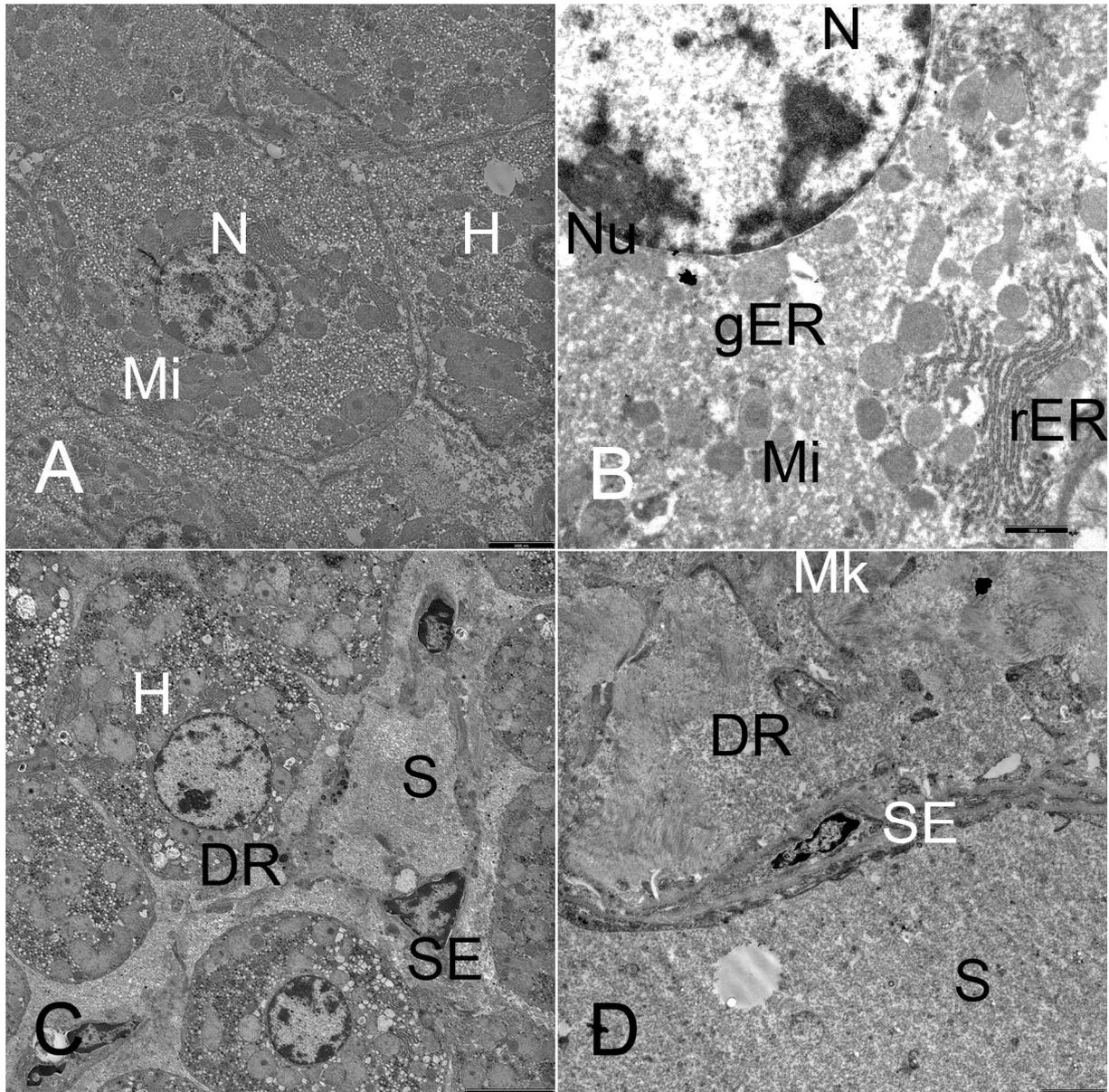


Abb. 14: Lagebeziehung zwischen Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen

Die sich daraus ergebende Anordnung der Hepatozyten zu Leberzellbalken sowie die Einrahmung der Sinusoide durch die Leberzellbalken bilden die Grundlage der Läppchenstruktur. **(A):** Leber Rind, EM. Räumliche Anordnung der Organellen im Innenraum eines klassisch polygonalen Hepatozyten. **(B):** Leber Rind, EM. Ausschnitt aus einem Hepatozyten. **(C):** Leber Rind, EM. Topographische Beziehung zwischen Hepatozyten und Endothelzellen. **(D):** Leber Rind, EM. Räumliche Anordnung der Organellen im Inneren einer sinusoidalen Endothelzelle.

H: Hepatozyt; SE: Sinusoidendothelzelle; DR: Disse Raum; S: Sinusoid; N: Nukleus; Nu: Nukleolus; Mi: Mitochondrium; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; gER: glattes Endoplasmatisches Retikulum; Mk: Mikrovilli; SB(A, D) = 2500nm; SB(B) = 1000nm;

SB(C)

=

5000nm

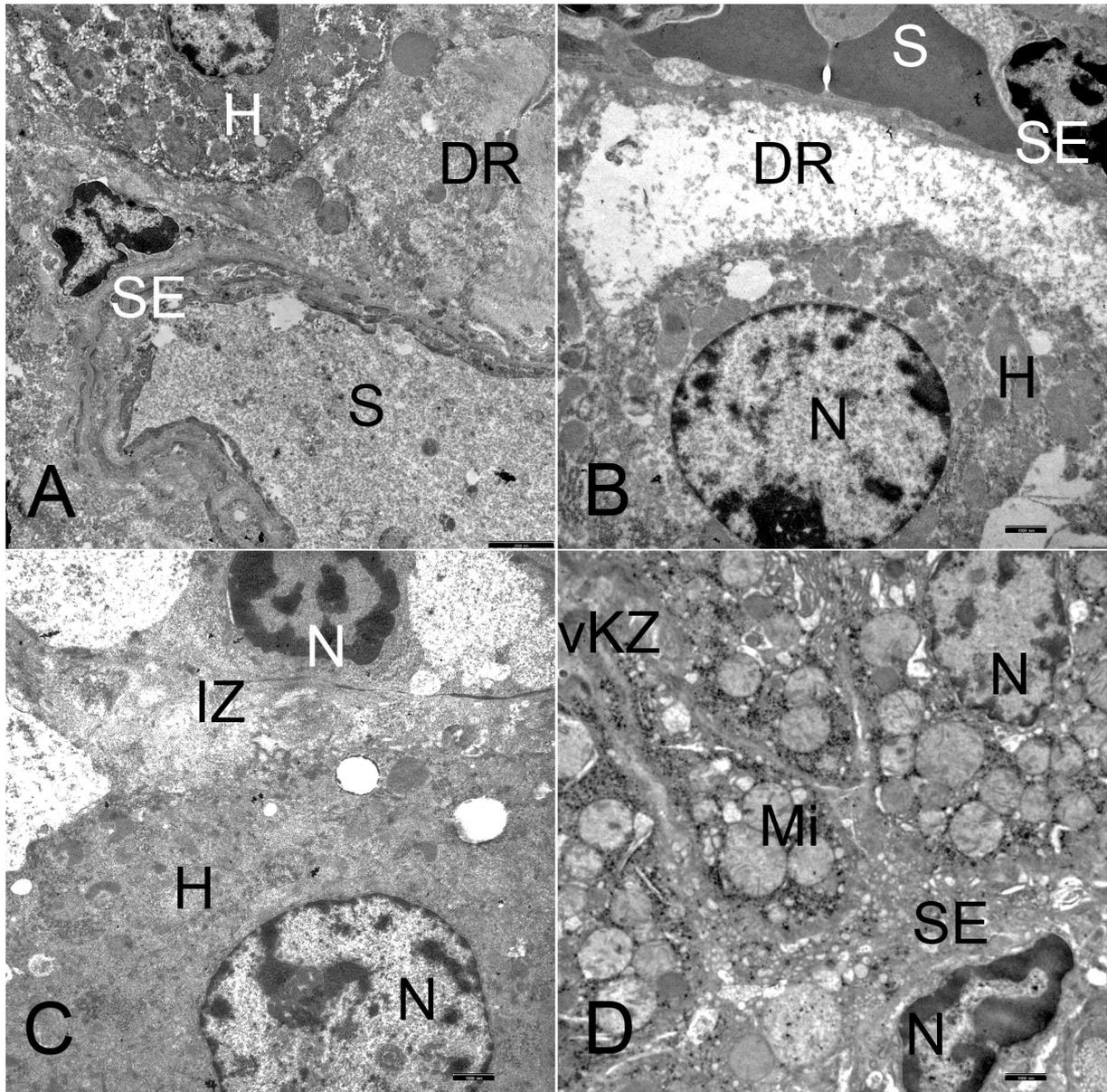


Abb. 15: Bausteine und Architektur des Disse Raums und Sinusoidlumens

(A): Leber Rind, EM. Endothelzellfortsatz und Hepatozytenmembran als Grenzen des Disse Raums. (B): Leber Rind, EM. Spuren von Kollagenfibrillen und Mikrofilamenten, sowie amorphes Material als azelluläre Bestandteile des Disse Raums. Amorphes Material auch im Sinusoidlumen. (C): Leber Rind, EM. Ito-Zelle als zellulärer Inhalt des Disse Raums. (D): Leber Rind, EM. Ausschnitt aus einer amöboid, entlang des Sinusoidendothels wandernden von Kupffer-Zelle.

H: Hepatozyt; SE: Sinusoidendothelzelle; IZ: Ito-Zelle; vKZ: von Kupffer-Zelle; DR: Disse Raum; S: Sinusoid; N: Nukleus; Nu: Nukleolus; Mi: Mitochondrium; SB(A) =2500nm; SB(B, C, D) = 1000nm

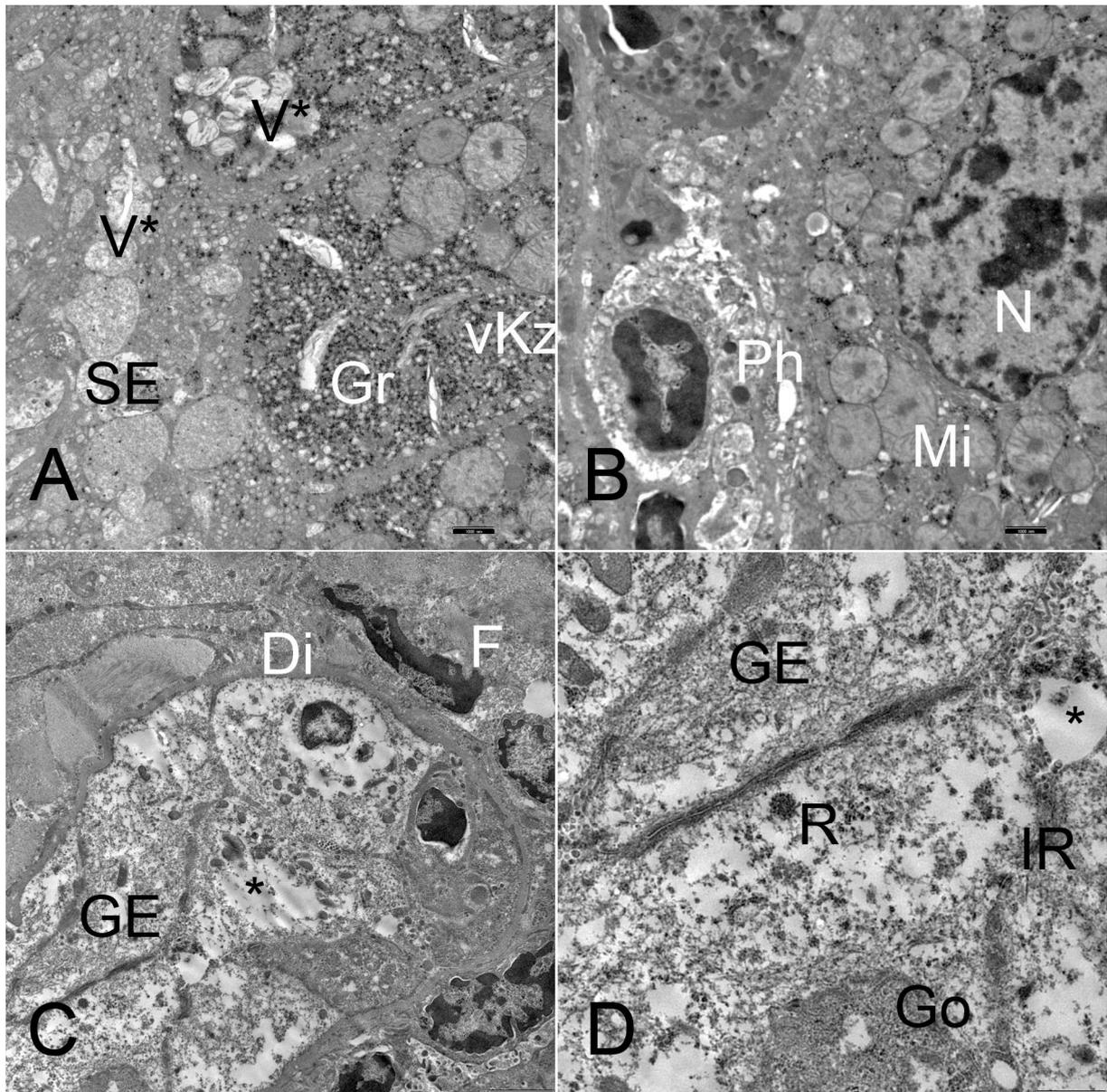


Abb. 16: von Kupfer-Zelle und Gallengangsepithelzelle

(A): Leber Rind, EM. Ausschnitt aus einer von Kupfer-Zelle: Zahlreiche Granula und diverse Vesikel als die, die Zelle dominierende Organellen. (B): Leber Rind, EM. Ausschnitt aus einer von Kupfer-Zelle: Organellen des Phagozytoseprozesses. (C): Leber Rind, EM. Querschnitt durch einen Ductus interlobularis bilifer. (D): Leber Rind, EM. Ausschnitt aus einer Gallengangsepithelzelle.

H: Hepatozyt; GE: Gallengangsepithelzelle; SE: Sinusoidendothelzelle; vKZ: von Kupfer-Zelle; Fb: Fibroblast; DR: Disse Raum; S: Sinusoid; Di: Ductus interlobularis bilifer; N: Nukleus; Nu: Nukleolus; Mi: Mitochondrium; Go: Golgi-Apparat; R: Ribosomen; Gr: Granula; Ph: Phagosom; V*: „brizzle-coated“-Mikropinozytosevesikel; IR: Interzellularrraum; *: Gallengangslumen

SB(A, B) = 1000nm; SB(C) = 2500nm; SB(D) = 1500nm

V. DISKUSSION

1. Konventionelle Lichtmikroskopie

Nach ROMEIS (2010b) können mit Hilfe der Alcianblau 8GX Färbung in Abhängigkeit davon, bei welchem pH-Wert sie durchgeführt wird, saure Mucopolysaccharide, die entweder Träger von Carboxyl- und Sulfatgruppen (pH 2,5) oder aber nur von Sulfatgruppen (pH 1,0) sind, nachgewiesen werden. Daher enthält das, sich in der Färbung mit Alcianblau 8GX bei pH 2,5 schwach positiv, bei pH 1,0 negativ verhaltende Bindegewebe in seinen Proteoglykanen und Glykoproteinen vorwiegend Carboxylgruppen aber kaum Sulfatgruppen. In der deutlich positiv reagierenden, arteriellen Intima liegen die sauren Mucopolysaccharide aufgrund der dichteren Lagerung des Bindegewebes in diesem Abschnitt der Arterienwand (HEES, 2006a) in höherer Konzentration vor. Das Zytoplasma der auch bei pH 1,0 noch schwach positiv reagierenden Mastzellen schließt zusätzlich einige Sulfatgruppen ein. Die Mastzellen treten als freie Bindegewebszellen in nahezu allen Bindegewebsstrukturen des Körpers auf (SCHWENGBERG, 1998). Die beobachtete, bevorzugte Ansiedlung im Bindegewebe der Blutgefäße und um diese herum, entspricht den typischen Eigenschaften dieser Zellen (LIEBICH, 2010b). Die dabei festzustellende, bevorzugte Assoziation mit Venenwänden ist auf den, im Vergleich zu den Arterien wesentlich langsameren, venösen Blutfluß (ENGELHARDT, 2009), der den Mastzellen die Anlagerung an das Endothel und den Übertritt ins Gewebe wesentlich erleichtert, zurückzuführen. Die Lokalisation im, dem Leberparenchym zugewandten Bereich der Glisson-Kapsel ermöglicht den Kontakt der Zellen zu über das Pfortaderblut einströmenden, antigenen, in der Regel pathogenen Substanzen (RIEMANN et al., 2011), was zur Aktivierung und Freisetzung präformierter Mediatoren, darunter auch Interleukin 4 führt (SCHWENGBERG, 1998). Interleukin 4 induziert die IgG und MHC II-Produktion der B- sowie die TH2-Antwort der T-Lymphozyten (SCHWENGBERG, 1998). Insofern leisten die Mastzellen einen Beitrag zum Schutz des Leberparenchyms vor schädigenden Umwelteinflüssen. Die weitaus nicht bei allen Gallengangsquerschnitten, sondern nur bei einigen, bevorzugt sehr kleinen Ductus interlobulares biliferi zu beobachtende, deutlich Alcianblau positive Reaktion des apikalen Teils der Epithelzellen sowie des, von ihnen umgebenen Ganglumens legt nahe, dass die Gallengangsepithelzellen unter bestimmten Bedingungen saure Mucopolysaccharide produzieren und sezernieren. Da diese Syntheseaktivität offensichtlich auf den Anfangsteil des interlobulären Gallengangssystems beschränkt bleibt und die positive Reaktion darüber hinaus nur in noch mit Galle gefüllten Anschnitten zu sehen ist, darf davon ausgegangen

werden, dass es sich bei den sauren Mucopolysacchariden um Beimengungen zur Galleflüssigkeit handelt. Diese Überlegung wird unter anderem dadurch bekräftigt, dass bereits ADLUNG (1968) auf die Existenz einer nicht nur passiven, durch Diffusionsausgleich bedingten, sondern auch einer aktiven, mit sekretorischer Substanzfreisetzung durch die Epithelzellen einhergehende Modifikation der Primärgalle in den Gallengängen verwies. Die sauren Mucopolysaccharide könnten eine, den ebenfalls in der Galle enthaltenen Phospholipiden, sehr ähnliche Funktion übernehmen und dadurch deren Wirkung verstärken. Die in der Galleflüssigkeit enthaltenen Phospholipide erhöhen die Löslichkeit des zur Kristallisation neigenden Cholesterols um ein Vielfaches und beugen so der Bildung von Cholesterolaggregaten und damit letztlich der Entstehung von Gallensteinen vor (HALPERN et al., 1993; RINGEL et al., 1998; GILAT, 2002). Sie werden allerdings unabhängig von der Menge der mit der Nahrung aufgenommenen Phospholipide streng reguliert, nur in sehr begrenztem Umfang in die Galle sezerniert (HALPERN et al., 1993; RINGEL et al., 1998; GILAT, 2002), so dass zur Unterstützung ihrer Wirkung andere Substanzen wie die sauren Mucopolysaccharide durchaus notwendig sein könnten.

Die stark positive Reaktion der Hepatozyten mit dem PAS-Reagenz und ihr völliges Ausbleiben nach Amylasevorbehandlung sind als Beweis für den Einschluss von Glykogen (ROMEIS, 2010b) in den Leberzellen zu deuten. Da stets die, den Zentralvenen unmittelbar benachbarten Läppchenareale am intensivsten gefärbt sind, scheinen die Hepatozyten in diesem Bereich die wichtigsten Glykogenspeicher zu sein. Die Tatsache, dass die Ausdehnung der Glykogenablagerungen in die Peripherie der Läppchen eines Präparats nahezu gleich ist, jedoch von Präparat zu Präparat erhebliche Unterschiede aufweist, veranschaulicht, dass die Glykogenspeicherung, wie von RIEDE und SASSE (1981); UCHIYAMA (1990) dargelegt, kein statischer, sondern ein dynamischer Prozess ist, der von der momentanen Stoffwechselsituation des Tieres abhängt: Steht eine größere Menge an Glukose als gerade nötig zur Verfügung, so wird diese aus dem sinusoidalen Blutstrom in die Hepatozyten aufgenommen und in Glykogen umgewandelt (DOENECKE et al., 2005). Im Falle eines Energiemangels kann dieses wieder zu Glukose, die anschließend der Glykolyse zugeführt wird, gespalten werden. Daher ist die Anlage eines Glykogenspeichers in der zentrolobulären Zone aus physiologischer Sicht auch durchaus sinnvoll: In den Hepatozyten dieses Areals sind die Schlüsselenzyme der Glykolyse, die Hexo- und Glukokinasen (BERG et al., 2007d), deren Aktivität zwar weitgehend sauerstoffunabhängig ist, die aber unbedingt Glukose als Substrat benötigen (SANDEMANN & FUHRMANN, 2009), lokalisiert. Die im

Verlauf der Glykolyse aus der Glukose freigesetzten Energieträger können so sofort in das Zentralvenenblut übertreten und rasch dorthin gelangen, wo sie benötigt werden. Die schlierenartige Anfärbung der Hepatozyten zeigt, dass die Glykogenablagerung auch innerhalb des Zytoplasmas nicht gleichmäßig, sondern in bestimmten Kompartimenten erfolgt (RIEDE & SASSE, 1981). Außerdem bewirkt nach UCHIYAMA (1990) der, durch den circadianen Rhythmus der Glykogenspeicherung hervorgerufene, erstmals bereits vor mehr als 50 Jahren an Kaninchenhepatozyten beobachtete, innerhalb von 24 Stunden stark schwankende Glykogengehalt der Leberzellen, der mit einer korrespondierenden Rhythmik der Aktivität der Enzyme des Glykogenstoffwechsels verbunden ist, einen circadianen Gestaltswandel der Hepatozyten: Mit fortschreitender Glykogeneinlagerung kommt es zu einer zunehmenden Verdrängung der Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien, aus den zentralen Bereichen der Zelle in Richtung Nukleus und Zellpole (RIEDE & SASSE, 1981). Die mit Ausnahme der arteriellen Tunica intima schwach positive Reaktion des hepatischen Bindegewebes, die auch nach Amylasevorbehandlung erhalten bleibt, ist nach ROMEIS (2010b) auf Proteoglykane und Glykoproteine in den Seitenketten der Bindegewebsmoleküle zurückzuführen. Aus dem Vergleich mit dem Färbeverhalten des Bindegewebes bei der Behandlung mit Alcianblau 8GX bei pH 2,5 geht ein identisches Reaktionsmuster hervor, was für ein Vorkommen von Hydroxylgruppen in den Seitenketten der Bindegewebsmoleküle spricht (ROMEIS, 2010b). Da die Farbtintensität in beiden Fällen auf ein sehr geringes Maß beschränkt bleibt, dürften allerdings nur sehr wenige dieser Gruppen vorhanden sein. Lediglich die Tunica intima der Arterien schließt aufgrund der höheren Dichte der Bindegewebsfasern (HEES, 2006a) eine höhere Zahl an Hydroxylgruppen ein und färbt sich somit auch intensiver an.

2. Immunhistochemie

Bei der Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Nachweise ist festzustellen, dass Zytokeratin 5 in den Epithelien der Rinderleber überhaupt nicht und die Zytokeratine 8, 14, 18 und 19 nur in denjenigen der Gallengänge vorzufinden sind. Bei Maus und Ratte verhalten sich im Gegensatz dazu, neben den Gallengangsepithelzellen, zusätzlich die Hepatozyten zumindest CK 8- und 18-positiv (FICKERT et al., 2009) bzw. CK 8-, 18- und 19-positiv (NISHIKAWA et al., 1996), was letztlich dafür spricht, dass das Zytoskelett der Hepatozyten im Speziesvergleich möglicherweise viel individueller als das der Epithelzellen gestaltet ist. Beim Gallengangsepithel handelt es sich um ein, mit einigen Ausnahmen, prinzipiell einschichtiges, isoprismatisches Epithel (HEES, 2006b), das bei den großen Gallengängen jedoch in Abhängigkeit von der Topographie des jeweiligen Gangabschnitts

morphologische Variationen aufweist. So erscheinen die Epithelien der peripheren Ductus interlobulares biliferi wesentlich weniger dicht und kompakt, als die der zentralen. Die Ursache hierfür ist folgender Umstand: Die peripheren großen Gallengänge werden aufgrund ihrer Randlage in den Areae interlobulares bzw. innerhalb der schmalen interlobulären Septen von so wenig geflechtartigem straffen Bindegewebe, das üblicherweise der Stabilisierung und Festigung des Organparenchyms dient (HEES, 2006c) umgeben, dass die Dämpfung der, von den benachbarten Leberzellplatten auf die Gallengangswände ausgehenden Druckkräfte, durch den Gallefluß notwendig ist, um die Gangquerschnitte aufrechterhalten zu können. Nach dem postmortalen Erlöschen des Galleflusses kommt es daher zu einer so starken Kompression der Gangquerschnitte, dass diese vollständig oder teilweise kollabieren und ihre Epithelzellen auseinander gedrängt und sogar vereinzelt werden. Im Gegensatz dazu sind die zentralen Ductus interlobulares biliferi aufgrund ihrer zentrumsnahen Platzierung von einer schützenden und zugleich stabilisierenden Bindegewebsschicht umhüllt und besitzen auch post mortem, (wie auch die kleinen Gallengänge, Ductuli biliferi,) noch ein intaktes einschichtiges, kubisches Epithel.

Nachdem sich von den, innerhalb des Leberläppchens gelegenen Teilen des Gallengangsystems, die zentralen Ductuli biliferi als primär nur CK 8- und die peripheren als nur CK 14-positiv erwiesen haben, ist davon auszugehen, dass sich das Zytoskelett der zentralen und peripheren Ductuli biliferi in ihrer Zusammensetzung deutlich unterscheiden und im Wesentlichen nur ein bestimmtes, für sie charakteristisches Keratinfilament (CK 8 bzw. 14) enthalten. Das intralobuläre Gallengangssystem lässt somit eine klare Gliederung in einen zentral gelegenen, CK 8-positiven und einen peripher lokalisierten, CK 14 positiven Teil erkennen. Das Läppchenparenchym selbst ist im Wesentlichen frei von kleinen, intralobulären Gallengängen. Im extralobulären Abschnitt des Gallengangsystems setzt sich die Beteiligung von primär nur einem, charakteristischen Keratinfilament am Aufbau des Zytoskeletts der Gallengangsepithelzellen zunächst fort: Die zahlreichen, kleinsten Ductus interlobulares biliferi, die unmittelbar entlang der Grenze zu den Lobuli hepatici aufgereiht sind, verhalten sich CK 18-positiv. Sie dienen als Bindeglied zwischen dem intra- und extralobulären Teil des Gallengangsystems, indem sie die, aus dem Läppchen heranziehenden Ductuli biliferi aufnehmen und sich zu den stark CK 18-positiven, im Vergleich zu den sich anschließenden Segmenten des Gallengangsystems etwas kleineren Ductus interlobulares biliferi vereinigen (LIEBICH, 2010b). Die, im Gegensatz zu diesen Verbindungs- und Sammelgängen mit einem Durchmesser von 50 µm geringgradig größeren, zentralen und peripheren Ductus interlobulares biliferi reagieren sowohl beim CK 8-, 14-, 18-

als auch CK 19-Nachweis positiv, was anzeigt, dass sich die Zusammensetzung des Zytoskeletts der Epithelzellen im Zuge des, mit der Zunahme der Gangdurchmesser einhergehenden Übergangs vom iso- zum hochprismatischen Epithel (HEES, 2006b) erneut wandelt. Welches der Zytokeratine jeweils das wichtigste Intermediärfilament in den Epithelien der soeben beschriebenen Abschnitte des Gallengangssystems darstellt, steht in gewissem Zusammenhang mit dessen embryologischer Entwicklung, die neben Wachstumsfaktoren auch von den Zytokeratinen beeinflusst wird (THORGEIRSSON & GRISHAM, 2006). So dominiert gerade CK 8, das während der frühembryonalen Entwicklung als eines der ersten Zytokeratine in einschichtigen Epithelien in Erscheinung tritt (WENDL, 2012), in den als Ursprung des lichtmikroskopisch sichtbaren Teils des Gallengangssystems fungierenden, zentralen Ductuli biliferi. Die Annahme, dass die zentralen Ductuli biliferi tatsächlich den lichtmikroskopisch wahrnehmbaren Anfangsabschnitt des Gallengangssystems darstellen, wird durch folgende, von FAUSTO (2004) gemachte Feststellung bekräftigt: Die Gallengangsepithelzellen leiten sich embryologisch von Hepatoblasten, die unmittelbar neben den Venenvorläufern lokalisiert sind ab. Diese Hepatoblasten dienen ab dem Tag 14 (Maus) beziehungsweise 15 (Ratte) als Ausgangspunkt für die Entstehung von primitiven intrahepatischen Ductuli, die eine Verbindung zwischen Leberparenchym und den sich später entwickelnden größeren Segmenten herstellen. Diese primitiven Ductuli entsprechen in der adulten Leber den Heringkanälchen sowie den, aus ihrer Vereinigung hervorgegangenen Anfangsabschnitten der größeren, lichtmikroskopisch sichtbaren, zentralen Ductuli biliferi. CK 18, ebenfalls eines der ersten Zytokeratine einschichtiger Epithelien (WENDL, 2012), das mit CK 8 Heterodimere bildet (WENDL, 2012), ersetzt dieses in den, die Verbindung zwischen dem intra- und extralobulären Abschnitten des Gallengangssystems herstellenden (LIEBICH, 2010b), kleinen bis durchschnittlich großen Ductus interlobulares biliferi (50-80 µm) zum großen Teil und deutet dadurch an, dass sich die Epithelzellen der Ductus gegenüber denen der Ductuli zu einem gewissen Grad weiterentwickelt haben. Das Überwiegen von CK 19 als sekundärem Zytokeratin einschichtiger Epithelien (WENDL, 2012) und anerkanntem Marker ausdifferenzierter Gallengangsepithelzellen adulter Labornager (NISHIKAWA et al., 1996), in den Ductus interlobulares biliferi besonders großen Durchmessers (100-160 µm) deutet an, dass die zuletzt entstehenden Abschnitte des Gallengangssystems die am weitesten entwickelten sind und das am weitesten ausdifferenzierte Epithel besitzen. CK 14 ist normalerweise nur in den Basalzellen mehrschichtiger Epithelien am Bau des Zytoskeletts beteiligt (WENDL, 2012), wobei der Grad der Expression unmittelbar mit der Pluripotenz der Zellen korreliert (WENDL, 2012). Bei den wenigen anderen Zelltypen, in denen sonst noch

CK 14 nachgewiesen werden konnte, handelt es sich ausnahmslos um Arten mit mindestens bipotentem Potential: So sind auch die Hepatoblasten, von denen sich embryologisch sowohl die Hepatozyten als auch die Gallengangsepithelzellen ableiten, CK 14-positiv (MITAKA et al., 1999). Ferner enthalten nach NISHIKAWA et al. (1996); MITAKA et al. (1999) auch die im Rahmen von schweren Leberverletzungen und Tumormetastasierungen auftretenden, den Gallengangsepithelzellen hinsichtlich Phänotyp und Proteinexpression stark ähnelnden Ovalzellen, die sich ebenfalls bipotent in Gallengangsepithelzellen und Hepatozyten differenzieren können, CK 14. Nicht zuletzt verfügen laut MITAKA et al. (1999) auch die Gallengangsepithelzellen adulter Nagetiere, die nach ihrer Transplantation in andere Lebern, in die Leberzellplatten integriert werden und sich in Hepatozyten umwandeln, über CK 14. Daher deutet die CK 14-Expression durch die bovinen Gallengangsepithelzellen an, dass auch diese bipotentes Potenzial besitzen. Die Tatsache, dass die Epithelzellen der peripheren Ductuli biliferi am stärksten CK 14-positiv reagieren, bekräftigt aufgrund dessen, dass die Ovalzellen nach FAUSTO (2004) ebenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit in der Lappchenperipherie am Übergang vom Leberparenchym zu den Heringkanälchen respektive periphere Ductuli biliferi liegen sollen, die Zugehörigkeit der bovinen Gallengangsepithelzellen zur Gruppe der Zellen mit bipotentem Charakter. Die Lokalisation bipotenter Zellen an dieser Stelle des Lebergewebes ist unter Berücksichtigung folgenden Zusammenhangs in funktioneller Hinsicht durchaus sehr sinnvoll: Der Ersatz untergegangener Hepatozyten erfolgt, unabhängig von der Ursache ihres Verlusts, normalerweise durch die Replikation noch im Gewebe vorhandener, intakter Hepatozyten (FAUSTO, 2004), wobei sich die unter physiologischen Bedingungen ruhenden Hepatozyten bei schweren Verletzungen oder nach Hepatektomie bis zu 70 mal replizieren können (FAUSTO, 2004). Somit ist prinzipiell weder bei der Regeneration noch der Reparation das Mitwirken einer anderen Zellart notwendig. Die Ovalzellen kommen erst dann zum Einsatz, wenn sich die Replikation der Leberzellen im Rahmen chronischer Erkrankungen (Leberzirrhose) oder wiederholter Verletzungen aufgrund von Telomerverkürzung verzögert oder gänzlich blockiert ist (FAUSTO, 2004). Die Ovalzellen transformieren sich zu den nicht vollständig differenzierten „Small Hepatocytes“, auch „Small Hepatocytes Precursor Cells“, (FAUSTO, 2004), die ausgehend von der Peripherie der Lobuli hepatici entlang der Laminae hepatici in Richtung Lappchenzentrum wandern (GRISHAM, 1994) und aufgrund des mit dieser Migration einhergehenden Funktionswandels sowohl periportal als auch zentrolobulär untergegangene Hepatozyten ersetzen (GRISHAM, 1994). Die enge Beziehung der Gallengangsepithelzellen zu Zellen mit bipotentem Potential wird nach FAUSTO (2004) nicht zuletzt auch dadurch unterstrichen, dass sich in dem Gebiet um die Heringkanälchen

beziehungsweise die Anfangsabschnitte der Ductuli biliferi neben den Ovalzellen auch Zwischenformen, die sogenannten „Intrahepatic Ductular Stem Cells“ befinden, die als eine Art Vorläufer der sich dreidimensional, in Form von Gängen anordnenden Ovalzellen fungieren.

Im Gegensatz zu den sich lediglich auf das Gallengangsepithel beschränkenden Zytokeratinen, tritt Vimentin in zahlreichen Strukturen der Rinderleber mit überwiegend deutlich bis stark positiver Reaktion in Erscheinung, was damit zu erklären ist, dass dieses Zytoskelettprotein als klassischer Bestandteil des intrazellulären Gerüstwerks sämtlicher Zellen mesenchymalen Ursprungs (LIEBICH, 2010a) auch in den Bindegewebszellen mit ihrer weiten Verbreitung über nahezu alle Kompartimente des Organs enthalten ist. Darüber hinaus stellt es zudem noch einen Baustein des Zytoskeletts der arteriellen, venösen und sinusoidalen Endothelzellen (LIEBICH, 2010a) dar. Die Beobachtung, dass der Vimentinnachweis am Endothel der Venen wesentlich schwächer als an dem der Arterien und Sinusoide ausfällt, geht hervor, dass die endotheliale Auskleidung der verschiedenen Blutgefäßtypen keinesfalls identisch ist, sondern erhebliche Unterschiede aufweist. Die Vimentin ärmeren Endothelzellen der Venen sind generell wesentlich zarter als die stark vimentinhaltigen der Arterien und die vergleichsweise riesigen Sinusoidendothelzellen präsentieren sich mit (HEES, 2006b) ihren kräftigen, weit verzweigten Ausläufern als Zellen mit morphologisch ganz eigenständigem Erscheinungsbild. Ob und in welchem Ausmaß an der stark positiven Reaktion der Sinusoidwände neben diesen kräftigen Endothelzellen und den, die Sinusoidräume umspannenden, retikulären Fasern (HEES, 2006b), auch die Basalmembran, die nach der Meinung vieler Autoren, wie beispielsweise auch WOOD (1963), SCHLEICHER (1968), GRUBB und JONES (1971), GEMELL und HEATH (1972), SAUER (1980) und WELSCH (2011) beim Rind, wie auch den übrigen Paarhufern, im Vergleich zu allen anderen Wirbeltieren nicht diskontinuierlich, sondern kontinuierlich sein soll, daran beteiligt ist, bleibt unter den lichtmikroskopischen Bedingungen offen. Die erhebliche Breite der positiv gefärbten Kapillarwände schließt eine Beteiligung zumindest nicht ganz aus und spricht, falls diese Annahme zutreffen sollte, auch eher für die Kontinuität der Basalmembran. In der arteriellen Intima ist, im Gegensatz zu den Kapillarwänden, schon makroskopisch ersichtlich, dass sie nicht allein durch die Endothelzellen, sondern vor allem auch durch die dicht gedrängten Bindegewebsfasern und Fibroblasten (HEES, 2006a) zu einem der Vimentin reichsten Komponenten des Lebergewebes gemacht wird. Auch beim zweiten, stark vimentinhaltigen Element, der Bindegewebsschicht der Ductus interlobulares biliferi, sind die zahlreichen Fasern besonders dicht aneinandergelagert (HEES, 2006a).

3. Glykohistochemie

Das Bindungsverhalten der Lektine soll zur Wahrung des Überblicks zunächst vergleichend zwischen den Vertretern derselben Gruppe diskutiert werden.

Bei den Glukose und Mannose-spezifischen Lektinen, kann zwischen Con A mit seiner schwerpunktmäßigen Affinität zum Zytoplasma der Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen einerseits und LCA und PSA mit ihrer ausschließlich auf die Bindegewebskomponenten der Leber sowie das Sinusoidendothel beschränkten Anheftungsneigung andererseits, unterschieden werden. Nachdem LCA in erster Linie an Mannosereste von Oligosacchariden, die an ihrem N-Acetylglucosaminern ein Fukoserest in α -2,6-glykosidischer Bindung aufweisen, bindet (ROTH, 2011) und die Reaktion des hepatischen Bindegewebes mit LCA wesentlich stärker ausfällt als zwischen diesem und PSA, ist davon auszugehen, dass es sich bei den Oligosaccharidketten der Bindegewebszellen- und -fasern hauptsächlich um solche handelt, die am N-Acetylglucosaminern über ein Fukosemolekül mit einem mannosehaltigen Glykan verknüpft ist. Daneben treten im Bindegewebe in erheblich geringerem Umfang Zuckerketten mit PSA bindenden Glukose- und/oder Mannoseresten auf. Auch Con A geht nur an den kräftigsten Abschnitten des Bindegewebes, sprich dort, wo Kohlenhydratketten und damit mögliche Bindungsstellen generell in höherer Konzentration vorliegen, eine Bindung mit Glukose und/oder Mannosemolekülen ein. Die Feststellung, dass lediglich das Endothel der Sinusoide, nicht aber das der Arterien und Venen mit PSA reagiert, bekräftigt den bereits beim Vimentinnachweis gewonnenen Befund, dass die arteriellen, venösen und sinusoidalen Endothelzellen nicht nach einem identischen, sondern einem unterschiedlichen Konzept aufgebaut sind. So weisen sie nicht nur hinsichtlich ihres Vimentingehalts und ihrer Morphologie, sondern auch im Bezug des Gehalts von Zuckerstrukturen Differenzen auf: Offensichtlich sind nur die Kohlenhydratstrukturen des Sinusoidendothels, nicht aber dasjenige der Arterien und Venen im Besitz von Zuckerketten, deren N-Acetylglucosaminern über ein Fukosemolekül in α -2,6 glykosidischer Bindung ein Mannose haltiges Glycan trägt (LCA-positiv, (ROTH, 2011)), sowie zusätzlich noch von Glukose und/oder Mannosemolekülen, die von PSA gebunden werden können. Nachdem Con A nur mit dem Zytoplasma der Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen, aber sonst keiner anderen der, in der Rinderleber vorkommenden Zellarten reagiert, scheint das Zytoplasma dieser beiden Zelltypen besonders viele Glykoproteine einzuschließen, was nicht weiter verwunderlich ist, wenn man bedenkt, dass die Hepatozyten der Hauptsyntheseort der meisten Proteine sind (SANDEMANN & FUHRMANN, 2009) und die Gallengangsepithelzellen

saure Mucopolysaccharide sezernieren (siehe Diskussion konventionelle Lichtmikroskopie).

Die Beobachtung, dass von den getesteten, Galaktose-spezifischen Lektinen PNA, RCA, VAA, SBA und SNA lediglich VAA dazu in der Lage ist, eine positive Reaktion auszulösen, die noch dazu nur das Arterienendothel (deutlich VAA-positiv) und in geringem Umfang noch das Venenendothel (schwach VAA-positiv) erfasst, einzugehen, impliziert ein äußerst geringes Vorkommen von Galaktose-haltigen Glykanen im Lebergewebe. Ferner scheint es eine charakteristische Eigenschaft der hepatischen Arterien und Venen zu sein, Glykane mit Galaktosemolekülen zu tragen. Die Galaktosemoleküle könnten Bestandteil von Proteoglykanen sein, da die, für Endothelzellen typischen Zelloberflächenproteoglykane, die erste Familie der Syndecane (BUDDECKE, 2009), mit Heparan Sulfat, dessen sich vielfach repetierende Disaccharideinheiten neben N-Acetylglucosamin Galaktose einschließen (BUDDECKE, 2009), ausgestattet sind.

WGA und WGAs binden an Tetrasaccharide mit N-Acetylglucosaminmolekülen (ROTH, 2011). Aus den Reaktionsmustern der beiden Lektine ergibt sich daher ein relativ umfangreiches, Vorkommen von N-Acetylglucosamin in den Bindegewebssepten des Interstitiums, dem Plasmalemm und dem Golgi-Apparat der Hepatozyten sowie dem Arterien-, Sinusoid und in geringem Umfang auch dem Venenendothel, vor allem aber dem hochprismatischen Gallengangsepithel an. Das vielfältige Vorkommen von N-Acetylglucosamin in der Leber ist angesichts dessen nahezu ubiquitären Auftretens in der Natur (RÜDIGER & GABIUS, 2009) nicht überraschend. Die N-Acetylglucosamin einschließenden Strukturen des Lebergewebes scheinen eine relativ hohe Basizität zu besitzen, da ihre Reaktion mit WGA in nahezu allen Fällen mit einer um ein bis zwei Stufen höheren Intensität als mit WGAs ausfällt und der Isoelektrische Punkt von WGA deutlich weiter im Basischen liegt als der von WGAs (ROTH, 2011). Trotz der weiten, unselektiven Verbreitung von N-Acetylglykosaminglykanen ermöglicht WGA in Kombination mit WGAs eine weitere Vertiefung der Charakterisierung der Endothelien: Arterielle und sinusoidale Endothelzellen verfügen zwar beide über eine gewisse Menge an N-Acetylglucosaminglykanen (beide deutlich WGA-positiv), aber die sinusoidalen sind deutlich basischer (WGAs-negativ) als die arteriellen (WGAs positiv). Demgegenüber zeichnet sich das nur in ungefähr einem Drittel aller Fälle schwach WGA-positiv reagierende Venenendothel als kaum N-Acetylglucosaminhaltig aus. Das Fehlen von Fluoreszenz bei ca. 70% der Venen unabhängig von Größe und Lokalisation könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese noch mit Blutresten, die die Interaktion zwischen Zuckerketten und Lektinen behindern, gefüllt sind. Die Beobachtung, dass das Epithel der Gallengänge umso stärker

WGA-positiv reagiert, je größer die Ductus und damit umso zylindrischer die Epithelzellen sind (HEES, 2006b), impliziert, dass deren Zuckerketten beim Übergang vom iso- zum hochprismatischen Epithel einen Wandel in der Zusammensetzung ihrer Zuckerketten erfahren und daran unter anderem auch der Einbau von mehr N-Acetylglucosaminglykanen beteiligt ist.

Nachdem von den untersuchten N-Acetylgalaktosamin-spezifischen Lektinen GSL-1, DBA, SBA, SJA und SNA nur GSL-1 eine Bindung, die allerdings nur auf das Arterienendothel beschränkt ist, zeigt, ist davon auszugehen, dass N-Acetylgalaktosamin in noch geringerem Umfang als Galaktose in der Leber verbreitet ist. Der Besitz von Zuckerketten mit N-Acetylgalaktosamin ist als ein sehr spezifisches Merkmal der arteriellen Endothelzellen anzusehen.

Anhand des Reaktionsmusters der spezifisch an Oligosaccharide bindenden Lektine PHA-E und L kann die Typisierung sowohl der Endothelien als auch des Gallengangsepithels fortgesetzt werden: Wiederholt erweisen sich die Endothelien der Arterien und Sinusoide gegenüber denjenigen der Venen als wesentlich stärkerer Träger von Kohlenhydratketten. Trotz dieser Gemeinsamkeit bewahren beide Strukturen, dadurch dass, das Arterienendothel wesentlich mehr PHA-L als PHA-E spezifische Oligosaccharide (deutlich stärker PHA-L als PHA-E positiv), das Sinusoidendothel hingegen nur PHA-E spezifische Oligosaccharide (nur PHA-E positiv) besitzt, ihren eigenständigen Charakter. Am Gallengangsepithel wird erneut die, mit dem Übergang vom iso- zum hochprismatischen Epithel einhergehende, durch den Einbau weiterer Kohlenhydratmoleküle - in diesem Fall Oligosaccharide- gekennzeichnete, Weiterdifferenzierung der Glykokalix nachvollziehbar. Ein typisches Merkmal der Lymphozyten, das sie mit keiner anderen der in der Rinderleber auftretenden Zellarten teilen, ist das umfangreiche Vorkommen von, für PHA-L spezifischen Oligosacchariden in den Glykanen insbesondere der zytoplasmatischen Granula aber auch dem Zytoplasma selbst.

Abschließend stellen sich die Endothelzellen, vor allem der Arterien und Sinusoide als die Träger der meisten, verschiedenartig gestalteten Glykane dar. Einen wesentlichen Beitrag zu diesem umfangreichen Spektrum dürften sowohl die, für die Endothelzellen typischen Zelloberflächenproteoglykane, die erste Familie der Syndecane (BUDDECKE, 2009), als auch die, in der Basalmembran befindlichen Proteoglykane leisten: Die Syndecane schließen in ihren Heparan Sulfaten neben den repetierenden N-Acetylglucosamin-Galaktose-Dissaccharideinheiten N-Acetylgalaktosamin, Mannose, Xylose und acetylierte Glukose ein

(BUDDECKE, 2009). Perlecan, das wichtigste Proteoglycan der Basalmembran, verfügt an seiner ersten Domäne über drei Bindungsstellen für Heparan-Sulfate, und an den übrigen vier Domänen über 38 weitere, mögliche Bindungsstellen für Glykosaminoglykane (BUDDECKE, 2009). Die umfangreiche Ausstattung der Endothelzellen mit Glykanen lässt sich mit Blick auf Funktion und Aufgaben dieser Zellen durch mehrere Ursachen erklären: Die Endothelzellen sind, neben den glatten Muskelzellen, die wichtigsten Produzenten von Glykosaminoglykanen und anderen Bindegewebskomponenten der Basalmembran (MARAGOUDAKIS, 1989). Besonders deutlich geht dies aus einer Studie von SRIKRISHNA et al. (2001), die aus Endothelzell-Kulturen, die ursprünglich von einerseits bovinen und andererseits humanen Aorten stammten, einander sehr ähnliche, heparinsulfathaltige Proteoglykane unterschiedlicher Länge und Dichte isolierten, wobei kleinere Proteoglykane höherer Dichte in der Zellschicht verblieben und für den Kontakt zwischen den Zellen sorgten, während umfangreichere, niedrigerer Dichte in die, einer Basalmembran gleichenden Matrix unterhalb der Zellschicht sezerniert wurden und der Aufrechterhaltung und Stabilität des Gewebeverbandes dienten. Zudem konnten sie beobachten, dass eine morphologische Veränderung der Endothelzellen mit einer Veränderung der Proteoglykansynthese, hin zu einer geringeren Zahl großer, aber dafür einer höheren an kleinen Proteoglykanen einherging, was in Erwägung ziehen lässt, dass die phänotypische Erscheinung der Endothelzellen auf gewisse Weise durch die Proteoglykane gesteuert wird. Für die Adhäsion zwischen den Zellen sorgen unter anderem auch sulfatierte Proteoglykane mit Affinität zu Pecam-1-Rezeptoren (CINES et al., 1998). Wie CINES et al. (1998) detailliert ausführen, sind die Endothelzellen außerdem in erheblichem Ausmaß an physiologischen und pathologischen Koagulations- und Antikoagulationsprozessen beteiligt: Zu diesem Zweck verfügen die Endothelzellen unter anderem über mehrere verschiedene Rezeptoren für Fibrin und Fibrinolyseprodukte, worunter sich laut CINES et al. (1998) neben einer Gewebstransglutaminase und einem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auch ein 130-kDa-Glykoprotein befindet. In Zellkultur sind Endothelzellen darüber hinaus noch mit dem Glykoprotein GPIIb/IIIa ausgestattet. Generell sind auf der Oberfläche des Arterienendothels weit mehr Fibrinablagerungen und -spaltprodukte anzutreffen als auf dem venösen CINES et al. (1998), was für eine höhere Rezeptordichte auf dem Arterienendothel spricht. Das damit einhergehende, deutlich ausgeprägtere Vorkommen auch von Glykoproteinen erklärt die im Vergleich zum Venenendothel wesentlich höhere Lektinbindungsbereitschaft des Arterienendothels. Nach SRIKRISHNA et al. (2001) ist die Erkennung, der auf der Oberfläche von Endothelzellen sitzenden Glykane durch Selektine, Integrine, Galektine und andere Lektine außerdem eine marginale Voraussetzung für die Aktivierung von

Gedächtniszellen durch Antigenpräsentation sowie die Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen von Prozessen der Immunologie und des Entzündungsgeschehens. So ist beispielsweise für die Extravasation aktivierter, neutrophiler Granulozyten die Anwesenheit carboxylierter N-Glykane auf der Endothelzelloberfläche notwendig. Die im Rahmen von Regenerations- und Reparatursprozessen ablaufende Angiogenese stellt aufgrund der folgenden, von CINES et al. (1998) ausgeführten Zusammenhänge ein weiteres, pathophysiologisches Phänomen dar, an dem die Glykane der Endothelzellen entscheidend mitwirken. Dabei spielt insbesondere die Wechselwirkung zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix eine Rolle. Vermittelt wird diese durch die Bindung von Proteinen, insbesondere Integrinen, an, auf bestimmten Positionen der Zelloberfläche sitzenden Proteoglykanen, wodurch die Organisation des Zytoskeletts so manipuliert wird, dass zum einen die Eigenbeweglichkeit der Zelle gefördert und zum anderen die Stabilität des Gewebes erhöht wird. Darüber hinaus kommt es durch die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, die entweder die Replikation der Zellen oder aber den programmierten Zelltod nach sich ziehen. Da an diesem Geschehen nicht nur ein einziges, sondern eine Vielzahl verschiedener Integrine beteiligt sind, ist auch eine ausreichende Menge different gestalteter Glykane als spezifische Liganden erforderlich.

Die Beobachtung, dass sich auch die Reaktionsmuster der, im Vergleich zu den Venen wesentlich reaktiveren Arterien und Sinusoide unterscheiden, dient als Indikator dafür, dass diesen beiden Abschnitte des Gefäßsystems jeweils verschiedene Aufgaben bevorzugt wahrnehmen. Beispielsweise finden sich nur auf der Oberfläche des Arterienendothels Glykane die als Liganden für HDL, LDL und VLDL (SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1989) wirken, während Ovalbumin in erster Linie nur vom Sinusoidendothel (CINES et al., 1998) absorbiert wird. Ferner zeigen die Sinusoidendothelzellen insbesondere im Rahmen des Fettstoffwechsels eine starke, Rezeptor-vermittelte Endozytoseaktivität (HORIUCHI et al., 1988). Darüber hinaus weisen CINES et al. (1998) mit Blick auf Wachstumsgeschwindigkeit, Kapillarbettbildung, Ausstattung mit Lymphozytenrezeptoren und andere Eigenschaften auf die generelle Verschiedenartigkeit der Endothelzellen der Mikro- und Makrozirkulation hin. Außerdem ist ihrer Meinung nach eine allgemeine Heterogenität der Endothelzellen, die sich neben Unterschieden bei der Proteinexpression und dem Gehalt intrazellulärer Enzyme, auch in solchen der phänotypischen Erscheinung der Zelloberfläche ausdrückt, zu berücksichtigen. Zudem bestehen diese Unterschiede ihrer Beobachtung nach nicht nur zwischen den Gefäßen in den verschiedenen Organen und Geweben desselben Organismus, sondern auch zwischen den verschiedenen Gefäßarten im selben Organ oder Gewebe und sogar noch zwischen den

einzelnen Abschnitten desselben Gefäßtyps im selben Organ. Beispielsweise besitzen in der Leber des Menschen die Sinusoide der periportalen Zone Pecam-1- und CD 34-Rezeptoren, die der zentrolobulären nicht (CINES et al., 1998). Ein weiteres Beispiel dafür, dass die einzelnen Gefäßarten aufgrund der, zwischen ihnen im Bezug auf die Gestaltung der Endotheloberfläche bestehenden Differenzen unterschiedlich gut für die Erfüllung verschiedener Funktionen eignen, liefert folgende Beobachtung: Das Arterienendothel ermöglicht hauptsächlich den Thrombozyten mit ihrer Affinität zu Bereichen mit großen Scherkräften die Anheftung (CINES et al., 1998), während das Venenendothel, insbesondere der postkapillären Gefäße, vor allem der Anlagerung der Leukozyten mit ihrer Präferenz für Abschnitte mit niedrigen Scherkräften (CINES et al., 1998) dient.

Neben den Endothelzellen verfügen auch die Hepatozyten über eine Vielzahl von Glykoproteinen mit einem relativ breiten Spektrum an verschiedenartig konfigurierten Glykanen, wobei diese nicht nur Bestandteil der Glykokalix sind, sondern sich auch in den Golgi-Apparaten und Con A-positive Zuckerreste darüber hinaus in großen Mengen frei im Zytoplasma finden. Die Glykokalix sorgt nach dem Prinzip der Liganden-Rezeptor-vermittelten Erkennung (GABIUS & GABIUS, 1992) für die Bindung von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren, Mediatoren, Hormonen und anderen im Blut zirkulierenden Stoffen (KOLLER, 1994), die nach ihrer Aufnahme als Substrat oder Regulator für die zahlreichen im Hepatozyten ablaufenden Stoffwechselprozesse dienen. Im Golgi-Apparat, als den für die Glykolisierung von Glykoproteinen und -lipiden sowie lysosomalen Enzymen und Proteoglykanen verantwortlichem Zellorganell (BERG et al., 2007e), sammeln sich die bereits einige Kohlenhydratstrukturen tragenden Vorläufer der soeben genannten Makromoleküle (SOROKA & GIST FARQUHAR, 1991)(SOROKA & GIST FARQUHAR, 1991) an. Im Zuge der posttranslationalen Modifikation werden von den bereits bestehenden Seitenketten Zuckerreste abgespalten und dafür andere angehängt (BERG et al., 2007e). Die mit der Anhäufung der Makromolekülvorläufer sowie der von diesen abgespaltenen beziehungsweise an diese neu angehängten Kohlenhydratstrukturen einhergehende, hohe Konzentration von Glykanen in den Golgi-Apparaten führt dazu, dass diese von allen Organellen des Hepatozyten die höchste Lektinbindungsbereitschaft aufweisen. Die Glykane ermöglichen durch Rezeptor-Liganden-vermittelte Erkennung und nachgeschaltete Signalkaskaden (GABIUS & GABIUS, 1992), dass die Glykoproteine, Glykolipide, Proteoglykane und lysosomalen Enzyme ihren endgültigen intra- oder auch extrazellulär gelegenen Zielort erreichen (BERG et al., 2007e). Die Glykane, die bei lysosomalen Enzymen sowie zum Export vorgesehenen Proteoglykanen, Glykoproteinen und -lipiden diese

„Adressfunktion“ (BERG et al., 2007e) übernehmen, schließen viele Mannosemoleküle ein. Da Con A mit hoher Affinität an über Asparaginsäure gebundene Oligosaccharide, die zahlreiche Mannosemoleküle entweder in Form zweier Antennen, oder eines Hybridkomplexes tragen, bindet (NAKAGAWA et al., 2006), dürfte es sich bei den in großen Mengen frei im Zytoplasma liegenden, mit stark Con A-positiven Glykanen besetzten Makromolekülen neben lysosomalen Enzymen überwiegend um den zum Export vorgesehenen Teil der vom Hepatozyten synthetisierten Glykoproteine und -lipide sowie Proteoglykane handeln. NAKAGAWA et al. (2006) äußern darüber hinaus die Vermutung, dass die Glykane in polaren Zellen, wie den Hepatozyten auch eine gewisse Signalfunktion dafür haben, ob die Glykoproteine über die apikale Membran in die Galle, oder über die basolaterale ins Blut sezerniert werden sollen. Es besteht, laut NAKAGAWA et al. (2006) der Verdacht, dass für die Ausschleusung über die apikale Membran N-Glykane verantwortlich sind, da sie beobachten konnten, dass diverse Glykoproteine nach dem Verlust der N-Glykane nicht mehr, oder nur in wesentlich geringerem Umfang, in der Galle erscheinen, während die Übertragung von N-Glykanen auf Glykoproteine zu deren Anreicherung in der Galle führt. Zudem konnte festgestellt werden, dass ein und dasselbe Glykoprotein sowohl im Serum, als auch in der Galle auftritt, wobei jedoch die N-Glykane der, in der Galle zirkulierenden Glykoproteine gegenüber denjenigen im Serum, deutlich anders glykolisiert sind. So sind die N-Glykane des in der humanen Galle enthaltenen α 1-Antitrypsins, α 1-Sauren Glykoproteins und des Haptoglobins wesentlich stärker als die, der in das Serum sezernierten, glykolisiert (NAKAGAWA et al., 2006). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Fukosylierung der N-Glykane als Signal für den Export des Glykoproteins in die Galle wirkt. Das Vorkommen derartiger, fukosylierter N-Glykane auch auf den, in der Galle des Rindes enthaltenen Glykoproteinen ist nicht auszuschließen, da die humanen N-Glykane trotz Fukosylierung genauso wie die bovinen Glykoproteine, UEA negativ reagieren, dafür aber hohe Affinität zu AAL und AOL zeigen (NAKAGAWA et al., 2006), was nahelegt, dass die Fukosereste nicht α -1-2, sondern α -1-3 oder α -1-6 glykosidisch gebunden sind (NAKAGAWA et al., 2006). Die Bindungsbereitschaft boviner Glykane für AAL und AOL konnte nicht getestet werden.

Wie bei Hepatozyten sind bei den Gallengangsepithelzellen ebenfalls die Glykane nicht nur als Bestandteil der Glykokalix, sondern auch frei im Zytoplasma präsent. Die Glykokalix dürfte wohl wesentlich an der, zu Beginn des Galleabflusses erfolgenden Modifikation der Primär- zur Sekundärgalle (ADLUNG, 1968) beteiligt sein: Durch Rezeptor-Ligandenvermittelte Erkennung (GABIUS & GABIUS, 1992) selektiert sie in der Primärgalle enthaltene Stoffe, die durch passiven Diffusionsausgleich und aktive

Rückresorptionsmechanismen (ADLUNG, 1968) von den Gallengangsepithelzellen aufgenommen werden. Die Beobachtung, dass auch im Zytoplasma der Gallengangsepithelzellen stark Con A-positive und damit Mannose reiche Glykane (NAKAGAWA et al., 2006) auftreten, legt die Vermutung nahe, dass auch die Gallengangsepithelzellen neben lysosomalen Enzymen zum Export vorgesehene Glykoproteine und -lipide sowie Proteoglykane produzieren, die aufgrund der „Adressfunktion“ ihrer Glykane (BERG et al., 2007e) über die apikale Membran in die Galle ausgeschleust werden. Da es sich bei diesen Makromolekülen nahe liegender Weise um die, bereits in der Färbung mit Alcianblau 8GX nachgewiesenen, sauren Mucopolysaccharide handelt, wird die Überlegung, dass die sauren Mucopolysaccharide von den Gallengangsepithelzellen produziert und als Gallebeimengungen sezerniert werden, weiter bestätigt. Nicht zuletzt produzieren die Gallengangsepithelzellen genauso wie die Hepatozyten einer bestimmten Gruppe zugehöriger, heparinsulfathaltiger Proteoglykane, die nach ihrer Ausschleusung aus der Zelle als Bestandteil der Basalmembran und der extrazellulären Matrix dienen (SOROKA & GIST FARQUHAR, 1991).

4. Elektronenmikroskopie

Hepatozyt

Die Hepatozyten des Rindes erfüllen aufgrund ihres polygonalen Grundrisses zwar einerseits die morphologischen Kriterien einer klassischen Leberzelle (WELSCH, 2011), unterscheiden sich aber andererseits durch ihre in der Regel sechs Ecken von den nur vier Ecken aufweisenden Zellen der Maus (KOLLER, 1994; JASTROW, 2001), der Ratte (KOLLER, 1994; JASTROW, 2001) und des Menschen (KOLLER, 1994; JASTROW, 2001). Die Hepatozyten sehen allerdings oft, innerhalb eines kleinen, nur den Umfang eines Schnitts umfassenden Bereichs sehr variabel gestaltet aus. Dies wird nach COSSEL (1964a) zum einen durch die, in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffwechsellage veränderlichen Funktionszustände des Hepatozyten, aber zum anderen auch durch die unterschiedlichen Bedingungen, unter denen das Präparat hergestellt wurde, das heißt Art und Zeitpunkt der Gewebeentnahme, Fixierungsverfahren und Schnittebene verursacht. Gegensatz zur Leber des Menschen, bei der in einem Bezirk, der neun Hepatozyten umfasst, in fünf der Leberzellen ein, in einer zwei und in drei kein Kernanschnitt beobachtet werden kann (COSSEL, 1964a), ist beim Rind ausnahmslos in jedem Hepatozyten ein Kernanschnitt zu sehen. Die überwiegend glatt verlaufende Kernmembran des Hepatozyten zeigt gelegentlich einige, wellige Einkerbungen, was laut COSSEL (1964a) als Ausdruck eines hoch aktivierten

Funktionszustands des Hepatozyten anzusehen ist. Die im bovinen Hepatozytenkern häufig sichtbare Zusammenlagerung des Heterochromatins zu zwei großen, knäulartigen Strukturen dürfte das morphologische Äquivalent einer Diploidie des Kerns sein, da auch KACHI (1994) an humanen, diploiden Hepatozytenkernen regelmäßig die Zusammenballung von Heterochromatin zu zwei großen, durch einen DNA-Strang verbundenen, kompakten, knäulartigen Ansammlungen beobachtete. Die Tatsache, dass der perinukleäre Raum nur in einigen Fällen sichtbar wird, soll nach COSSEL (1964a) ebenfalls stoffwechselbedingt sein, wobei eine kräftige Entwicklung auf einen intensiven Stoffaustausch zwischen dem Kanälchensystem des rauen Endoplasmatischen Retikulums und dem perinukleären Raum hinweist (COSSEL, 1964a). Nicht zuletzt stellen neben Heterochromatin die Nukleoli einen konstanten Bestandteil des Hepatozytenkerns dar. So können oft, im Gegensatz zum Menschen nicht nur ein oder zwei (COSSEL, 1964a), sondern bis zu vier oder fünf Nukleoli pro Kern beobachtet werden. Hinsichtlich ihrer bevorzugt exzentrischen Lagerung stimmen sie mit anderen, bisher untersuchten Tierarten (JASTROW, 2001) überein.

Der beim Rind im Vergleich zur Maus (JASTROW, 2001), Ratte (JASTROW, 2001), Affe (JASTROW, 2001) und Pferd (KOLLER, 1994), augenscheinlich sehr spärliche Mikrovillibesatz der bovinen Hepatozyten hat verschiedene Ursachen: Nicht auszuschließen ist, dass ein Teil der Mikrovilli bei der Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie zerstört worden ist. Außerdem ist die Zahl der Mikrovilli vom funktionellen Zustand des Hepatozyten abhängig (COSSEL, 1964a). Darüber hinaus schwankt die Dichte des Mikrovillibesatzes innerhalb einer Leber generell von Bereich zu Bereich (COSSEL, 1964a). Ferner erschwert die nicht selten gewundene, schräge oder zum Plasmalemm direkt parallele Anordnung der Mikrovilli (COSSEL, 1964a) ihren Nachweis. Die bevorzugte Lage der Mitochondrien entlang der sinusoidalen Zellmembran sowie in der unmittelbaren Nachbarschaft des Kerns, wird nicht nur im Hepatozyten des Rindes, sondern auch bei den übrigen, bisher untersuchten Tierarten (COSSEL, 1964a; JASTROW, 2001) sowie beim Menschen (COSSEL, 1964a; JASTROW, 2001) beobachtet. Sie lässt sich damit erklären, dass sich die Mitochondrien als Energieproduzenten der Zelle (BERG et al., 2007b) bevorzugt in den Arealen anordnen, die wie der Nukleus und die, nahezu den gesamten Stoffaustausch organisierende, sinusoidale Zone, aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität einen besonders großen Energiebedarf haben (SINOWATZ, 2006). Die variable Größe und Form der Mitochondrien wird ebenfalls nicht bloß beim Rind, sondern generell bei den Hepatozyten aller Säugetiere festgestellt (COSSEL, 1964a). Die Begründung für diese sehr variable Gestaltung besteht zum einen darin, dass die Mitochondrien verschiedene,

morphologisch differente Aktivitätszustände einnehmen können, wobei eine Aktivitätssteigerung mit einer Größenzunahme einhergeht (COSSEL, 1964a) und zum anderen darin, dass die Mitochondrien in unterschiedlicher Höhe von der Schnittebene getroffen werden (COSSEL, 1964a). Wie bei den Hepatozyten anderer Spezies (JASTROW, 2001), erscheinen die Mitochondrien der bovinen Hepatozyten sehr elektronendicht, was von COSSEL (1964a) auf die hohe Dichte der Mitochondrienmatrix zurückgeführt wurde. Diese kommt dadurch zu Stande, dass in der mitochondrialen Grundsubstanz in hohen Konzentrationen die Substrate, die an der inneren Mitochondrienmembran sowie in der Matrix selbst lokalisierten Enzymsysteme eingelagert sind (BERG et al., 2007b). Nicht zuletzt ist auch das geringe Auftreten von Cristae bei allen bisher untersuchten Arten, einschließlich des Menschen, beobachtet worden (COSSEL, 1964a). Die zumeist auffallend großen, verschiedenartig gestalteten, entweder elektronenoptisch leeren oder nur wenig, mäßig dichtes Material beinhaltenden Vakuolen wurden in gleichartiger Ausprägung in menschlichen Leberzellen gefunden und als Fetttropfen, deren Neutralfette technisch bedingt verloren gegangen sind, interpretiert (COSSEL, 1964a). Nach COSSEL (1964a) kommt es in Abhängigkeit von der Verweildauer des Gewebes in der Fixierungslösung und im Alkohol, sowie dessen Konzentration, entweder zur Herauslösung der stark osmiophilen Neutralfette aus dem Gewebe oder aber zu einer mehr oder weniger starken Schrumpfung, sodass nur noch geringe, mäßig dichte Reste in den Vakuolen übrig bleiben. Das Erscheinungsbild der Zelle insgesamt wird von dem stark schwankenden Ausmaß der Glykogenablagerungen und damit letztlich von der aktuellen Stoffwechselsituation geprägt (RIEDE & SASSE, 1981; UCHIYAMA, 1990): Wenn aufgrund von Glukoseüberschuss die Glykogenspeicher aufgefüllt werden können, wirkt die Zelle zunehmend dichter und eher grau. Sind die Glykogenvorräte aufgebraucht, dann herrscht das Netzwerk des Endoplasmatischen Retikulums vor und die Zelle sieht eher hell und vakuolisiert aus. Die ebenfalls sehr variable Morphologie der Zisternen und Kanälchen des Endoplasmatischen Retikulums, wird gemäß COSSEL (1964a) durch verschiedene Faktoren verursacht: Zum einen sorgen präparationsbedingte Artefakte, wie Sauerstoffmangel durch zu langsame Gewebeentnahme und eine unterschiedliche Lage der Schnittebene für Unterschiede in der Struktur des Endoplasmatischen Retikulums, zum anderen hängt diese vom Funktionszustand des Endoplasmatischen Retikulums ab. Letztlich besteht also auch hier eine starke Abhängigkeit der Mikromorphologie von der aktuellen Stoffwechselsituation: Im Ruhezustand, wenn kein Protein synthetisiert wird, erscheinen die Zisternen des rauen Endoplasmatischen Retikulums schmal und elektronenoptisch leer (SINOWATZ, 2006), im aktivierten Zustand werden sie von den de novo produzierten, sich als mittelgradig elektronendichtes Material darstellenden

Eiweißmolekülen aufgetrieben (SINOWATZ, 2006). Analog sind die Kanälchen des an der Beseitigung giftiger Stoffe und der Betaoxidation von beim Lipidabbau frei werdenden Fettsäuren beteiligten glatten Endoplasmatischen Retikulums (SINOWATZ, 2006) bei erhöhtem Anfall zu entgiftender Stoffe sowie katabolen Stoffwechsellagen breiter und durch das eingeschlossene Material elektronendichter. Die bevorzugte Lage des rauhen Endoplasmatischen Retikulum um den Kern, entlang der Zellmembran sowie in unmittelbarer Nähe der Mitochondrien, die bereits von COSSEL (1964a) auch für die menschliche Leberzelle beschrieben wurde, steht möglicherweise im Zusammenhang mit den, sich für den Ablauf der Translation ergebenden Vorteilen, wie der unmittelbaren Nachbarschaft der vom Nukleus synthetisierten RNA (SINOWATZ, 2006) zu den Ribosomen und der Gewährleistung einer ausreichenden Energieversorgung für die Eiweißproduktion durch die Mitochondrien (SINOWATZ, 2006).

Sinusoidendothelzelle

Die sinusoidalen Endothelzellen des Rindes repräsentieren zum einen, wie bei den übrigen Spezies auch (KOLLER, 1994), die Barriere zwischen dem Sinusoidlumen einerseits und dem Disse Raum bzw. Leberparenchym andererseits. Auf der anderen Seite treten sie aber im Gegensatz zu denen des Menschen (COSSEL, 1964c; JASTROW, 2001), der Labornager (COSSEL, 1964a; JASTROW, 2001) und des Affen (JASTROW, 2001) mit einem weitaus weniger breitflächigen Zellkörper, aber dafür wesentlich längeren, kräftigeren, faserigen, trabekulären Zytoplasmafortsätzen und mehr oder weniger nicht mit feinen, filamentösen, mikrovilliartigen Zytoplasmaausläufern, die nach COSSEL (1964c) bei den übrigen bisher untersuchten Arten dominieren, in Erscheinung. Die Sinusoidlumina nahe zu vollständig umgebend, sorgen sie wie bei den übrigen Spezies, auch beim Rind für die endotheliale Auskleidung der Leberkapillaren (KOLLER, 1994). Die Tatsache, dass die Zytoplasmaausläufer auch beim Rind trotz ihrer kräftigen, strangartig, trabekulären Struktur an ihren Enden nicht durch spezielle Zellverbindungen zusammengefügt werden, stellt eine mögliche Erklärung für das Auftreten einer kontinuierlichen Basalmembran in der Wand der bovinen Leberkapillaren. Das Sinusoidendothel grenzt das Leberparenchym nicht hermetisch vom kapillären Blutstrom ab, sondern ermöglicht durch zwei spezielle Einrichtungen einen regen Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe: Erstens können sowohl durch die Freiräume zwischen den Zytoplasmaausläufern als auch durch deren Poren die, im Blut enthaltenen Stoffe direkt in den Disse Raum übertreten (YOKOMORI et al., 2000) und über diesen zu der, mit Rezeptoren für zahlreiche, verschiedene Substanzen wie Nährstoffe, Hormone,

Wachstumsfaktoren und Mediatoren besetzten Hepatozytenoberfläche (KOLLER, 1994) gelangen. Da nur Stoffe bis zu einem Durchmesser von 100nm die Poren durchqueren können (KOLLER, 1994), wirkt das Sinusoidendothel wie ein Filter, der größere, körpereigene und fremde Partikel vom Leberparenchym abschirmt, und diese dadurch vor schädigenden Einflüssen schützt. Der zweite den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe ermöglichende Mechanismus besteht in der starken endozytotischen Aktivität der Endothelzellen, was anhand der zahlreichen, verschiedenartigen Vesikeltypen, unter denen sich unter anderem auch „brizzle coated“ Mikropinzytosevesikel befinden, deutlich wird. Die Aufnahme der Stoffe erfolgt in der Regel durch die von GOLDSTEIN et al. (1985) ausgeführte Variante der Rezeptor vermittelten Endozytose, bei der, der Rezeptor am Ende des Endozytoseprozesses zur Zelloberfläche zurückkehrt, während der Ligand abgebaut wird: Die auf zu nehmenden Stoffe werden durch die, in den sich als Eindellungen des Plasmalemmis darstellenden, sogenannten coated pits, befindlichen Rezeptoren gebunden. Im Zuge der Invagination der Zellmembran formen sich die coated pits zu coated Vesikel, die sich schließlich von der Zellmembran abschnüren um. Nach Abstreifung ihres „coats“ verschmelzen die Vesikel miteinander zu größeren Endosomen, die als helle umfangreichere Vesikel in den zentraleren Zellbereichen sichtbar werden. Ihr Inhalt der sich unter anderem aus dem Rezeptor-Liganden-Komplex zusammensetzt, wird durch ATP-getriebene Protonenpumpen angesäuert, so dass es zur Trennung von Rezeptor und Ligand kommt. Der Rezeptor kehrt zur Zelloberfläche zurück, während der Ligand entweder dem proteolytischen Verdau durch lysosomale Enzyme zugeführt wird, oder aber nach dem Transport durch die Zelle auf der gegenüberliegenden Seite exozytotisch in den Disse Raum freigesetzt wird. Nach dessen Durchquerung erreicht er schließlich die Hepatozytenoberfläche (COSSEL, 1964b).

Disse Raum

Der Disse Raum stellt nach KOLLER (1994) einen, im Dienste des Stoffaustauschs zwischen Blut und Leberparenchym stehenden Funktionsraum dar, dessen Weite in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffwechselsituation teils erheblichen Schwankungen unterliegt. Entscheidend ist dabei, dass er gemäß COSSEL (1964b) als Behältnis für die am Stoffaustausch teilnehmende Flüssigkeit fungiert, das diese vom zirkulierenden Blutstrom abtrennt und unabhängig von Strömungseinflüssen einen intensiven Kontakt zwischen den in der Flüssigkeit erhaltenden Substanzen und den Zelloberflächen ermöglicht. Seine Weite wird somit von der in ihm zurückgehaltenen Flüssigkeitsmenge bestimmt. Dies lässt sich deutlich anhand der Studien von COSSEL (1964b) und MOHNIKE (1959), die die Weite von Sinusoidlumen und Disse Raum sowie die Ausprägung des Mikrovillibesatzes sowohl zum

Zeitpunkt der maximalen Zuckeraufnahme als auch -abgabe durch den Hepatozyten an Kaninchenlebern untersuchten. Im ersten Fall beobachteten sie weite Sinusoide und Disse Räume sowie einen starken Mikrovillibesatz, im zweiten enge Sinusoide und spärlich ausgebildete Mikrovilli, aber dennoch breite Disse Räume. Somit entscheidet nicht die Zahl der Mikrovilli über die Breite des Disse Raums, sondern allein die Menge, der in ihm zurückgehaltenen, von der sinusoidalen Blutzirkulation abgetrennten Flüssigkeit. Diese ist offensichtlich nicht nur im Stadium der maximalen Resorption, sondern auch der maximalen Sekretion besonders umfangreich, was sich damit erklären lässt, dass bei der maximalen Substanzfreisetzung aus den Hepatozyten in großer Zahl osmotisch wirksame Partikel im Disse Raum vorliegen, die viel Flüssigkeit aus dem Kapillarlumen anziehen. Aus physiologischer Sicht ist dies durchaus sinnvoll, da für ein möglichst schnelles Eintreffen der vom Hepatozyten sezernierten Stoffe am Zielort möglichst viel Flüssigkeit als Transportmedium zur Verfügung stehen sollte. Auch in der vorliegenden Arbeit ist, trotz eines minimalen Mikrovillibesatzes, ein weiter, mit relativ viel, mäßig dichtem, amorph bis granulärem Material gefüllter Disse Raum festzustellen, was in absolutem Einklang mit dem soeben dargelegten Sachverhalt steht, wenn man bedenkt, dass die Rinder vor der Schlachtung 24 Stunden keine Nahrung bekamen und somit zum Zeitpunkt der Tötung nüchtern sind. Im Gegensatz dazu werden im Hungerzustand von verschiedenen Autoren immer wieder Disse Räume mit langen Mikrovilli beschrieben (FAWCETT, 1955; ROUILLER, 1956). Auch dieser Befund bekräftigt die Annahme, dass es sich beim Disse Raum um einen Dienste des Stoffaustauschs zwischen Blut und Leberparenchym stehenden, das Austauschmedium Flüssigkeit von den störenden Einflüssen der Zirkulation abscheidenden Funktionsraum handelt. Bei minimalem Nährstoffgehalt des Blutes und zugleich leeren Glykogenspeichern der Hepatozyten sind zwar die Mikrovilli zur maximalen Vergrößerung der resorptiv-aktiven Zelloberfläche gut entwickelt (KOLLER, 1994), da aber aus dem Blut keine Partikel und damit aus osmotischen Gründen auch keine Flüssigkeit durch das Kapillarendothel in den Disse Raum übertritt, nimmt er ohne einen damit verbundenen metabolischen Nutzen auch nicht an Volumen zu. Die Annahme, dass es sich bei der im Disse Raum enthaltenen Flüssigkeit um einen Teil des Blutplasmas handelt, wird unter anderem dadurch bestätigt, dass die sowohl im Sinusoidlumen als auch im Disse Raum auftretende, amorph bis feingranuläre, mäßig dichte Substanz nach COSSEL (1964b) geronnenes bzw. durch die Fixierung ausgefälltes Eiweiß des Blutplasmas darstellt. Die Beobachtung, dass im Disse Raum des Rindes im Gegensatz zu diesen Plasmaproteinen Kollagenfaserbündel und Mikrofilamente nahezu vollständig fehlen, lässt sich sicherlich einerseits mit der von COSSEL (1964b) angeführten, im Vergleich zur Dicke der elektronenmikroskopischen

Schnitte, außerordentlichen Weitmaschigkeit des aus Kollagenfaserbündeln und Mikrofilamenten bestehenden, den Disse Raum als stützendes Gerüst durchziehenden Netzwerks begründen. Andererseits sind im Gegensatz zu Aufnahmen von Disse Räumen des Pferdes (Koller 1964), der Ratte (Jastrow 2001), des Affen (Jastrow 2001) und des Menschen (Jastrow 2001) beim Rind überhaupt keine Kollagenfaserbündel und Mikrofilamente zu sehen, so dass von einer speziesspezifischen Besonderheit ausgegangen werden kann. Diese ist möglicherweise darauf zurück zuführen, dass beim Rind das Sinusoidendothel als die üblicherweise schwächere der beiden Begrenzungen des Disse Raums aufgrund der kräftigen, trabekulären Endothelzellausläufer sowie einer kontinuierliche Basalmembran wesentlich stabiler als bei den anderen Arten und dadurch weitaus weniger auf die mechanische Unterstützung und Festigung durch Kollagenfasern und Mikrofilamente angewiesen ist.

Ito-Zelle

Die Ito-Zellen zeigen funktionelle Aspekte von drei verschiedenen Zelltypen: Zum einen die von Fibrozyten bzw. Fibroblasten, die als zellulärer Bestandteil des Disse Raums nach der Meinung verschiedener Autoren wie POPPER (1941); SCHNACK et al. (1967) für die Synthese von Kollagenfaserbündel verantwortlich sind und daher beim Rind, bei dem diese kaum vorkommen, in dieser Funktion bloß eine untergeordnete Rolle spielen dürften. Zum anderen wirken sie nach MAEDA et al. (2003) aufgrund ihrer langen, die Sinusoide teilweise vollständig umfassenden Zytoplasmaausläufer als Perizyten mit sphinkterähnlicher Funktion, die der Regulation des kapillären Blutflusses dienen (WISSE et al., 1989). Diese regulative Funktion beschränkt sich nicht auf die Kapillaren allein, sondern erfasst auch die nachgeschalteten Venolen im Sinne einer postkapillären Schließmuskeleinheit (HORN et al., 1986). Die Notwendigkeit der Regulation des kapillären Blutflusses in der Leber des Rindes durch die Ito-Zellen, zeigt sich unter anderem an der, vergleichsweise kräftigen Ausbildung der Zytoplasmafortsätze, die angesichts des starken, trabekulären Sinusoidendothels nötig sind, um erforderlichenfalls eine ausreichende Drosselung des kapillären Blutflusses zu erzielen. Nicht zuletzt stellen die Ito-Zellen aber auch Vitamin A und Fett speichernde Zellen dar, welche die genannten Substanzen in Form von mit Retinolestern bzw. Triacylglycerolestern gefüllten Vakuolen einschließen (UETSUKA et al., 2007). Die insbesondere im Vergleich zu den kleinen Labornagern wenigen, aber dafür sehr großen Vakuolen (ITO, 1973; BARTOK et al., 1979) drücken einen statischen Zustand aus, bei dem der Speichervorgang weitestgehend abgeschlossen ist, Die Ito-Zellen des Rindes gleichen hinsichtlich Größe und Zahl der Fettvakuolen denen des Schweins und der Ziege (ITO, 1973;

BARTOK et al., 1979), was wiederum implizieren könnte, dass größere Spezies einen weniger regen Fettstoffwechsel haben. Zumindest wirken die Ito-Zellen der kleinen Labornager auf Grund ihrer zahlreichen, kleinen Fettvakuolen weitaus dynamischer, was auf ein im Vergleich zu den Großtieren wesentlich aktiveren Fettstoffwechsel hindeutet. Diese Überlegung ist keineswegs abwegig, wenn man bedenkt, dass sich aus der von KLEIBER und GÜTTE (1967) ermittelten interspeziesspezifisch für alle Säugetiere gültigen Formel $E(\text{kJ/d}) = 283 \times \text{Körpermasse}(\text{kg})^{0,756}$ zur Berechnung des energetischen Grundumsatzes in KJ pro Tag bei kleinen Tieren ein relativ zur Körpermasse größerer Energiebedarf als bei großen ableiten lässt (RODEHUTSCORD & PETRY, 2009). Dieser erhöhte Energiebedarf kann besonders gut durch die Verbrennung von Fett, das pro Gramm im Gegensatz zu Kohlenhydraten und Eiweiß, nicht nur 4,1kcal (DOENECKE et al., 2005), sondern 9,3kcal (DOENECKE et al., 2005) liefert gedeckt werden.

Von Kupffer-Zelle

Die von Kupffer-Zellen des Rindes weisen ähnlich hohe Gehalte an Endozytosevesikeln und Granula wie die des Pferdes auf. Diese schließen nach KOLLER (1994) und BLOUIN et al. (1977) 22% aller in der Leber vorkommenden Vesikel ein, obwohl sie selbst nur einen Anteil von 2,1% an allen in der Leber auftretenden Zellen haben. Bei ihnen handelt es sich um aus Monozyten differenzierte, „sessile, leberspezifische Gewebemakrophagen“ (DEMUTH, 2009), die ein Mitglied des mononukleären Phagozytensystems, darstellen. Da die von Kupffer-Zellen, je nach Autor sogar 80-90% (DEMUTH, 2009) aller im Organismus zu findenden Gewebemakrophagen ausmachen, gilt die Leber zu recht als größtes MPS-Organ des Körpers (GARCIA MARQUES et al., 2004). Die hohe Konzentration der von Kupffer-Zellen in der Leber ist nach den detaillierten Ausführungen von DEMUTH (2009) unter Berücksichtigung nachfolgenden Sachverhalts aus physiologischer Sicht durchaus sinnvoll: Die wichtigste Funktion dieser Zellen besteht in der Endozytose, Umsetzung und Präsentation antigener Strukturen sowie der Sekretion antimikrobiell und zytotoxisch wirksamer Substanzen, wie Defensine und Stickoxid. Antigene Substanzen sind in Form von Mikroorganismen, Endotoxinen, Immunkomplexen, körpereigenen Abbauprodukten sowie Fremdpartikeln in großen Mengen im Pfortaderblut enthalten. Durch ihre amöboide Wanderung entlang der Sinusoidwand (ABT, 2011) kommen die von Kupffer-Zellen nun als erste mit den genannten antigenen, in der Regel häufig auch pathogenen Stoffen in Kontakt und können sie endozytotisch entfernen noch bevor diese das Leberparenchym erreichen und schädigen. Die Aufnahme des antigenen Materials erfolgt durch die von GOLDSTEIN et al.

(1985) beschriebene Variante der Rezeptor vermittelten Endozytose, bei der sowohl der Rezeptor als auch der Ligand im Verlauf des Endozytosevorgangs zur Zelloberfläche rezirkulieren: Zu Beginn werden die Antigene von in „coated pits“ der Zellmembran befindlichen Rezeptoren gebunden. Daraufhin invaginiert sich die Zellmembran in diesen Bereichen und die Rezeptor-Liganden-Komplexe gleiten durch laterale Verschiebung tief in die „coated pits“, die in Form zahlreicher, kleinster Einziehungen unterhalb der Membran sichtbar werden, hinein. Aus diesen Ein- bzw. Ausstülpungen der Zellmembran entstehen durch Abschnürung unter Mitwirkung des Proteins Clathrin „coated vesicles“ die unter anderem als „bristle coated“ und „fuzzy coated“ Mikropinozytosevesikel in tieferen Zytoplasmaschichten in Erscheinung treten. Nach Abstreifung ihres „coats“ verschmelzen die Vesikel miteinander zu Endosomen, die tiefer im Zytoplasma liegen und größer als die Vesikel sind. Ihr Inhalt, der unter anderem aus dem an den Rezeptor gebundenen Antigen besteht, wird durch ATP-getriebene Protonenpumpen angesäuert. Der Rezeptor gibt seinen Liganden schließlich an ein saures Kompartiment der Zelle ab, wo dieser teilweise proteolytisch verdaut wird. Die aus der proteolytischen Spaltung hervorgegangenen Fragmente werden nach ihrer Rückkehr auf die Zelloberfläche den Antigenrezeptoren benachbarter T-Lymphozyten präsentiert. Die Endozytose kann in Abhängigkeit von der Größe der aufzunehmenden Stoffe in die Pinozytose und die Phagozytose unterteilt werden (SINOWATZ, 2006). Zur Phagozytose kommt es, wenn die Größe der zu absorbierenden Partikel 10 nm überschreitet (KOLLER, 1994), weshalb in den als Phagosom bezeichneten, endozytotischen Vesikel vor allem Blutreste, Zelltrümmer und körperfremdes Material als kompakte, schwarze Einschlüsse sichtbar werden. Nach dem lysosomalen Abbau zurückbleibende, unverdaute Reste lagern sich als die schwarzen, kompakten Restkörper im Zytoplasma ab. Bei der Rezeptor vermittelten Endozytose ist eine Unterscheidung in die, mit der Bildung von „bristle-coated“-Mikropinozytosevesikeln einhergehende sowie die, durch das Auftreten von „fuzzy coated“-(Makro-)pinozytosevesikeln gekennzeichnete (Makro-)pinozytose möglich. Der „fuzzy coat“ enthält Reste der Zellmembran als Reserve für die Umhüllung größerer Partikel von 3,5-7,5 nm (KOLLER, 1994). Neben der Rezeptor-vermittelten Endozytose existiert die Flüssigphasepinozytose mit deren Hilfe unter physiologischen Bedingungen laufend kleinste Plasmatropfen aus dem Blutstrom aufgenommen, darin befindliche, brauchbare Stoffe behalten und das Restplasma wieder exozytotisch in die Kapillaren abgegeben wird (WISSE & DE ZANGER, 1980) Die Endozytoseaktivität wird von einer hohen Stoffwechselaktivität der von Kupffer-Zelle begleitet, was nicht zuletzt auch anhand des, bereits von CARSTEN (1961) festgestellten, insbesondere verglichen mit Sinusoidendothel- und Gallengangsepithelzellen, umfangreichen

Auftretens von großen, intensiv Energie produzierenden Mitochondrien zum Ausdruck kommt

Gallengangsepithelzellen

Die große morphologische Variabilität der bovinen Gallengangsepithelzellen wird teilweise durch präparationsbedingte Artefakte hervorgerufen: So ist das Fehlen der Kerne in vielen Zellen ebenso wie das veränderliche Erscheinungsbild und ihre variable Größe darauf zurückzuführen, dass die Zellen und auch die Kerne in unterschiedlichen Höhen von der Schnittebene getroffen werden (COSSEL, 1964d).

Das unregelmäßige Vorkommen von teilweise gut ausgebildeten Dictyosomen des Golgi-Apparates ist sehr wahrscheinlich Ausdruck dessen, dass die Gallengangsepithelzellen möglicherweise zwei morphologisch differente Funktionszustände, nämlich einen ruhenden und einen aktivierten einnehmen können. Dabei ist der aktivierte Funktionszustand durch die Synthese und Sekretion von sauren Mucopolysacchariden, die von den gut entwickelten Golgi-Apparaten posttranslational modifiziert werden (BERG et al., 2007e), gekennzeichnet. Da es sich bei den sauren Mucopolysacchariden höchst wahrscheinlich um Beimengungen zur Galleflüssigkeit handelt (siehe Diskussion Alcianblau 8GX und Glykohistochemie), werden diese nur produziert, wenn Galle fließt. Die Galle wird wiederum von den Hepatozyten nur zeitgleich mit Glykogen freigesetzt (FORSGREN, 1928), was letztlich dazu führt, dass die Synthese von sauren Mucopolysacchariden einschließlich deren Glykolisierung und damit auch die besonders deutliche Ausbildung der Dictyosomen des Golgi-Apparates in den Gallengangsepithelzellen, demselben circadianen Rhythmus wie die metabolische Aktivität des Hepatozyten (UCHIYAMA, 1990) unterliegt. Folglich können die Dictyosomen vornehmlich in den Phasen der Dissimilation beobachtet werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die histochemischen und ultrastrukturellen Eigenschaften der Leber des Rindes mit modernen morphologischen Methoden näher zu untersuchen. Dabei sollte zugleich festgestellt werden, ob und in wie weit sich diese zwischen den einzelnen Leberlappen (*Lobi hepatici*) unterscheiden. Das Untersuchungsmaterial stammte von, als frei von pathologischen Befunden beurteilten Lebern frisch geschlachteter Rinder. Daraus wurden Präparate für konventionell lichtmikroskopische, immun- und glykohistochemische sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen hergestellt. Als Grundlage für die konventionell lichtmikroskopischen Studien dienten Hämatoxylin-Eosin-, Masson-Goldner, Alcianblau 8GX- sowie PAS-gefärbte Schnitte. Bei den immunhistochemischen Analysen wurde der Nachweis von Zytokeratin 5, 8, 14, 18 und 19 sowie von Vimentin verfolgt. Bei den glykohistochemischen Untersuchungen kamen 14 verschiedene Lektine pflanzlicher Herkunft, deren Bindungsverhalten im Lebergewebe fluoreszenzmikroskopisch erfasst wurde zum Einsatz. Die ultrastrukturelle Analyse des Lebergewebes erfolgte transmissionselektronenmikroskopisch. Die Auswertung begann mit der konventionellen Lichtmikroskopie. Bereits die Analyse der HE-gefärbten Schnitte legte nahe, dass sich die *Lobi hepatici* mikroanatomisch nicht unterscheiden, was sich im Zuge der weiteren Analysen bestätigte. Die Färbung mit Alcianblau 8GX zeigte zudem zum einen das Vorkommen von Mastzellen im Bindegewebe der Rinderleber an und deutete zum anderen auf die Synthese und Sekretion von sauren Mucopolysacchariden, durch die insbesondere am Beginn des extralobulären Teils des Gallengangssystems gelegenen Epithelzellen hin. In der mit und ohne Amylasevorbehandlung durchgeführten PAS-Reaktion erwiesen sich darüber hinaus die Läppchenzentren als die Speicher des Leberglykogens, wobei deren Umfang in Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation großen Schwankungen unterlag. Im Zuge der immunhistochemischen Studien konnte Zytokeratin 5 überhaupt nicht, und die Zytokeratine 8, 14, 18 und 19 nur in den Gallengangsepithelzellen nachgewiesen werden, wobei die einzelnen Zytokeratine nicht in allen Bereichen des Gallengangssystems, sondern nur in ganz bestimmten, für das jeweilige Zytokeratin individuell spezifischen Abschnitten deutlich in Erscheinung traten. Dieses Zytokeratin-Nachweismuster erlaubte unter Einbeziehung anatomischer, topographischer und morphologischer Gesichtspunkte eine Gliederung des Gallengangssystems in die überwiegend CK 8-positiven, zentralen *Ductuli biliferi*, die hauptsächlich CK 14-positiven, peripheren *Ductuli biliferi* sowie die, für die Verbindung zwischen dem intra- und extralobulären Teil des Gallengangssystems verantwortlichen, primär

CK 18-positiven Ductus interlobulares biliferi kleinerer bis mittlerer Größe, und die von CK 19 dominierten Ductus interlobulares biliferi besonders großen Durchmessers. Diese sich unter Berücksichtigung des Zytokeratin-Nachweismusters ergebende Gliederung des intrahepatischen Gallengangssystems, spiegelte, mit Blick auf die Eigenschaften der einzelnen Zytokeratine, zugleich auch die embryologische Entwicklung des lichtmikroskopisch sichtbaren Teils des Gallengangs-systems, beginnend mit den zentralen Ductuli biliferi bis hin zu den größten, am weitesten entwickelten Ductus interlobulares biliferi wieder. Das Auftreten der normalerweise außer für Basalzellen mehrschichtiger Epithelien nur noch für Zellarten mit mindestens bipotentem Potential typischen CK-14-Expression in den einschichtigen Gallengangsepithelien, ließ vermuten, dass auch die bovinen Gallengangsepithelzellen wenigstens zu einem gewissen Grad über bipotentes Potential verfügen. Vimentin war im gesamten Bindegewebe sowie im Endothel aller Blutgefäße nachweisbar. Im Rahmen der glykohistochemischen Untersuchungen zeigten das Endothel, insbesondere der Arterien und Sinusoide, im Vergleich zu den übrigen Strukturen des Lebergewebes den stärksten Besatz mit verschiedenartig gestalteten Glykanen. Dies war angesichts der zahlreichen Funktionen der Endothelzellen, wie etwa Aufrechterhaltung der Gewebestabilität, Mitwirkung an immunologischen Prozessen, Schaffung eines Gleichgewichtszustands zwischen Koagulation und Antikoagulation sowie Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe, deren Erfüllung nur aufgrund der umfangreichen Glykokalix möglich ist, nicht überraschend. Darüber hinaus wurde eindeutig ersichtlich, dass die Zuckerketten der arteriellen, venösen und sinusoidalen Endothelzellen jeweils ganz individuell spezifische, sich von denen der anderen Gefäßarten gänzlich unterscheidende Glykane tragen, was sich darauf zurückführen ließ, dass die verschiedenen Gefäßarten verschiedene Aufgaben bevorzugt wahrnehmen. Neben den Endothelzellen stellten sich auch die Hepatozyten als Träger von verhältnismäßig vielen, verschiedenartig gestalteten Glykane dar, wobei sich deren Präsenz nicht nur auf die Glykokalix beschränkte, sondern sie auch im Golgi-Apparat, sowie im Zytoplasma selbst nachgewiesen werden konnten. Im letzten Fall bestand der Verdacht, dass es sich aufgrund des, durch die rein auf Con A begrenzte Bindungsaffinität angezeigten, hohen Mannosereichtums der Kohlenhydratstrukturen um die Glykane von lysosomalen Enzymen und von, vom Hepatozyten synthetisierten und zur Sekretion vorgesehenen Glykoproteinen und -lipiden handelte. Bei den Gallengangsepithelzellen als weiterer Zellart, die über relativ zahlreiche, verschiedenartig strukturierte Glykane verfügt, traten diese ebenfalls nicht nur als Bestandteil der Glykokalix, sondern auch im Zytoplasma in Erscheinung. Die im Zytoplasma beobachteten, ebenfalls nur Con A-positiven und damit stark Mannose reichen Glykane ließen vermuten, dass auch die

Gallengangsepithelzellen neben lysosomalen Enzymen zum Export vorgesehene Makromoleküle produzieren. Als derartige Makromoleküle kamen die bereits in der Färbung mit Alcianblau 8GX nachgewiesenen, sauren Mucopolysaccharide in Betracht. Sie könnten als Gallebeimengung ähnlich wie Phospholipide die Löslichkeit des zur Kristallisation neigenden Cholesterols erhöhen. Die, mit der Größenzunahme der Gallengänge korrelierende, zunehmende Reaktionsfreudigkeit der Epitheloberfläche implizierte eine, mit dem Übergang vom iso- zum hochprismatischen Epithel einhergehende, durch den Einbau weiterer Kohlenhydratmoleküle gekennzeichnete Weiterdifferenzierung der epithelialen Glykokalix. Sie dürfte durch Rezeptor-Liganden spezifische Erkennung zur Reabsorption vorgesehener Stoffe wesentlich an der, insbesondere im Anfangsteil des Gallengangssystems stattfindenden Modifikation der Primär- zur Sekundärgalle beteiligt sein. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen, deren Schwerpunkt auf die Parenchymzellen sowie den Disse Raum gelegt wurde, stand der Speziesvergleich im Vordergrund. Dabei zeichnete sich die Leber des Rindes durch Hepatozyten mit sehr spärlichem Mikrovillibesatz, Endothelzellen mit besonders kräftigen, trabekulären von einer kontinuierlichen Basalmembran unterlagerten Fortsätzen, Ito-Zellen mit ebenfalls sehr starken Ausläufern und wenigen, aber sehr großen Fettropfen sowie einem, von Kollagenfibrillen und Mikrofilamenten nahezu völlig freien, Disse Raum aus

VII. SUMMARY

The main goal of this thesis was to study the bovine liver with histological, histochemical and ultrastructural techniques to establish possible histological variations between the different hepatic lobes. Samples were taken from eleven livers of cows immediately after slaughter at a Munich abattoir. These were then prepared for examination by both light and electron microscopy, and also for immuno- and glycohistochemical studies.

Using conventional Hämatoxylin-Eosin-staining of paraffin embedded specimens proved the absence of distinct histological variations between the hepatic lobes. Staining with Alcian blue 8GX at pH 1 and pH 2.5 showed the occurrence of mast cell in the connective tissue of the liver and demonstrated the synthesis and secretion of acid mucopolysaccharids by the bile duct epithelial cells. The results of PAS-staining with and without amylase pretreatment suggest that the centers of the hepatic lobules are the main storage sites of glycogen in the liver.

Immunohistochemical studies (not detecting CK 5 at all and CKs 8, 14, 18 and 19 only in the bile duct epithelial cells) established a specific cytokeratin distribution pattern within the lobuli. This pattern, together with topographical and morphological considerations allowed a classification of the bile duct system into four different regions: the CK 8-positive central ductuli biliferi, the predominantly CK 14-positive peripheral ductuli biliferi, the primarily CK18-positive ductus interlobulares biliferi of small till average size, responsible for the connection between the intra- and the extralobular parts of the bile duct system and in the end the large-sized ductus interlobulares biliferi with distinct CK 19 immunostaining. The CK distribution pattern reflects the embryological development of the bile duct system. The intermediate filament vimentin was only found in the fibroblast of the connecting tissue and in vascular endothelium of the liver.

The glycohistochemical studies revealed that the endothelium, especially the endothelium of the arteries and sinusoids, displayed the greatest variety of glycans in comparison to all other liver structures. It could be also shown that carbohydrate structures of arterial, venous and sinusoidal endothelial cells carried unique glycans. This may be due to their specialized

functions.

Hepatocytes showed a distinct lectin staining pattern (Con A, WGA and WGAs) of the cell membrane, Golgi-apparatus and also within the cytoplasm. Because of their high number of mannose residues, the glycans of the cytoplasm could be clearly localized using Con A-FITC. The mannose rich glycans identified by Con A are probably parts of glycoproteins and –lipids which are synthesized and secreted by the hepatocytes.

Also the epithelial cells of the bile ducts show a distinct staining with several lectins. (Con A, WGA, WGAs, PHA-E and PHA-L). The lectins bound to glycocalix of the cell membrane but also to cellular structures within the cytoplasm, like the Golgi-apparatus and the lysosomes.

Electron-microscopical analysis, focusing on liver parenchyma cells and Disse's space revealed several specific structures of the bovine liver. The hepatocytes carried very few microvilli, possess a large number of mitochondria and a fair amount of smooth and rough endoplasmic reticulum. Alpha and beta-glycogen particles are regularly found. Sinusoidal endothelial cells sit on a continuous basal lamina and Ito-cells with only few but very large fat droplets are occasionally found. Within the Disse's space only few collagen fibrils occur, which is different to other domestic animal species.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abt SD (2011) Nachweis des Neurokinin-1 Rezeptors und des Calcitonin-Gene-Related-Peptide-Rezeptors und Untersuchung ihres Vorkommens auf parenchymalen und nicht-parenchymalen Zellen der menschlichen Leber. In: Institut für Anatomie I und Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg

Adlung J. Bestimmung von Lactat, Pyruvat, Malat, Oxalacetat und Alpha-Ketoglutarat in menschlicher Blasen- und Lebergalle. *Klinische Wochenschrift*. 1968; 7: 385-7.

Assmann G, Schriewer H, Oberwittler W. Klinik und Pathobiochemie der High Density Lipoproteine. *Klinische Wochenschrift* 1980; 58: 757-65.

Bartok I, Toth J, Remenar E, Viragh S. Ultrastructure of the hepatic perisinusoidal cells in man and other mammalian species. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 1979; 194: 571-86.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biosynthese der Aminosäuren. In: *Biochemie*. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, eds. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2007a: 757-90.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Oxidative Phosphorylierung. In: *Biochemie*. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, eds. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2007b: 560-602.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Proteinumsatz und Aminosäurekatabolismus. In: *Biochemie*. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, eds. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2007c: 722-56.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Glykolyse und Gluconeogenese. In: *Biochemie*. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, eds. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2007d: 484-530.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Kohlenhydrate. In: *Biochemie*. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, eds. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2007e: 339-64.

Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non-hepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *Cell Biology* 1977; 72: 441-5.

Bouwens L, Brouwer A, Wisse E. Ultrastructure of human hepatic pit cells. *Cells of the Hepatic Sinusoid* 1989; 2: 471-6.

Brooks S, Haggis GH. Scanning electron microscopy of rat's liver. Application of freeze-fracture and freeze-drying techniques. *Laboratory Investigation* 1973; 29: 60-4.

Buddecke E. Proteoglycans. In: *The Biochemical Basis and Coding Capacity of the Sugar Code*. In: *The Sugar Code Fundamentals of Glycosciences*. Gabius HJ e, ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2009: 199-216.

Budny T, Palmes D, Stratmann U, Minin E, Herbst H, Spiegel HU. Morphologic features in the regenerating liver--a comparative intravital, lightmicroscopical and ultrastructural analysis with focus on hepatic stellate cells. *Virchows Archiv* 2007; 451: 781-91.

Carsten PM. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Sinuswand menschlicher, fetaler Lebern. *Zeitschrift für Zellforschung* 1961; 54: 252-61.

Cines DB, Pollack ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmermann GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan RS, McCrae KR, Hug BA, Schmidt A, Stern DM. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-61.

Cossel L. Die Leberepithelzellen (Leberzellen, Parenchymzellen). In: *Die menschliche Leber im Elektronenmikroskop*. Cossel L, ed. Jena: Gustav Fischer Verlag 1964a: 49-101.

Cossel L. Der Dissesche Raum. In: *Die menschliche Leber im Elektronenmikroskop*. Cossel L, ed. Jena: Gustav Fischer Verlag 1964b: 37-44.

Cossel L. Die Sinusoide (Leberkapillaren). In: *Die menschliche Leber im*

Elektronenmikroskop. Cossel L, ed. Jena: Gustav Fischer Verlag 1964c: 31-6.

Cossel L. Elektronenmikroskopische Befunde an der Begrenzung der Leberepithelzellen. In: Die menschliche Leber im Elektronenmikroskop. Cossel L, ed. Jena: Gustav Fischer Verlag 1964d: 14-20.

Demuth JE (2009) Einfluss von freien Fettsäuren und Tryglyceriden auf die Expression von proinflammatorischen Mediatoren und Adhäsionsmolekülen in Hepatozyten und von Kupffer-Zellen (der Ratte). In: Zentrum der Inneren Medizin der Medizinischen Fakultät. Georg-August Universität Göttingen

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W. Ernährung, Mineralhaushalt und Vitamine. In: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W, eds. Stuttgart: Thieme Verlag 2005: 583-625.

Drackley J. Sofort Propionat zufüttern. VET impulse 2012: 6.

Engelhardt W. Kreislauf. In: Physiologie der Haustiere. Engelhardt W, Breves G, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2009: 172-96.

Fausto N. Liver Regeneration and Repair: Hepatocytes, Progenitor Cells, and Stem Cells. Hepatology 2004; 39: 1477-88.

Fawcett D. Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. Journal of the National Cancer Institute 1955: 1475-503.

Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Silbert D, Zatloukal K, Denk H, Trauner M. The role of the hepatocyte cytokeratin network in bile formation and resistance to bile acid challenge and cholestasis in mice. Hepatology 2009; 50: 893-900.

Forsgren E. Mikroskopische Untersuchungen über die Gallebildung in den Leberzellen. Zeitschrift für Zellforschung 1928; 6: 647-88.

Frenzel H, Kremer B, Richter I-E. Der Einfluß des Perfusionsdrucks bei der Perfusionsfixation auf die Feinstruktur der Lebersinusoide. *Research in Experimental Medicine* 1976; 168: 229-41.

Gabius H (2009) *The Sugar Code Fundamentals of Glycosciences*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Gabius S, Gabius HJ. *Angewandte Lektinforschung. Biologie in unserer Zeit* 1992: 330-8.

Garcia Marques R, Petroianu A, Betânia Nunes de Oliveira M, Bernardo-Filho M, Crisóstomo Portela M. Evaluation of Possible Failure of the Mononuclear

Phagocyte System after Total Splenectomy in Rats. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY AN INTERNATIONAL JOURNAL* 2004; 47: 199-204.

Gemell RT, Heath T. Fine structure of sinusoids and portal capillaries in the liver of the adult sheep and newborn lamb. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 1972; 172: 57-70.

Gilat T. Fatty Acid Derivates of Bile Acids and Bile Acid Derivates. United States Patent 2002; US 6,395,722 B1: 1-8.

Glisson F (1681) *Anatomia hepatis*, Den Haag

Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. What should be called a lectin? *Nature* 1980; 285

Goldstein IJ, Poretz R. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ, eds.: Academic Press 1986:

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russell DW, Schneider WJ. RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS: Concepts Emerging from the LDL Receptor System. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1985: 1-39.

Grisham JW, Nopanitaya W, Compagno J, Nägel AEH. Scanning Electron Microscopy of Normal Rat Liver: The Surface Structure of Its Cells and Tissue Components. *American Journal of Anatomy* 1975; 144: 295-322.

Grisham JW. Migration of Hepatocytes Along Hepatic Plates and Stem Cell-Fed Hepatic Lineages. *American Journal of Pathology* 1994; 144: 849-54.

Grubb DJ, Jones AL. Ultrastructure of Hepatic Sinusoids in Sheep. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 1971; 170: 75-80.

Halpern Z, Moshkowitz M, Laufer H, Peled Y, Gilat T. Effects of phospholipids and their molecular species on cholesterol solubility and nucleation in human and model biles. *Gut* 1993; 34: 110-5.

Hees H. Kreislaufsystem. In: *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. . Hees H, Sinowatz F, eds. Köln: Deutscher Ärzteverlag 2006a: 191-203.

Hees H. Verdauungsapparat. In: *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Hees H, Sinowatz F, eds. Köln: Deutscher Ärzteverlag 2006b: 262-84.

Hees H. Binde- und Stützgewebe. In: *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. . Hees H, Sinowatz F, eds. Köln: Deutscher Ärzteverlag 2006c: 113-50.

Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1981; 78: 6499-503.

Heppes C (2003) Blutglukose-, Insulin- und Glukagonkonzentration bei Vielseitigkeitspferden unter Belastung. In: Institut für Tierzucht, Mariensee (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft). Tierärztliche Hochschule Hannover

Hildebrand R, Karcher B. Karyometry of nuclei in liver cells. Heterogeneity of nuclear volume and percentage of binucleate cells associated with veins. *Cell Tissue Research* 1984; 235: 669-74.

Horiuchi K, Takta K, Rahim ATMA. Lipoprotein receptors of sinusoidal liver cells. 4th International Kupffer Cell Symposium 1988;

Horn T, Lyon H, Christoffersen P. The blood hepatocytic barrier: a light microscopical, transmission- and scanning electron microscopic study. *Liver* 1986; 6: 233-45.

Illig L. Organ-eigene Besonderheiten im Bauplan und in der Funktion der terminalen Strombahn, III. Leber. In: *Die terminale Strombahn, Capillarbett und Mikrozirkulation*. Illig L, ed. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer Verlag 1960: 289-303.

Ito T. Recent advances in the study in the fine structure of the hepatic sinusoidal wall: A review. *Gunma Reports on Medical Science* 1973; 6: 119-83.

Itoshima T, Kobayashi T, Shimida Y, Murakami T. Fenestrated Endothelium of the Liver Sinusoids of the Guinea Pig as Revealed by Scanning Electron Microscopy. *Archives of Histology and Cytology, Japan* 1974; 37: 15-24.

Jastrow H (2001) C Organe - exokrine Drüsen. In: *Elektronenmikroskopischer Atlas von Zellen, Geweben und Organen im Internet*. Ed Jastrow H

Kachi K. The connection between the nuclei of binucleated hepatocytes: an ultrastructural study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1994; 26: 163-4.

Kaneda K, Wake K, Senoo H. The rod-cored vesicle: a new type of vesicle in the pit cells. *Sinusoidal Liver Cells* 1982: 77-84.

Kleiber MV, Gütte JO (1967) *Der Energiehaushalt von Mensch und Tier. The fire of Life. Ein Lehrbuch der Tierenergetik*. Parey-Verlag, Berlin

Knook DL, Sleyster EC. Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. *Experimental Cell Research* 1976; 99: 444-9.

Knook DL, Blansjaar N, Sleyster EC. Isolation and characterization of Kupffer cells from the rat liver. *Experimental Cell Research* 1977 109: 317-29.

Koller H (1994) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der perisinusoidalen Funktionseinheit der Pferdeleber. In: Institut für Tieranatomie der Tierärztlichen Fakultät. LMU, München

König E, Sotonyi P, Ruberte J, Liebich H. Verdauungsapparat (Apparatus digestorius). In: Anatomie der Haussäugetiere. König E, Liebich H, eds. Stuttgart: Schattauer Verlag 2011: 301-66.

Körner T, Rath F-W. Morphologie und Funktion der Ito-Zellen der Leber. *Zeitschrift der gesamten Inneren Medizin* 1987; 42: 349-54.

Kozar T, André S, Ulicny J, Gabius HJ. Three-Dimensional Aspects of the Sugar Code In: The Sugar Code Fundamentals of Glycosciences

Gabius HJ, ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2009: 15-30.

Liebich H. Zelle (Cellulae). In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Liebich H, ed. Stuttgart: Schattauer Verlag 2010a: 1-42.

Liebich H. Verdauungsapparat (Apparatus digestorius). In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Liebich H, ed. Stuttgart: Schattauer Verlag 2010b: 191-254.

Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K, Yoshizato K. Stimulation of Proliferation of Rat Hepatic Stellate Cells by Galectin-1 and Galectin-3 through Different Intracellular Signaling Pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 18938-44.

Maragoudakis ME. The Role of Basement Membrane in Angiogenesis. In: Vascular

Endothelium, Receptors and Transduction Mechanisms. Catravas JD, Gillis CN, Ryan US, eds. New York: Plenum Publishing Corporation 1989: 111-20.

Meier PJ, Sztul ES, Reuben A, Boyer JL. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield for rat liver. *The Journal of Cell Biology* 1984; 98: 991-5.

Merten K (2011) Ultrastrukturelle, enzymhistochemische, immunhistochemische und glykohistochemische Untersuchungen am Blut des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*). In: Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Fakultät LMU München

Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y. Reconstruction of Hepatic Organoid by Rat Small Hepatocytes and Hepatic Nonparenchymal Cells. *Hepatology* 1999; 29: 111-25.

Mohnike G. Elektronenmikroskopische Befunde an Lebersinusoiden und -epithelien bei verschiedenen Funktionszuständen der Leber Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 1959; 43: 204-8.

Motta P, Porter KR. Structure of Rat Liver Sinusoids and Associated Tissue Spaces as Revealed by Scanning Electron Microscopy. *Cell and Tissue Research* 1974; 148: 111-35.

Motta P. A Scanning Electron Microscopic Study of the Rat Liver Sinusoid. *Cell and Tissue Research* 1975; 164: 371-85.

Muto M. A Scanning Electron Microscopic Study on Endothelial Cells and Kupffer Cells in Rat Liver Sinusoids. *Archives of Histology and Cytology, Japan* 1975; 37: 369-76.

Muto M, Nischi M, Fujita T. Scanning Electron Microscopy of Human Liver Sinusoids. *Archives of Histology and Cytology, Japan* 1977; 40: 137.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Pharmakokinetik. In:

Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, eds.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 2001: 5-61.

Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Mizuno-Horikawa Y, Okuyama N, Taguchi T, Gu J, Taniguchi N, Miyoshi E. Fucosylation of N-Glycans Regulates the Secretion of Hepatic Glycoproteins into Bile Ducts. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 297-308.

Nishikawa Y, Tokusashi Y, Kadohama T, Nishimori H, Ogawa K. Hepatocytic Cells Form Bile Duct-like Structures within a Three-Dimensional Collagen Gel Matrix *Experimental Cell Research* 1996; 223: 357-81.

Nopanitaya W, Grisham JW. Scanning Electron Microscopy of Mouse Intrahepatic Structures. *Experimental and Molecular Pathology* 1975; 23: 441-58.

Nopanitaya W, Carson JL, Grisham JW, Aghajanian JG. New Observations on the Fine Structure of the Liver in Goldfish. *Cell and Tissue Research* 1979; 196: 249-61.

Popper H. Histologic distribution of vitamin A in human organs under normal and under pathologic conditions. *Archiv of Pathology* 1941; 31: 766-73.

Reiche D (2003) Roche Lexikon Medizin. Urban&Schwarzenberg, München

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 1963; 17: 208-12.

Riede UN, Sasse D. Quantitative topography of organelles in the liver. A combined histochemical and morphometric analysis. *Cell and Tissue Research* 1981; 221: 209-20.

Riemann JF, Galle PR, Fischbach W (2011) Gastroenterologie in Klinik und Praxis: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Ringel Y, Sömjen GJ, Konikoff FM, Rosenberg R, Michowitz M, Gilat T. The effects of phospholipid molecular species on cholesterol crystallization in model bile: the influence of phospholipid head groups. *Journal of Hepathology* 1998; 28: 1008-14.

Rodehutsord M, Petry H. Energiehaushalt. In: *Physiologie der Haustiere*. Engelhart W, Breves G, eds.: Enke Verlag
2009: 465-75.

Romeis B. Präparationsmethoden. In: *Mikroskopische Technik*. Mulisch M, Welsch U, eds. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2010a: 39-180.

Romeis B. Färbungen. In: *Mikroskopische Technik*. Mulisch M, Welsch U, eds. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag 2010b: 181-298.

Romeis B. Immunlokalisation. In: *Mikroskopische Technik*. Mulisch M, Welsch U, eds. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2010c: 387-418.

Roth J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochemical Cell Biology* 2011; 136: 117-40.

Rouiller C. Les canalicules biliaires. *Acta Anatomica* 1956; 26: 94-109.

Rüdiger H, Gabius H-J. The Biochemical Basis and Coding Capacity of the Sugar Code. In: *The Sugar Code Fundamentals of Glycosciences*. Gabius HJ, ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2009: 1-14.

Sandemann H, Fuhrmann JP. Physiologische Bedeutung der Leberfunktion. In: *Physiologie der Haustiere*. Engelhart W, Breves G, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2009: 451-64.

Sauer R (1980) Vergleichende Untersuchung zur Ultrastruktur der Lebersinusoide. Tierärztliche Hochschule, Hannover

Schleicher J. Die Leber des Rindes im elektronenmikroskopischen Bild. *Wissenschaftliche*

Zeitung der Karl-Marx-Universität Leipzig 1968; 17: 151-61.

Schnack H, Stockinger L, Wewalka F. Adventitious connective tissue cells in the space of Disse and their relation to fiber formation. *Review of International Hepatology*. 1967; 17: 855-60.

Schnorr B, Kressin M. Entwicklung des Verdauungstrakts. In: *Embryologie der Haustiere*. Schnorr B, Kressin M, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2006: 161-85.

Scholz J (2012) Ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen der Blutzellen des Strausses. In: *Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Fakultät LMU München*

Schummer A, Nickel R. Verdauungsapparat (Apparatus digestorius). In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band II Eingeweide* Frewein J, Gasse H, Leiser R, Roos H, Thomé H, Vollmerhaus B, Waibl H, eds. Stuttgart: Parey Verlag 2004: 15-213.

Schwengberg S (1998) Isolierung und funktionelle Charakterisierung humaner intestinaler Mastzellen. In: *Fachbereich Biologie der Universität Hannover*. Universität Hannover, Hannover

Simionescu N, Simionescu M. Endothelial specific binding sites for permanent plasma macromolecules: albumin binding proteins. In: *Vascular Endothelium, Receptors and Transduction Mechanisms*. Catravas JD, Gillis CN, Ryan US, eds. New York: Plenum Publishing Corporation 1989: 55-66.

Sinowatz F. Die Zelle. In: *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Hees H, Sinowatz F, eds. Köln: Deutscher Ärzteverlag 2006: 35-93.

Sinowatz F. Verdauungskanal und Anhangsorgane. In: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Rüsse I, Sinowatz F, eds. München: Hohnholt GmbH 2008: 318-49.

Soroka CJ, Gist Farquhar M. Characterization of a Novel Heparan Sulfate Proteoglycan

Found in the Extracellular Matrix of Liver Sinusoids and Basement Membranes. *The Journal of Cell Biology* 1991; 113: 1231-41.

Srikrishna G, Panneerselvam K, Westphal V, Abraham V, Ajit Varki A, Freeze H. Two Proteins Modulating Transendothelial Migration of Leukocytes Recognize Novel Carboxylated Glycans on Endothelial Cells. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 4678-88.

Sunaga Y. Über den Einfluss des Futters auf die Fettspeicherungszellen der Kaninchenleber. *Archives of Histology and Cytology, Japan* 1955; 7: 241-9.

Taira K, Mutoh H. Comparative Ultrastructural Study of the Ito Cells in the Liver in Some Reptiles. *Archives of Histology and Cytology, Japan* 1981; 44: 373-84.

Takahashi T. Morphologische Studien über die jahreszeitlichen Veränderungen von Mitochondrien, Glykogen-, Fettgehalt und basophiler Substanz der Fledermausleberzellen, sowie der Fettspeicherungszellen (fat-storing cells). *Archives of Histology and Cytology, Japan* 1959; 17: 343-69.

Takahashi Y, Oya M, Shindo K. Morphologische Studien über die jahreszeitlichen Veränderungen von Mitochondrien, Glykogen- und Fettgehalt der Froschleber nebst Bemerkungen der Fettspeicherungszellen (fat-storing cells). *Archives of Histology and Cytology, Japan* 1957; 12: 87-125.

Thorgeirsson SS, Grisham JW. Hematopoietic Cells as Hepatocyte Stem Cells: A Critical Review of the Evidence. *Hepatology* 2006; 43: 2-8.

Uchiyama Y. Rhythms in morphology and function of hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1990; 5: 321-33.

Uetsuka K, Nishikawa S, Isobe K, Nakayama H. Histopathological Characteristics of Kupffer Cells and Ito cells in the Porcine and Bovine Liver. *Journal of Veterinar Medical Science* 2007; 69: 767-71.

Vanderkerken K, Bouwens L, Wisse E. Characterization of a phenotypically and functionally and distinct subset of large granular lymphocytes (Pit cells) in rat liver sinusoids. *Hepatology* 1990; 12: 70-5.

Volbracht J (2004) Beziehung zwischen klinisch-chemischen Labormessgrößen und pathohistomorphologischen Befunden der Leber bei der Katze. In: *Klinik für kleine Haustiere Tierärztliche Hochschule, Hannover*

Vonnahme FJ, Müller O. A scanning electron microscopic study of the liver of the monkey, *Macacar speciosa*. *Cell and Tissue Research* 1980; 215: 193-205.

Welsch U. Verdauungsorgane. In: *Lehrbuch Histologie*. Welsch U, Deller T, eds. München: Elsevier Urban&Fischer 2011: 337-406.

Wendl J (2012) Follikulogenese und Intermediärfilamente Eine immunhistochemische Studie am Ovar des Rindes mit Verweisen auf Laser-Mikrodissektion und anschließender quantitativer Reverse-Transkriptase PCR. In: *Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität-München*. Ludwig-Maximilian-Universität, München. 99

Wisse E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Ultrastructure Research* 1970; 38: 528-62.

Wisse E, Van T Noordende JM, Van Der Meulen J, Daems WT. The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell and Tissue Research* 1976; 173: 423-31.

Wisse E, De Zanger RB. On the morphology and other aspects of Kupffer cell function: observations and speculations concerning pinocytosis and phagocytosis. In: *The Reticuloendothelial System and the Pathogenesis of Liver Disease*. Liehr H, Grun M, eds. Amsterdam: Elsevier 1980: 3-9.

Wisse E, De Zanger R, Jacobs R. Lobular gradients in endothelial fenestrae and sinusoidal

diameter favour centrolobular exchange processes: A scanning EM Study. In: Sinusoidal Liver Cells. Knook DL, Wisse E, eds. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press 1982:

Wisse E, Geerts A, Bouwens L, Bossuyt Hv, Vanderkerken K, Goethem Fv. Cells of the hepatic sinusoid anno 1988; An attempt to review the IVth International Kupffer Cell Symposium. In: Cells of the Hepatic Sinusoid. Wisse E, Knook DL, Decker K, eds. The Netherland: Kupffer Cell Foundation 1989: 1-9.

Wood RL. Evidence of species differences in the ultrastructure of the hepatic sinusoid. *Zellforschung* 1963; 58: 679-92.

Yokomori H, Oda M, Ogi M, Kamagaya Y, Nakamura M, Ishi H. Hepatocytic sinusoidal endothelial fenestrae express plasma membrane Ca⁺ pump and Ca⁺⁺Mg⁺⁺-ATPase. *Liver* 2000: 458-63.

Yokomori H, Oda M, Ogi M, Kamagaya Y, Tsukada N, Ishii H. Endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 are co-localized in sinusoidal endothelial fenestrae. *Liver* 2001; 21: 198-206.

Yokomori H. New insights into the dynamics of sinusoidal endothelial fenestrae in liver sinusoidal endothelial cells. *Medical Molecular Morphology* 2008; 41: 1-4.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	<i>Probenentnahmestellen auf der Leber A</i>	30
Abb. 2:	<i>Probenentnahmestellen auf den Lebern B-K</i>	32
Abb. 3:	<i>Probenentnahmestellen auf den Lebern B, C, D, G, H und I</i>	48
Abb. 4:	<i>Bausteine und Architektur des Leberparenchyms</i>	53
Abb. 5:	<i>Alcianblau-positive Strukturen des Lebergewebes</i>	54
Abb. 6:	<i>PAS-positive Strukturen des Lebergewebes</i>	56
Abb. 7:	<i>Reihenfolge der verschiedenen Abschnitte des Gallengangssystems</i>	59
Abb. 8:	<i>Reihenfolge der verschiedenen Abschnitte des Gallengangssystems</i>	61
Abb. 9:	<i>Vimentinhaltige Komponenten des Lebergewebes</i>	62
Abb. 10:	<i>Con A-, LCA- und PSA-positive Strukturen der Rinderleber</i>	68
Abb. 11:	<i>PSA-, GSL- und WGA-positive Strukturen der Rinderleber</i>	69
Abb. 12:	<i>WGA- und WGAs-positive Strukturen der Rinderleber</i>	70
Abb. 13:	<i>PHA-E- und L-positive Strukturen der Rinderleber</i>	71
Abb. 14:	<i>Lagebeziehung zwischen Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen</i>	76
Abb. 15:	<i>Bausteine und Architektur des Disse Raums und Sinusoidlumens</i>	77
Abb. 16:	<i>von Kupffer Zelle und Gallengangsepithelzelle</i>	78

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	<i>Vergleich zwischen den Poren des portalen und zentralen Sinusendothels.....</i>	<i>7</i>
Tabelle 2:	<i>Siebplattenporen und Fenestrationsen im Speziesvergleich.....</i>	<i>8</i>
Tabelle 3:	<i>Morphometrische Daten von Pit-Zell Granula</i>	<i>13</i>
Tabelle 4:	<i>Quantitative Daten von Pit-Zellen der Ratte.....</i>	<i>14</i>
Tabelle 5:	<i>Vergleich des Granulavorkommens der verschiedenen LGL-Klassen.....</i>	<i>14</i>
Tabelle 6:	<i>Morphometrischer Vergleich der verschiedenen LGL-Klassen.....</i>	<i>15</i>
Tabelle 7:	<i>Vergleich der portalen und zentralen Sinusoide</i>	<i>18</i>
Tabelle 8:	<i>Wichtige, v.a. periportal bzw. zentrolobulär ablaufende Stoffwechselwege....</i>	<i>20</i>
Tabelle 9:	<i>Tierdaten.....</i>	<i>29</i>
Tabelle 10:	<i>Probenentnahmestellen auf der Leber A</i>	<i>31</i>
Tabelle 11:	<i>Probenentnahmestellen auf den Lebern B-K.....</i>	<i>32</i>
Tabelle 12:	<i>Stationen der Alkoholreihe des Einbettungsautomaten.....</i>	<i>35</i>
Tabelle 13:	<i>Stationen der Alkoholreihe des Einbettungsautomaten.....</i>	<i>35</i>
Tabelle 14:	<i>Labortechnische Daten der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper....</i>	<i>41</i>
Tabelle 15:	<i>Klassifizierung und Herkunft der verwendeten Lektine</i>	<i>27</i>
Tabelle 16:	<i>Hemmsuckerlösungen zur Prüfung der Zuckerspezifität der Lektine.....</i>	<i>46</i>
Tabelle 17:	<i>Probenentnahmestellen auf den Lebern B, C, D, G, H und I.....</i>	<i>48</i>
Tabelle 18:	<i>Zytokeratine der verschiedenen Abschnitte des Gallengangssystems.....</i>	<i>59</i>
Tabelle 19:	<i>Verbreitung von Vimentin im Bindegewebe und den Endothelien der Leber... </i>	<i>62</i>
Tabelle 20:	<i>Bindungsverhalten verschiedener Lektine in der Rinderleber</i>	<i>67</i>

XI. ANHANG

1. Lösungen für die Lichtmikroskopie

1.1. Fixierungsmittel

Bouin- Lösung:

- Gesättigte wässrige Pikrinsäure¹ (filtriert) 375 ml
- 37% Formaldehyd¹ 125 ml
- 100% Essigsäure² 25 ml

3,7% Formol:

- DEPC-Wasser (2 l Aqua dest. +1,5 ml DEPC² (Diethylpyrocarbonat + Autoklavierung) 567 ml
- PBS-10x Konzentrat (Phosphate Buffered Saline Solution)¹ 63 ml
- 37% Formaldehyd 70 ml

1.2. Lösungen für histologische Färbungen

1.2.1. Hämalaun-Eosin (HE) nach Meier

Hämalaun:

- Hämatoxilin¹ 2 g
- Natriumjodat⁵ 0,4 g
- Kalialaun p.A.⁴ 100 g
- Chloralhydrat⁴ 100 g
- Zitronensäure krist.⁷ 2 g
- ad Aqua dest. 2 l

Eosin:

1% Stammlösung:

- Eosin¹ 2 g
- ad Aqua dest. 198 ml
- 37% Formaldehyd 5 Tropfen

Verdünnung für Färbung (1 l Färbelösung):

- Stammlösung 100 ml
- ad Aqua dest. 900 ml

100% Essigsäure 5 Tropfen/100 ml Verdünnung

1.2.2. Trichromfärbung nach Masson und Goldner

Eisenhämatoxylin nach Weigert:

- Lösung A:
 - Hämatoxylin 1 g
 - 96% Ethanol 100 ml
 - eine Woche reifen lassen
- Lösung B:
 - Eisen-(III)-chlorid 4 2,48 g
 - Aqua dest. 100 ml
 - Salzsäure konz. 4 1 ml
- Lösung A mit Lösung B im Verhältnis 1:1 mischen

Azophloxinlösung:

- Azophloxin 1 0,5 g
- Aqua dest. 100 ml
- 100% Essigsäure 0,2 ml

1% Essigsäure:

- 100% Essigsäure 10 ml
- ad Aqua dest. 1 l

Phosphormolybdänsäure-Orange:

- Phosphormolybdänsäure 4 4 g
- Aqua dest. 100 ml
- Orange G 4 2 g

Lichtgrün:

- Lichtgrün 4 0,2 g
- Aqua dest. 100 ml

- 100% Essigsäure 0,2 ml

1.2.3. Alcianblau

Alcianblau pH 2,5:

- Alcianblau⁴ 1 g
- ad 3% Essigsäure 100 ml
- pH Einstellung und Filtration
- Thymol krist.⁴ 0,5 g

Alcianblau pH 1,0:

- Alcianblau 1 g
- ad 0,1N Salzsäure⁷ 100 ml
- pH Einstellung und Filtration
- Thymol⁴ 0,5 g

3% Essigsäure:

- Essigsäure 100% 30 ml
- ad Aqua dest. 1 l

Kernechtrot¹

1.2.4. PAS-Reaktion nach Mc Manus

α -Amylase 0,5% :

- α -Amylase⁴ 10 mg
- ad Aqua dest. 2 ml

0,5% wässrige Perjodsäure:

- Perjodsäure⁴ 1 g
- Aqua dest. 200 ml

Schiff'sches Reagenz⁴

SO₂-Wasser:

- N-Salzsäure: Salzsäure konz. 3 ml
- Aqua dest. 27 ml
- 10% Natriumpyrosulfitlösung: Natriumpyrosulfit⁴ 3,003 g

- Aqua dest. 30 ml
- Leitungswasser 600 ml

Hämalaun

2. Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen

PBS (Phosphate- Buffered- Saline- Solution) (pH: 7,4):

- Natriumchlorid 42,5 g
- Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat 6,35 g
- Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Monohydrat 1,95 g
- ad Aqua dest. 5 l

7,5% Hydrogenperoxidlösung:

- 30% Hydrogenperoxidlösung 50 ml
- Aqua dest. 150 ml

Protein Block Serum Free with Background reducing components¹

StreptAB-Complex¹

DAB-Hydrogenperoxidlösung:

- DAB-Lösung:
 - DAB-Tabletten 1 (10 mg) 6 Stück
 - ad Aqua dest. 60 ml
 - abgedunkelt auf Magnetrührer auflösen und filtrieren (unter Abzug!)
- Hydrogenperoxidlösung:
- PBS (pH 7,4) 5 ml
 - Hydrogenperoxidlösung 30% 15 µl
 - 400 µl Hydrogenperoxidlösung mit 60 ml DAB-Lösung mischen

3. Lösungen für die glykohistochemischen Untersuchungen

Fluoreszenzfarbstoffe und Eindeckmedien

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-Verdünnung:

- DAPI-Verdünnung 1 (1 µg/µl) 1 µl

- ad PBS pH 7,4 1 ml

4. Lösungen für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

4.1. Fixierungsmittel

Fixierungslösung nach Karnovsky:

- Karnovsky-Stammlösung (siehe unten) 8 ml
- Glutaraldehyd 25% 1 1,37 ml
- erst kurz vor Gebrauch mischen

Karnovsky-Stammlösung:

- 10% Paraformaldehydlösung (siehe unten) 20 ml
- Cacodylat-Puffer, 0,2M (pH 7,2) 50 ml
- Kalziumchlorid (wasserfrei) 1 0,05 g

10% Paraformaldehydlösung:

- Paraformaldehyd 10 g
- ad Aqua dest. 100 ml
- Natriumhydroxid 41M bis zu 6 Tropfen

4.2. Puffer

Cacodylat-Puffer 0,2M (pH 7, 2):

- Lösung A 50ml:
 - Sodium cacodylate $13(\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ 8,56 g
 - ad Aqua dest. 200 ml
- Lösung B 100ml:
 - Aqua dest 100 ml
 - Salzsäure 0,2M pH einstellen

Cacodylat-Puffer 0,1M (pH 7,2):

- Cacodylat-Puffer 0,2M (pH 7,2) siehe oben 50 ml
- Aqua dest. 50 ml

4.3. Kontrastierungslösungen

2% Osmiumtetroxid-Lösung

- 4% Osmiumtetroxid 2 ml
- Cacodylat-Puffer 0,1M 2 ml

3% Kaliumferrocyanid- Lösung:

- Kaliumferrocyanid 0,3 g
- ad Cacodylat-Puffer 0,1M 10 ml

1% Osmiumtetroxid-1,5% Kaliumferrocyanid in Cacodylat-Puffer 0,1M:

- 2% Osmiumtetroxid-Lösung 4 ml
- 3% Kaliumferrocyanid-Lösung 4 ml

4.4. Einbettmedien

Propylenoxid¹⁵

Epon:

- Poly/ bed 81215 (1,2,3-Propanetriol, polymer with (Chloromethyl) oxirane) 20 ml
- DDSA15 (Dodecyl succinic Anhydride) 16 ml
- NMA15 (Nadic Methyl Anhydride) 10 ml
- BDMA15 (N,N-Benzyl dimethylamine) 1,4 ml

4.5. Färbelösungen

Methylenblau nach Richardson:

- Lösung A 100ml:
 - Methylenblau 1 g
 - 1% Borax 14 (Natriumtetraboratdecahydrat)-Lösung
- Lösung B 100ml
 - Azur II 1 g
 - ad Aqua dest. 100 ml

4.6. Nachkontrastierungsmedien

Uranylacetat¹³ (gesättigte Lösung)

Bleicitratlösung nach REYNOLDS (1963):

- Natriumcitrat Stock 3ml:

- Natriumcitrat⁴ $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$ 35,7 g
- ad Aqua dest. 100 ml
- Bleinitrat Stock 2ml:
 - Bleinitrat⁴ $(\text{Pb}(\text{NO}_3)_2)$ 33,1 g
 - ad Aqua dest. 100 ml
- Natriumhydroxid⁴ 1M tropfenweise zugeben bis Lösung klar

1 Fluka Chemie GmbH, Steinheim

2 Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

4 Merck, Darmstadt

5 Riedel- de Haën AG, Seelze- Hannover

6 Herstellung: Apotheke der klinischen Universitäts- Anstalten München

7 Sigma Chemical Company, St. Louis, USA

8 Dako, Hamburg

9 Dako, Glostrup, Dänemark

10 Kem- En- Tec Diagnostics, Taastrup, Dänemark

11 Roche, Mannheim

12 Agar Scientific LTD, Essex, England

13 Serva, Heidelberg

14 Polysciences Inc., Warrington, USA

15 Grübler, Stuttgart- Untertürkheim

XII. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz für die Überlassung meines Doktorarbeitsthemas und die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Ferner gilt mein Dank dem Laborpersonal des Lehrstuhls für die Unterstützung bei der Durchführung des praktischen Teils meiner Arbeit, wobei ich insbesondere Frau Scholz und Frau Neumüller für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate Dank sagen möchte.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Felix Habermann für die zu jeder Zeit äußerst freundliche, umfangreiche und kompetente Hilfe bei allen Fragen zur Textverarbeitung bedanken.