

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

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

**Histologische, immunhistochemische und ultrastrukturelle
Untersuchungen an der Nebenniere des Afrikanischen
Straußes (*Struthio camelus*) unter besonderer
Berücksichtigung der Interrenalzellen**

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

von Nadja Kunkel
aus Offenbach am Main

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

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

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Für Oma, Mutti und Martin

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Die Nebenniere des Vogels.....	2
1.1.	Allgemeine und topographische Anatomie	2
1.2.	Histologie	4
1.2.1.	Mikroskopische Anatomie der Interrenalzellen	5
1.2.2.	Mikroskopische Anatomie der Adrenalzellen.....	6
1.2.3.	Embryologie	7
1.2.3.1.	Entwicklung der Interrenalzellen	7
1.2.3.2.	Entwicklung der Adrenalzellen.....	8
1.2.3.3.	Entwicklung der Nebennierenkapsel.....	8
1.2.4.	Physiologie	9
1.2.4.1.	Hormone der Interrenalzellen.....	9
1.2.4.2.	Synthese und Regulation der Steroidhormone	10
1.2.4.3.	Hormone der Adrenalzellen	13
1.3.	Immunhistochemie	14
1.3.1.	Grundlagen immunhistochemischer Untersuchungen	14
1.3.2.	Zytoskelett.....	15
1.3.2.1.	Zytoskelettale Marker	18
1.3.2.1.1.	Smooth Muscle Actin.....	18
1.3.2.1.2.	Non-Muscle Myosin.....	19
1.3.2.1.3.	Vimentin.....	19
1.3.2.1.4.	Pancytokeratin.....	19
1.3.2.1.5.	Tubulin	20
1.3.3.	Marker für neuronale Elemente.....	20
1.3.3.1.	S100.....	20
1.3.3.2.	Neuronspezifische Enolase	20
III.	MATERIAL UND METHODEN	22
1.	Untersuchungsmaterial.....	22
2.	Probenentnahme, Fixierung und Probenverarbeitung.....	24
2.1.	Probenentnahme	24

2.2.	Fixierung für lichtmikroskopische Untersuchungen	25
2.3.	Probenverarbeitung	25
2.4.	Fixierung und Probenverarbeitung der Gefrierproben	26
2.5.	Fixierung und Probenverarbeitung für elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	27
3.	Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen.....	29
3.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer	29
3.2.	Trichromfärbung nach Masson Goldner	30
3.3.	Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung.....	30
3.4.	Alcianblau-Färbung.....	31
3.5.	Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus	31
3.6.	Histomorphometrie.....	32
4.	Immunhistochemische Färbungen.....	33
4.1.	Gefrierschnitte	36
IV.	ERGEBNISSE	37
1.	Makroskopische Untersuchungen an der Nebenniere.....	37
2.	Lichtmikroskopische Untersuchungen an der Nebenniere	39
2.1.	Übersichtsfärbungen.....	39
2.1.1.	Adrenalzellen	39
2.1.2.	Interrenalzellen.....	40
2.1.3.	Morphometrische Untersuchungen	51
2.1.4.	Substrathistochemie	55
2.1.4.1.	Alcianblau-Färbung.....	55
2.1.4.2.	PAS-Reaktion mit und ohne Amylaseverdau.....	57
2.2.	Immunhistochemische Untersuchungen an der Nebenniere.....	59
2.2.1.	Immunhistochemischer Nachweis von Smooth Muscle Actin	59
2.2.2.	Immunhistochemischer Nachweis von Non-Muscle Myosin	62
2.2.3.	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin	65
2.2.4.	Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin.....	68
2.2.5.	Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin.....	72
2.2.6.	Immunhistochemischer Nachweis von S100	75
2.2.7.	Immunhistochemischer Nachweis von neuronaler Enolase.....	79
2.3.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Nebenniere	82

2.3.1.	Interrenalzellen.....	82
2.3.2.	Übergang Interrenalzellen Adrenalzellen.....	93
V.	DISKUSSION	95
1.	Konventionelle Lichtmikroskopie.....	95
2.	Immunhistochemie	101
3.	Transmissionselektronenmikroskopie.....	106
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	110
VII.	SUMMARY.....	112
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	114
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	125
X.	TABELLENVERZEICHNIS	128
XI.	ANHANG	129
1.	Lösungen für die Lichtmikroskopie	129
1.1.	Fixierungslösungen	129
1.2.	Histologische Färbelösungen	130
1.2.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer	130
1.2.2.	Resorcinfuchin-van Gieson-Färbung	131
1.2.3.	Trichromfärbung nach Masson und Goldner	132
1.2.4.	Alcianblau-Färbung.....	133
1.2.5.	PAS-Reaktion nach Mc Manus	134
1.3.	Alkohole	135
2.	Lösungen für die Immunhistochemie.....	135
3.	Lösungen für die Elektronenmikroskopie	138
3.1.	Fixierlösung nach Karnovsky.....	138
3.2.	Cacodylat-Puffer	138
3.3.	Kontrastierungslösungen	139
3.4.	Einbettmedien.....	140
3.5.	Färbelösungen	140
3.6.	Nachkontrastierungsmedien	141
XII.	DANKSAGUNG	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Signifikanzniveau	mm	Millimeter
A	Aceton	Min.	Minute
A.	Arteria	ml	Milliliter
Abb.	Abbildung	N.	Nervus
ABC	Avidin-Biotin-Komplex	nm	Nanometer
abs.	absolut	N. N.	Nomen nominandum
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym	NMM	Non-Muscle Myosin
ACTH	Adenocorticotropes Hormon	NSE	Neuronspezifische Enolase
ad.	auffüllen auf	OT	Objektträger
A. dest.	Aqua destillata	P	Perineurium
ANOVA	Analysis of variance	p	Probability
Az	Adrenalzellen	PAS	Periodic acid Schiff
biot.	biotinyliert	PBS	Phosphate Buffered Saline
ca.	circa	PS	Paraffinschnitte
cm	Zentimeter	PZ	Periphere Zone
E	Endoneurium	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
EM	Elektronenmikroskopie	RT	Raumtemperatur
ER	Endoplasmatisches Retikulum	S	Sinusoid
EtOH	Ethanol	SB	scale bar
Fa.	Firma	sec.	Sekunde
F	Formalin	SMA	Smooth Muscle Actin
°C	Grad Celsius	St.	Stück
g	Gramm	SKZ	Subkapsuläre Zone
GF	Gefrierschnitte	Tab.	Tabelle
H.E.	Hämatoxylin-Eosin	T	Temperatur
HEV	high endothelial venule	TH	Tyrosinhydroxylase
HRP	Horseradish peroxidase	Tr.	Tropfen
HSD	Honestly significant difference	V.	Vena
IgG	Immunglobulin G	Va.	Vakuole
IHC	Immunhistochemie	Vv.	Venae
IP ₃	Inositoltrisphosphat	w.	weiblich
IZ	Innere Zone	z.B.	zum Beispiel
Iz	Interrenalzellen	ZZ	Zentrale Zone
K	Kapsel		
kDa	Kilo-Dalton		
kg	Kilogramm		
KGW	Körpergewicht		
krist.	kristallin		
L	Lipidtröpfchen		
l	Liter		
LM	Lichtmikroskopie		
m	Männlich		
M	Methanol		
μ l	Mikroliter		
μ m	Mikrometer		

I. EINLEITUNG

Die Nebenniere ist als endokrine Drüse an vielen wichtigen metabolischen Prozessen beteiligt. In der Nebennierenrinde werden einerseits Steroidhormone wie Mineral- und Glukokortikoide sowie Androgene synthetisiert, im Nebennierenmark hingegen werden die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin produziert.

Sie ist vor allem in der klinischen Tiermedizin von Interesse, in der es der Tierarzt mit Hyper- oder Hypoadrenokortizismus zu tun hat. Insbesondere bei Hund, Katze oder Pferd spielen diese Stoffwechsellbalancen eine wesentliche Rolle.

Der Strauß erfährt in der Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung, da er als Nutztier von wirtschaftlichem Interesse ist. Sein Fleisch und das aus seiner Haut erzeugte Leder sind hochpreisige Luxusgüter. Seinen Federn und Eiern kommt eine eher untergeordnete Rolle zu, sie dienen hauptsächlich zu Dekorationszwecken. Der Strauß wird auf speziellen Straußenfarmen gezüchtet und auch als Zootier gehalten. Als größter lebender Laufvogel stellt er mit seiner imposanten Erscheinung eine Besucherattraktion dar.

Über die Nebenniere verschiedener Vogelarten liegen bereits eingehendere Untersuchungen vor, allerdings kaum eine über die des Straußes. Ziel meiner Arbeit ist es die Straußennebnieren mit modernen morphologischen Methoden zu charakterisieren.



Abb. 1 Afrikanischer Strauß (*Struthio camelus*)

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Nebenniere des Vogels

1.1. Allgemeine und topographische Anatomie

Die Nebenniere (Glandula adrenalalis seu suprarenalis) der Vögel unterscheidet sich in ihrem Aufbau von dem der Säugernebnieren. Während beim Haussäugetier und beim Mensch die Nebenniere in eine äußere Zone, die Nebennierenrinde (Cortex adrenalalis) und eine innere Zone, das Nebennierenmark (Medulla adrenalalis) unterteilt ist, ist diese Zonierung beim Vogel nicht vorzufinden. Dem Nebennierenmark entsprechen beim Vogel funktionell die Adrenalzellen, der Nebennierenrinde die Interrenalzellen, die nebeneinander in direktem Kontakt zueinander liegen (KÖNIG et al., 2009).

Die paarigen Nebennieren des Vogels liegen beiderseits der Aorta descendens craniomedial der Nieren, dorsal der Gonaden und caudal der Lunge (NICKEL et al., 2004; KÖNIG et al., 2009). Ihre Form ist bei den verschiedenen Vogelarten unterschiedlich. Häufig weist sie die einer dreiseitigen Pyramide auf. Bei Huhn und Taube ist die rechte Nebenniere pyramidenförmig, die linke hingegen ovoid und platt (NICKEL et al., 2004). Beim Strauß ist die rechte Nebenniere ebenfalls dreieckig und die linke von länglicher Gestalt (TANG et al., 2009). Sie stehen in enger Lagebeziehung zueinander und können bei einigen Spezies sogar verschmelzen (HARTMAN & BROWNELL, 1949; CARSIA & HARVEY, 2000).

Ihre Farbe variiert von gelb über grau-gelb bis rötlich-gelb zu braun-gelb (NICKEL et al., 2004; KÖNIG et al., 2009). Ihre Größe erreicht beim adulten Haushuhn 13 x 8 x 4,5 mm (MÜLLER, 1929) und bei der Ente 7 x 4,5 x 3,5 mm (NICKEL et al., 2004). Beim Strauß weist die linke Nebenniere eine Größe von ca. 60 x 10 mm, die rechte Nebenniere eine Länge von ca. 30 mm auf (DEEMING, 1999).

Die arterielle Blutversorgung der Vogelnebnieren erfolgt insbesondere beim Huhn über die A. renalis cranialis und teilweise über Rami, die direkt der Aorta descendens entspringen. Beide Nebennieren leiten das Blut über Vv. adrenales in die V. cava caudalis (CARSIA & HARVEY, 2000; NICKEL et al., 2004).

Beim Huhn werden beide Nebennieren außerdem von je ein bis zwei Lymphgefäßen drainiert (CARSIA & HARVEY, 2000; DE MATOS, 2008).

Die Innervation der Vogelnebenniere erfolgt über ein dichtes Netz aus vegetativen Nerven. Sie nehmen ihren Ursprung vom Ganglion adrenale craniale und Ganglion adrenale caudale, die eingebettet in der bindegewebigen Nebennierenkapsel liegen oder teilweise in das Drüsengewebe hineinziehen. Beide Ganglien sind durch präganglionäre sympathische Fasern mit den Thorakalganglien fünf bis sieben und den Sympakralganglien eins bis zwei des Grenzstrangs verbunden (FREEDMAN, 1968). Die Innervation des Nebennierenparenchyms erfolgt durch die die Ganglien verlassenden marklosen cholinergen Fasern, die in die Zellbündel der Adrenalzellen ziehen (UNSICKER, 1973). Sympathische noradrenerge postganglionäre Fasern innervieren hingegen die adrenalen Blutgefäße und vermutlich ebenso die Adrenalzellen der Nebenniere (UNSICKER, 1973). Die Interrenalzellen werden im Gegensatz zu den Nebennierenmarkzellen nur von wenigen cholinergen und p-Typ Fasern versorgt. Die p-Typ Fasern ziehen außerdem noch in die Basallamina, die die Interrenalzellen umgibt (UNSICKER, 1973). Andere Autoren hingegen beschreiben, dass nur die Adrenalzellen mit Sicherheit von marklosen Nervenfasern versorgt werden (NICKEL et al., 2004).

1.2. Histologie

Die Nebenniere der Vögel besteht aus ineinander verwobenen Interrenal- und Adrenalzellen (Abb. 2). Letztere werden auch häufig wegen ihrer Anfärbbarkeit mit Chromsalzen als chromaffine Zellen bezeichnet. Die Gesamtheit der beiden Gewebe werden auch als Interrenalkörper und Adrenalkörper beschrieben (MÜLLER, 1929). Außen wird die Nebenniere von einer starken bindegewebigen Kapsel umgeben, von der aus Septen, die Gefäße und Nerven enthalten, radiär ins Innere des Organs ziehen (SINOWATZ & HEES, 2006).

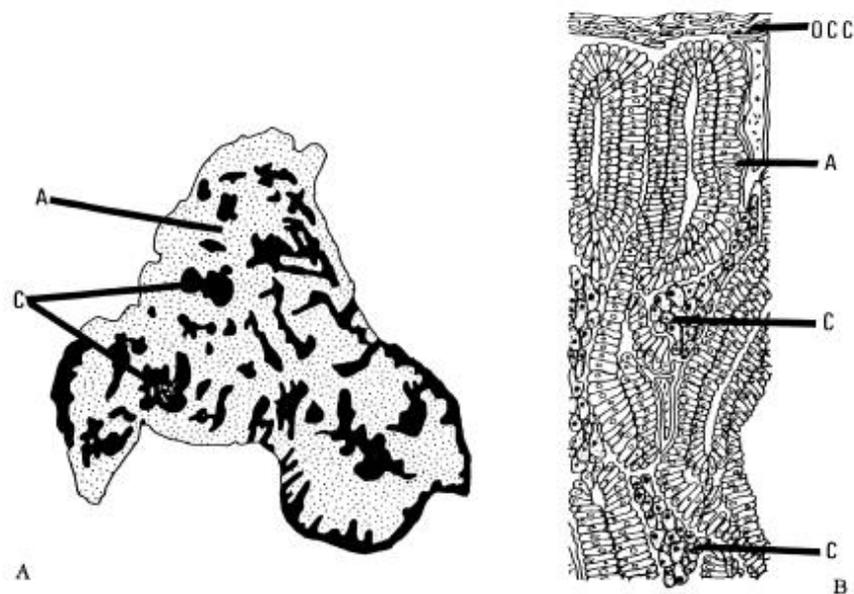


Abb. 2 Mikroskopische Anatomie einer typischen Vogelnebenniere am Beispiel der Wachtel modifiziert nach Chester & Phillips (CHESTER & PHILLIPS, 1986)

- A Verteilung von Interrenalzellen (A) und Adrenalzellen (C)
- B Struktur der schleifenförmigen Interrenalzellreihen (A) mit durchmischten Adrenalzellinseln (C), umgeben von einer bindegewebigen Kapsel (OCC)

1.2.1. Mikroskopische Anatomie der Interrenalzellen

Die Zellen des Interrenalkörpers sind strangartig in Doppelreihen angeordnet. Sie sind iso- bis hochprismatisch mit azidophilem Zytoplasma. Im Querschnitt haben sie vor allem im Zentrum die Form von Rosetten und ähneln daher Drüsenanschnitten. In den subkapsulären oder peripheren Zonen formieren sie sich zu Knäueln zusammen. Der Grad der Knäuelbildung kann bei den verschiedenen Vogelarten sehr unterschiedlich ausgebildet sein (BHATTACHARYYA et al., 1972). Man kann bei den einzelnen Vogelarten eine schmale subkapsuläre Zone, die der Zona glomerulosa bei Säugern ähnelt und eine zentrale, innere Zone, die das Analogon zur Zona fascicularis darstellt, unterscheiden. Diese Anordnung ist bei den untersuchten Vogelarten beim Wellensittich und Flamingo am ausgeprägtesten, etwas weniger deutlich bei der Wachtel feststellbar, während die Gliederung bei der Taube nur noch schwach und beim Huhn gar nicht mehr auffindbar ist (BHATTACHARYYA et al., 1972). Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Müller (1929) bei Huhn und Taube überein (MÜLLER, 1929). Müller (1929) berichtet weiterhin von einer altersabhängigen Gliederung, genauso wie andere Autoren bei der Japanischen Wachtel (BASHA et al., 2009). Ebenso wird von solch einer Unterteilung des Interrenalgewebes in eine subkapsuläre, periphere, äußere und zentrale, innere Zone bei Enten und Gänsen (HASSAN, 1975), beim Huhn (HODGES, 1974; HUMAYUN et al., 2012), bei Taube und Spatz (BHUJLE & NADKARNI, 1980), bei der Wachtel (BASHA et al., 2004) und auch beim juvenilen Strauß (TANG et al., 2009) berichtet. Lediglich der Braune Pelikan bildet hier eine Ausnahme. Bei ihm ist eine Zonierung ähnlich der Säugernebeniere erkennbar. Allerdings nimmt die Zona reticularis nahezu das gesamte Zentrum der Nebeniere ein und ist damit sehr breit, die Zona fasciculata hingegen relativ gesehen sehr viel kleiner als bei den Säugern (KNOUFF & HARTMAN, 1951). Die Interrenalzellen in der Peripherie sind eher groß, weisen zwei Nucleoli und viele Lipidtröpfchen auf, wohingegen zentral gelegene Zellen eher klein und gestreckt erscheinen und weniger Lipidtröpfchen enthalten (HARTMAN & BROWNELL, 1949; CHESTER & PHILLIPS, 1986).

Elektronenmikroskopisch weist das Interrenalgewebe eine Zellorganellausstattung, wie sie typisch ist für Steroidhormone produzierende Zellen, auf. So finden sich etwa Mitochondrien vom Tubulustyp, viele

Lipidvakuolen und viele Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums. Dabei lässt sich eine polare Ausrichtung erkennen. Der Hauptanteil der Mitochondrien, des glatten ER und der Lipidtröpfchen sind im basalen an die Basalmembran grenzenden Zellteil zu finden, der Golgi-Apparat hingegen ist im supranukleären Zytoplasma am apikalen Pol der Zellen zu finden (NICKEL et al., 2004).

1.2.2. Mikroskopische Anatomie der Adrenalzellen

Die Adrenalzellen kommen als kleine Stränge oder Zellbündel zwischen den Interrenalzellen zum Liegen. Ihre Verteilung ist abhängig vom relativen Anteil der Adrenalzellen am Gesamtparenchym. Ist ihr Anteil gering, so liegen sie inselartig zwischen den Strängen der Interrenalzellen. Dies ist etwa beim Pelikan der Fall (HODGES, 1981). Ist ihr Anteil hingegen höher, wie beispielsweise bei der Wachtel, so bilden sich Zellbündel, die ein anastomosierendes Netzwerk bilden können. Bei Vogelarten, bei denen der Anteil des Adrenalkörpers besonders ausgeprägt ist, lässt sich direkt im subkapsulären Bereich ein unterbrochenes Netzwerk dieser Zellen erkennen. Hierdurch kommen die Zellen des Interrenalkörpers kaum mit der Organkapsel in direkten Kontakt (NICKEL et al., 2004).

Bei den Adrenalzellen handelt es sich um große Zellen mit polygonalem Zytoplasma. Dieses ist stark basophil und enthält zahlreiche kleine Granula. Ihr im Zentrum der Zelle gelegener Zellkern ist groß und rund (NICKEL et al., 2004). Wegen ihrer Anfärbbarkeit mit Chromsalzen (Kaliumbichromatlösung), bei der es zu einer starken Braunfärbung kommt, werden diese Zellen auch als Chromaffinzellen bezeichnet. Die Reaktion beruht auf der Oxidation der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin (SINOWATZ & HEES, 2006). Die Adrenalkörper liegen häufig in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen. Dabei handelt es sich insbesondere um kapilläre Sinusoide mit gefenstertem Endothel, aber auch kleine und größere Venen (SINOWATZ & HEES, 2006).

Elektronenmikroskopisch sind zahlreiche Granula im Zellinneren erkennbar. Aufgrund ihrer Ultrastruktur kann man adrenalin- und noradrenalin-speichernde Zellen unterscheiden. Die adrenalinhaltigen Granula sind kleiner mit einer Größe von 168 nm und zeigen einen dichten, feinkörnigen Inhalt, der jedes Granulum ausfüllt. Die Noradrenalin enthaltenden Granula dagegen sind ungefähr 224 nm

groß und besitzen einen dichten zentralen Bereich, der von einem hellen Hof umgeben wird (GHOSH, 1977). Nicht bei allen Vögeln lassen sich beide Adrenalzellarten eindeutig unterscheiden.

1.2.3. Embryologie

Die Nebenniere entsteht aus zwei unterschiedlichen Anlagen. Die Nebennierenrinde hat ihren Ursprung im Mesoderm in einer Ausbuchtung des Zölomepithels medial der Urniere, das Nebennierenmark hingegen ist ektodermaler Herkunft und entwickelt sich aus der Neuralleiste (MICHEL, 1995; SCHNORR, 1996; SINOWATZ & HEES, 2006).

Phylogenetisch sind bei den Fischen Rinde und Mark noch vollständig separiert, bei den Amphibien lagern sie sich bereits aneinander an, wohingegen sie sich bei den Vögeln gegenseitig durchdringen. Erst bei den Säugetieren umschließt die Nebennierenrinde das Nebennierenmark vollständig (MICHEL, 1995).

1.2.3.1. Entwicklung der Interrenalzellen

Bereits frühzeitig ist die Anlage der Nebennierenrinde zu erkennen. Sie entsteht durch Proliferation des Zölomepithels (SCHNORR, 1996). Die weitere Entwicklung geht beim Säugetier mit der Ausdifferenzierung der drei unterschiedlichen Zonen der Nebennierenrinde einher (MICHEL, 1995).

Bei der Bebrütung von Hühnerembryonen sind bereits nach 96 Stunden Zellen erkennbar, die sich aus dem peritonealen Epithel differenzieren und die später die kortikale Substanz formen. Ungefähr neun Stunden später formieren sie sich durch Aufreihung entlang des Zölomepithels und bilden einen soliden Körper zu beiden Seiten des Mesenteriums. Nach 120 Stunden der Inkubation lösen sie sich ab und migrieren als Zellgruppen dorsal. In den weiteren Stunden legen sie an Masse zu, sammeln sich in größeren Gruppen an, um schließlich als große, ovale Massen beiderseits der Aorta zum Liegen zu kommen. Nach ungefähr 192 Stunden Bebrütungszeit weisen die Zellbündel eine Länge von ca. 2 mm auf (HAYS, 1914). Ab etwa dem 10. Inkubationstag lassen die kortikalen Zellen bereits eine sekretorische Aktivität erkennen (SIVARAM, 1968).

1.2.3.2. Entwicklung der Adrenalzellen

Die aus der Neuralleiste wandernden Markzellen durchdringen das bereits angelegte kortikale Gewebe und bilden das Nebennierenmark. In ihrer Gesamtheit stellen die chromaffinen Zellen ein sympathisches Paraganglion dar (MICHEL, 1995; SCHNORR, 1996; RÜSSE, 1991).

Nach 120 Stunden der Bebrütung migrieren große, ovale Zellen ventral des sympathischen Strangs zu beiden Seiten der Aorta. Eine erste Verbindung zwischen dem paravertebralen sympathischen Plexus und der chromaffinen Substanz ist ca. zehn Stunden später mit Sicherheit erkennbar. Zu dieser Zeit haben sich die Zellen in großen, kompakten Massen arrangiert und zeigen eine deutliche äußere Grenze. Nach ca. 168 Stunden der Inkubation beginnen die Zellen sich zu differenzieren. Weitere 24 Stunden später haben sie weiter an Größe gewonnen und arrangieren sich zu Schnüren und Reihen (HAYS, 1914).

Einen weiteren Tag später und somit ca. 216 Stunden nach Beginn der Bebrütung, sind die charakteristischen Merkmale der beiden Gewebe ausgebildet und sie gewinnen weiterhin noch an Volumen und Größe (HAYS, 1914).

Die erste Katecholaminsynthese der Hormone Adrenalin und Noradrenalin findet ca. am 11. Tag nach Inkubation statt (SIVARAM, 1968).

Bei den Haussäugetieren setzt die Funktion der Nebenniere im letzten Trächtigkeitsdrittel ein, die Cortisolsynthese beginnt hingegen erst mit der Geburt (MICHEL, 1995).

1.2.3.3. Entwicklung der Nebennierenkapsel

Die Entwicklung der Nebennierenkapsel geht nur langsam von statten. Erst 168 Stunden nach Beginn der Inkubation formiert sich Bindegewebe um die Drüse herum. Nach ca. 17 Tagen hat sich eine dichte Kapsel um jede der beiden Nebennieren gebildet. Ihre Fasern dringen in das Drüsenparenchym ein und umgeben die Kortikalzellen (HAYS, 1914).

1.2.4. Physiologie

1.2.4.1. Hormone der Interrenalzellen

Corticosteron reguliert wichtige Stoffwechselfvorgänge im Kohlenhydrat-, Lipid- und Elektrolytmetabolismus der Vögel. Der Elektrolytstoffwechsel wird hauptsächlich durch Aldosteron gesteuert, aber auch Corticosteron spielt eine gewisse Rolle (HESS, 2002; NICKEL et al., 2004). Die Hauptfunktion der aviären Interrenalzellen ist die Produktion von Glucocorticoiden und Mineralocorticoiden, wobei Corticosteron das Hauptsekretionsprodukt der Nebenniere bei adulten Vögeln darstellt (ROSSKOPF & WOERPEL, 1996; CARSIA & HARVEY, 2000). Im Gegensatz dazu synthetisiert die Säugernebeniere 3-4 mal mehr Cortisol als Corticosteron (ROSSKOPF & WOERPEL, 1996). Das Mineralocorticoid Aldosteron wird nur in geringem Maß bei Vögeln produziert. Das durchschnittliche Verhältnis des basal zirkulierenden Aldosterons gegenüber Corticosteron beträgt bei erwachsenen Vögeln ca. 1:100. Während der embryonalen und pränatalen Phase synthetisiert die Vogelnebeniere auch signifikante Mengen anderer Corticosteroide wie beispielsweise Cortisol und Cortison ebenso wie die Sexualsteroid Testosteron und Östradiol (FREEMAN, 1983; CARSIA & HARVEY, 2000). Im Embryonalstadium stellen die Nebennieren sogar eine wichtigere Testosteronquelle als die Hoden oder die Ovarien dar (FREEMAN, 1983). Die Synthese dieser Steroide wird allerdings nach dem Schlüpfen eingestellt (FREEMAN, 1983; RITCHIE et al., 1994). Allerdings wird von messbaren Plasmakonzentrationen von Cortisol bei einigen adulten Psittacidenarten (LOTHROP et al., 1985; WALSH et al., 1985; ZENOBLE et al., 1985) und bei Condors (ZENOBLE et al., 1985) berichtet.

Die Biosynthese der Corticosteroidhormone erfolgt aus Cholesterol unter Beteiligung des Cytochrom P-450 Enzym über die gleichen Syntheseschritte wie sie in Säugern beschrieben wurden (Abb. 3) (WESTERHOF, 1998; CARSIA & HARVEY, 2000). Die Corticosteroidkonzentration im Blut wird durch ein Gleichgewicht von adrener Sekretion und metabolischer Ausscheidung der Leber und Niere gesteuert. Die Halbwertszeit von Corticosteron und Aldosteron beträgt beim Vogel ca. 15 Minuten. Die metabolische Ausscheidungsrate für Corticosteron variiert je nach dem physiologischen Status. Im höheren Alter nimmt sie ab, bei Proteinrestriktion im Futter nimmt sie zu (CARSIA &

HARVEY, 2000; HESS, 2002).

1.2.4.2. Synthese und Regulation der Steroidhormone

Die Sekretion von Corticosteron und vermutlich auch Aldosteron wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse durch Ausschüttung des hypophysären Adenocorticotropen Hormons (ACTH) reguliert. Als Antwort auf Stress wird durch den Corticotropin-Releasing-Faktor, der vom Hypothalamus freigesetzt wird, die Ausschüttung von ACTH aus der Hypophyse stimuliert. ACTH wiederum bewirkt die Ausschüttung von Glucocorticoiden aus der Nebenniere (RITCHIE et al., 1994; CARSIA & HARVEY, 2000). Glucocorticoide erfahren einen negativen Feedbackmechanismus auf allen Ebenen der Hypothalamus-Hypophysenachse, um die Ausschüttung von ACTH zu reduzieren. Die ACTH-Freisetzung kann außerdem durch Somatostatin und Opiode gehemmt werden (CARSIA & HARVEY, 2000).

Die Regulation der Aldosteronsekretion entspricht bei Vögeln der bei Säugern. Renin wird vom Juxtaglomerulären Apparat der Niere als Antwort auf eine Hyponatriämie oder Hypovolämie ausgeschüttet (RITCHIE et al., 1994; CARSIA & HARVEY, 2000). Im Gegensatz zu Säugetieren aktiviert eine Hyperkaliämie nicht das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bei Vögeln (RITCHIE et al., 1994). Renin wandelt zirkulierendes Angiotensinogen zu Angiotensin I um, welches dann durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) zu Angiotensin II wird (Abb. 4). Angiotensin II stimuliert die Nebenniere direkt, worauf diese Aldosteron und auch Corticosteron freisetzt. Dies geschieht eher als durch die Stimulierung der Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse (RITCHIE et al., 1994; CARSIA & HARVEY, 2000). ACTH kann ebenso die Ausschüttung von Aldosteron bewirken, obwohl ACTH nicht durch Elektrolyt- und hämodynamische Imbalancen beeinflusst wird. Die Rolle des RAAS bei der Aldosteronfreisetzung ist bei Vögeln weniger von Bedeutung als bei Säugern. Vermutlich ist der Grund hierfür die andere zelluläre Organisation des Interrenalgewebes. Die Bedeutung des RAAS variiert je nach Vogelspezies aufgrund der verschiedenen Lebensräume und unterschiedlichen Futterressourcen (CARSIA & HARVEY, 2000).

Die Synthese und Ausschüttung der Steroidhormone des Interrenalkörpers unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. Höchstwerte der

Corticosteronplasmakonzentration treten kurz vor Beginn der Aktivitätsperiode auf. Bei Erpeln wurde ebenso ein jährlicher Zyklus der adrenalen Steroidhormonproduktion beobachtet, mit einem Maximum im Oktober und einem Minimum im März (NICKEL et al., 2004). Studien bei Japanischen Wachteln, Tauben, Hühnern, Truthähnen und Enten zeigen weiterhin eine deutliche zirkadiane Rhythmik der Corticosteronkonzentration im Blut (CARSIA & HARVEY, 2000). Generell werden Maximalkonzentrationen in der Nacht oder beim Übergang der Dunkel-Hellphase beobachtet (FREEMAN, 1983; WESTERHOF, 1998; CARSIA & HARVEY, 2000).

Biosynthese der Steroidhormone

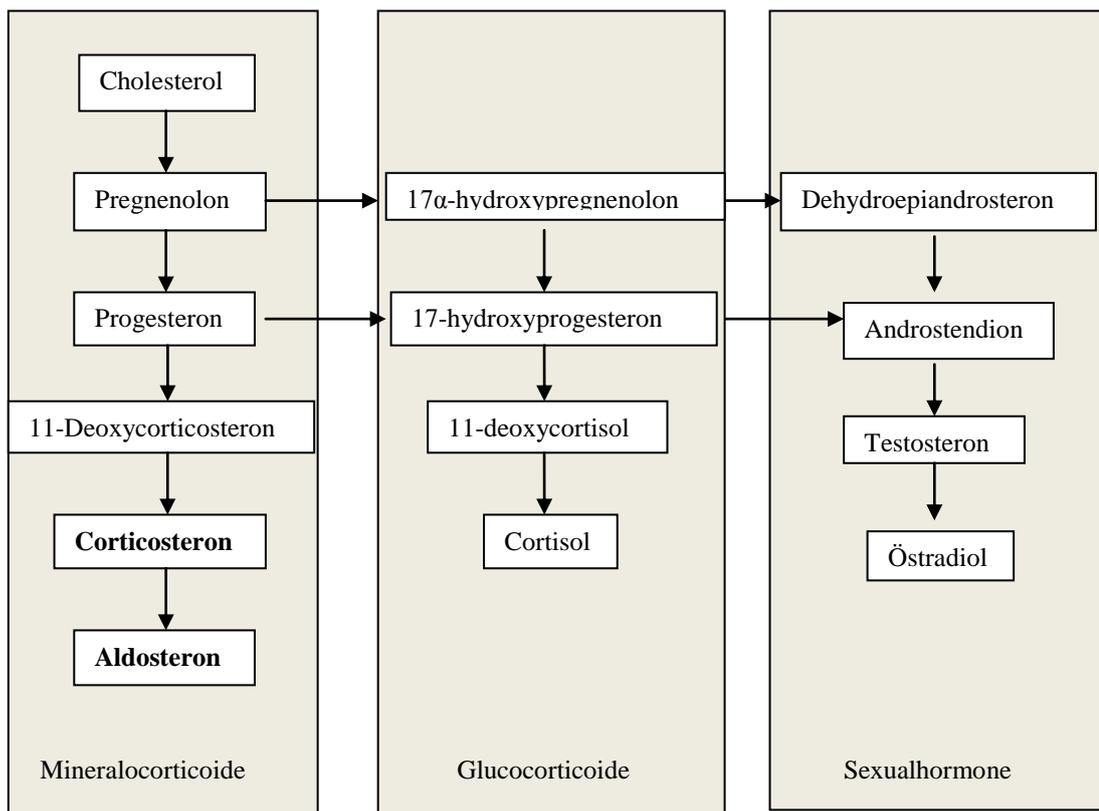


Abb. 3 Biosynthese der Steroidhormone modifiziert nach De Matos (DE MATOS, 2008)

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

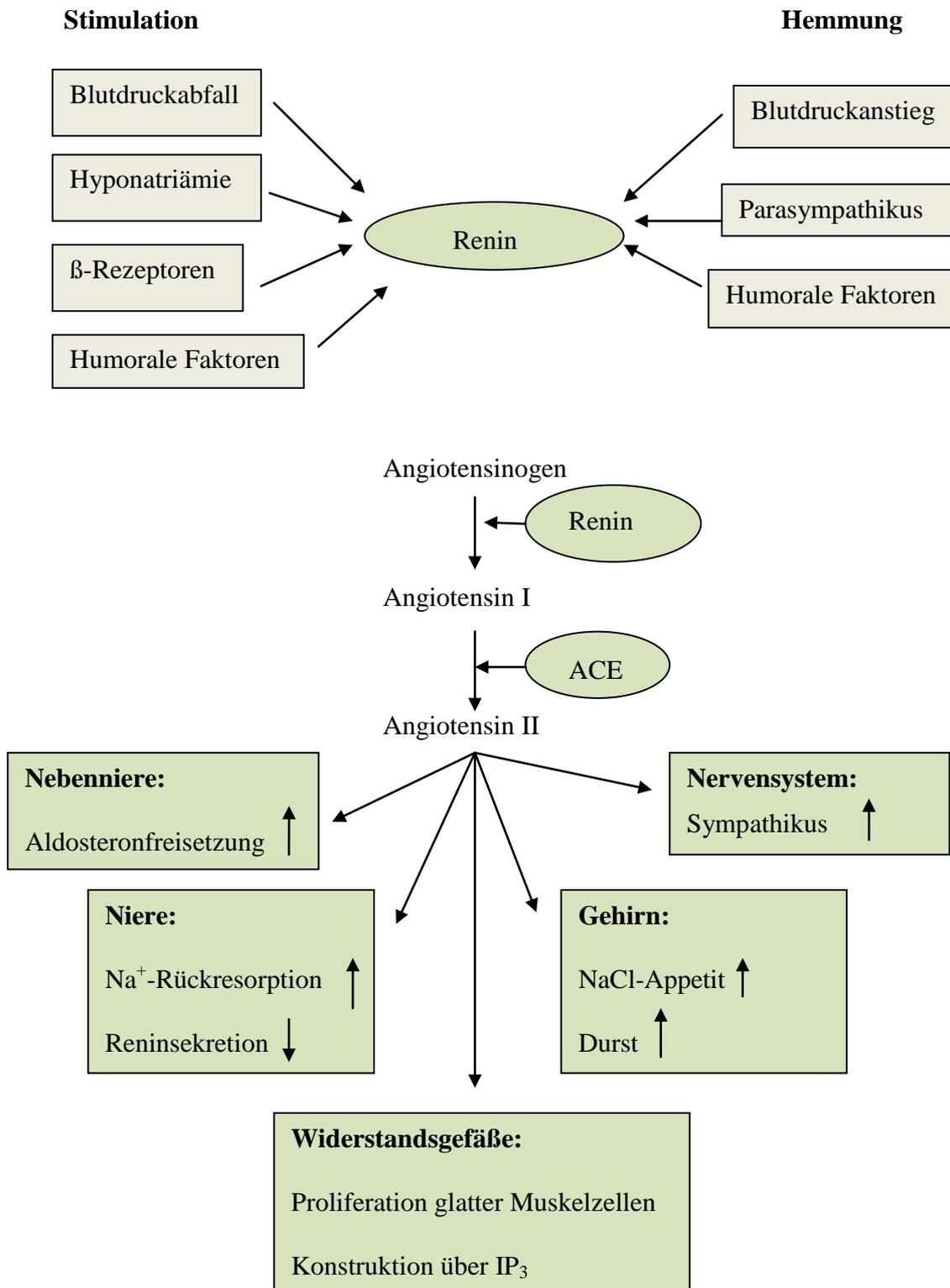


Abb. 4 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System modifiziert nach Gersthofer (GERSTHOFER, 2004)

1.2.4.3. Hormone der Adrenalzellen

Die beiden Hormone der Adrenalzellen sind die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Sie spielen eine wichtige Rolle im Kohlehydrat- und Lipidstoffwechsel. Der relative Anteil der beiden an der Hormonsekretion soll je nach Vogelart stark variieren. Primitivere Vogelarten sezernieren mehr Noradrenalin als höher entwickelte Vogelarten, die dafür mehr Adrenalin sezernieren (GHOSH, 1980; GHOSH et al., 2001). Weiterhin soll das Alter innerhalb einer Vogelspezies ein Faktor für die Zusammensetzung des Noradrenalin-Adrenalin-Verhältnisses darstellen (GHOSH et al., 2001). Studien mit adrenaletomierten Pekingenten kommen zu dem Schluss, dass ca. die Hälfte des zirkulierenden Noradrenalins und die Gesamtheit des zirkulierenden Adrenalins der Nebenniere entstammen (WILSON & BUTLER, 1983a, 1983b; BUTLER & WILSON, 1985).

Die beiden Hormone wirken stark glykogenolytisch und bewirken daher eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Adrenalin scheint einen höheren Effekt auf den Abbau von Glykogen aus Leber und Muskeln zu besitzen als Noradrenalin. Bei Hühnerküken kommt es durch den Einfluss von Noradrenalin zu einem Anstieg der freien Fettsäuren im Blutplasma. Bei Adulten konnte allerdings kein Effekt von Adrenalin und Noradrenalin auf den aviären Fettstoffwechsel nachgewiesen werden (NICKEL et al., 2004).

Neben Stoffwechseleinflüssen besitzen die beiden Hormone aber auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks. Adrenalin und Noradrenalin bewirken eine Vasokonstriktion und eine Erhöhung des systolischen und diastolischen Blutdrucks. Noradrenalin wird dabei ein höherer Einfluss zugeschrieben. Dabei haben beide interessanterweise keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Herzfrequenz (CARSIA & HARVEY, 2000).

Im Gegensatz zum Säuger, in dem Adrenalin hauptsächlich metabolische Funktionen inne hat und Noradrenalin vor allem Kreislaufwirkung besitzt, gibt es diese Unterscheidung beim Vogel nicht. Noradrenalin besitzt einen ebenso starken hyperglykämischen Einfluss und Adrenalin wirkt zu seiner Stoffwechselbeteiligung außerdem noch hyperton (GHOSH, 1980).

1.3. Immunhistochemie

1.3.1. Grundlagen immunhistochemischer Untersuchungen

Die Immunhistochemie spielt vor allem in der medizinischen Diagnostik zur Identifizierung und Lokalisierung von Tumoren eine bedeutende Rolle. Daneben findet sie vor allem in der biologischen Forschung Anwendung. In der Entwicklungsbiologie wird sie etwa genutzt um den Ablauf und die Steuerung von Entwicklungsprozessen nachvollziehen zu können. In der Zellbiologie werden mit ihrer Hilfe Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen in der Zelle untersucht und die Expression bestimmter Gene analysiert (ROMEIS, 2010; LANG, 2013).

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Identifizierung von Antigenen von Zellen oder Gewebe durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen. Antikörper zeigen gegenüber einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) eine besondere Bindungsstärke (Affinität). Diese spezifische, starke Bindung zwischen Antikörper und Epitop kann man am Gewebeschnitt sichtbar machen. Der Antikörper ist daher an ein bestimmtes Detektionssystem gekoppelt. Dabei handelt es sich z. B. um einen Fluoreszenzfarbstoff, oder ein Enzym, das bei Hinzugabe eines spezifischen Substrats zu einem Farbstoff umgesetzt wird und damit sichtbar gemacht wird. Neben dieser direkten Methode gibt es außerdem eine Vielzahl unterschiedlicher indirekter Methoden, bei denen ein markierter Sekundärantikörper an den unmarkierten Erstantikörper bindet (ROMEIS, 2010; LANG, 2013).

Der immunhistochemische Nachweis erfolgte bei meiner Arbeit nach der indirekten Immunmarkierung mit Signalverstärkung durch die sogenannte ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex). Hierbei wird die hohe Bindungsaffinität von Avidin an Biotin und ihre vier Bindungsstellen genutzt. Statt des Avidins wurde hier Streptavidin, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert wurde, verwendet. Man verwendet bei dieser Methode einen biotinylierten Sekundär-Antikörper, der an den Primär-Antikörper bindet. Das Streptavidin bildet einen Komplex mit einem biotinylierten Marker, der Meerrettich-Peroxidase (HRP), und bindet an den biotinylierten Antikörper. Als Substrat verwendet das Enzym HRP Wasserstoffperoxid. Vor der Immunmarkierung setzt man dieses im Überschuss ein, um endogene Peroxidasen zu blocken. Das

Hydrogenperoxid wird erst nach der Antikörperbindung umgesetzt. Man verwendet verschiedene Substrate (Chromogene), um das Enzym HRP zu entwickeln. So entstehen unterschiedlich gefärbte Produkte, die den Antigen-Antikörper-Komplex und damit die lokale Immunreaktion sichtbar machen. Als Chromogen wurde hier 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid-Dihydrat (DAB-Tabletten 10 mg, Fa. Kem En Tec Diagnostics, Taastrup, Dänemark) verwendet. Es wird bei der Reaktion oxidiert und ergibt mit Wasserstoffperoxid ein braunes Reaktionsprodukt. Somit wird die Antikörperbindung an das gesuchte Substrat sichtbar gemacht (ROMEIS, 2010).

Einige immunhistochemische Untersuchungen in meiner Studie bedurften einer Vorbehandlung mit sogenannten *Retrievals* zur Antigen-Demaskierung. Unter Antigen-Maskierung versteht man, dass durch Vernetzungsreaktionen durch die vorangegangene Fixierung der Zugang des Primär-Antikörpers zu seinem Antigen erschwert oder gar unmöglich ist. Durch eine Vorbehandlung wird daher das Antigen wieder zugänglich gemacht. Die häufigsten *Retrievals* stellen die Vorbehandlung mit einem der beiden Enzyme Protease oder Trypsin dar. Durch die Enzymwirkung werden die fixierungsbedingten Proteinvernetzungen aufgebrochen und die Permeabilität des Gewebes wird gesteigert (proteolytisch induziertes Epitop). Erstaunlicherweise bildet auch die Vorbehandlung mit feuchter Hitze in der Mikrowelle eine adäquate Vorbehandlung für einige Antikörper (*heat induced epitop retrieval*). Auch bei dieser Methode werden die Permeabilität des Gewebes erhöht, Epitope freigelegt und so für die Reaktion mit Antikörpern zugänglich gemacht (LANG, 2013).

1.3.2. Zytoskelett

Das Zytoskelett bildet ein aus Proteinen aufgebautes Netzwerk im Zytoplasma eukaryotischer Zellen. Es ist ein dynamisches Geflecht aus dünnen, fadenförmigen Zellstrukturen. Seine Aufgabe ist u.a. die mechanische Stabilisierung und Formhaltung der Zelle. Es ist weiterhin verantwortlich für Bewegungen der gesamten Zelle, für Transporte innerhalb der Zelle und für die Signalübertragung zwischen verschiedenen Zellen. Auch bei der Zellteilung spielt es eine wichtige Rolle. Es kann sich effizient den zellulären Anforderungen anpassen. Man unterscheidet chemisch und morphologisch drei Komponenten des Zytoskelett: die Mikrotubuli, die Mikrofilamente und die Intermediärfilamente.

Die Mikrotubuli kommen in allen Zellen mit Zellkern vor. Es sind regelmäßig aufgebaute Hohlzylinder, die durch ihre Anordnung die subzelluläre Struktur des Zytoplasmas bestimmen. Ein Mikrotubulus weist einen Durchmesser von 24 nm und eine Wanddicke von 5 nm auf. Ihre Länge variiert und kann häufig mehrere μm betragen. Sie spielen hauptsächlich eine Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen, wirken aber auch bei der Zellbewegung mit. Ihre Wand ist aus Molekülen des globulären Proteins Tubulin aufgebaut.

Die Mikrofilamente oder auch Aktinfilamente sind aus Aktin aufgebaute feine Fasern. Sie weisen einen Durchmesser von 5-7 nm auf und machen etwa 10-15 % des Gesamtproteingehalts einer Zelle aus. Sie sind netzartig unter der Plasmamembran und in Membranausbuchtungen, wie den Mikrovilli oder Pseudopodien, angeordnet. Somit tragen sie zur Stabilisierung der äußeren Form der Zelle bei und halten membranständige Proteine an ihrem Platz. Sie sind außerdem an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, sogenannten Adhärenz-Verbindungen, beteiligt. Sie bestehen aus kugelförmigen Aktin-G-Molekülen, die sich reversibel zu längeren Aktin-F-Fasern verbinden können. Man unterscheidet Aktinfilamente, die regelmäßig mit Myosin verbunden sind, von denen, die mit nur wenig oder ohne Myosin auftreten. Mit Myosin assoziierte Aktinfilamente erhalten durch die Verbindung die Fähigkeit sich zu kontrahieren. In der glatten Muskulatur bilden diese Aktin-Myosin-Komplexe die Myofibrillen. Reine Aktinfilamente sind dagegen starr und sollen bei der Endo- und Exozytose sowie der Kontraktion der Mikrovilli eine Rolle spielen (SINOWATZ & HEES, 2006).

Die Intermediärfilamente dienen hauptsächlich der mechanischen Stabilisierung der Zelle. Sie verlaufen parallel zueinander entlang zytoplasmatischer Zug- und Drucklinien. Sie sind deutlich stabiler als Mikrotubuli und Aktinfilamente und ihr Durchmesser liegt mit 8-10 nm zwischen dem der beiden anderen. Daher werden sie als Intermediärfilamente bezeichnet. Sie sind aus Polypeptidketten aufgebaut und sind die am wenigsten löslichen Bestandteile des Zytoplasmas und des Zellkerns. Sie bilden sich nicht neu und sind damit permanente Strukturelemente der Zelle (LIEBICH, 2004; SINOWATZ & HEES, 2006). Mithilfe biochemischer und immunzytochemischer Methoden werden die Intermediärfilamente in sechs Klassen unterteilt (Tab. 1) (DEY et al., 2014). Epithelzellen besitzen Intermediärfilamente aus Cytokeratin, mesenchymale Zellen wie Chondrozyten, Fibroblasten, Endothelzellen etc. enthalten Vimentin.

Muskelzellen enthalten als intermediäre Filamente Desmin, Astrozyten und andere Gliazellen das „Glial Acidic Fibrillary Protein“. Periphere Neuronen und craniale Nerven besitzen Peripherin. Neurone des zentralen und des peripheren Nervensystems enthalten die intermediären Neurofilamente (SINOWATZ & HEES, 2006; DEY et al., 2014). In neuronalen Stammzellen kommt das Intermediärfilament Nestin vor (DEY et al., 2014).

Tab. 1 Klassen der Intermediärfilamente

Klasse	Protein	Vorkommen
Klasse I	Saure Keratine	Epithelzellen
Klasse II	Basische Keratine	Epithelzellen
Klasse III	Vimentin	Mesenchymale Zellen
	Desmin	Muskelzellen
	Glial Fibrillary Acidic Protein	Astrozyten, andere Gliazellen
	Peripherin	Periphere Neurone, craniale Nerven
Klasse IV	Neurofilamente	Nervenzellen
Klasse V	Lamine A, B, C	Zellkern
Klasse VI	Nestin	Neuronale Stammzellen

Die Intermediärfilamente besitzen eine Reihe wichtiger Funktionen. Durch ihre mechanische Stützfunktion dienen sie als Matrix für Mitochondrien, den Golgi-Apparat und andere zytoskelettale Elemente und unterstützen damit die normale Funktion des Gewebes. In diesem Zusammenhang interagieren sie mit Aktin und den Mikrotubuli unter Beteiligung von Kinase und Phosphatase. Daneben spielen sie eine Rolle in der Regeneration und im Wachstum von Gewebe, in dem sie die Migration von Regenerationszellen unterstützen und damit zur Wundheilung beitragen. Des Weiteren sind sie in die Apoptose involviert. Verschiedene Subtypen der Keratine erleichtern apoptotischen Signalmolekülen die Durchführung der Apoptose. So binden die Cytokeratine CK14, CK16, CK17 und

CK18 ein bestimmtes Adapterprotein („TRADD“, *tumor necrosis factor receptor type1-associated death domain protein*), das als Bindeglied zum TNF-Rezeptor (Tumornekrosefaktor-Rezeptor) fungiert. Der TNF-Rezeptor wiederum spielt eine entscheidende Rolle in der Apoptose. Weiterhin sind die Intermediärfilamente am Proteintransport und an der Zelladhäsion beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Transport und der Verteilung von Vesikeln. Vimentin ist beispielsweise für den Transport von Lysosomen innerhalb der Zelle verantwortlich. Bei der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionskontrolle wirken sie mit, indem sie an Desmosomen und Hemidesmosomen in der Zellmembran binden und damit zur Gewebeintegrität beitragen (DEY et al., 2014).

Die Intermediärfilamente sind außerdem in der histopathologischen Diagnostik von großer Bedeutung. Bei undifferenzierten Tumoren und bei Metastasen mit unklarem Primärherd können durch den immunhistochemischen Nachweis der Intermediärfilamente Rückschlüsse auf die Zellart des Ursprungsgewebes gezogen werden (SINOWATZ & HEES, 2006; DEY et al., 2014).

1.3.2.1. Zytoskelettale Marker

1.3.2.1.1. Smooth Muscle Actin

In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus verwendet.

Die zytoplasmatischen Aktine gehören dem Mikrofilamentsystem der Zytoskelettproteine an. Sie gehören zu den am häufigsten konservierten Proteinen, die in Vögeln und Säugetieren exprimiert werden. Das Protein besteht aus sechs Isoformen von unterschiedlicher Aminosäuresequenz, jedoch besitzen alle ein Molekulargewicht von 42 kDa (ALBERTS et al., 1989). Es gibt verschiedene α -Isoformen, die eine Spezifität für Muskelgewebe aufweisen wie etwa Skelettmuskel- α , Herzmuskel- α oder Glattmuskel- α (RIZEQ et al., 1994). Die β - und γ -Aktine können in Muskelzellen, aber auch in vielen anderen Zellarten, einschließlich Nicht-Muskelzellen vorkommen (SCHMITT-GRÄFF et al., 1991).

1.3.2.1.2. Non-Muscle Myosin

In meiner Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen benutzt.

Bei Non-Muscle Myosin handelt es sich um ein Klasse II Myosin, welches ubiquitär in der Natur exprimiert wird. Es bestehen drei verschiedene Isoformen: Non-Muscle-Myosin II, II-A, II-B und II-C. Es ist in verschiedene zelluläre Prozesse inklusive Zellmigration, Zytokinese, Zelladhäsion und Zellformveränderungen sowohl während der prä- und postnatalen Entwicklung als auch beim adulten Organismus, involviert (CONTI et al., 2008).

1.3.2.1.3. Vimentin

In der vorliegenden Studie wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus verwendet.

Bei Vimentin handelt es sich um ein 57 kDa schweres Intermediärfilament. Es ist ein Bestandteil des Zytoskeletts von Wirbeltieren. Es gehört zur Klasse III der insgesamt 6 Klassen von Intermediärfilamenten, die neun Gruppen beinhalten und weist eine hohe Spezifität für Zellen mesenchymalen Ursprungs auf. Die Intermediärfilamente stellen wichtige diagnostische histogenetische Marker dar. Man nahm ursprünglich an, dass die von jeder Intermediärfilamentunterklasse gezeigte Zellart spezifisch sei für maligne und gesunde Zellen. Die Koexpression der Intermediärfilamente, besonders von Vimentin und Pancytokeratin, wurde in diversen normalen und malignen Geweben entdeckt, so dass für die Tumordiagnostik die Verwendung eines Antikörperpanels nötig wurde (HERRMANN & AEBI, 2000).

1.3.2.1.4. Pancytokeratin

In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler Pancytokeratin plus Antikörper aus der Maus verwendet.

Zytokeratine gehören zu einer Familie wasserlöslicher Proteine mit Molekulargewichten von 40-70 kDa. Sie kommen vor allem in Epithelzellen vor. Bis heute wurden 20 verschiedene Zytokeratine entdeckt (SCHWEIZER et al., 2006). Diese lassen sich in die zwei Unterfamilien A und B einteilen. Die Unterfamilie A enthält saure Zytokeratine mit einem pH-Wert kleiner 5,5, die Unterfamilie B hingegen besitzen einen eher basischen pH-Wert von 6 oder höher (EICHNER et al., 1984).

1.3.2.1.5. Tubulin

In meiner Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus eingesetzt.

Tubulin stellt den Hauptbestandteil der Mikrotubuli dar. Es befindet sich in nahezu allen eukaryotischen Zellen. Es besitzt eine zylindrische, filamentöse Struktur. Mikrotubuli fungieren als mobile und Strukturelemente. Sie spielen eine Rolle während der Mitose und des intrazellulären Transports, ebenso wie bei Flagellarbewegungen und im Zytoskelett. Tubulin ist ein Heterodimer, das aus α - und β -Tubulin aufgebaut ist. Beide Untereinheiten weisen ein Molekulargewicht von 55 kDa auf. Die Tubuline können mittlerweile in sieben Hauptgruppen (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η) unterteilt werden (DUTCHER, 2001; MCKEAN et al., 2001).

1.3.3. Marker für neuronale Elemente

1.3.3.1. S100

In der vorliegenden Studie wurde ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen verwendet.

Bei S100 handelt es sich um eine Multigenfamilie von geringem Molekulargewicht zwischen 9 und 13 kDa. Sie sind Ca^{2+} -bindende Proteine und besitzen viele zelluläre Funktionen. Die Familie besteht aus 19 Mitgliedern, die in verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Man findet S100B vor allem reichlich in Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems, in Melanozyten, Chondrozyten und Adipozyten, S100A1 auch in Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen, epithelialen Speichelzellen und renalen Zellen. Außerdem findet man S100B in Tumorzellen, in Unterpopulationen von Neuronen, S100A1 in hippokampalen Neuronen. Sie werden durch die Ca^{2+} -abhängige Regulierung mit vielen intrazellulären Vorgängen in Verbindung gebracht, so z.B. Proteinphosphorylierung, Zellproliferation inkl. neoplastischer Transformation und Differenzierung (GOULD et al., 1986; DONATO, 1999).

1.3.3.2. Neuronspezifische Enolase

In meiner Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus eingesetzt.

Bei Enolasen handelt es sich um glykolytische homo- und heterodimere Isoenzyme. Sie katalysieren die reversible Reaktion von 2-Phosphoglycerat und

Phosphophenolpyruvat. Bisher sind drei Untereinheiten bekannt, nämlich α (46 kDa), β (44 kDa) und γ (46 kDa). Diese bilden gemeinsam das Enolase-molekül. Des Weiteren sind bis heute fünf Formen bekannt ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$, $\alpha\beta$ und $\alpha\gamma$) (SHIMIZU et al., 1983).

Abhängig von ihrer Lokalisation kann man sie in drei Hauptgruppen einteilen: Nicht-neuronale Enolase (α), muskelspezifische Enolase (β) und neuronspezifische Enolase (γ) (KANG et al., 1996).

Der Antikörper detektiert gesunde und neoplastische Zellen neuronalen oder neuroendokrinen Ursprungs, obwohl es sich nicht um einen exklusiven neuronalen Marker handelt (FEDERSPIEL et al., 1987). Er ist geeignet, um periphere Nerven, neurale und neuroendokrine Tumoren (Neuroblastom, malignes Melanom, kleinzelliges Bronchialkarzinom) zu detektieren (ANSTEY et al., 1994; KANG et al., 1996).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung wurden die Nebennieren von 18 Afrikanischen Straußen (*Struthio camelus*) herangezogen. Diese wurden auf der Straußenfarm Donaumoos in Leipheim geschlachtet. Unmittelbar nach der Schlachtung wurden die Nebennieren herauspräpariert. Unter den Tieren befanden sich sowohl männliche als auch weibliche mit einem Lebendgewicht von ca. 90-110 kg. Alle Strauße waren klinisch gesund und die Organe zeigten makroskopisch keinerlei pathologische Auffälligkeiten. Tabelle 2 liefert eine Übersicht über die verwendeten Strauße.

Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Strauße

Strauß Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Verwendung
1	Afrikanischer Strauß	17 Mon.	männlich	LM
2	Afrikanischer Strauß	18 Mon.	männlich	LM
3	Afrikanischer Strauß	18 Mon.	weiblich	LM
4	Afrikanischer Strauß	18 Mon.	weiblich	LM
5	Afrikanischer Strauß	19 Mon.	weiblich	LM
6	Afrikanischer Strauß	17 Mon.	männlich	EM
7	Afrikanischer Strauß	17 Mon.	männlich	EM
8	Afrikanischer Strauß	17 Mon.	männlich	EM
9	Afrikanischer Strauß	17 Mon.	weiblich	EM
10	Afrikanischer Strauß	17 Mon.	weiblich	EM
11	Afrikanischer Strauß	14 Mon.	männlich	LM
12	Afrikanischer Strauß	14 Mon.	männlich	LM
13	Afrikanischer Strauß	14 Mon.	männlich	LM
14	Afrikanischer Strauß	14 Mon.	weiblich	LM
15	Afrikanischer Strauß	14 Mon.	weiblich	LM
16	Afrikanischer Strauß	14 Mon.	weiblich	LM
17	Afrikanischer Strauß	14 Mon.	männlich	LM
18	Afrikanischer Strauß	14 Mon.	weiblich	LM

2. Probenentnahme, Fixierung und Probenverarbeitung

2.1. Probenentnahme

Direkt im Anschluss an die Eröffnung der Körperhöhle und der Entfernung des Magen-Darmtraktes und der Leber wurden die beiden Nebennieren entnommen. Sie wurden von überschüssigem Bindegewebe frei präpariert. Anschließend wurden mit einer sterilen Skalpellklinge von beiden Nebennieren an unterschiedlichen Stellen kleine Gewebestücke mit einer Kantenlänge von ca. 1 x 1 x 0,5 cm herausgeschnitten. Eine schematische Übersicht über die Entnahmestellen der Gewebeproben ist in Abbildung 5 zu sehen.

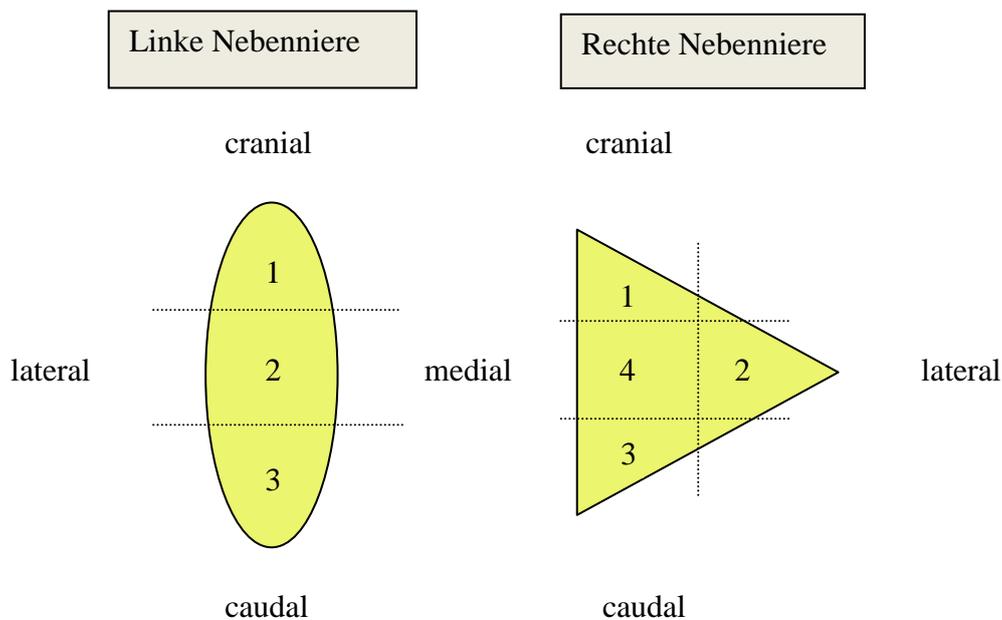


Abb. 5 Schematische Übersicht der Probenentnahmestellen

2.2. Fixierung für lichtmikroskopische Untersuchungen

Für die konventionellen lichtmikroskopischen Färbungen, die Substrathistochemie und die Immunhistochemie wurden zwei verschiedene Fixanzien verwendet. Es wurden sowohl Gewebeblöcke in Bouin'scher Lösung als auch in 3,7% gepuffertem Formalin fixiert (ROMEIS, 2010).

Fixierung in Bouin'scher Lösung:

Die Gewebeproben wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur in Bouin'scher Lösung (gesättigte Pikrinsäure:Formalin:Eisessig im Verhältnis 15:5:1) fixiert. Das Fixans wurde anschließend drei Mal im Abstand von 24 Stunden gewechselt und die Probengefäße mehrmals durchgeschwenkt. Anschließend wurde die Fixierlösung in 70%igen Ethanol ausgewaschen. Dieser wurde ebenso drei Mal alle 24 Stunden erneuert.

Fixierung in Formalin:

Die Proben wurden für vier Tage bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Fa. Gerhardt, Bonn) in 3,7% Formalin fixiert. Die Lösung wurde ein Mal nach Ankunft der Proben im Institut und anschließend nach drei Tagen gewechselt. Weiter wurden sie jeweils drei Mal im Abstand von ca. 40 Minuten in demineralisiertem Wasser ausgewaschen, um darauf in 70%igem Ethanol entwässert zu werden.

2.3. Probenverarbeitung

Darauffolgend wurden sowohl die in Bouin'scher Lösung als auch die in Formalin fixierten Gewebeproben nochmals auf eine Kantenlänge von ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm zugeschnitten. Sie wurden dann in kleine Einbettkassetten (TissueTek[®], Fa. Sakura, Staufen) verbracht. Anschließend wurden sie in einem Einbettungsautomaten (Shandon Citadel 2000, Fa. Shandon, Frankfurt) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x 80%iger EtOH, 2x 96%iger EtOH, 2-3x Isopropanol, 3x Xylol und 2x Paraplast) über 24 Stunden dehydriert und mit flüssigem Paraplast[®] (Fa. Monoject Scientific Inc., Kildare, Irland) durchtränkt. In

weiterer Folge wurden die Geweblöcke mithilfe einer Ausgießstation (Leica EG 1140H, Fa. Leica Biosystems GmbH, Nussloch) in kleine rechteckige Aluförmchen (Fa. Sakura, Staufen) in Paraffin eingebettet. Sie befanden sich danach ca. eine Stunde zum Aushärten auf einer Gefrierplatte und wurden anschließend bei 4°C vor dem Schneiden aufbewahrt.

Von jedem der so hergestellten Paraffinblöcke wurden am Rotationsmikrotom (Mikrom HM 340 E, Mikrom International GmbH, Walldorf) jeweils 30 Schnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt. Sie wurden dann zum Ausstrecken in ein Wasserbad überführt. Es wurden je 10 Schnitte auf unbeschichtete Objektträger (Super Frost[®], Fa. Roth, Karlsruhe) und je 20 Schnitte auf beschichtete Objektträger (Superfrost Ultra Plus[®], Fa. Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen. Zur Trocknung kamen sie anschließend auf einer Wärmeplatte (Fa. Medax Nagel GmbH, Kiel) zum Liegen und wurden anschließend in einen Metallständer (Fa. Wagner & Munz, München) eingeordnet und für mindestens 24 Stunden in einem 37°C Wärmeschrank (Fa. Bender Hobein, München, Karlsruhe) weiter getrocknet, damit das Paraffin fest mit dem Objektträger verschmolz.

Die Schnitte auf den unbeschichteten Objektträgern wurden daraufhin für die konventionellen histologischen Färbungen verwendet, die Schnitte auf den beschichteten Objektträgern wurden für die immunhistochemischen Färbungen benutzt.

2.4. Fixierung und Probenverarbeitung der Gefrierproben

Außer den in Lösungen fixierten Proben wurden auch einige Blöcke als Gefrierproben verwendet. Hierzu wurden von einigen Tieren kleine Gewebestücke von ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm Größe gleich nach der Präparation Alufolie gewickelt und in flüssigen Stickstoff (T ca. -196°C) verbracht. Da dieser während der weiteren Bearbeitung beim Kontakt mit der Umgebungsluft zunehmend verdampfte, wurden die Proben für den Transport auf Trockeneis (T ca. -80°C) in einer Styroporbox gelagert. Im Institut wurden die Gewebestückchen dann weiterhin auf -80°C in einem Gefrierschrank gelagert.

Später wurden Sie dann in Tissue Tek[®] Cryo Gel (Fa. Sakura, Staufen) bei ca. -20°C auf dem Pelletierelement des Kryotoms Microm HM 500 OM Vacutome

(Fa. Mikrom International GmbH, Walldorf) eingeblockt. Von den so entstandenen Kryoblöcken wurden sodann am Gefriermikrotom 8 µm dicke Schnitte angefertigt, von jedem Block 14 Stück. Die Objektträger wurden auf unterschiedliche Weise fixiert. So wurden pro Block 2 Schnitte unfixiert belassen, 5 Schnitte für 5 Minuten in 4% Formalin, 5 für 1-2 Minuten in absolutem Methanol und 2 Objektträger für 2 Minuten in Aceton fixiert (alle Lösungen Fa. Merck, Darmstadt).

Die Schnitte wurden dann bis zu ihrer Verwendung für immunhistochemische Färbungen auf -20°C gelagert.

2.5. Fixierung und Probenverarbeitung für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Es wurden von 5 Tieren die Nebennieren für elektronenmikroskopische Auswertungen herangezogen. Aus den Organen wurden jeweils vier bis fünf sehr kleine Stückchen von ca. 1 x 1 x 1 mm Größe mit 2 Skalpellklingen herauspräpariert. Die Blöckchen wurden in Karnovsky-Lösung (2 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer, pH-Wert 7,2) (KARNOVSKY, 1965; ROMEIS, 2010) über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben in Cacodylat-Puffer (0,1 M, pH-Wert 7,2) überführt und ausgewaschen, dieser wurde an den darauffolgenden Tagen noch zwei Mal gewechselt. Anschließend wurden die Gewebestücke in 1,5%igem Kaliumferrocyanid mit 1%igem Osmiumtetroxid für zwei Stunden bei 4°C im Dunkeln vorkontrastiert. Darauffolgend wurde wieder 3 x mit 0,1 M Cacodylat-Puffer ausgewaschen, um die Proben dann bei Raumtemperatur auf dem Schüttler über eine aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 20 Minuten 30%iges, 50%iges, 70%iges, 90%iges EtOH, sowie 3 x EtOH abs.) zu entwässern. Danach erfolgte die schrittweise Einbettung in Polyembed. Hierfür wurden die Proben auf dem Rüttler zweimal 15 Minuten in das Intermedium Propylenoxid (Fa. Merck, Darmstadt), eine Stunde in Propylenoxid-Polyembed-Gemisch (2:1), über Nacht in Propylenoxid-Polyembed-Gemisch (1:1) und darauffolgend eine Stunde in reines Polyembed überführt. Anschließend erfolgte die Kunstharzeinbettung in spezielle Flacheinbettungsformen (Fa. Polysciences, Warrington, USA). Nach mindestens 24-stündiger Polymerisation bei 60°C im Wärmeschrank wurden am

Ultramikrotom (Ultracut II, Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Diese wurden weiterhin mit Methylenblau nach Richardson gefärbt (RICHARDSON et al., 1983; ROMEIS, 2010) und lichtmikroskopisch beurteilt. Auf diese Weise wurden die interessierenden Bereiche für die Anfertigung von Ultradünnschnitten ausgewählt. Die Herstellung der Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 40-60 nm erfolgte wieder am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser (Ultracut II, Fa. Reichert-Jung, Wien). Abschließend wurden die so angefertigten Schnitte auf Kupfergrids (Meshweite 200 µm) aufgezogen, um dann mit gesättigtem 2 %igem Uranylacetat und Bleicitratlösung (REYNOLDS, 1963) nachkontrastiert zu werden.

Nachkontrastierung mit Uranylacetat:

Hierfür wurden für jeden Schnitt 80-100 µl Uranylacetat auf Dentalwachs pipettiert und die Grids darauf gelegt. Nach 20 minütiger Inkubation wurde dieses durch dreimaliges Waschen in A. dest. entfernt. Die Grids wurden kurz auf Filterpapier getrocknet und wieder auf das Dentalwachs gelegt.

Nachkontrastierung mit Bleicitrat:

Auf jedes Grid wurden 80-100 µl Bleicitrat pipettiert. Nach 10 minütiger Inkubation wurde das überschüssige Bleicitrat durch dreimaliges Waschen mit A. dest. beseitigt. Die Kupfernetze wurden wieder kurz auf Filterpapier zum Trocknen gebracht und anschließend als fertige Präparate in die Gridboxen zur Aufbewahrung verbracht.

Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte an der Ludwig-Maximilians-Universität München, am Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie, Fachbereich Histologie am Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Fa. Zeiss, Oberkochen). Der besseren Übersichtlichkeit halber wurden einige Bilder mit Hilfe der Software AutoStitch (Version 2.2., Demoversion 2004, Brown & Lowe, University of British Columbia, USA) zusammengefügt. Anschließend wurde in Microsoft Windows Paint (Version 6.1, Microsoft Corporation, Redmond, USA) der durch das „Stitchen“ entstandene schwarze Hintergrund in Weiß eingefärbt, damit sich die Fotos übergangslos in meine Arbeit einfügen ließen.

3. Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen

Für die folgenden lichtmikroskopischen Färbungen dienten Gewebeschnitte von 13 Tieren. Es wurden drei Übersichtsfärbungen (H.E., Masson Goldner, van Gieson) und zwei substrathistochemische Färbungen (Alcianblau und PAS) angefertigt.

Für die verschiedenen Färbungen nach Romeis (ROMEIS, 2010) wurden zunächst alle Schnitte zweimal zehn Minuten mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe (2 x Isopropanol, 96% EtOH, 70% EtOH) bis A. dest. rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte gefärbt und dann mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% EtOH, 96% EtOH, 2 x Isopropanol) und zweimal fünf Minuten Xylol wieder dehydriert. Zum Schutz der gefärbten Präparate wurden sie nach Lufttrocknung mit einer dünnen Schicht Eukitt® (Quick Hardening Mounting Medium, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) und einem Deckgläschen (Fa. Roth, Karlsruhe) eingedeckelt und in Objektträgerkästen dunkel aufbewahrt.

Die gefärbten Präparate wurden an meiner Arbeitsstelle an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, am Institut für Sehnen- und Knochenregeneration in Salzburg, Österreich lichtmikroskopisch ausgewertet (Lichtmikroskop Axioplan, Fa. Zeiss, Oberkochen) und fotografisch dokumentiert (Kamera: Color View III Soft Imaging System, Software: Cell D; beides Fa. Olympus, Hamburg).

Eine genaue Auflistung der Lösungen und Reagenzien mit Bezugsquellen ist im Anhang aufgeführt (Kapitel IX. 1.)

3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer

Bei dieser Übersichtsfärbung stellen sich die Kerne blauviolett und das restliche Gewebe kräftig rosarot dar.

Im Anschluss an die Alkoholreihe wurden die Schnitte 20 Minuten in Hämalaun zur Kernfärbung gebracht, kurz in A. dest. ausgewaschen und dann 20 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte für zehn Minuten in Eosin zur Zytoplasmaanfärbung belassen und darauffolgend durch die aufsteigende Alkoholreihe gezogen.

3.2. Trichromfärbung nach Masson Goldner

Bei dieser Färbung stellen sich die Kerne braunschwarz, das Zytoplasma ziegelrot, die Erythrozyten orange und das Bindegewebe grün dar.

Die Objektträger wurden für die Kernfärbung für 1 Minute in Eisenhämatoxylin nach Weigert gebracht und daraufhin 3 x kurz in A. dest. und dann 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, um die Reaktion zwischen Zellkernmaterial und Farbstoff zu ermöglichen. Anschließend wurden sie für 5 Minuten in Azophloxin belassen, um dann gut in 1%iger Essigsäure ausgespült zu werden. Im Folgenden wurden die Schnitte in Phosphormolybdänsäure-Orange weiter gefärbt und unter mikroskopische Kontrolle der Endpunkt nach 10 Minuten bestimmt. Dieser war erreicht, als das Bindegewebe nicht mehr orange erschien. Um überschüssige Farbstofflösung zu entfernen, wurde erneut in 1%iger Essigsäure gut gespült. Weiterhin wurden die Schnitte zur Gegenfärbung mit Lichtgrün für 5 Minuten in dieses verbracht. Nach letzmaligem Ausspülen in 1%iger Essigsäure wurden die Schnitte in die aufsteigende Alkoholreihe überführt.

3.3. Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung

Bei dieser Färbung erscheinen die elastischen Fasern blauschwarz, die Zellkerne dunkelbraun, kollagenes Bindegewebe leuchtend rot und Muskelgewebe gelb.

Die Schnitte wurden im Anschluss an die absteigende Alkoholreihe für 25 Minuten in Resorcinfuchsinlösung gefärbt, dann 1 Minute unter fließendem Leitungswasser gespült, weiterhin für fast 3 Minuten in Eisenhämatoxylin nach Weigert verbracht, dann kurz in A. dest. wieder ausgespült und weiter für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser belassen. Darauffolgend wurden sie für 5 Minuten in Pikrinsäure-Thiazinrot erneut gefärbt und danach wieder kurz in A. dest. ausgespült. Zur Differenzierung wurde im Folgenden 2 x mit 96% EtOH die überschüssige Pikrinsäure unter mikroskopischer Kontrolle ausgewaschen, bis die Resorcinfuchsin gefärbten Fasern gut erkennbar waren. Abschließend wurden die Schnitte wieder durch die aufsteigende Alkoholreihe gezogen und dehydriert.

3.4. Alcianblau-Färbung

Bei dieser Färbung stellen sich saure Mukosubstanzen leuchtend blau, die Zellkerne hellrot und der Hintergrund zartrosa dar. Um zwischen Karboxyl- und Sulfatgruppen differenzieren zu können ist es notwendig, die gleiche Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 und 1,0 durchzuführen. Bei einem pH-Wert von 1,0 färben sich nur sulfatierte Mukosubstanzen leuchtend blau, bei einem pH-Wert von 2,5 zusätzlich karboxylierte Mukosubstanzen.

Zur Anfärbung saurer Mukosubstanzen wurden die Schnitte in 3%ige Essigsäure gebracht und anschließend 30 Minuten in 1%igem Alcianblau (in 3%iger Essigsäure, pH 2,5) belassen, mit A. dest. ausgespült und 4 Minuten mit Kernechtrot gefärbt. Nach erneutem Ausspülen der überschüssigen Färbelösung folgte die aufsteigende Alkoholreihe.

Zur Anfärbung sulfatierter Mukosubstanzen wurden die Schnitte zunächst in 0,1 N Salzsäure gegeben, dann für 30 Minuten mit 1%igem Alcianblau (in 0,1 N Salzsäure, pH 1,0) gefärbt, anschließend wieder kurz in 0,1 N Salzsäure und A. dest. ausgespült und wieder 4 Minuten mit Kernechtrot gefärbt. Nach letztmaligem Ausspülen in A. dest. wurden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe gezogen.

3.5. Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus

Mithilfe dieser Färbung (PAS-Reaktion) können Aldehydgruppen nachgewiesen werden, die durch Oxidation mit Perjodsäure entstehen. Somit dient sie dem Nachweis kohlenhydratreicher Makromoleküle wie etwa Glykoproteinen, Glykogen, Glykolipiden und Mukopolysaccharide. Die Aldehydgruppen gehen mit dem Schiff'schen Reagenz einen purpurroten Farbkomplex ein. PAS-positive Substanzen färben sich daher rosa bis violettrot an.

Die Objektträger wurden nach der absteigenden Ethanolreihe für 5 Minuten in einer 0,5%igen wässrigen Perjodsäurelösung belassen, anschließend in A. dest. kurz ausgespült, um dann für 15 Minuten in Schiff'schem Reagenz zu verbleiben. Nachfolgend wurden sie 3 x 2 Minuten in Schwefeldioxid-Wasser und danach 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser ausgespült. Es schloss sich dann die Kernfärbung mit Hämalaun für 4 Minuten und erneutes Spülen unter Leitungswasser für 15 Minuten an. Abschließend durchliefen die Schnitte die

aufsteigende Alkoholreihe.

PAS-Reaktion mit Amylaseverdau

Diese Reaktion wird durchgeführt, um Glykogen identifizieren zu können, da Glykogen von Amylase verdaut wird. Folglich handelt es sich bei Substanzen, die nach dem Amylaseverdau noch eine positive Reaktion zeigen, nicht um Glykogen.

3.6. Histomorphometrie

Zur Bestimmung der unterschiedlichen Epithelhöhen und der Zellkerndurchmesser in den drei verschiedenen Bereichen der Straußennebenniere wurden beide am Lichtmikroskop Axioplan (Fa. Zeiss, Oberkochen) mit der Kamera (Color View III Soft Imaging System) in Verbindung mit der Software Cell D (beide Fa. Olympus, Hamburg) vermessen. Es wurden von 6 Tieren (3 weibliche, 3 männliche) in je 5 Gesichtsfeldern jeweils an 10 Interrenalzellen und an 10 Adrenalzellen die Epithelhöhen an senkrecht angeschnittenen Stellen und die Kerngrößen in jedem Organabschnitt (3 Zonen) ausgemessen. Anschließend wurden in Microsoft Office Excel 2010 (Fa. Microsoft Corporation, Redmond, USA) die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet und diese graphisch in vier Boxplot-Diagrammen abgebildet. Die statistischen Werte wurden mittels der Software GraphPad Prism (Fa. GraphPad, San Diego, USA) errechnet. Es wurde die Signifikanz der Werte mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (*one way-ANOVA*) und dem Tukey HSD-Test (*honestly significant difference*) überprüft. Diese histomorphometrischen Untersuchungen wurden an meiner Arbeitsstelle an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, Institut für Sehnen- und Knochenregeneration in Salzburg, Österreich durchgeführt.

4. Immunhistochemische Färbungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die wichtigsten Bestandteile des Zytoskeletts (Aktin, Nicht-Muskel Myosin, Vimentin, Pancytokeratin und Tubulin) untersucht. Außerdem wurden die beiden Marker für neuronale Elemente Neuronspezifische Enolase und S100 charakterisiert.

Negativkontrolle:

Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurden Negativkontrollen durchgeführt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers detektieren zu können. Dabei wurde an Stelle des Primär-Antikörpers nur Dako Antibody Diluent aufgetragen.

Positivkontrolle:

Hierzu wurden Schnitte von Geweben verwendet, von denen bekannt ist, dass sie mit dem entsprechenden Antikörper reagieren.

Auswertung:

Die Auswertung und Fotodokumentation der immunhistologisch gefärbten Schnitte erfolgte an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, am Institut für Sehnen- und Knochenregeneration, Salzburg, Österreich an dem Lichtmikroskop Axioplan[®] (Fa. Zeiss, Oberkochen) mithilfe der Kamera Color View III[®] Soft Imaging System und der Software Cell D[®] (beides Fa. Olympus, Hamburg).

Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper liefert Tabelle 3.

Eine genaue Auflistung der verwendeten Reagenzien mit Bezugsquellen der Antikörper ist im Anhang aufgeführt (Kapitel IX. 2.)

Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Antikörper

Primärantikörper	AK-liefernde Tierart (Isotyp)	Verdünnung und Inkubation	Sekundärantikörper	Verdünnung und Inkubation
SMA (<i>α-smooth-muscle-actin</i>) ⁷	Maus (IgG2a)	1:40 60 Min. bei RT	Anti-Maus IgG (F(ab') ₂) biot. vom Kaninchen ⁷	1:30 30 Min. bei RT
NMM (<i>non-muscle myosin</i>) ⁸	Kaninchen (IgG)	1:250 über Nacht bei 6°C	Anti-Kaninchen IgG (F(ab') ₂) biot. vom Schwein ⁷	1:300 30 Min. bei RT
Vimentin ⁷	Maus (IgG1)	1:500 über Nacht bei 6°C	Anti-Maus IgG (F(ab') ₂) biot. vom Kaninchen ⁷	1:300 30 Min. bei RT
Pancytokeratin ¹¹	Maus (IgG1)	1:100 über Nacht bei 6°C	Anti-Maus IgG (F(ab') ₂) biot. vom Kaninchen ⁷	1:300 30 Min. bei RT
Tubulin ⁸	Maus (IgG1)	1:400 über Nacht bei 6°C	Anti-Maus IgG (F(ab') ₂) biot. vom Kaninchen ⁷	1:300 30 Min. bei RT
S 100 ⁷	Kaninchen (IgG)	1:400 30 Min. bei RT	Anti-Kaninchen IgG (F(ab') ₂) biot. vom Schwein ⁷	1:300 30 Min. bei RT
Neuron-spezifische Enolase ¹²	Maus (IgG1)	1:250 über Nacht bei 6°C	Anti-Maus IgG(F(ab') ₂) biot. vom Kaninchen ⁷	1:300 30 Min. bei RT

Die Nebennieren von 8 Tieren wurden immunhistochemisch untersucht. Es wurden sowohl Bouin- als auch Formalin-fixierte Proben mit einer Schnittdicke von 5 μ m verwendet.

Die Schnitte wurden zunächst in Xylol (2 x 30 Min.) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2 x Isopropanol, 96% EtOH, 70% EtOH) und dann in A.dest. (2 x 5 Min.) und PBS-Puffer (pH-Wert 7,4, 3 x 5 Min.) ausgewaschen.

Die Schnitte, die für den immunhistochemischen Nachweis von Vimentin und Neuronspezifischer Enolase verwendet wurden, wurden einer Vorbehandlung mit 0,1%iger Protease (10 Min. bei RT) unterzogen. Beim Nachweis von Pancytokeratin wurde eine Vorbehandlung mit Trypsin (20 Min. bei RT), bei Tubulin eine Vorbehandlung in Citratpuffer in der Mikrowelle (3 x 10 Min., dann Abkühlung für 20 Min. bei RT) und bei S 100 in Dakopuffer (pH-Wert 6,1) in der Mikrowelle (2 x 10 Min., abkühlen bei RT für 20 Min.) durchgeführt. Anschließend wurden alle Schnitte wieder in PBS ausgewaschen (3 x 5 Min.).

Um die endogene Peroxidase zu hemmen, wurden im Folgenden alle Schnitte für 10 Minuten in eine 7,5 % Hydrogenperoxidlösung verbracht. Daraufhin wurden sie für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser, um das nicht verbrauchte Hydrogenperoxid auszuwaschen und danach nochmals in PBS-Puffer gespült (3 x 5 Minuten). Anschließend erfolgte das Auftragen von Dako Protein Block Serum Free für 10 Minuten in einer feuchten Kammer, um eine mögliche Hintergrundfärbung zu reduzieren. Schließlich wurden je 100 µl des Primär-Antikörpers in Dako Antibody Diluent auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte auch hier wieder in einer Feuchtkammer (Verdünnung und Inkubationszeit s. Tabelle 2). Vor der Weiterbehandlung wurden die Schnitte 60 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen, danach erneut in PBS ausgewaschen (3 x 5 Minuten). Anschließend wurde der Sekundär-Antikörper aufgebracht und wieder in einer Feuchtkammer inkubiert. Es schloss ich erneut ein Auswaschen in PBS (3 x 5 Minuten) an. Weiterhin wurden pro Schnitt 100 µl Streptavidin-Biotin HRP aufgebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Darauffolgend wurde wieder in PBS ausgespült (3 x 5 Minuten). Es schloss sich das Entwickeln in DAB-Hydrogenperoxidlösung bei Raumtemperatur im Dunkeln für 8 Minuten an. Anschließend wurde wieder für knapp eine Minute unter fließendem Leitungswasser gespült. Um die Zellkerne sichtbar zu machen und somit die mikroskopische Orientierung zu erleichtern, wurden die Kerne für 30 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt. Im Folgenden wurde wieder 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert.

Zu guter Letzt erfolgte die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% EtOH, 96% EtOH, 2 x Isopropanol) und zweimaliges Verbringen in Xylol für je 5 Minuten. Die so gefärbten Schnitte wurden dann mit Eukitt[®] Quick Hardening Mounting Medium (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) und einem Deckgläschen (Fa. Roth, Karlsruhe) in Objekträgerkästen dunkel verwahrt.

4.1. Gefrierschnitte

An den Gefrierschnitten wurden immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern Anti-Pancytokeratin, Anti-S 100 sowie Anti-Neuronspezifische Enolase angefertigt. Hierfür wurde das herkömmliche Immunhistoprotokoll analog zu den Paraffinschnitten mit einigen Modifizierungen angewendet. Es entfielen der Entparaffinierungs- und Rehydrierungsschritt. Die Schnitte wurden vor ihrer Verwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen und ohne Vorbehandlung 3 x 5 Minuten in PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Anschließend folgte die Hemmung der endogenen Peroxidase und die weiteren Arbeitsschritte des Protokolls wie oben angegeben.

IV. ERGEBNISSE

1. Makroskopische Untersuchungen an der Nebenniere

Die Nebennieren des Straußes liegen beim männlichen Tier umgeben von Bindegewebe craniomedial der beiden Nieren und cranial der beiden Hoden und Samenleiter. Beim weiblichen Tier liegen sie ebenso craniomedial der beiden Nieren, die linke Nebenniere außerdem cranial des Ovariums (Abb. 6 und 7).

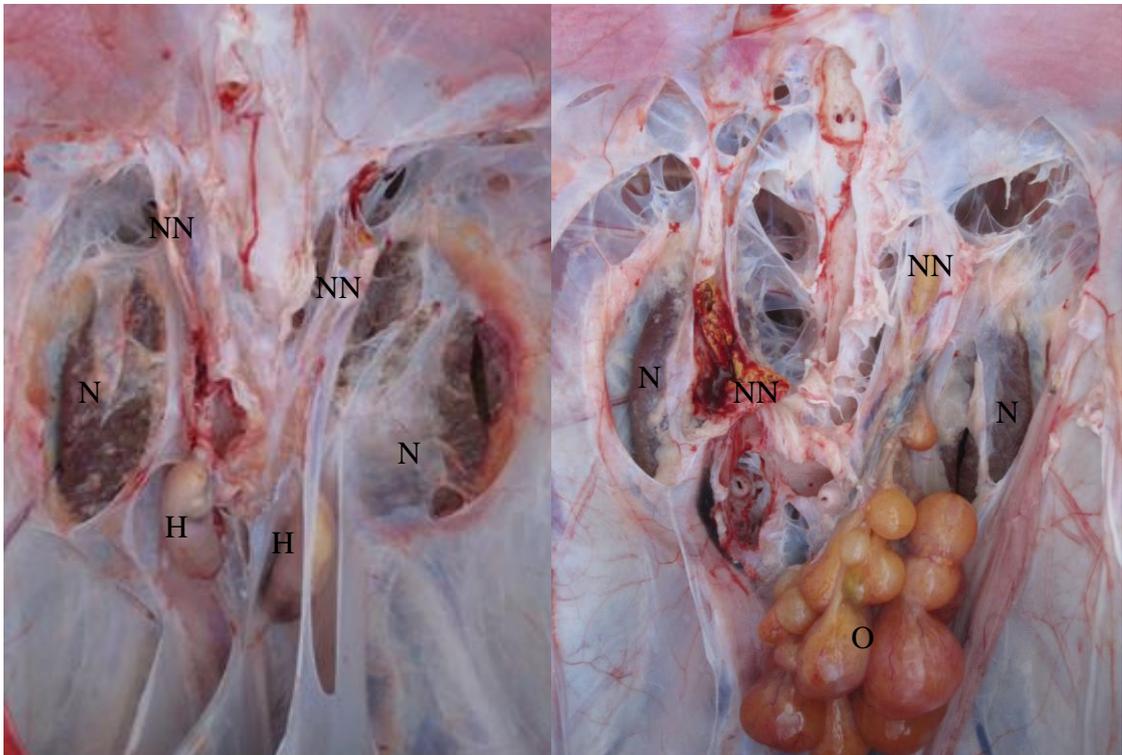


Abb. 6 Nebennieren beim männlichen Tier *in situ*, Ventralansicht.

Abb. 7 Nebennieren beim weiblichen Tier *in situ*, Ventralansicht.

Die beiden Nebennieren (NN) liegen eingebettet in Bindegewebe in enger Lagebeziehung zu den beiden Nieren (N) und den beiden Hoden (H).

Die beiden Nebennieren (NN) liegen in enger Lagebeziehung zu den beiden Nieren (N) und dem Ovarium (O), das zahlreiche Follikel trägt.

Die beiden Nebennieren lassen sich makroskopisch voneinander unterscheiden. Die linke Nebenniere besitzt eine längsovale Form, die rechte Nebenniere ist hingegen dreieckig pyramidenförmig. Ihre Farbe reicht von grau-gelb bis senfgelb. Mit der sie umgebenden Bindegewebskapsel erscheint sie blassrosa (Abb. 8). Die Größe der linken Nebenniere beträgt durchschnittlich 5,5 x 1,3 x 0,6 cm ($\pm 0,5 \times 0,3 \times 0,1$ cm), die Größe der rechten Nebenniere dagegen 4,8 x 1,8 x 0,7 cm ($\pm 0,4 \times 0,4 \times 0,1$ cm). Das Gewicht der linken Nebenniere beträgt 2,3 g ($\pm 0,4$ g), das Gewicht der rechten Nebenniere hingegen 2,6 ($\pm 0,4$) g.

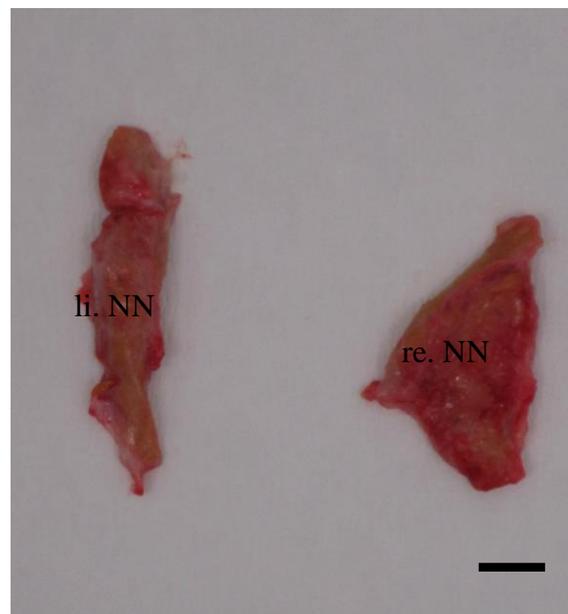


Abb. 8 Beide Nebennieren *ex situ*, SB = 1 cm

Die linke Nebenniere (li. NN) ist längsoval, die rechte Nebenniere (re. NN) hingegen dreieckig.

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen an der Nebenniere

2.1. Übersichtsfärbungen

Die mit Hämatoxylin-Eosin, Masson Goldner und Resorcinfuchsin-van Gieson gefärbten Präparate lassen eine eindeutige lichtmikroskopische Unterscheidung der verschiedenen Anteile der Nebenniere zu.

Die Nebenniere des Afrikanischen Straußes ist von einer bindegewebigen Kapsel umgeben. In ihr sind zahlreiche Blutgefäße, glatte Muskelzellen, Lipidtröpfchen und periphere Nerven mit assoziierten Ganglien eingebettet (Abb. 10, 11, 14). Die Organkapsel ist relativ dünn. Sie zieht radiär in das Parenchym und formt zahlreiche dünne Septen, die retikuläre Fasern und reichlich Blutgefäße enthalten. Im Parenchym der Nebenniere lassen sich Kapillaren wie auch venöse Sinusoide mit einem diskontinuierlichen Endothel finden. Meist sind aber mehr Sinusoide im Drüsengewebe zu finden, die im Zentrum des Organs größere venöse Sinusoide bilden.

Die Nebennieren der Strauße bestehen aus zwei morphologisch und physiologisch verschiedenen endokrinen Drüsen. Dem Interrenalgewebe (kortikales Gewebe) und dem Adrenalgewebe (medulläres Gewebe). Die beiden Gewebearten greifen ungleichmäßig ineinander, die Adrenalzellen liegen verstreut als Zellhaufen zwischen den Interrenalzellen (Abb. 9).

2.1.1. Adrenalzellen

Der Großteil der basophilen Adrenalzellen liegt ungleichmäßig verteilt zwischen den Zellgruppen der Interrenalzellen und ist durch unregelmäßig auftretende Blutsinusoide separiert (Abb. 9). Gelegentlich liegt eine Gruppe oder ein streifenförmiges Areal aus Adrenalzellen nahe der bindegewebigen Kapsel (Abb. 12, 13). Im Zentrum der Nebenniere ist ihr Anteil am Gesamtparenchym größer als in den peripheren Bereichen. Sie sind meistens in inselartigen Gruppen oder kurzen, serpentinartigen Aggregaten organisiert. In den Gruppen sind wenig Sinusoide zu finden. Die Zellgrenze ist undeutlich und verschwommen, so dass die Zellkerne dicht gelagert erscheinen (Abb. 12). Sie besitzen nur eine dünne, diskontinuierliche Basalmembran.

Die Adrenalzellen sind polygonal und ca. 15,0 μm ($\pm 3,7 \mu\text{m}$) groß. Sie sind daher

kleiner als die Interrenalzellen. Die Zellkerne sind rund, im Mittel $6,1 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) groß und besitzen ein bis zwei Nucleoli. Sie liegen zentral innerhalb der Zelle und sind ebenso geringfügig kleiner als die Kerne der Interrenalzellen (Abb. 16). Das Zytoplasma ist in den drei Übersichtsfärbungen dunkler als das der Interrenalzellen gefärbt und enthält zahlreiche getüpfelte Granula. Insgesamt weisen die Adrenalzellen ein homogeneres Bild auf als die Interrenalzellen, die in den verschiedenen Zonen des Organs von unterschiedlicher Gestalt sind.

2.1.2. Interrenalzellen

Den Hauptanteil des glandulären Parenchyms bildet das Interrenalgewebe (Abb. 12). Es lässt sich in eine periphere Zone (PZ) und eine zentrale Zone unterteilen (ZZ). Weiterhin kann man die periphere Zone (PZ) in eine äußere, subkapsuläre Zone (SKZ) und eine innere Zone (IZ) einteilen (Abb. 10, 11). Die Anordnung der Interrenalzellen ist sehr unterschiedlich zwischen der peripheren Zone und der zentralen Zone. Die Interrenalzellgruppen können kugel-, bogen- oder traubenförmige Gestalt annehmen (Abb. 13, 14). Zwischen den Zellbündeln befinden sich zahlreiche Kapillaren und Sinusoide mit spindelförmigem, diskontinuierlichem Endothel (Abb. 14). Die Zellen des Interrenalgewebes sind hochprismatisch. Sie sind im Querdurchmesser durchschnittlich $24,2 \mu\text{m}$ ($\pm 5,1 \mu\text{m}$) groß. Die Grenze der Interrenalzellen erscheint im Gegensatz zu der der Adrenalzellen scharf. Zwischen den Zellen sind keine Interzellularräume erkennbar. Die Zellkerne der Interrenalzellen sind längsoval bis rund und im Mittel ca. $6,3 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) groß. Sie besitzen entweder einen einzelnen Nucleolus oder aber mehrere Nucleoli. Diese liegen meist zentral im Zellkern, gelegentlich aber auch am basalen Pol. Weiterhin sind einzelne bindegewebige Fasern und reichlich Blutgefäße zwischen den Zellgruppen des Interrenalgewebes zu finden.

Die Zellgruppen direkt unterhalb der Kapsel (subkapsuläre Zone, SKZ) sind kompakt arrangiert und liegen parallel zueinander (Abb. 13, 14). Mit ihrer Längsachse liegen sie meist senkrecht zur Kapsel (Abb. 13). Jede Zellgruppe ist von einer dichten Basalmembran umgeben. Jedes Bündel ist im Querschnitt radiär oder sternförmig organisiert. Das Zytoplasma der Interrenalzellen in der SKZ ist azidophil. Die Interrenalzellen der SKZ sind durchschnittlich $24,3 \mu\text{m}$ ($\pm 5,1 \mu\text{m}$)

groß. Sie weisen eine eher undeutliche Zellgrenze auf. Lange Bündel von Interrenalzellen in der SKZ liegen parallel zur Kapsel und sind senkrecht zur Basalmembran angeordnet. Ihr Zytoplasma ist heller gefärbt als das der Interrenalzellen in der ZZ und es enthält zahlreiche Vakuolen (Abb. 13, 14). Die Zellkerne sind längsoval, ca. $6,5 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) groß im Durchmesser und zur Basalmembran hin gerichtet.

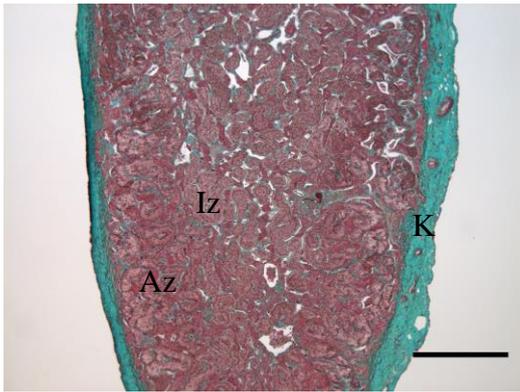


Abb. 9 Nebenniere Strauß, Übersicht, Masson Goldner-Färbung, SB = 500 µm

Umgeben von einer bindegewebigen Kapsel (K) liegen die helleren Interrenal- (Iz) und dunkleren Adrenalzellgruppen (Az) ineinander verwoben vor.

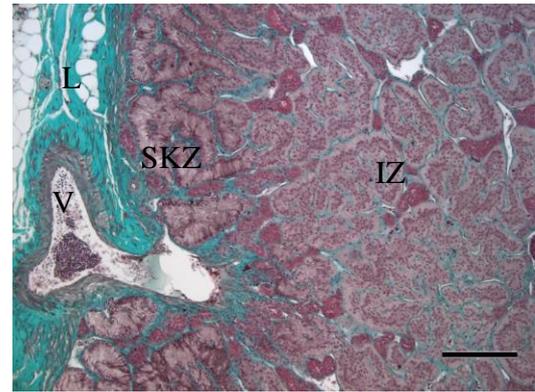


Abb. 10 Nebenniere Strauß, Periphere Zone, Masson Goldner-Färbung, SB = 200 µm

In der Organkapsel sind eine große Vene (V) und viele Lipidtröpfchen (L) eingebettet. Die Peripherie lässt sich in eine subkapsuläre (SKZ) und innere Zone (IZ) gliedern.

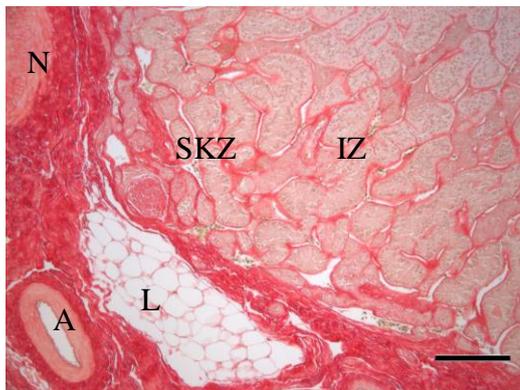


Abb. 11 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, van Gieson-Färbung, SB = 200 µm

In der Kapsel liegen Arterie (A), Nerv (N) und Lipidtröpfchen (L). Der Übergang der SKZ in die IZ ist deutlich.

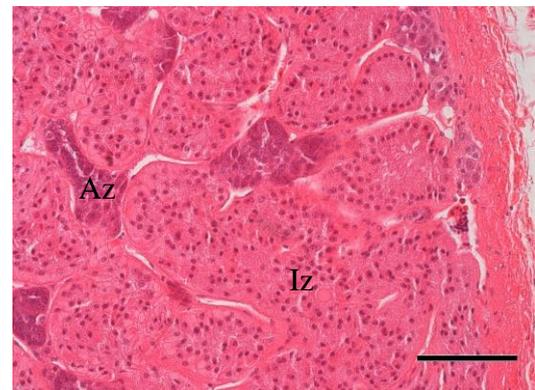


Abb. 12 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, H.E.-Färbung, SB = 100 µm

In der subkapsulären Zone sind nur wenige Adrenalzellinseln (Az) vorhanden. Ihre Basalmembran ist undeutlich, ihre Zellkerne dichtgelagert. Die Interrenalzellen (Iz) bilden den Hauptteil des Parenchyms.

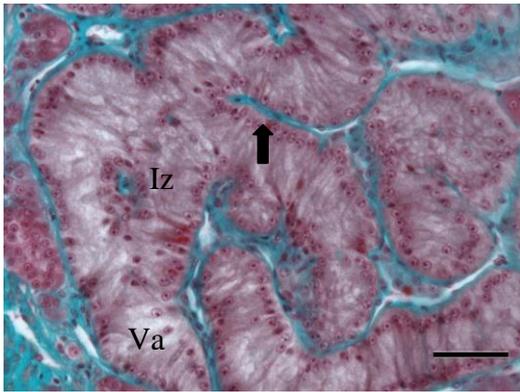


Abb. 13 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Masson Goldner-Färbung, SB = 50 µm

Die kompakten Interrenalzellen (Iz) liegen serpentinen- und bogenförmig parallel zueinander innerhalb der SKZ. Ihre Zellkerne (Pfeil) liegen am basalen Pol. Ihr Zytoplasma ist hier heller als in den folgenden Zonen und enthält zahlreiche Vakuolen (Va).

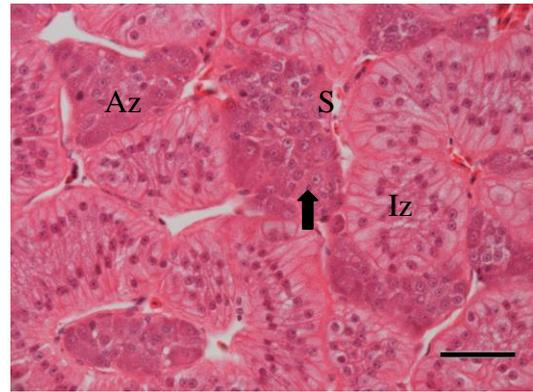


Abb. 14 Nebenniere Strauß Subkapsuläre Zone, H.E.-Färbung, SB = 50 µm

Trauben- und bogenförmige Interrenalzellen (Iz) umgeben die Adrenalzellbündel (Az). Die Zellkerne der Adrenalzellen (Pfeil) liegen zentral. Ihr Zytoplasma ist dicht, wohingegen das der Interrenalzellen wabig erscheint. Zwischen den Zellen sind viele kleine Sinusoide (S) gelegen.

Tab. 4 Histomorphologische Befunde der Subkapsulären Zone (SKZ)

Vorhandene Zelltypen	Interrenalzellen	
	Adrenalzellen	
Interrenalzellen	Zellform	einschichtig hochprismatisch
	Epithelhöhe	24,3 μm (\pm 5,1 μm)
	Zellkernform	längsoval
	Zellkerngröße	6,5 μm (\pm 1,1 μm)
	Zellkernlage	basal
	Nucleoli	ein bis drei
	Basalmembran	regelmäßig, kräftig
Adrenalzellen	Zellform	polygonal
	Epithelhöhe	16,4 μm (\pm 4,1 μm)
	Zellkernform	rund
	Zellkerngröße	6,2 μm (\pm 1,1 μm)
	Zellkernlage	zentral
	Nucleoli	ein bis zwei
	Basalmembran	unregelmäßig, dünn
Bindegewebige Kapsel	Blutgefäße	viele, tlw. in großen Gruppen
	Periphere Nerven	mehrere, mit multipolaren Ganglienzellen
	Lipdtröpfchen	zahlreich, groß

Die Zellabschnitte in der inneren Zone (IZ), zwischen der SKZ und der ZZ, liegen senkrecht zur Kapsel und ziehen im rechten Winkel zu dieser (Abb. 15, 16). Die IZ besteht aus kompakten Zellhaufen, die parallel zueinander in Einzel- oder Zweierreihen organisiert sind (Abb. 16). Die IZ enthält säulenförmige oder polyedrische Zellen. Sie weisen eine durchschnittliche Größe von $26,4 \mu (\pm 5,0 \mu)$ auf und sind somit größer als die Interrenalzellen der SKZ und der ZZ. Die Zellgrenze ist deutlich und die Zellen sind viel kompakter im Vergleich zu den vakuolenhaltigen Interrenalzellen der SKZ (Abb. 17). Das Zytoplasma ist dunkel gefärbt, azidophil und weniger wabig als das der SKZ. Die Zellkerne in dieser Zone sind rund und ca. $6,3 \mu (\pm 1,1 \mu)$ groß.

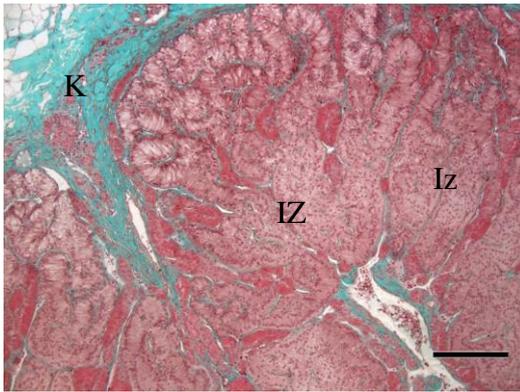


Abb. 15 Nebenniere Strauß, Innere Zone, Masson Goldner-Färbung, SB = 200 μ m

In der inneren Zone (IZ) ziehen die Interrenalzellgruppen (Iz) perpendikulär zur Bindegewebskapsel (K).

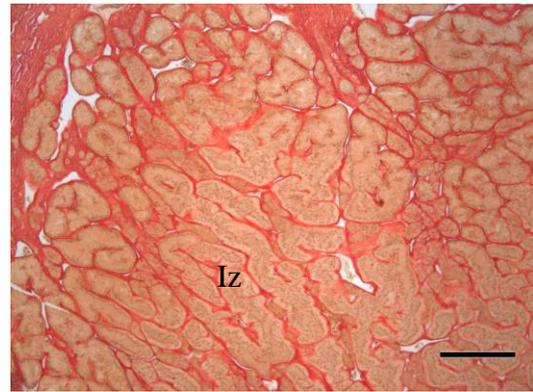


Abb. 16 Nebenniere Strauß, Innere Zone, van Gieson-Färbung, SB = 200 μ m

Die senkrecht zur Kapsel parallel zueinander verlaufenden Interrenalzellstränge (Iz) sind in Einzel- oder Zweierreihen arrangiert.

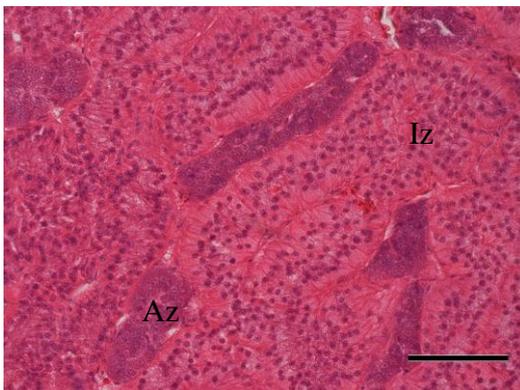


Abb. 17 Nebenniere Strauß, Innere Zone, H.E.-Färbung, SB = 100 μ m

Kompakte Interrenalzellreihen (Iz) mit deutlicher Zellgrenze. Die Adrenalzellen (Az) erschienen weniger organisiert.

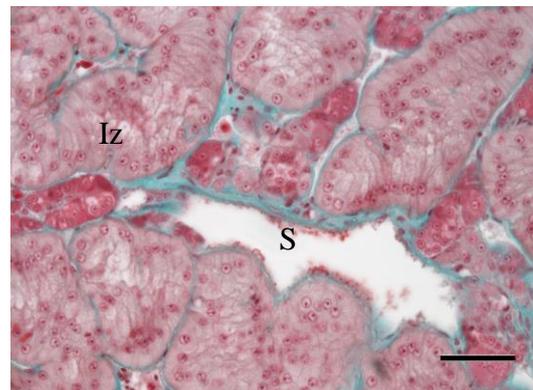


Abb. 18 Nebenniere Strauß, Innere Zone, Masson Goldner-Färbung, SB = 50 μ m

Die Zellkerne der Interrenalzellen (Iz) sind in dieser Zone rund. Die Sinusoide (S) sind in der IZ bereits größer.

Tab. 5 Histomorphologische Befunde der inneren Zone (IZ)

Vorhandene Zelltypen	Interrenalzellen	
	Adrenalzellen	
Interrenalzellen	Zellform	isoprismatisch bis polyedrisch
	Epithelhöhe	26,4 μm (\pm 5,0 μm)
	Zellkernform	rund
	Zellkerngröße	6,3 μm (\pm 1,1 μm)
	Zellkernlage	basales Zelldrittel
	Nucleoli	ein dominanter, manchmal zwei
	Basalmembran	regelmäßig, kräftig
Adrenalzellen	Zellform	polygonal
	Epithelhöhe	14,9 μm (\pm 3,6 μm)
	Zellkernform	kugelförmig, rund
	Zellkerngröße	6,0 μm (\pm 1,2 μm)
	Zellkernlage	zentral
	Nucleoli	ein bis zwei
	Basalmembran	unregelmäßig, dünn
Sinusoide	Lokalisation	Vereinzelte zwischen den Zellgruppen

Die zentrale Zone (ZZ) bildet den größten Bereich des Interrenalgewebes. Sie enthält Zellgruppen, die unregelmäßig verteilt liegen. Die Zellgruppen die aus zweireihigen oder mehrschichtigen Zellreihen aufgebaut sind, sind entweder klumpig, kompakt oder in zirkulären Gruppen in einem lockeren Verband angeordnet. Im perivaskulären Extrazellularraum liegen zwischen diesen Zellgruppen große, unregelmäßige Interzellularräume und venöse Sinusoide (Abb. 19, 20, 22). Die Zellgrenze der ZZ ist deutlich ausgeprägt. Die Zellen sind einschichtig hochprismatisch, durchschnittlich $22,0 \mu\text{m}$ ($\pm 4,3 \mu\text{m}$) groß und weisen ein azidophiles, dicht gefärbtes Zytoplasma auf. Sie besitzen runde, basal oder zentral gelegene Zellkerne mit einer mittleren Größe von $6,2 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) (Abb. 19-22).

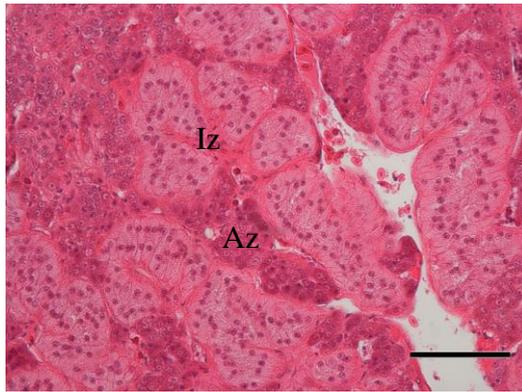


Abb. 19 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, H.E.-Färbung, SB = 100 µm

Die Zellkerne der Interrenalzellen (Iz) liegen sowohl basal als auch zentral. Die Adrenalzellen (AZ) liegen diffus verteilt vor.

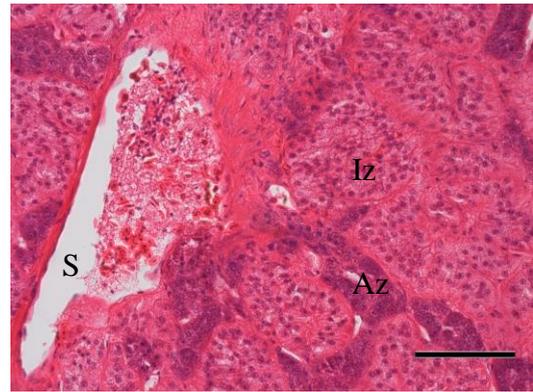


Abb. 20 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, H.E.-Färbung, SB = 100 µm

Im Zentrum der Nebenniere finden sich große Sinusoide (S) mit diskontinuierlichem Endothel und kernhaltigen Erythrozyten.

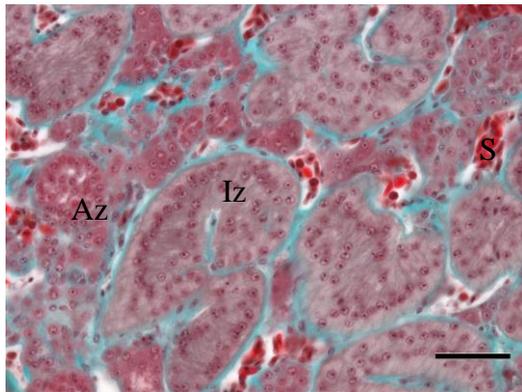


Abb. 21 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Masson Goldner-Färbung, SB = 50 µm

Die ZZ bildet den größten Bereich des Interrenalgewebes (Iz). Der Anteil der Adrenalzellinseln (Az) am Parenchym nimmt in der ZZ ebenfalls zu.

S = Sinusoid



Abb. 22 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, van Gieson-Färbung, SB = 50 µm

Die Sinusoide (S) stehen in enger Verbindung zu den Zellen.

Tab. 6 Histomorphologische Befunde der zentralen Zone (ZZ)

Vorhandene Zelltypen	Interrenalzellen	
	Adrenalzellen	
Interrenalzellen	Zellform	Isoprismatisch oder polygonal, klumpig
	Epithelhöhe	22,0 μm (\pm 4,3 μm)
	Zellkernform	rund
	Zellkerngröße	6,2 μm (\pm 1,1 μm)
	Zellkernlage	basal oder zentral
	Nucleoli	ein bis drei
	Basalmembran	regelmäßig, kräftig
Adrenalzellen	Zellform	polygonal
	Epithelhöhe	13,6 μm (\pm 2,9 μm)
	Zellkernform	rund
	Zellkerngröße	6,0 μm (\pm 1,2 μm)
	Zellkernlage	zentral
	Nucleoli	ein bis zwei
	Basalmembran	unregelmäßig, dünn
Sinusoide	Lokalisation	Peripher kleinere, zentral große

2.1.3. Morphometrische Untersuchungen

Die Epithelhöhen der beiden Zelltypen variieren in den verschiedenen Nebennierenzonen. Die Interrenalzellen weisen in der subkapsulären Zone (SKZ) eine mittlere Epithelhöhe von $24,3 \mu\text{m}$ ($\pm 5,1 \mu\text{m}$) auf, in der inneren Zone (IZ) besitzen sie eine Größe von durchschnittlich $26,4 \mu\text{m}$ ($\pm 5,0 \mu\text{m}$) und in der zentralen Zone (ZZ) ergibt sich ein Mittelwert von $22,0 \mu\text{m}$ ($\pm 4,3 \mu\text{m}$). Auf Grundlage der ANOVA und des Tukey HSD-Tests ergibt sich bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,001$ ein signifikanter Unterschied von $p = 0,001$ der Epithelhöhe in der SKZ, der IZ und der ZZ der Nebenniere. (Abb. 23).

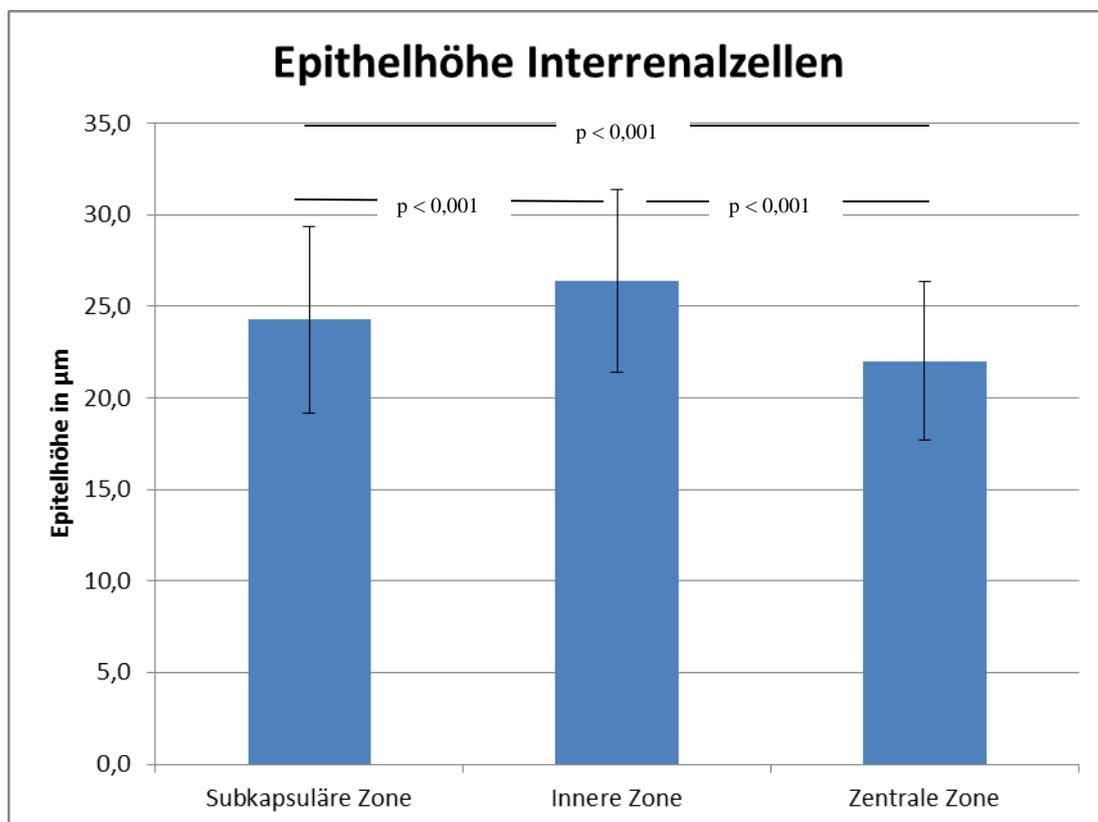


Abb. 23 Epithelhöhe der Interrenalzellen in den drei Zonen der Straußennebenniere

Ebenso ändern sich die Zellkerndurchmesser der Zellarten je nach Nebennierenzone. Bei den Interrenalzellen beträgt er in der subkapsulären Zone (SKZ) im Mittel $6,5 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$), in der inneren Zone (IZ) $6,3 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) und in der zentralen Zone (ZZ) $6,2 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$). Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ sind die Werte der Epithelhöhen der SKZ und der ZZ gegeneinander signifikant unterschiedlich, das Epithel der SKZ gegenüber der IZ und das der IZ gegenüber der ZZ hingegen sind nicht signifikant (n.s.) unterschiedlich zueinander (Abb. 24).

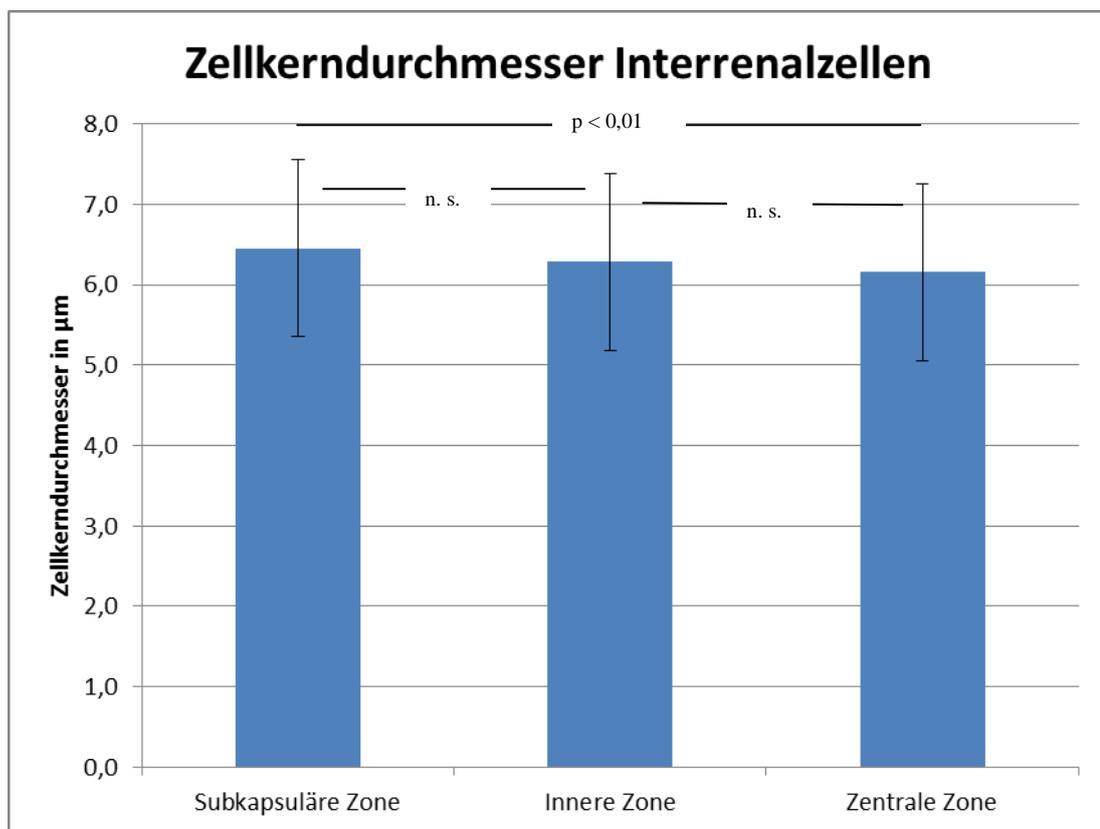


Abb. 24 Zellkerndurchmesser der Interrenalzellen in den drei Zonen der Straußenebenniere

Die Adrenalzellepithelien sind dagegen in der subkapsulären Zone $16,4 \mu\text{m}$ ($\pm 4,1 \mu\text{m}$) groß, in der inneren Zone ergibt sich ein mittlerer Wert von $14,9 \mu\text{m}$ ($\pm 3,6 \mu\text{m}$) und in der zentralen Zone ein Median von $13,6 \mu\text{m}$ ($\pm 2,9 \mu\text{m}$). Alle Werte sind zueinander statistisch signifikant unterschiedlich, $p = 0,001$ (Abb. 25).

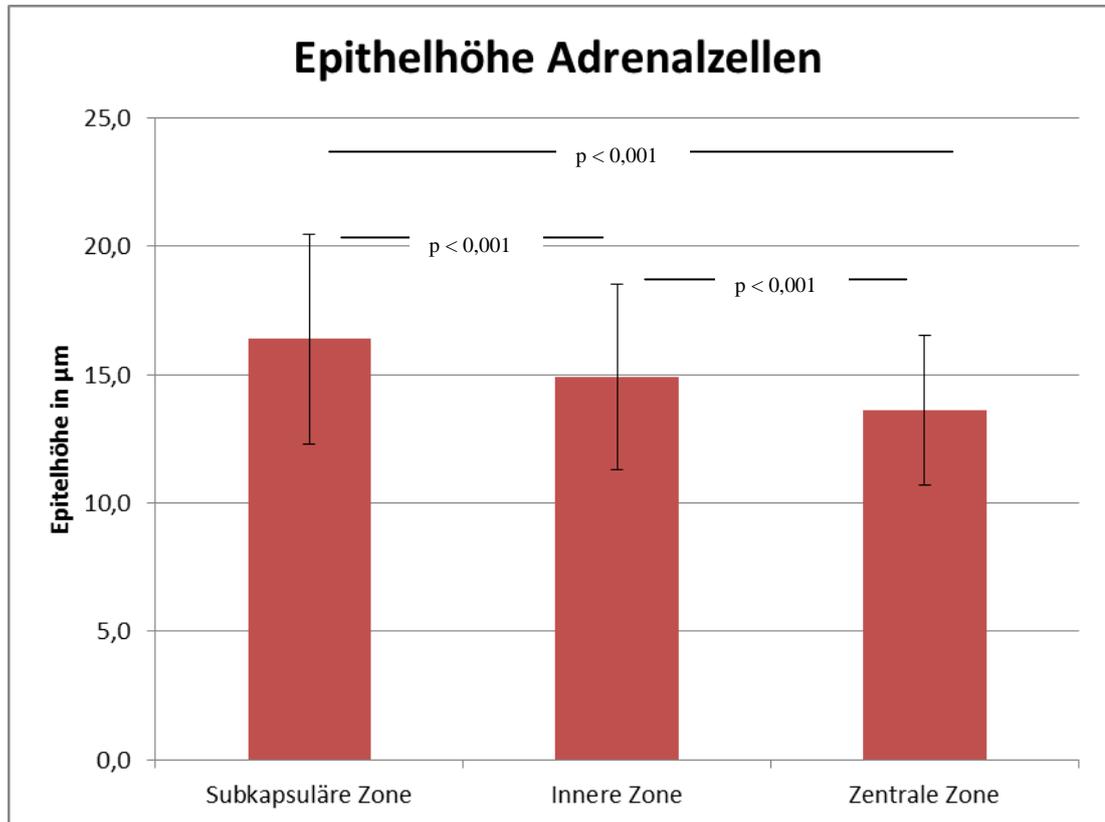


Abb. 25 Epithelhöhe der Adrenalzellen in den drei Zonen der Straußennebeniere

Die Zellkerne der Adrenalzellen weisen in der subkapsulären Zone einen mittleren Durchmesser von $6,2 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$), in der inneren Zone von $6,0 \mu\text{m}$ ($\pm 1,2 \mu\text{m}$) und in der zentralen Zone von $6,0 \mu\text{m}$ ($\pm 1,2 \mu\text{m}$), auf. Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zeigt sich, dass sie nicht signifikant unterschiedlich zueinander sind (Abb. 26).

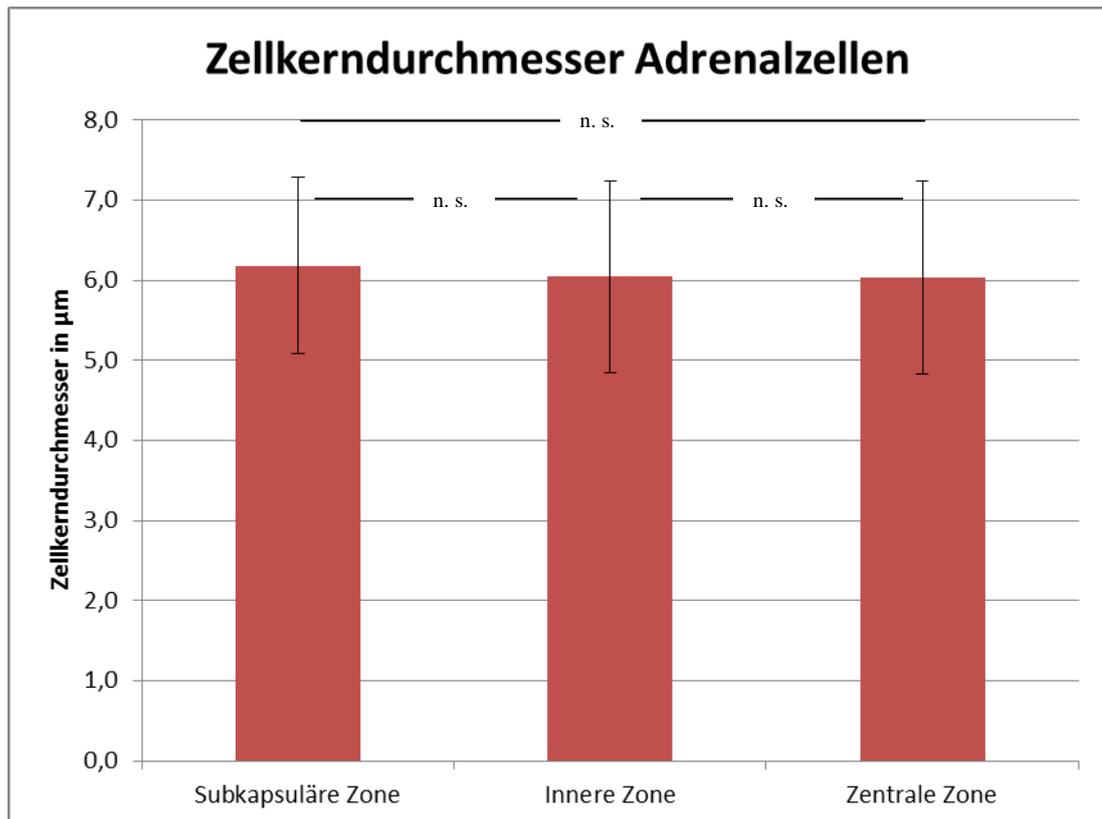


Abb. 26 Zellkerndurchmesser der Adrenalzellen in den drei Zonen der Straußennebenniere

2.1.4. Substrathistochemie

2.1.4.1. Alcianblau-Färbung

Bei der Alcianblau-Färbung mit einem pH-Wert von 2,5 sind insbesondere in der subkapsulären Zone positive Strukturen erkennbar. Die Basalmembran, die die Interrenalzellgruppen in der subkapsulären Zone umgibt, ist stark positiv. Weiter zentral lassen die Basalmembran und das Endothel der Sinusoide noch eine deutliche Färbung erkennen. Gleiches lässt sich an der kollagenhaltigen Nebennierenkapsel feststellen. Das Zytoplasma der Adrenalzellen weist eine sehr schwache Färbung auf. Das Zytoplasma der Interrenalzellen ist hingegen Alcianblau-negativ. Ebenso ist auch innerhalb der Zellkerne keine Färbung erkennbar.

Bei der Alcianblau-Färbung mit einem pH-Wert von 1,0 ist auch die Basalmembran stark Alcianblau-positiv. Die Organkapsel ist ebenfalls positiv, aber schwächer. An den beiden Nebennierenzelltypen ist kein Alcianblau-Reaktionsmuster auszumachen.

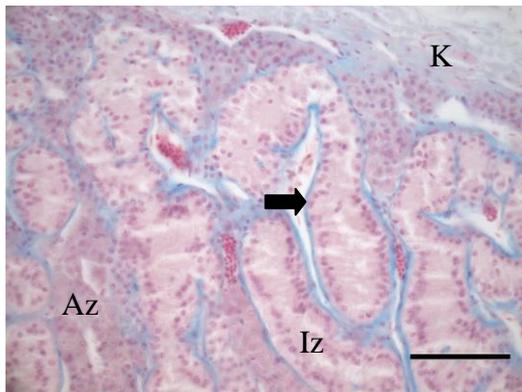


Abb. 27 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5, SB = 100 µm

Die Basalmembran in der SKZ zeigt eine stark positive Reaktion auf Alcianblau (Pfeil). Die Nebennierenkapsel (K) ist hingegen deutlich gefärbt. Die Adrenalzellen (Az) sind nur sehr schwach blau gefärbt, die Interrenalzellen (Iz) dagegen negativ.

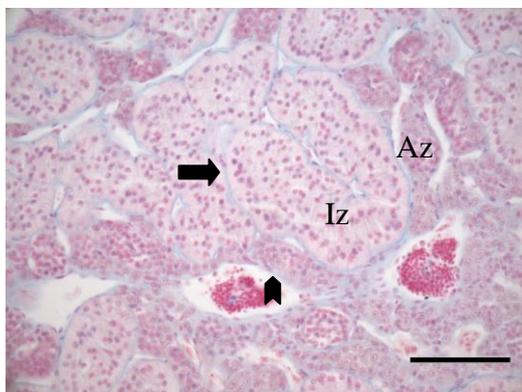


Abb. 29 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5, SB = 100 µm

Die Basalmembran (Pfeil) und das Gefäßendothel (Pfeilspitze) lassen eine deutliche Alcianblau-Färbung erkennen. Az = Adrenalzellen, Iz = Interrenalzellen

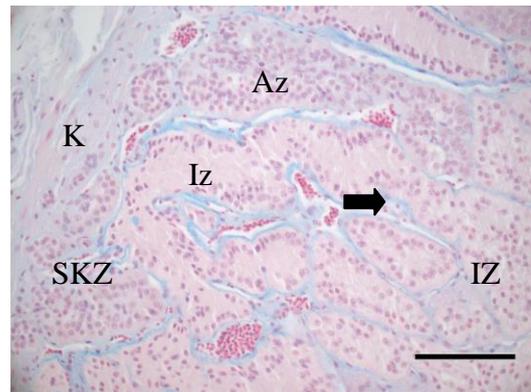


Abb. 28 Nebenniere Strauß, Periphere Zone, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5, SB = 100 µm

Beim Übergang von der SKZ in die IZ reagiert die Basalmembran noch deutlich positiv (Pfeil).

K = Kapsel, Az = Adrenalzellen, Iz = Interrenalzellen, SKZ = Subkapsuläre Zone, IZ = Innere Zone

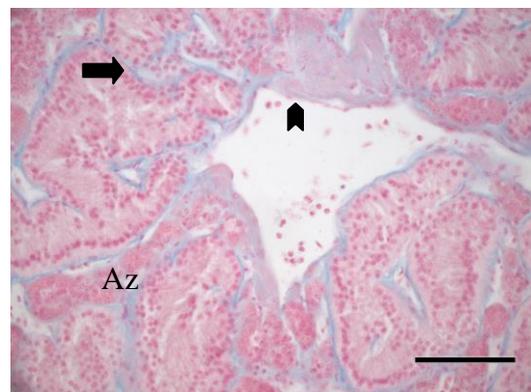


Abb. 30 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Alcianblau-Färbung bei pH 1,0, SB = 100 µm

Bei einem pH von 1,0 zeigt die die Zellen umgebende Basalmembran (Pfeil) eine stark positive Reaktion, das diskontinuierliche sinusoidale Endothel ist deutlich positiv gefärbt (Pfeilspitze), die Adrenalzellen dagegen nicht mehr.

2.1.4.2. PAS-Reaktion mit und ohne Amylaseverdau

Bei der PAS-Reaktion reagieren die bindegewebige Nebennierenkapsel und die Basalmembran mit ihren retikulären Fasern, die sich in der subkapsulären Zone befinden, deutlich positiv. Zur Organmitte hin besitzt die Basalmembran noch eine mittelgradig-starke Farbintensität, diese gleicht jener des sinusoidalen Endothels und der Tunica media der Blutgefäße innerhalb der Organkapsel. Das Zytoplasma der endokrinen Zellen verhält sich hingegen PAS-negativ.

Nach Amylaseverdau verändert sich das Ergebnis der Färbung nicht. Alle Strukturen, die in der PAS-Reaktion positiv sind, zeigen ebenso nach Amylaseverdau eine Reaktion.

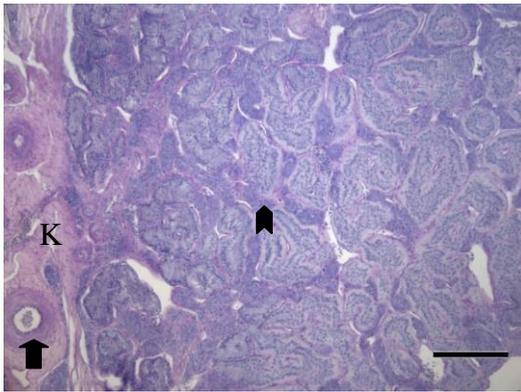


Abb. 31 Nebenniere Strauß, Periphere Zone, PAS-Reaktion, SB = 200 μ m

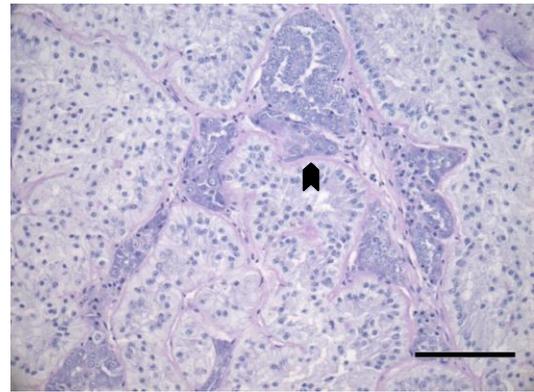


Abb. 32 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, PAS-Reaktion, SB = 100 μ m

Die Kollagenfasern der Nebennierenkapsel (K), die Tunica media der in ihr gelegenen Gefäße (Pfeil) und die retikulären Fasern der Basalmembran (Pfeilspitze) sind stark PAS-positiv.

Im Zentrum reagiert die Basalmembran noch deutlich positiv (Pfeilspitze).

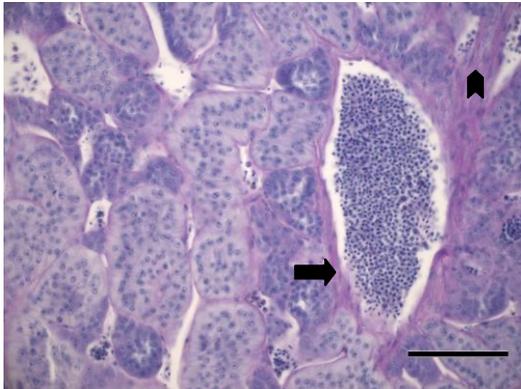


Abb. 33 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, PAS-Reaktion, SB = 100 μ m

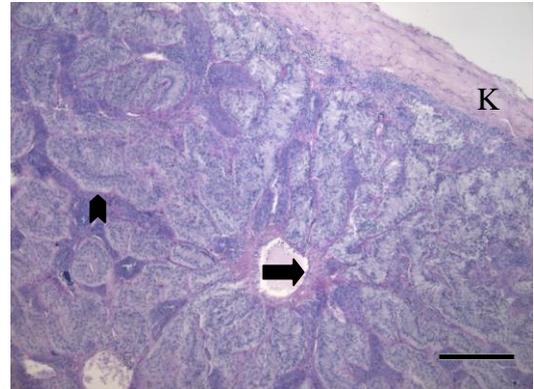


Abb. 34 Nebenniere Strauß, Periphere Zone, PAS-Reaktion mit Amylaseverdau, SB = 200 μ m

Starke Reaktion am Blutgefäßendothel (Pfeil) und dem bindegewebigen Septum (Pfeilspitze), das von der Kapsel entlassen wird.

Kapsel (K), Basalmembran (Pfeilspitze) und Blutgefäße (Pfeil) weisen weiterhin eine starke PAS-Reaktion auf.

2.2. Immunhistochemische Untersuchungen an der Nebenniere

2.2.1. Immunhistochemischer Nachweis von Smooth Muscle Actin

Mit dem Antikörper gegen α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) ist an der Nebennierenkapsel, an der Tunica media der Blutgefäße und am Endothel der Sinusoide eine stark positive Reaktion zu erkennen (Abb. 35-38). Die multipolaren Nervenzellen der peripheren Nerven zeigen eine deutlich erkennbare Reaktion (Abb. 35). Gelegentlich ist im Zytoplasma der Erythrozyten eine schwache Färbung auszumachen (Abb. 38). Die Epithelien der Interrenal- und Adrenalzellen hingegen reagieren immunnegativ.

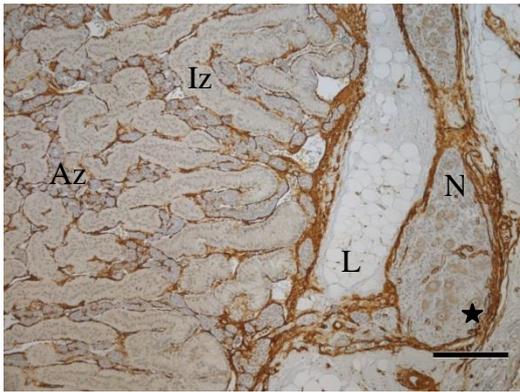


Abb. 35 Nebenniere Strauß, Periphere Zone, Immunhistochemischer SMA-Nachweis, SB = 200 µm

Kapsel und Basalmembran sind stark-, multipolare Nervenzellkerne (Stern) deutlich immunpositiv.

Iz = Interrenalzellen, Az = Adrenalzellen, L = Lipidtröpfchen, N = Nerv

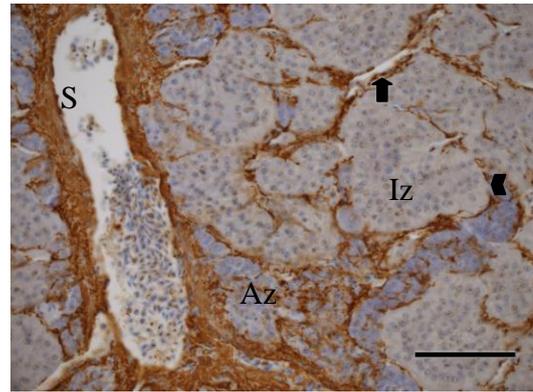


Abb. 36 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer SMA-Nachweis, SB = 100 µm

Starke SMA-Reaktion des Sinusoids (S), der Bindegewebssepten (Pfeil) und der Basalmembran (Pfeilspitze).

Iz = Interrenalzellen, Az = Adrenalzellen

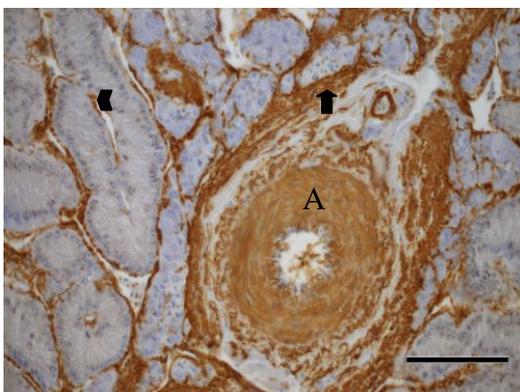


Abb. 37 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer SMA-Nachweis, 100 µm

Die Tunica media der Arterie (A) zeigt eine starke Reaktion auf SMA ebenso wie die Bindegewebssepten (Pfeil) und die Basalmembran (Pfeilspitze).

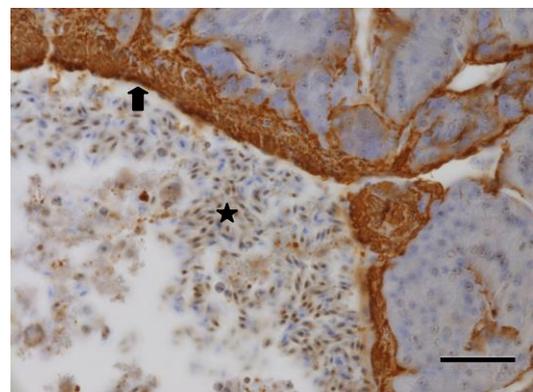


Abb. 38 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer SMA-Nachweis, SB = 50 µm

Das sinusoidale Endothel (Pfeil) weist ebenfalls eine starke SMA-Färbung auf. Die kernhaltigen Erythrozyten sind schwach immunpositiv (Stern).

Tab. 7 Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA

Zelltyp/Gewebeteil		SKZ	IZ	ZZ
Interrenalzellen	Zytoplasma	-	-	-
	Zellkern	-	-	-
Adrenalzellen	Zytoplasma	-	-	-
	Zellkern	-	-	-
	Granula	-	-	-
Organkapsel		+++		
Basalmembran		+++	+++	+++
Blutgefäße		+++	+++	+++
Periphere Nerven		++		

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

2.2.2. Immunhistochemischer Nachweis von Non-Muscle Myosin

Beim Nachweis von Non-Muscle Myosin (NMM) verhalten sich die bindegewebige Nebennierenkapsel, ebenso wie die Basalmembran sowie die Tunica media und interna der Blutgefäße stark immunpositiv (Abb. 39-41). Außerdem zeigen die peripheren Nerven, die eingebettet in der Kapsel liegen, ebenso eine stark Anti-Myosin-positive Färbung (Abb. 42). Das Zytoplasma der Adrenalzellen weist eine deutlich erkennbare Reaktion auf (Abb. 39, 41). Bei den Erythrozyten ist in einigen Bereichen der Nebenniere hin und wieder auch eine deutliche Färbung auszumachen (Abb. 40). Das Epithel der Interrenalzellen zeigt keine Immunfärbung.

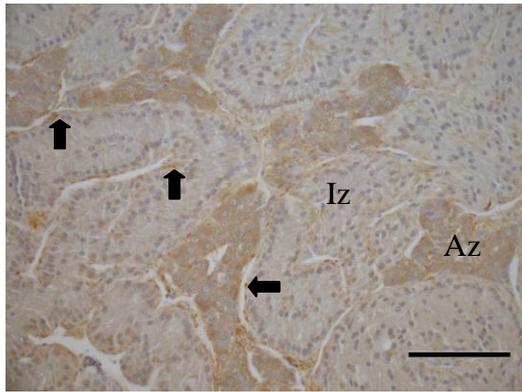


Abb. 39 Nebenniere Strauß, Innere Zone, Immunhistochemischer NMM-Nachweis, SB = 100 µm

Das Zytoplasma der Adrenalzellen (Az) ist deutlich-, die Basalmembran (Pfeile) dagegen stark NMM-positiv.

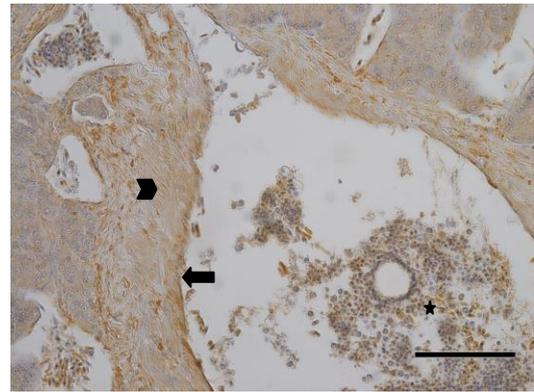


Abb. 40 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer NMM-Nachweis, 100 µm

Tunica media (Pfeilspitze) und interna (Pfeil) der Vene sind stark immunpositiv, das Zytoplasma der Erythrozyten (Stern) ist deutlich gefärbt.

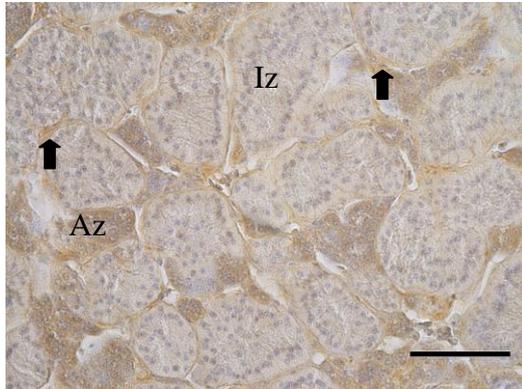


Abb. 41 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer NMM-Nachweis, 100 µm

Iz = Interrenalzellen, Az = Adrenalzellen

Pfeile = Basalmembran

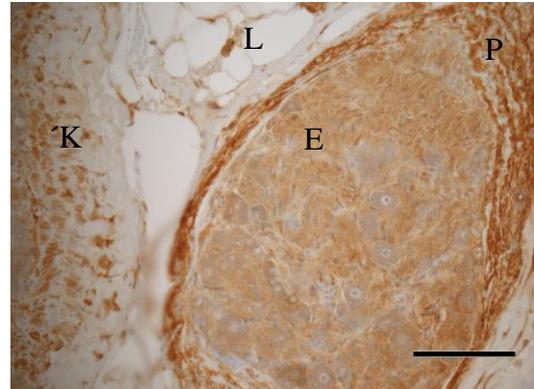


Abb. 42 Nebenniere Strauß, Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer NMM-Nachweis, 100 µm

Stark immunpositives Endo- (E) und Perineurium (P) eines Nerven

K = Kapsel, L = Lipidtropfen

Tab. 8 Immunhistochemischer Nachweis von NMM

Zelltyp/Gewebeteil		SKZ	IZ	ZZ
Interrenalzellen	Zytoplasma	-	-	-
	Zellkern	-	-	-
Adrenalzellen	Zytoplasma	++	++	++
	Zellkern	-	-	-
	Granula	-	-	-
Organkapsel		+++		
Basalmembran		+++	+++	+++
Blutgefäße		+++	+++	+++
Periphere Nerven		+++		

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

2.2.3. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Vimentin-Antikörper weist die Basalmembran, die die Interrenalzellgruppen separiert, eine deutlich positive Reaktion auf (Abb. 43, 44). Die Interrenalzellen selbst zeigen allerdings keine immunhistochemische Färbung. Die bindegewebige Nebennierenkapsel reagiert schwach positiv auf Anti-Vimentin (Abb. 44). Dagegen ist das Zytoplasma der Adrenalzellen sehr stark Vimentin-positiv (Abb. 43-46) und das Endothel der Blutgefäße ist ebenfalls stark gefärbt (Abb. 45, 46). Die peripheren Nerven zeigen innerhalb der multipolaren Ganglienzellen keine Reaktion, innerhalb des bindegewebigen Endoneuriums ist allerdings eine deutliche positive Färbung erkennbar.

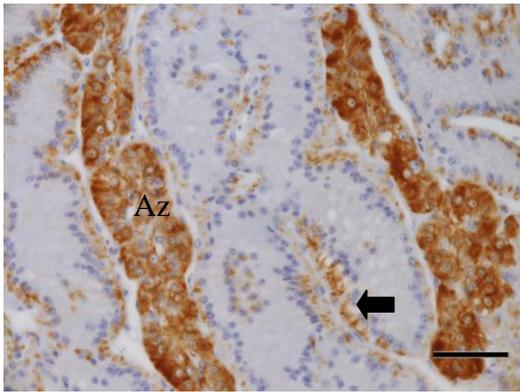


Abb. 43 Nebenniere Strauß, Innere Zone, Immunhistochemischer Vimentin-Nachweis, SB = 50 μ m

Stark Vimentin-positive zytoplasmatische Färbung der Adrenalzellen (Az). Die Basalmembran reagiert ebenfalls immunpositiv (Pfeil).

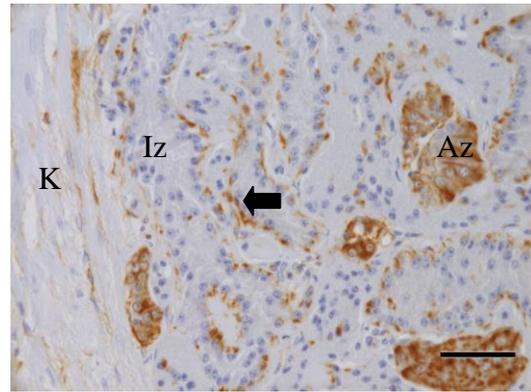


Abb. 44 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Vimentin-Nachweis, SB = 50 μ m

Die Adrenalzellen (Az) sind stark immunpositiv, die Basalmembran (Pfeil) reagiert deutlich positiv und die Nebennierenkapsel (K) schwach positiv auf den Antikörper .

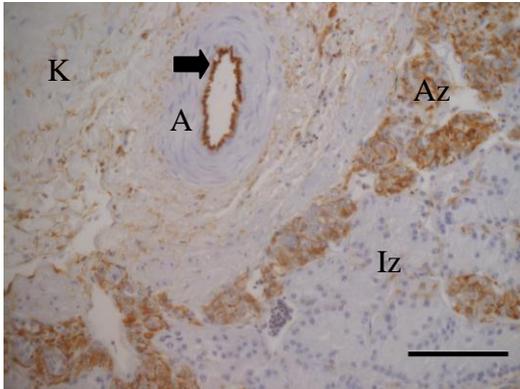


Abb. 45 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Vimentin-Nachweis, SB = 100 μ m

Starke endotheliale Reaktion (Pfeil) der Arterie (A). Die Adrenalzellreihe (Az) zeigt ebenfalls eine stark positive Reaktion auf Anti-Vimentin. Iz = Interrenalzellen, K = Nebennierenkapsel

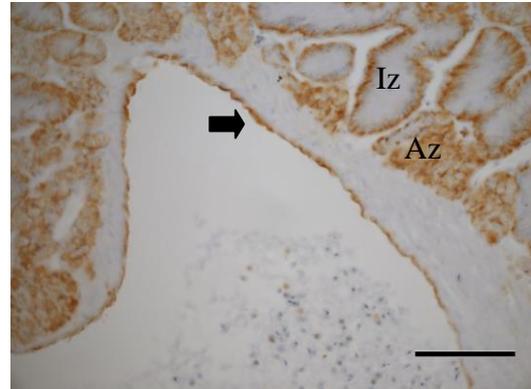


Abb. 46 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer Vimentin-Nachweis, SB = 100 μ m

Pfeil = stark Vimentin-positive Endothelzellen, Az = Adrenalzellen, Iz = Interrenalzellen,

Tab. 9 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Zelltyp/Gewebeteil		SKZ	IZ	ZZ
Interrenalzellen	Zytoplasma	-	-	-
	Zellkern	-	-	-
Adrenalzellen	Zytoplasma	+++	+++	+++
	Zellkern	-	-	-
	Granula	-	-	-
Organkapsel		+		
Basalmembran		++	++	++
Blutgefäße		+++	+++	+++
Periphere Nerven		++		

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

2.2.4. Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin

Paraffinschnitte

Bei den Paraffinschnitten zeigt sich im gesamten Parenchym der Nebenniere ein immunnegatives Reaktionsmuster mit dem Anti-Pancytokeratin-Antikörper. Lediglich die Tunica interna der Blutgefäße insbesondere das isoprismatische Endothel der postkapillären Venolen (HEV, *high endothelial venule*) nahe des lymphatischen Gewebes (Abb. 47, 48) und das Perineurium der peripheren Nerven innerhalb der Nebennierenkapsel (Abb. 49) weisen ein stark positives Bild auf. Das Zytoplasma der Erythrozyten ist deutlich angefärbt (Abb. 50).

Gefrierschnitte

Abhängig von der verwendeten Fixierung sind unterschiedliche Bereiche der Nebenniere angefärbt. Bei den unfixierten Schnitten ist die Tunica interna der in der Kapsel eingebetteten Blutgefäße stark positiv, das restliche Gewebe dagegen nicht gefärbt. Bei den mit Aceton fixierten Schnitten ist ebenso die Tunica interna der Blutgefäße stark positiv und das Zytoplasma der Interrenalzellen deutlich immunpositiv (Abb. 51, 52). Die Adrenalzellen färben sich nicht an. Die mit Methanol fixierten Objektträger weisen nur eine sehr schwache Färbung an den Interrenalzellen auf, ansonsten zeigt sich keine Reaktion auf den Marker. Die mit Formalin vorbehandelten Schnitte weisen ebenfalls wieder eine starke positive Reaktion in der Tunica interna der kapselständigen Blutgefäße und eine deutliche Färbung des Zytoplasmas der Interrenalzellen auf (Abb. 53). Das übrige Gewebe verhält sich immunnegativ.

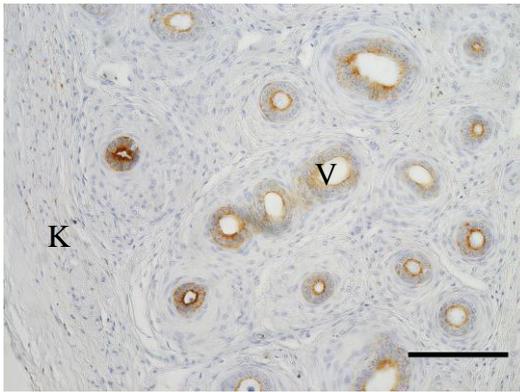


Abb. 47 Nebenniere Strauß, Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis, SB = 100 µm

Stark Pancytokeratin-positives Endothel der kubischen postkapillären Venolen (V) innerhalb der Nebennierenkapsel (K).

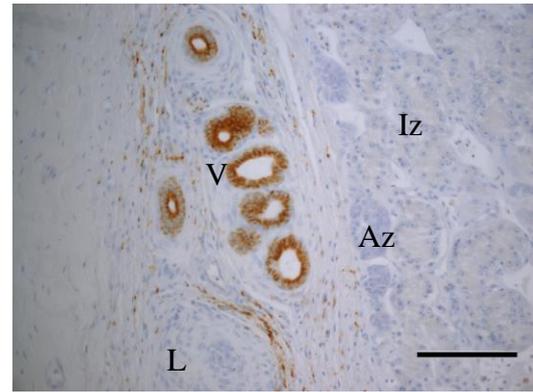


Abb. 48 Nebenniere Strauß, Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis, SB = 100 µm

V = postkapilläre Venolen, L = Lymphatisches Gewebe, Iz = Interrenalzellen, Az = Adrenalzellen

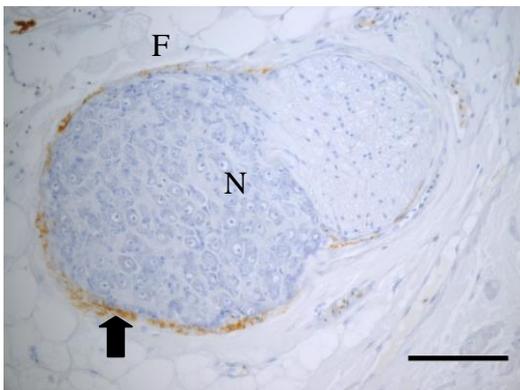


Abb. 49 Nebenniere Strauß, Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis, SB = 100 µm

Stark Immunpositives Perineurium (Pfeil) des peripheren Nervs (N). F = Fettzellen

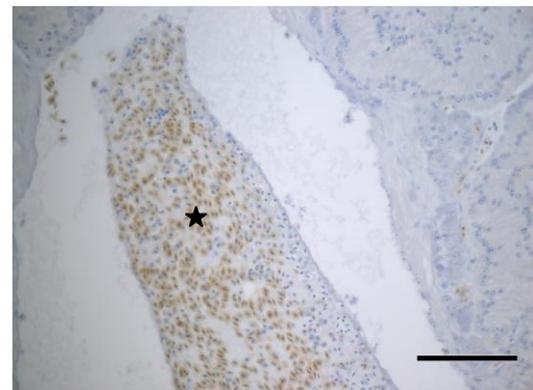


Abb. 50 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis, SB = 100 µm

Die Erythrozyten sind deutlich Pancytokeratin-positiv (Stern).

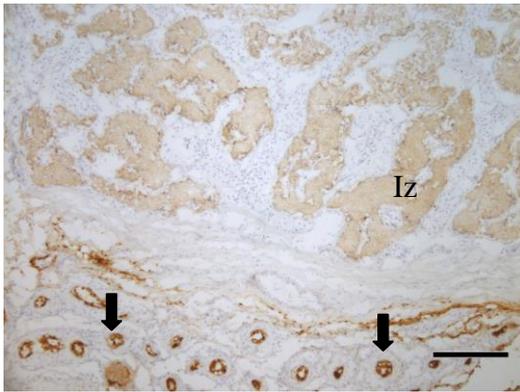


Abb. 51 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis, Cryoschnitt, Acetonfixierung, SB = 200 µm

Starke Anfärbung der postkapillären Venolen (Pfeile) und deutliche Reaktion des Interrenalzellzytoplasmas (Iz).

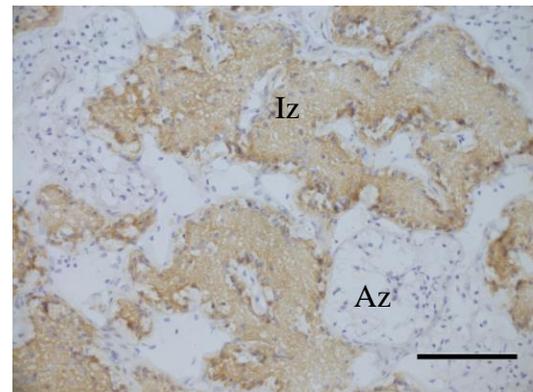


Abb. 52 Nebenniere Strauß, Innere Zone, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis, Cryoschnitt, Acetonfixierung, SB = 100 µm

Die Interrenalzellen (Iz) sind deutlich immunpositiv, die Adrenalzellen (Az) bleiben ungefärbt.

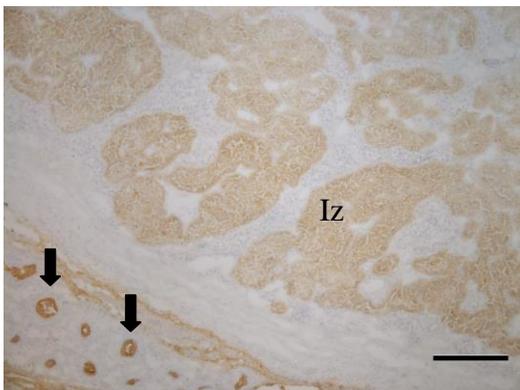


Abb. 53 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis, Cryoschnitt, Formalinfixierung, SB = 200 µm

Das Blutgefäßendothel (Pfeil) ist stark Pancytokeratin-positiv gefärbt, das Zytoplasma der Interrenalzellen (Iz) dagegen deutlich markiert.

Tab. 10 Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin

Zelltyp/Gewebeteil		SKZ		IZ		ZZ	
		PS	GF	PS	GF	PS	GF
Interrenalzellen	Zytoplasma	-	++ A,F + M	-	++ A,F + M	-	++ A,F + M
	Zellkern	-	-	-	-	-	-
Adrenalzellen	Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
	Zellkern	-	-	-	-	-	-
	Granula	-	-	-	-	-	-
Organkapsel		-	-				
Basalmembran		-	-	-	-	-	-
Blutgefäße		+++	+++ U,A,F	-	-	-	-
Periphere Nerven		++					

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

PS = Paraffinschnitte, GF = Gefrierschnitte

U = unfixiert, A = Aceton-, M = Methanol-, F = Formalinfixierung

2.2.5. Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Die Adrenalzellen weisen beim Tubulin-Nachweis eine starke zytoplasmatische Anfärbung auf (Abb. 54-57). Das Zytoplasma der Interrenalzellen ist schwach immunpositiv, vor allem im basalen Zelldrittel (Abb. 55-57). Die bindegewebige Nebennierenkapsel und die Basalmembranen zeigen allerdings keine Reaktion auf Anti-Vimentin (Abb. 54, 56). Bei den Blutgefäßen zeigt die Tunica interna eine stark Tubulin-positive Reaktion und die Tunica media eine deutliche Färbung. An den peripheren Nerven lässt sich eine stark positive Immunreaktion mit dem Antikörper ausmachen (Abb. 56).

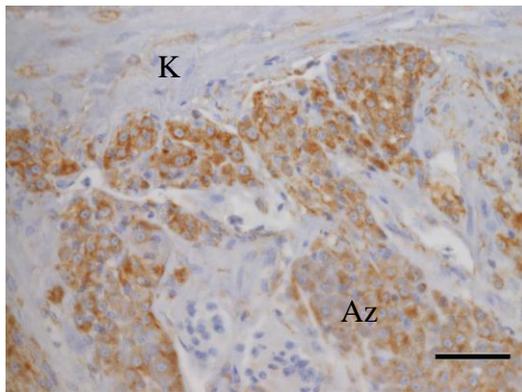


Abb. 54 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Tubulin-Nachweis, SB = 50 μ m

Die Adrenalzellen sind stark immunpositiv (Az). K = Bindegewebige Nebennierenkapsel

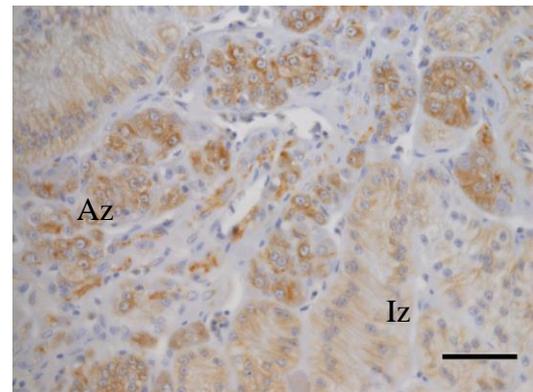


Abb. 55 Nebenniere Strauß, Innere Zone, Immunhistochemischer Tubulin-Nachweis, SB = 50 μ m

Iz = Interrenalzellen, Az = Adrenalzellen

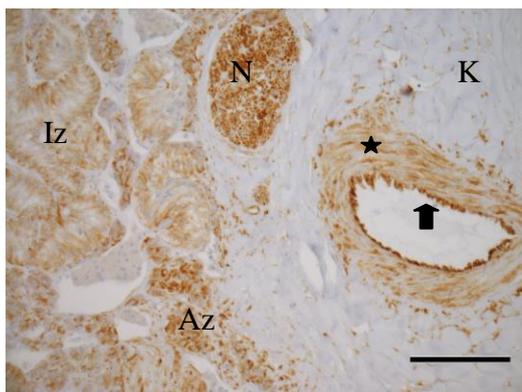


Abb. 56 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Tubulin-Nachweis, SB = 100 μ m

Das Endothel der Arterie (Pfeil), das Endoneurium des peripheren Nervs (N) und das Zytoplasma der Adrenalzellen (Az) zeigen eine stark Tubulin-positive Reaktion. Die Tunica media des Blutgefäßes (Stern) ist deutlich- und das basale Zytoplasma der Interrenalzellen (Iz) schwach gefärbt.

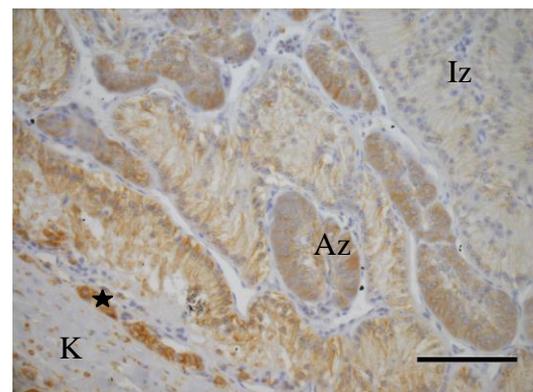


Abb. 57 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Tubulin-Nachweis, SB = 100 μ m

K = Kapsel, Iz = Interrenalzellen, Az = stark immunpositive Adrenalzellen, Stern = einzelne Adrenalzellbündel liegen eingebettet in der Nebennierenkapsel

Tab. 11 Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Zelltyp/Gewebeteil		SKZ	IZ	ZZ
Interrenalzellen	Zytoplasma	+	+	+
	Zellkern	-	-	-
Adrenalzellen	Zytoplasma	+++	+++	+++
	Zellkern	-	-	-
	Granula	-	-	-
Organkapsel		-		
Basalmembran		-	-	-
Blutgefäße		+++		
Periphere Nerven		+++		

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

2.2.6. Immunhistochemischer Nachweis von S100

Paraffinschnitte

Beim Nachweis von S100 weist das Zytoplasma der Adrenalzellen durchweg eine stark positive Immunreaktion auf (Abb. 58-61). Ebenso ist an den peripheren Nerven eine starke Färbung zu erkennen. Hier zeigen sich das Endoneurium sowie das Perineurium sehr stark reaktiv, der Kern ist hingegen deutlich positiv gefärbt (Abb. 60, 61). Die Erythrozyten weisen vereinzelt eine deutliche Anfärbung auf. Das Epithel der Interrenalzellen und die Blutgefäße reagieren negativ.

Gefrierschnitte

Bei den mit Aceton fixierten Schnitten verhält sich das Zytoplasma der Adrenalzellen schwach S100-positiv, das weitere Nebennierenparenchym reagiert hingegen nicht mit dem Antikörper. Es sind lediglich unspezifische Reaktionen am übrigen Gewebe auszumachen (Abb. 62, 63).

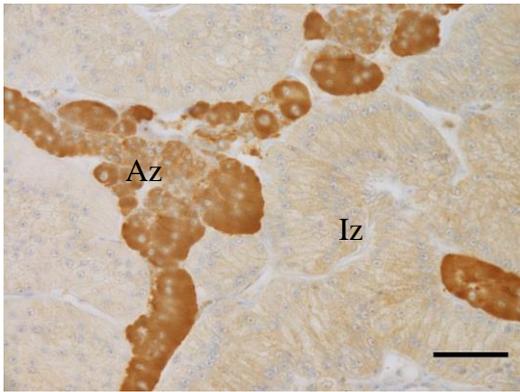


Abb. 58 Nebenniere Strauß, Innere Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis, SB = 50 µm

Das Zytoplasma der Adrenalzellen reagiert sehr stark S100-positiv. Die Interrenalzellen reagieren hingegen nicht.

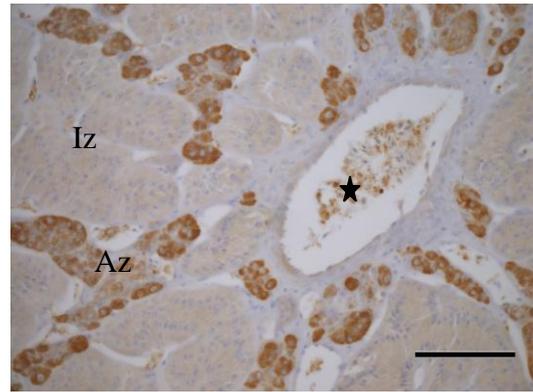


Abb. 59 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis, SB = 100 µm

Az = Adrenalzellen, Iz = Interrenalzellen, neuroendokrine Adrenalzellen im Lumen des Blutgefäßes (Stern)

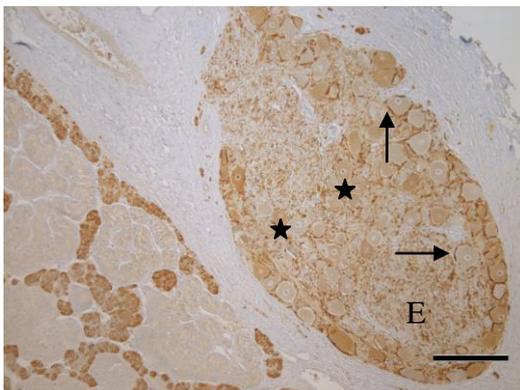


Abb. 60 Nebenniere Strauß, Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer S100-Nachweis, SB = 200 µm

Das Perineurium (Pfeile) und das Endoneurium (E) sind stark mit Anti-S100 markiert, die multipolaren Nervenzellen (Stern) sind deutlich immunpositiv.

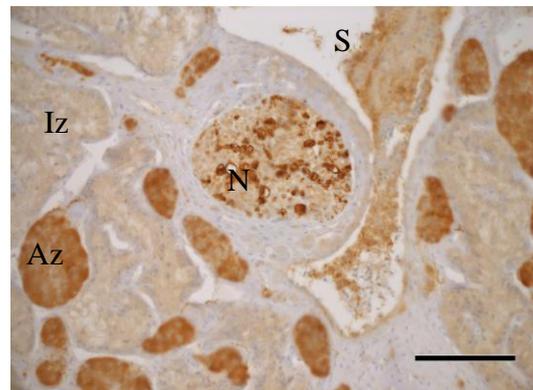


Abb. 61 Nebenniere Strauß, Innere Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis, SB = 100 µm

N = Nervenfaserbündel, S = Sinusoid, Iz = Interrenalzellen, Az = Adrenalzellen

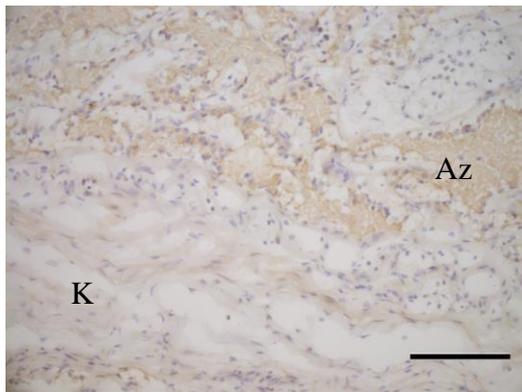


Abb. 62 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis, Cryoschnitt, Acetonfixierung, SB = 100 µm

Schwach immunpositive Adrenalzellen (Az), das übrige Parenchym und die Organkapsel (K) weisen keine Markierung mit dem Antikörper gegen S100 auf.

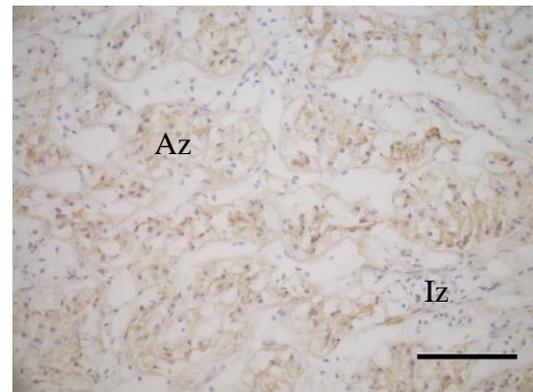


Abb. 63 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis, Cryoschnitt, Acetonfixierung, SB = 100 µm

Az = Adrenalzellen, Iz = Interrenalzellen

Tab. 12 Immunhistochemischer Nachweis von S100

Zelltyp/Gewebeteil		SKZ		IZ		ZZ	
		PS	GF	PS	GF	PS	GF
Interrenalzellen	Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
	Zellkern	-	-	-	-	-	-
Adrenalzellen	Zytoplasma	+++	+ A	+++	+ A	+++	+ A
	Zellkern	-	-	-	-	-	-
	Granula	-	-	-	-	-	-
Organkapsel		-	-				
Basalmembran		-	-	-	-	-	-
Blutgefäße		-	-	-	-	-	-
Periphere Nerven		+++					

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

A = Aceton

2.2.7. Immunhistochemischer Nachweis von neuronaler Enolase

Paraffinschnitte

Bei der immunhistochemischen Untersuchung auf Neuronspezifische Enolase (NSE) weisen die Zellkerne der Adrenalzellen, die sich innerhalb der umliegenden Sinusoide befinden, eine starke Anfärbung auf (Abb. 64-66). Weiterhin zeigen die multipolaren Nervenzellkerne eine deutliche Immunreaktion (Abb. 67). Die Interrenalzellen und die bindegewebige Nebennierenkapsel färben sich nicht an.

Gefrierschnitte

Die am Kryotom gefertigten Schnitte weisen bei allen Fixiertechniken durchweg ein unspezifisches Färbemuster beim immunhistochemischen Nachweis von NSE auf.

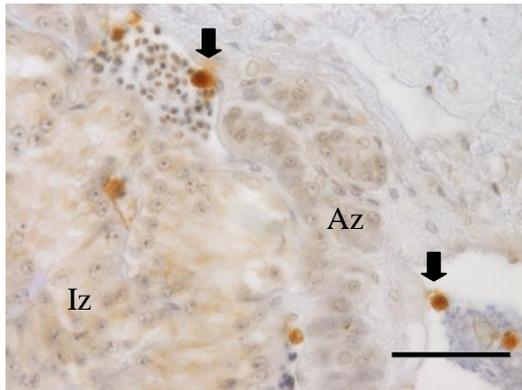


Abb. 64 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer NSE-Nachweis, SB = 50 µm

Stark S100-positive Reaktion der Zellkerne der Adrenalzellen (Pfeile) in den Blutgefäßen.

Az = Adrenalzellen, Iz = Interrenalzellen

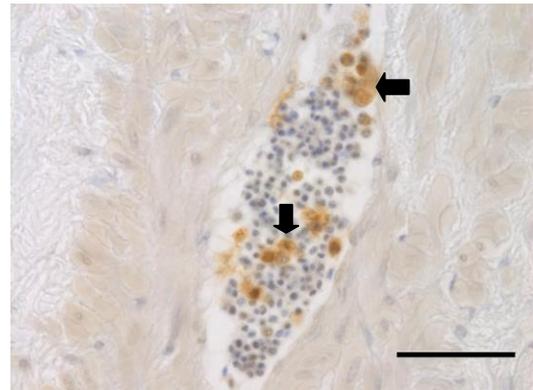


Abb. 65 Nebenniere Strauß, Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer NSE-Nachweis, SB = 50 µm

Im Lumen des Blutgefäßes gelegene Zellkerne der Adrenalzellen (Pfeile) mit starker Immunreaktion.

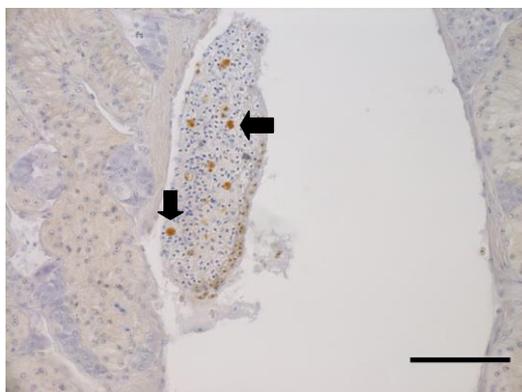


Abb. 66 Nebenniere Strauß, Zentrale Zone, Immunhistochemischer NSE-Nachweis, SB = 100 µm

Zentral gelegener Sinusoid mit stark immunpositiven Zellkernen der Adrenalzellen (Pfeile).

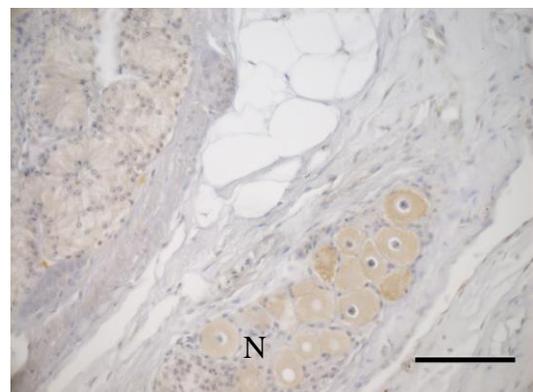


Abb. 67 Nebenniere Strauß, Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer NSE-Nachweis, SB = 100 µm

Die multipolaren Nervenzellen zeigen eine deutliche Reaktion auf den Antikörper (N).

Tab. 13 Immunhistochemischer Nachweis von NSE

Zelltyp/Gewebteil		SKZ		IZ		ZZ	
		PS	GF	PS	GF	PS	GF
Interrenalzellen	Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
	Zellkern	-	-	-	-	-	-
Adrenalzellen	Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
	Zellkern	+++	-	+++	-	+++	-
	Granula	-	-	-	-	-	-
Organkapsel		-	-				
Basalmembran		-	-	-	-	-	-
Blutgefäße		-	-	-	-	-	-
Periphere Nerven		++					

- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv

2.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Nebenniere

2.3.1. Interrenalzellen

Die Interrenalzellen der Strauße weisen eine polygonale, unregelmäßige Form auf. In ihrem Zytoplasma sind zahlreiche Lipidtröpfchen zu finden. Diese sind groß, oval oder rund und weisen keine begrenzende Membran auf (Abb. 68, 69, 73, 77). Aufgrund der elektronenmikroskopischen Präparation erscheinen sie häufig vakuolenartig, da bei dem Einbettungsvorgang das enthaltene Fett häufig durch Alkohole herausgewaschen wird. Selten sind aber auch Lipidtropfen mit einer geringen Elektronendichte auffindbar.

Weiterhin sind im Zytoplasma viele Mitochondrien von unterschiedlicher Gestalt gelegen. Es kommen große, runde oder ovale Mitochondrien sowohl vom Cristae-Typ als auch vom Tubulus-Typ vor, die durch Einstülpungen ihrer inneren Membran gebildet werden. Teilweise kommen beide Typen auch innerhalb der gleichen Zelle vor. Es überwiegen allerdings die tubulären Mitochondrien (Abb. 69, 73, 75).

Außerdem befinden sich in den Interrenalzellen reichlich glattes Endoplasmatisches Retikulum, viele freie Ribosomen sowie zahlreiche dunkle membranumgebene Lysosomen mit hoher Elektronendichte (Abb. 73). Rauen Endoplasmatisches Retikulum kann spärlich gesichtet werden, meist ist dieses dann mit Ribosomen assoziiert (Abb. 69, 75). Das raue Endoplasmatische Retikulum umrahmt häufig die Mitochondrien und die Lipidtropfen. Das Auftreten zahlreicher Lipidtropfen in Verbindung mit Mitochondrien vom Tubulus-Typ und glattem Endoplasmatischen Retikulum ist ein Charakteristikum Steroidhormon produzierender Zellen.

Die Zellkerne der Interrenalzellen sind groß und polygonal geformt. Sie können rund oder länglich oval sein und liegen entweder basal oder zentral innerhalb der Zelle (Abb. 68, 69, 73). Ihr Karyoplasma erscheint granulär und dicht; hauptsächlich tritt das Chromatin als Euchromatin in Erscheinung. An der Innenseite der Zellkernmembran oder um den Nukleolus herum kann es allerdings auch als Heterochromatin auftreten (Abb. 70, 71, 73). Die Kernhülle ist ebenfalls

von unregelmäßiger Form und weist häufig Kernporen auf. Der perinukleäre Raum ist deutlich angelegt. Die Nucleoli sind groß und prominent, erscheinen sehr dicht und besitzen keine Membran (Abb. 69, 70, 71).

Die Interrenalzellgruppen werden von einer Basalmembran umschlossen. Elektronenmikroskopisch kann nun auch die Basallamina erkannt werden, die sich an die lichtmikroskopisch sichtbare Lamina fibroreticularis anschließt (Abb. 78). Die einzelnen Interrenalzellen innerhalb einer Gruppe werden häufig durch Interzellularräume voneinander getrennt. Die Zellmembranen sind meist miteinander durch *Zonulae occludentes* (*Tight junctions*) und *Zonulae adherentes* verbunden (Abb. 75, 76). Die Zellgruppen der Interrenalkörper sind von den Adrenalzellhaufen durch eine Basalmembran separiert (Abb. 78).

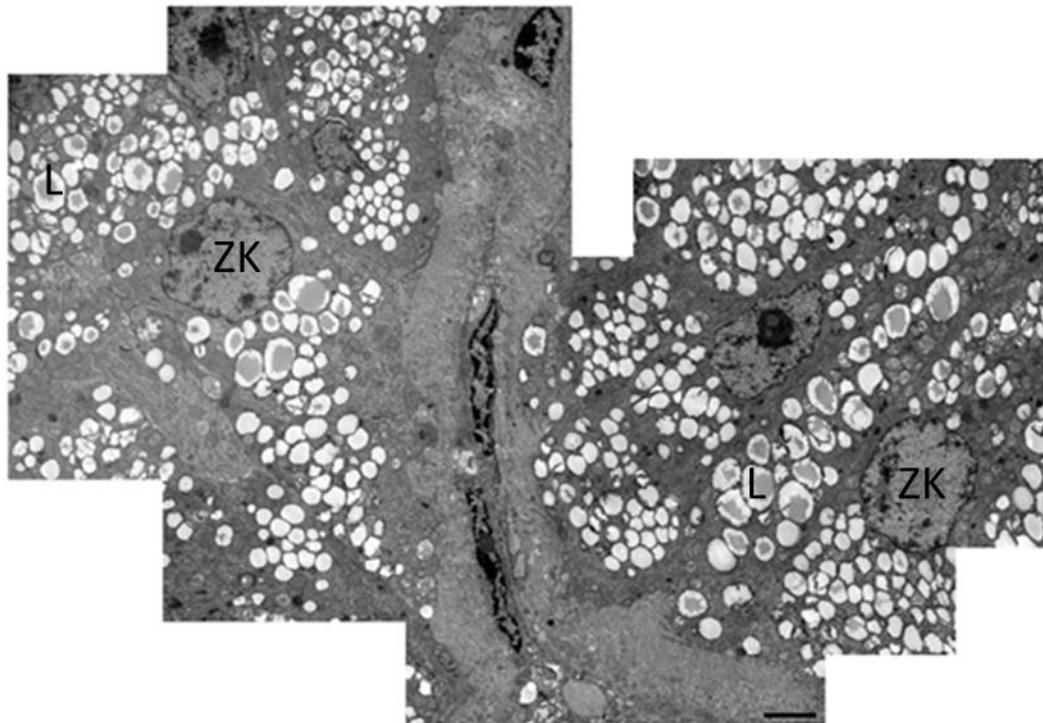


Abb. 68 TEM, Nebenniere Strauß, Überblick über das Epithel der Interrenalzellen, SB = 2,5 μ m

Die hochprismatischen Interrenalzellen enthalten zahlreiche Lipidtröpfchen (L). Ihre basal gelegenen Zellkerne (ZK) variieren von rund über längsoval bis polygonal. TEM = Transmissionselektronenmikroskopie

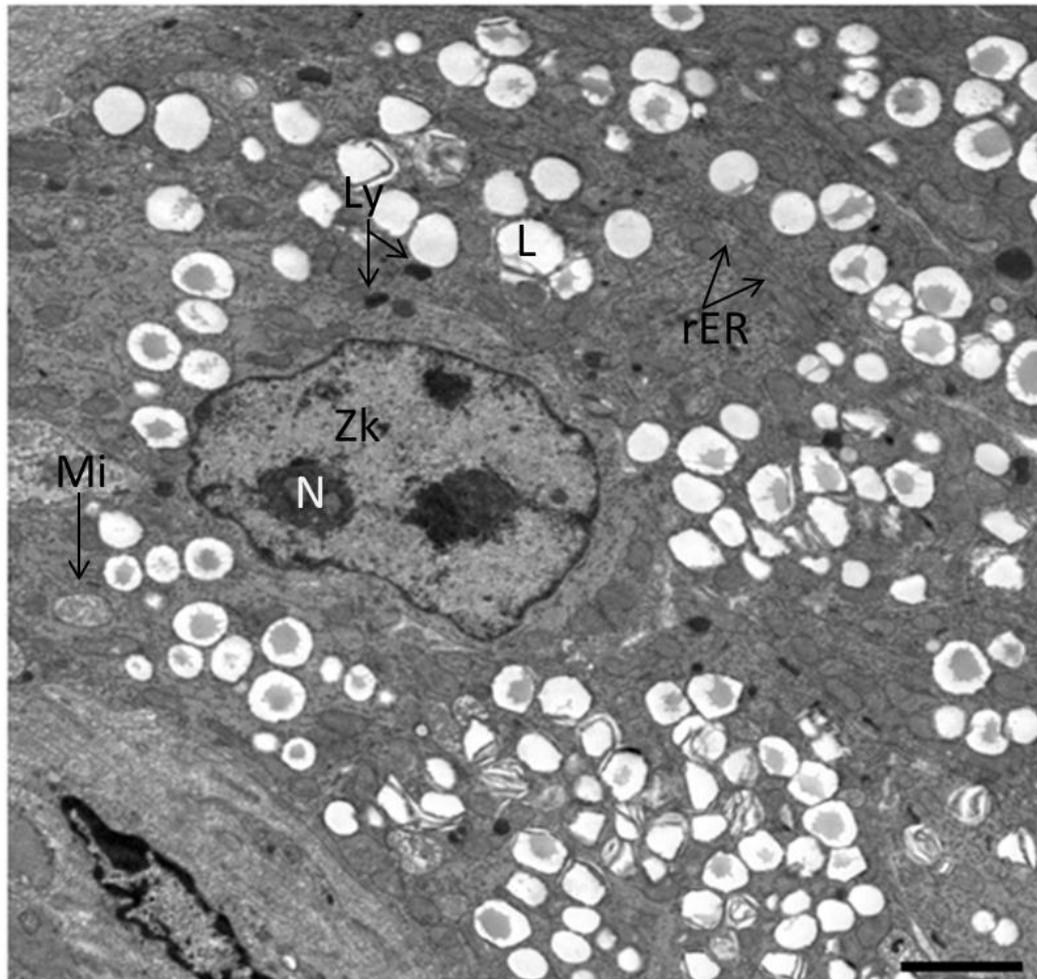


Abb. 69 TEM, Nebenniere Strauß, Interrenalzelle, SB = 2,5 μm

Die Interrenalzelle weist einen runden Zellkern (ZK) mit deutlichen Nukleoli (N), viele Lipidtropfen (L), reichlich Lysosomen (Ly) und raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) sowie Mitochondrien vom Tubulus-Typ auf.

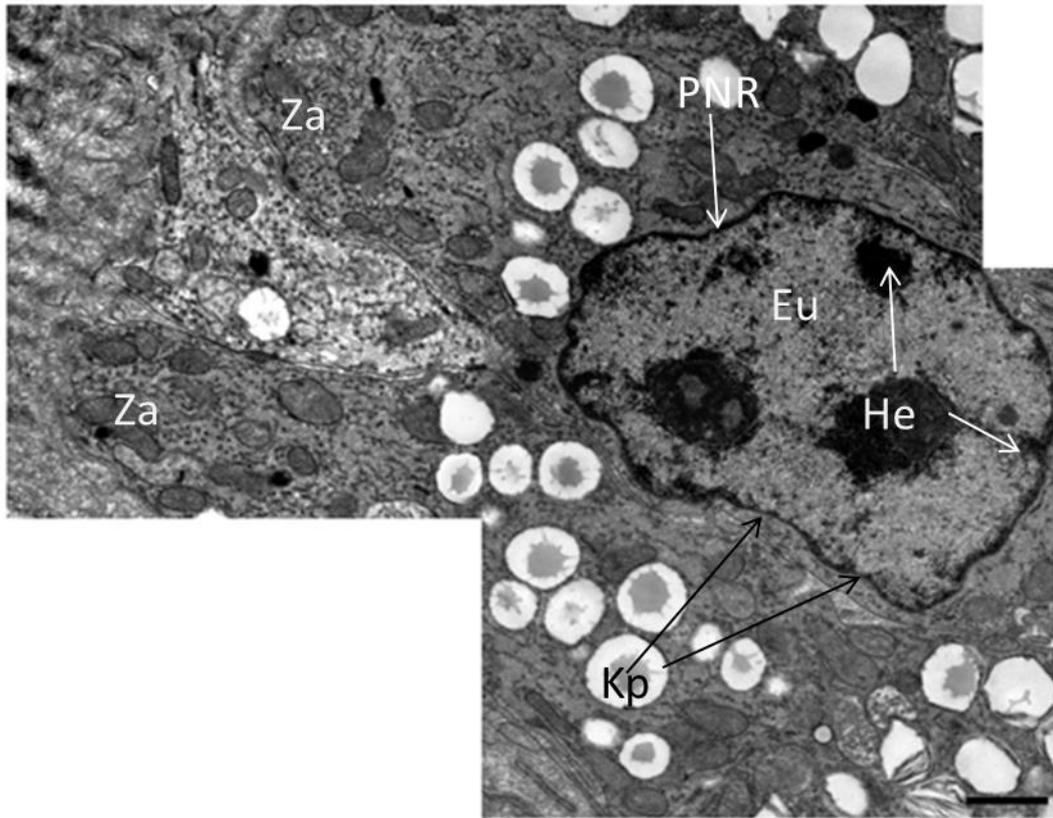


Abb. 70 TEM, Nebenniere Strauß, Interrenalzelle, SB = 1 μm

Die Interrenalzellen weisen Zytoplasmaausläufer (Za, Interdigitationen) auf, über die sie mit Nachbarzellen in Verbindung stehen. Der Zellkern besitzt häufig Kernporen (Kp), sein perinukleärer Raum (PNR) ist deutlich angelegt. Das elektronendichte Heterochromatin (He) kommt sowohl nukleolusassoziiert als auch membrangebunden vor. Das Karyoplasma enthält weiterhin reichlich nicht-kondensiertes Euchromatin (Eu).

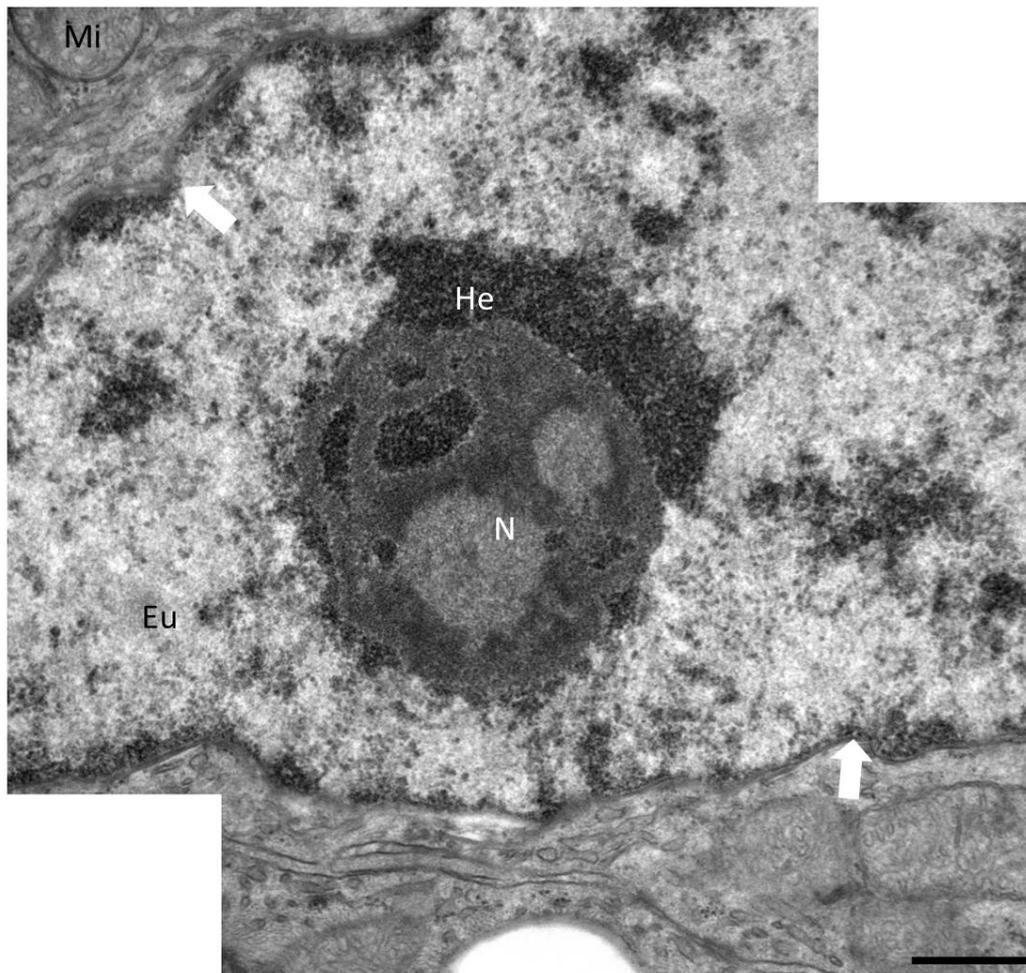


Abb. 71 TEM, Nebenniere Strauß, Zellkern einer Interrenalzelle SB = 0,5 μ m

Der prominente Nukleolus (N) wird von Heterochromatin (He) umsäumt, im Karyoplasma liegt viel Euchromatin. Deutliche Kernporen (Pfeile) sind an der Zellkernmembran erkennbar. Am linken oberen Bildrand befindet sich ein Mitochondrium (Mi).

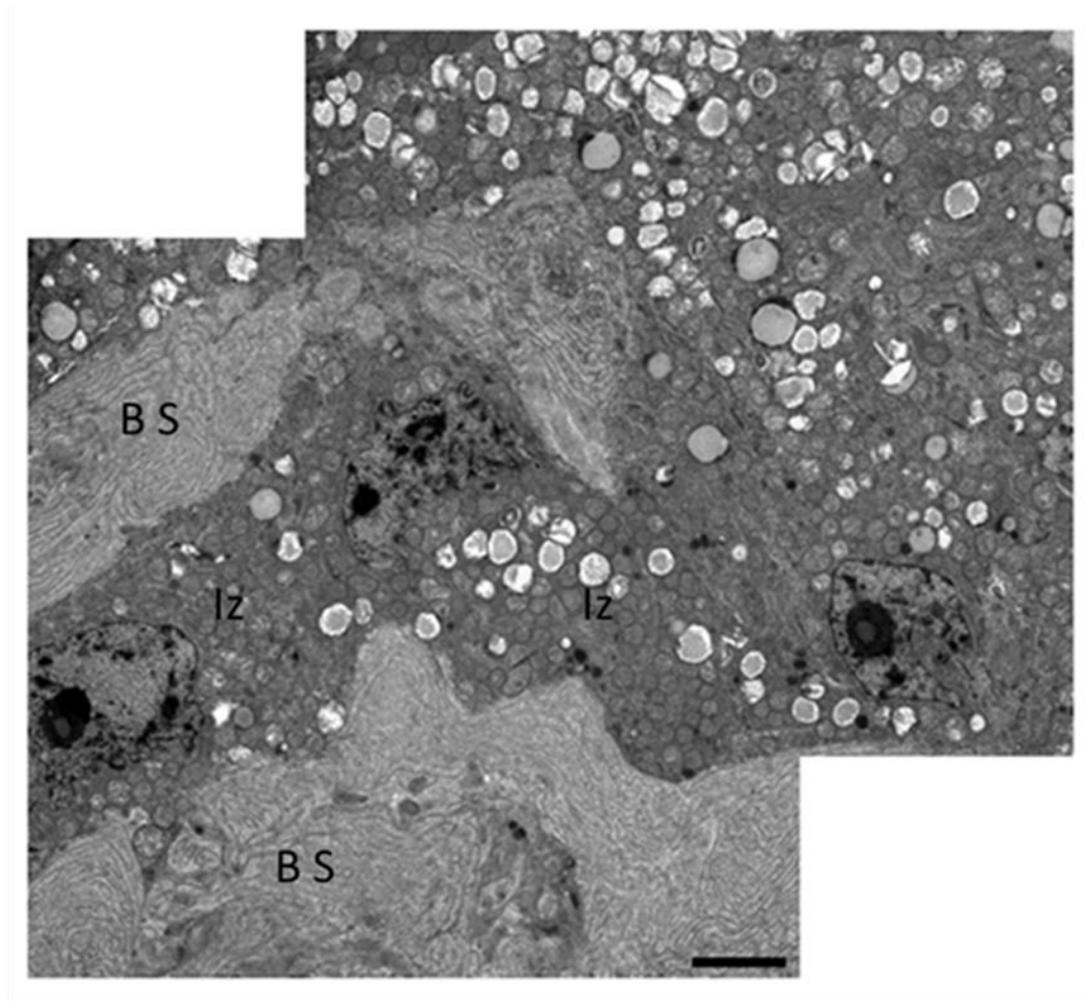


Abb. 72 TEM, Nebenniere Strauß, Interrenalzellen SB = 2,5 μ m

Die Interrenalzellen (Iz) werden umgeben von bindegewebigen Septen (BS), die aus zahlreichen retikulären Kollagenfibrillen aufgebaut sind.

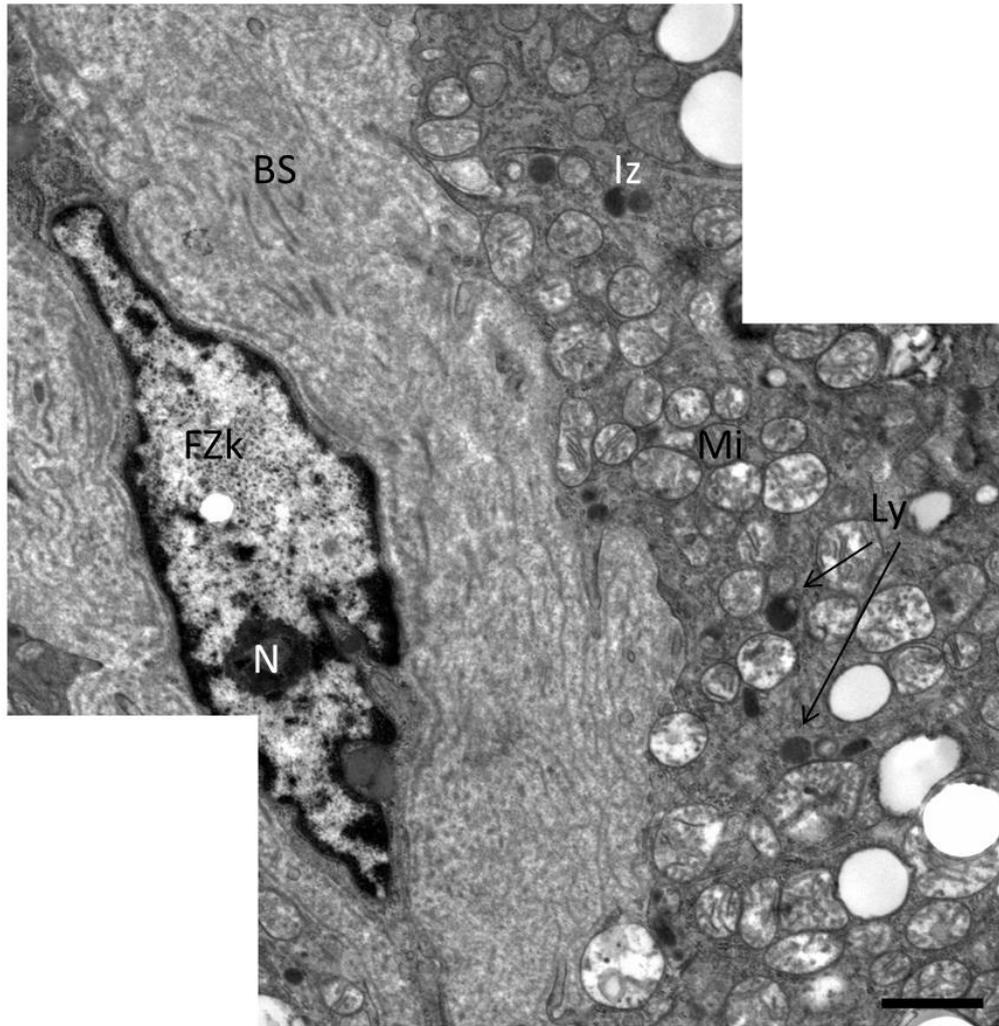


Abb. 73 TEM, Nebenniere Strauß, Zellkern eines Fibrozyten, SB = 1 μ m

Langgestreckter spindelförmiger Zellkern eines Fibrozyten (FZk) innerhalb der Bindegewebssepten (BS), dessen äußere Kernhülle aufgrund des dichten Besatzes mit Ribosomen deutlich von dem umliegenden Gewebe abgrenzbar ist.

N = Nukleolus, Iz = Interrenalzelle L = Lipidtröpfchen, Mi = Mitochondrien; Ly = Lysosomen

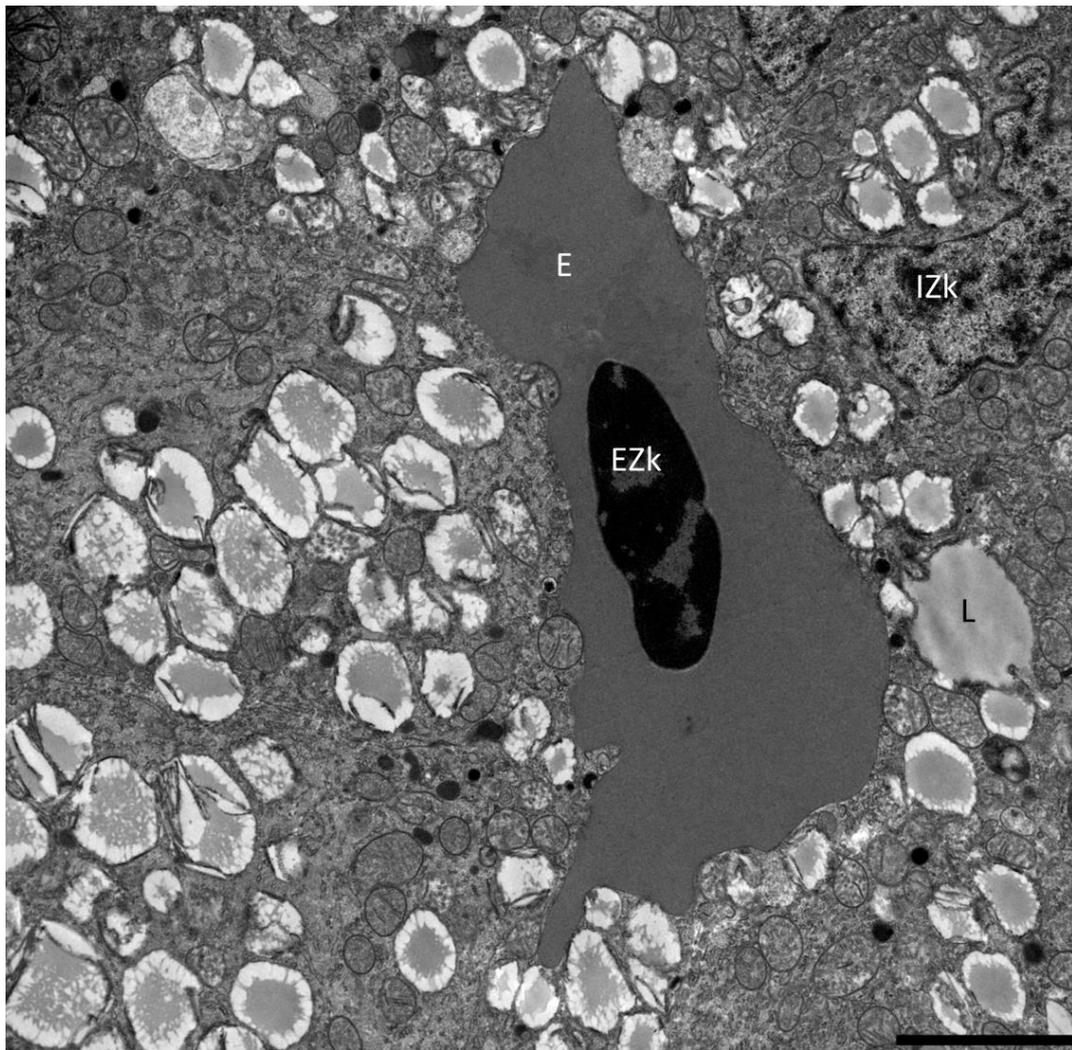


Abb. 74 TEM, Nebenniere Strauß, Sinusoid zwischen Interrenalzellen, SB = 2,5 μ m

Im Lumen der Kapillare befindet sich ein großer kernhaltiger Erythrozyt (E).

EZk = Erythrozytenzellkern, IZk = Interrenalzellkern



Abb. 75 TEM, Nebenniere Strauß, Zellkontakte der Interrenalzellen, SB = 0,5 μ m

Die Interrenalzellen sind über Zonulae occludentes (Zo, *tight junctions*) und Zonulae adherentes (Za) miteinander verbunden. Sie weisen den typischen Aufbau Steroidhormon produzierender Zellen auf: Viele Mitochondrien vom Tubulus-Typ, glattes ER und Lipidtropfen. Außerdem findet sich in den Interrenalzellen noch raues ER (rER), das mit vielen kleinen elektronendichten Ribosomen besetzt ist.

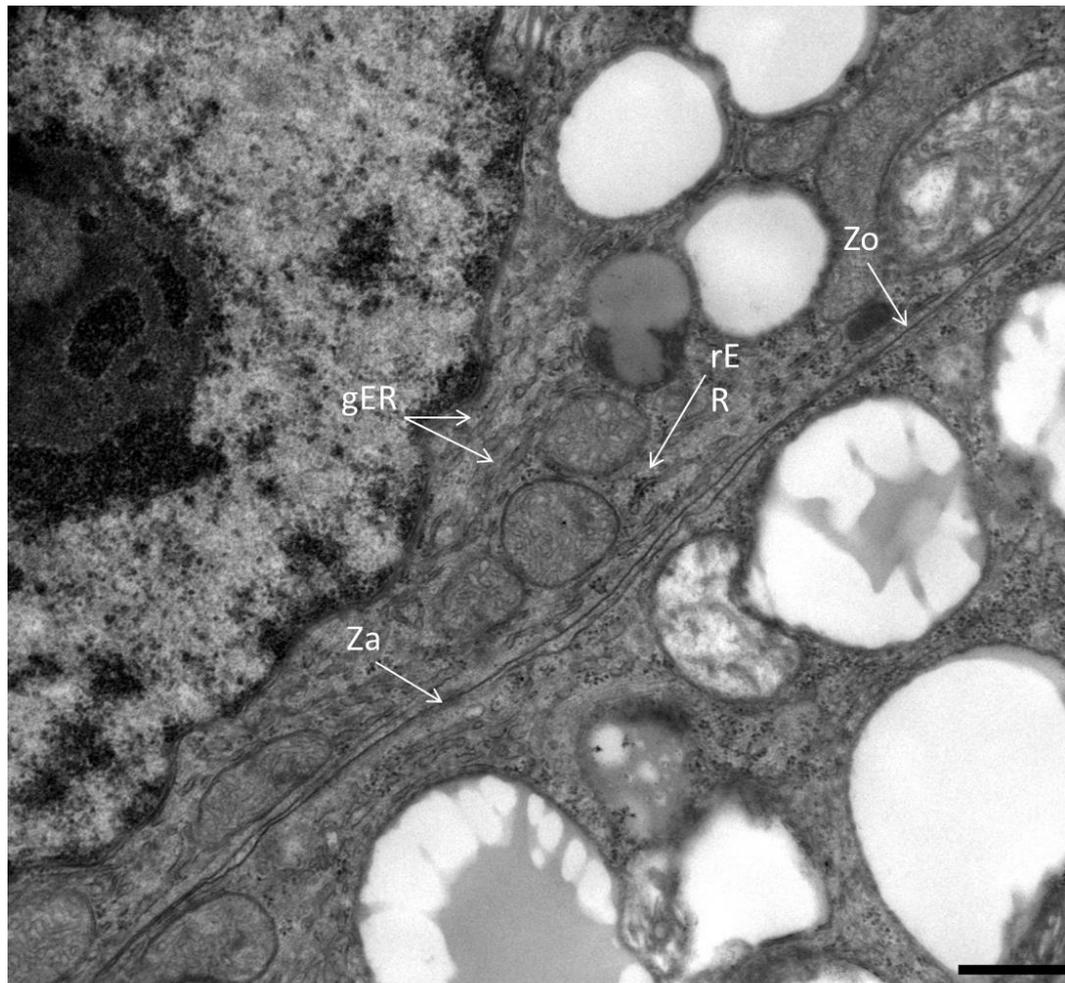


Abb. 76 TEM, Nebenniere Strauß, Zellkontakte der Interrenalzellen, SB = 0,5 μm

Zo = Zonula occludens, Za = Zonula adherens, gER = glattes Endoplasmatisches Retikulum, rER = raues Endoplasmatisches Retikulum mit Ribosomenbesatz

2.3.2. Übergang Interrenalzellen Adrenalzellen

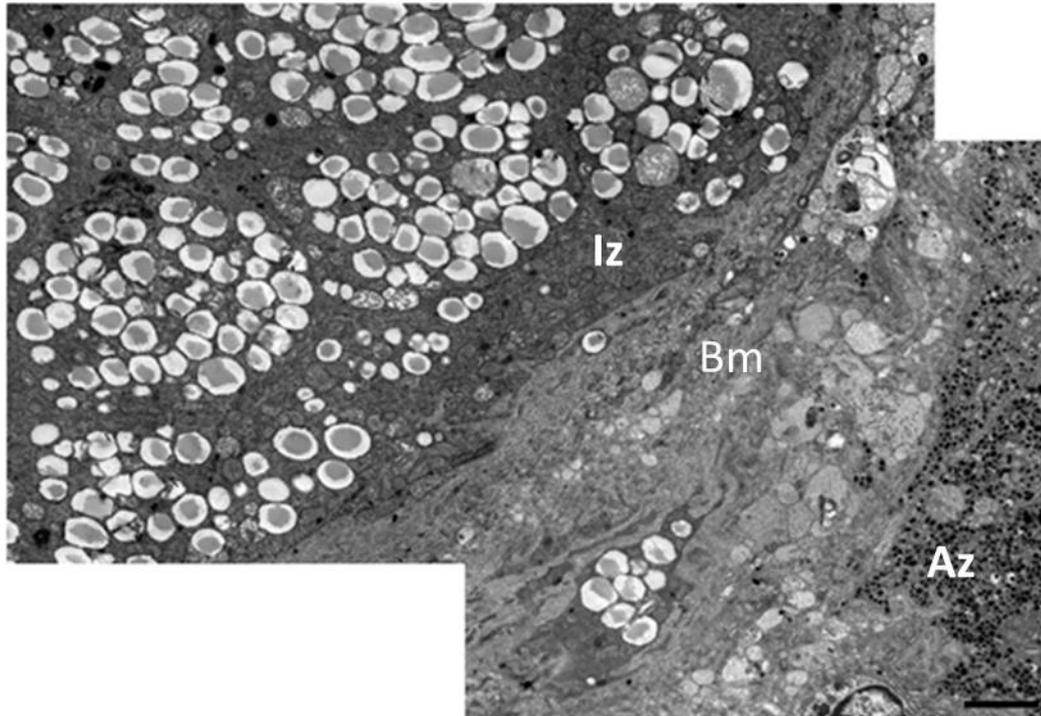


Abb. 77 TEM, Nebenniere Strauß, Übergang Interrenalzelle Adrenalzelle, SB = 2,5 μm

Die beiden Zelltypen werden durch ihre Basalmembran (Bm) voneinander separiert. Ihre Morphologie unterscheidet sich deutlich. Die Interrenalzellen (Iz) weisen zahlreichen große Lipidtropfen, die Adrenalzellen (Az) dagegen viele kleine elektronendichte Granula, auf.

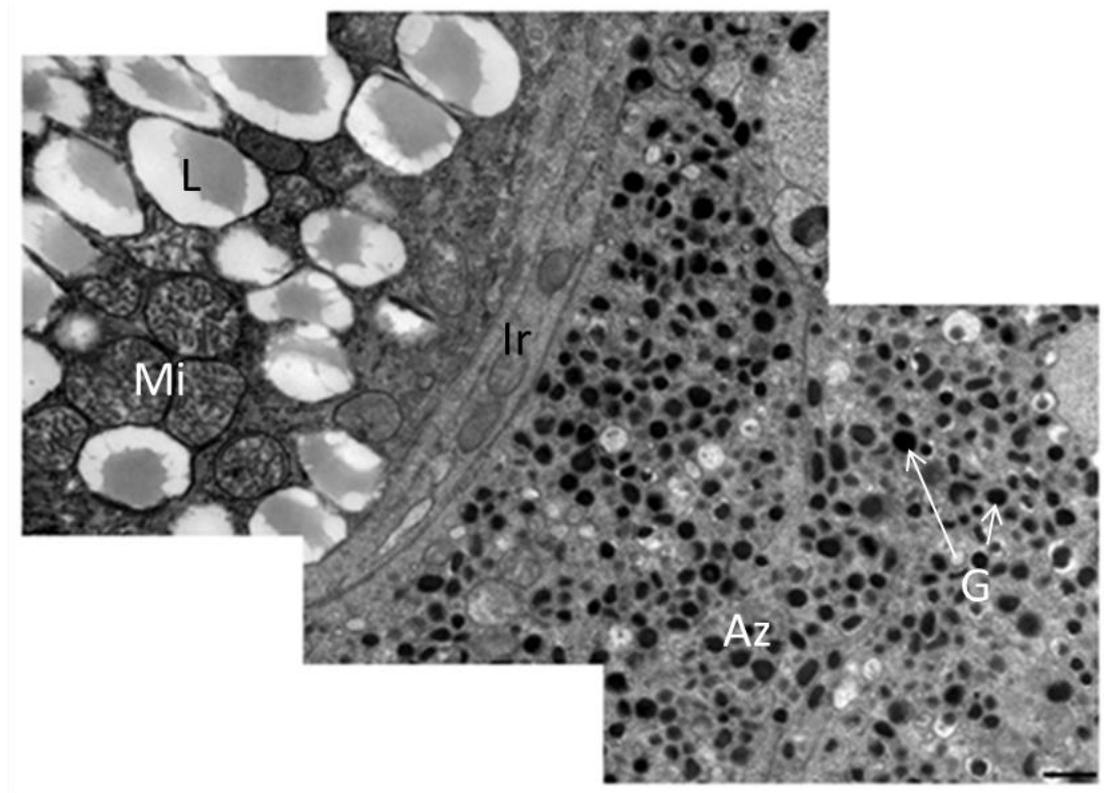


Abb. 78 TEM, Nebenniere Strauß, Übergang Interrenalzelle Adrenalzelle, SB = 0,5 μm

Die Interrenalzelle mit ihren vielen Lipidtröpfchen (L) und Mitochondrien (Mi) und die Adrenalzelle mit ihren zahlreichen Granula (G) werden durch einen Interzellularraum (Ir) voneinander separiert.

V. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit untersucht den Aufbau der Nebenniere des Straußes mit histologischen, histochemischen und ultrastrukturellen Methoden. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Struktur der Interrenalzellen gelegt. Makroskopisch lassen sich die beiden graugelben paarigen Nebennieren voneinander unterscheiden. Die linke Nebenniere weist eine längsovale Form auf, die rechte ist hingegen pyramidenförmig. Die linke Nebenniere weist eine mittlere Größe von $5,5 \times 1,3 \times 0,6$ cm ($\pm 0,5 \times 0,3 \times 0,1$ cm) und ein Gewicht von $2,3$ g ($\pm 0,4$ g) auf, die rechte ist durchschnittlich $4,8 \times 1,8 \times 0,7$ cm ($\pm 0,4 \times 0,4 \times 0,1$ cm) groß und $2,6$ g ($\pm 0,4$ g) g schwer. Beide liegen eingebettet in reichlich Bindegewebe craniomedial der beiden Nieren, beim männlichen Tier außerdem cranial der beiden Hoden und Samenleiter. Beim weiblichen Tier liegt die linke Nebenniere craniomedial des Ovars, die rechte Nebenniere medial der rechten Niere. Bei einigen Vogelarten wurde beschrieben, dass die Nebennieren von den Gonaden bedeckt werden (MORMEDE et al., 2007). Dies konnte ich beim adulten Strauß nicht feststellen. Ebenso hat Tang (2009) beim juvenilen Strauß herausgefunden, dass die Nebennieren zwar in enger Lagebeziehung zu den Gonaden stehen, aber nicht von diesen überlagert werden (TANG et al., 2009).

1. Konventionelle Lichtmikroskopie

Histologisch zeigen die Nebennieren des Straußes den für Vögel typischen Grundaufbau. Umgeben von einer bindegewebigen Kapsel, von der aus Septen radiär ins Innere des Nebennierenparenchyms ziehen, liegen das kortikale Gewebe, die Interrenalzellen, und das medulläre Gewebe, die Adrenalzellen ineinander verwoben vor. Makroskopisch lassen sich Rinde und Mark nicht voneinander unterscheiden (GHOSH et al., 2001). Es gibt nicht den beim Menschen und Säugetieren vorkommenden Aufbau der Nebennierenrinde in drei verschiedene Zonen. Die meisten Autoren unterteilen die Nebenniere der Vögel in zwei Zonen. Nämlich in eine zentrale innere und eine periphere subkapsuläre Zone. Dieser zonale Aufbau lässt sich beim Huhn (UNSICKER, 1973), bei Enten und Gänsen (HASSAN, 1975), bei Krähe und Spatz (BHUJLE & NADKARNI, 1980), bei der Wachtel (MIKAMI et al., 1980; BASHA et al., 2004), bei der Taube (MADHU et al., 2010) und beim Perlhuhn (PRABHAVATHI et al., 2010)

wiederfinden. Hodges (1974) und Humayun (2012) beschreiben beim Huhn allerdings im Unterschied zu den Befunden von Unsicker (1973) drei Zonen, die den Nebennierenaufbau ausmachen. Sie erwähnen eine subkapsuläre, eine periphere und eine zentrale Zone (HODGES, 1974; HUMAYUN et al., 2012). Ebenso beschreibt Knouff (1951) beim Braunen Pelikan drei Zonen, die dem Aufbau der Säugernebenniere ähneln. Er benennt sie analog der Terminologia Anatomica in Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis. Beim Strauß konnte ich zunächst einen zweizonalen Aufbau ausmachen, der sich in eine periphere und eine zentrale innere Zone gliedert. Allerdings muss man aus morphologischen Gesichtspunkten die periphere Zone weiter in eine subkapsuläre und in eine periphere, innere Zone unterteilen. Dies deckt sich mit den Befunden Tangs (2009) beim juvenilen Strauß (TANG et al., 2009). In den konventionellen lichtmikroskopischen Untersuchungen an der Straußennebenniere zeigte sich, dass das Interrenalgewebe den Hauptteil des Nebennierenparenchyms einnimmt. Dies ist ebenso beim juvenilen Strauß (TANG et al., 2009), bei der Wachtel (MIKAMI et al., 1980; BASHA et al., 2004), beim Huhn (HUMAYUN et al., 2012) und beim Braunen Pelikan (KNOUFF & HARTMAN, 1951) der Fall. Das Interrenalgewebes in meiner Studie wies ebenfalls, wie in den Untersuchungen Tangs (2009), eine azidophile Färbung auf (TANG et al., 2009); auch beim Huhn ist das Interrenalzellzytoplasma azidophil gefärbt (HUMAYUN et al., 2012). Bei der Wachtel teilt Basha (2004) die Interrenalzellen in vier Typen ein. Die Typ 1-Zellen, die sich nur in der subkapsulären Zone finden lassen, sind große hochprismatische Zellen mit sphärischem Zellkern und farbdichtem Zytoplasma. Die Typ 2-Zellen sind häufiger in der inneren Zone der Wachtelnebenniere anzutreffen. Diese weisen als Charakteristikum ebenfalls eine hochprismatische Epithelform auf, besitzen aber runde Zellkerne und dichtes Zytoplasma (BASHA et al., 2004). Ihre säulenartige Anordnung ist identisch mit den Beobachtungen Hodges beim Huhn (HODGES, 1974) und Hassans bei Enten und Gänsen (HASSAN, 1975). Die Typ 3-Zellen in der inneren Zone sind klein, ebenfalls hochprismatisch, weisen aber ein helles Zytoplasma auf. Die Typ 4-Zellen treten in der inneren Zone nur spärlich auf und kommen auch in der subkapsulären Zone nur selten vor. Sie sind klein, hochprismatisch und besitzen einen pleomorphen, kompakt erscheinenden Zellkern (BASHA et al., 2004). Die Einteilung der Interrenalzellen in vier Zelltypen nahmen vor Basha (2004) bereits Mikami bei der Wachtel (MIKAMI et al., 1980) und Pearce bei der Ente (PEARCE et al.,

1978) und später noch Prabhavathi beim Perlhuhn (PRABHAVATHI et al., 2010) vor. Beim Huhn beschreibt Humayun (2012) die Interrenalzellen als massive, irreguläre und zylindrische Zellbündel mit runder bis ovaler Form. In der peripheren Zone sind diese unregelmäßig angeordnet und größer als in der inneren Zone. Sie sind hochprismatisch mit einem kleinen, runden bis leicht ovalen, exzentrisch gelegenen Zellkern. Die Zahl der Sinusoide nimmt im Inneren der Nebenniere des Huhns zu. Sie formen im Zentrum größere Lakunen (HUMAYUN et al., 2012). In meinen Untersuchungen zeigte sich, dass die Interrenalzellen der subkapsulären Zone kompakt arrangierte parallel zueinander gelegene Zellgruppen sind, die entweder als große radiäre Bündel unterhalb der Nebennierenkapsel liegen oder senkrecht zur Kapsel angeordnet sind. Ihr hochprismatisches Epithel weist eine Höhe von $24,3 \mu\text{m}$ ($\pm 5,1 \mu\text{m}$) auf. Die Epithelhöhe dieses Bereichs unterscheidet sich signifikant zu denen in der inneren und der zentralen Zone ($p = 0,001$). Ihre Zellgrenze ist unscheinbar, ihr Zytoplasma heller und vakuolenreicher als das der Zellen innerhalb der zentralen Zone. Ihre längsovalen basalen Zellkerne sind $6,5 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) groß und divergieren signifikant zu denen der zentralen Zone ($p = 0,01$), nicht aber zu denen der inneren Zone. In der inneren Zone, die sich zwischen der subkapsulären und der zentralen Zone befindet, ziehen die Interrenalzellen perpendikulär zur Nebennierenkapsel. Die Zellstränge sind hauptsächlich in Doppelreihen angelegt, weisen ein hochprismatisches Epithel auf und erscheinen viel kompakter als die vakuolenhaltigen Zellen der subkapsulären Zone. Die Interrenalepithelhöhe beträgt in diesem Nebennierenabschnitt des Straußes $26,4 \mu\text{m}$ ($\pm 5,0 \mu\text{m}$), daher sind die Zellen hier größer als im vorigen Abschnitt. Sie zeigen einen signifikanten Unterschied der Zellhöhe gegenüber der subkapsulären und der zentralen Zone ($p = 0,001$). Ihre basalen Zellkerne weisen einen Durchmesser von $6,3 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) auf. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellkerndurchmessern der inneren Zone zu denen der subkapsulären Zone und ebenfalls nicht zu denen der zentralen Zone. In der zentralen Zone der Nebenniere des Straußes befinden sich die meisten Interrenalzellen. Sie liegen unregelmäßig verteilt als kleine klumpige Bündel oder in einem lockeren radiären Verband. Ihre Zellgrenzen sind allerdings klar ausgeprägt. Die Epithelhöhe in diesem Nebennierenbereich beträgt $22,0 \mu\text{m}$ ($\pm 4,3 \mu\text{m}$), der Zellkerndurchmesser $6,2 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$). Die Epithelhöhe der Interrenalzellen in der zentralen Zone divergiert signifikant zu der in der inneren Zone und ebenso zu der Höhe in der

subkapsulären Zone ($p = 0,001$). Die Zellkerndurchmesser der zentralen Zone unterscheiden sich signifikant von denen der subkapsulären Zone, nicht aber von denen der inneren Zone.

Die polygonalen Adrenalzellen beschreibt Basha (2007) bei der Wachtel als Zellinseln, die verwoben mit den Interrenalzellen der inneren Zone vorliegen. Die Zellinseln variieren bei der Wachtel in Größe und Form. Direkt unterhalb der Kapsel erscheint eine diskontinuierliche Schicht von zwei bis drei Lagen von Adrenalzellen. Basha (2007) unterscheidet zwei Typen von Adrenalzellen anhand der Größe ihrer zytoplasmatischen Granula. Die Noradrenalin synthetisierenden Zellen enthielten größere Granula als die Adrenalin produzierenden Granula des zweiten Zelltyps (BASHA & RAMESH, 2007). Ich konnte bei meinen lichtmikroskopischen Studien dagegen keinen Unterschied zwischen Adrenalin- und Noradrenalinzellen ausmachen. Humayun (2012) charakterisiert die Adrenalzellen des Huhns als polygonal geformte Zellen, die größer als die Interrenalzellen sind. Sie haben ein basophiles Zytoplasma und sphärische, zentral innerhalb der Epithelzellen liegende Zellkerne. Innerhalb der subkapsulären Zone fand Humayun (2012) ausschließlich Adrenalzellen (HUMAYUN et al., 2012). In meinen lichtmikroskopischen Untersuchungen stellten sich die Adrenalzellen als basophile Zellen mit getüpfeltem, granulärem Zytoplasma dar, die diskontinuierlich zwischen den Interrenalzellgruppen gelegen sind. Vereinzelt befand sich ein Adrenalzellstreifen direkt unterhalb der Nebennierenkapsel. Sie liegen häufig assoziiert mit Blutsinusoiden vor. Ihr Anteil am gesamten Nebennierenparenchym steigt, in Richtung des Zentrums der Nebennieren. Sie besitzen nur undeutliche erkennbare Zellgrenzen und eine schwächere Basalmembran als die Interrenalzellgruppen. Ihre Epithelhöhe beträgt auf das Gesamtparenchym betrachtet ca. $15,0 \mu\text{m}$ ($\pm 3,7 \mu\text{m}$). Sie sind somit kleiner als die Interrenalzellen der Nebenniere des Straußes. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen Humayuns beim Huhn (2012), bei dem die Adrenalzellen größer als die Interrenalzellen waren (HUMAYUN et al., 2012). In den verschiedenen Nebennierenabschnitten des Straußes zeigen die Adrenalzellen insgesamt ein homogeneres Bild als die morphologisch stärker variierenden Interrenalzellen. Ihre Epithelhöhen sind allerdings in den drei Zonen der Nebenniere gegeneinander signifikant ($p = 0,001$). Ihre runden zentral gelegenen Zellkerne sind im Mittel $6,1 \mu\text{m}$ groß ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) und ebenso kleiner als die

Interrenalzellkerne. Ihre Zellkerndurchmesser sind hingegen nicht signifikant unterschiedlich zueinander in der subkapsulären, inneren und zentralen Zone der Straußennebenniere. Histologisch konnte kein Geschlechtsdimorphismus beim Aufbau der Nebenniere erkannt werden. Meine Ergebnisse an der Nebenniere bei adulten Straußen korrespondieren in vielen Punkten mit denen Tangs (2009) beim juvenilen Strauß (TANG et al., 2009). Tang hatte allerdings 40 Tage alte Tiere mit einem Lebendgewicht von 6-7 kg untersucht, während die Strauße in meiner Studie zwischen 14 und 19 Monate alt und 90-110 kg schwer waren. Der dreizonale Aufbau der Nebenniere der Strauße erinnert in seiner Zytomorphologie stark an den Aufbau der Nebennierenrinde der Säugetiere; ähnliche Befunde wurden von Knouff beim Braunen Pelikan erhoben (KNOUFF & HARTMAN, 1951). Die Interrenalzellen der subkapsulären Zone ähneln der kortikalen Zona glomerulosa, die perpendikulären Zellstränge der inneren Zone entsprechen den ebenfalls senkrecht zur Nebennierenkapsel ziehenden Kortikalzellen der Zona fasciculata und die Interrenalzellen der zentralen Zone gleichen den Nebennierenrindenzellen der Zona reticularis. Allerdings benennt Knouff (1951) eine dünne Zona fasciculata und eine viel breitere Zona reticularis, die allerdings beide genauso wie die Zona reticularis insgesamt viel dünner als die Zonen an der Säugernebenniere seien (KNOUFF & HARTMAN, 1951). Beim Strauß dagegen sind die innere und die zentrale Zone nahezu gleich weit ausgeprägt und das Gesamtorgan weist wie die Nebennieren der anderen Vögel auch morphologisch den typisch verwobenen Aufbau von kortikalem und medullärem Gewebe auf.

Bei den substrathistochemischen Untersuchungen an der Nebenniere des Straußes zeigt sich in der Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 eine stark angefärbte Basalmembran, ein deutlich Alcianblau-positives Endothel der kapillären Sinusoide und deutlich angefärbte kollagene Fasern der Nebennierenkapsel sowie ein nur mehr sehr schwach positives Zytoplasma der Adrenalzellen. Das Interrenalzellzytoplasma und die Zellkerne der beiden Zelltypen färben sich hingegen nicht mit Alcianblau an. In der Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 1,0 reagiert die Basalmembran ebenfalls stark positiv, die Organkapsel und das sinusoidale Endothel reagieren deutlich positiv, die Adrenal- und die Interrenalzellen gehen dagegen keine Reaktion mit Alcianblau ein. Basha (2007) beschreibt an der Nebenniere der Wachtel ebenfalls eine sehr schwache Alcianblau-positive Reaktion des Adrenalzellzytoplasmas bei

einem pH-Wert von 2,5 und keine Reaktion des Interrenalzellzytoplasmas auf den Farbstoff. Bei Alcianblau mit einem pH-Wert von 1,0 sind die Adrenalzellen ebenfalls gar nicht mehr bläulich gefärbt (BASHA et al., 2008). Die Alcianblau-Färbung dient dem Nachweis saurer Mukosubstanzen. Unter der Annahme, dass der positiv geladene Alcianblau-Farbstoff bei einem pH-Wert von 2,5 eine elektrostatische Bindung mit den negativ geladenen Sulfatgruppen und Carboxylgruppen der sauren Glykokonjugate eingeht, erlaubt dies eine selektive Anfärbung der beiden Gruppen. Senkt man den pH-Wert der Färbelösung auf 1,0, so wird die Dissoziation der Carboxylgruppen behindert, diese weisen daher keine negative Ladung mehr auf und färben sich demnach nicht mehr an. Es färben sich nur noch selektiv die Sulfatgruppen an (LANG, 2013). Bezogen auf die Nebenniere des Straußes bedeutet das, dass die Nebennierenkapsel, die Basallamina und die bindegewebigen Septen, die ins Parenchym ziehen genauso wie das Endothel der Sinusoide saure Glykokonjugate mit Carboxyl- und Sulfatgruppen enthalten. Dabei handelt es sich vermutlich um Proteoglykane, die neben Kollagen den Hauptbestandteil des Bindegewebes bilden. Das Zytoplasma der Adrenalzellen, das nur eine sehr schwache Anfärbung mit einem pH-Wert von 2,5 aufzeigt, enthält dagegen vermutlich nur einige wenige carboxyl- und keine sulfatgruppenhaltigen Substanzen. In der PAS-Reaktion zeigte Basha (2007) bei der Wachtel eine stark PAS-positive Nebennierenkapsel, gleichfalls stark positive Adrenalzellen und schwach PAS-positive Interrenalzellen. Er schlussfolgerte somit aus seinen subtrathistochemischen Untersuchungen, dass die Interrenalzellen der Wachtel neutrale Mucopolysaccharide aber keine sauren Muzine aufweisen. Die Adrenalzellen zeigten eine starke PAS-Reaktion und eine schwache Alcianblaufärbung, somit bewies er, dass diese Zellen keine stark sulfatierten sauren Mucopolysaccharide enthalten (BASHA et al., 2008). Die PAS-Reaktion dient beispielsweise dem Nachweis neutraler Zucker in Glykokonjugaten, Glykoproteinen sowie von Glykogen. Bei der Reaktion werden Hydroxylgruppen mithilfe von Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese reagieren mit dem Schiff'schen Reagens zu einem rot-violetten Komplex. Zur selektiven Glykogendarstellung macht man sich dessen Amylase-Sensitivität zu Nutze. Diejenigen Strukturen auf Schnitten, auf denen ein Amylaseverdau vorgenommen wurde und die anschließend nicht mehr angefärbt sind, verglichen mit Schnitten, auf denen die PAS-Reaktion ohne Amylase durchgeführt wurde, enthalten somit Glykogen (LANG, 2013). Glykogen lässt sich allerdings in der

Nebenniere des Straußes nicht nachweisen. In der PAS-Reaktion reagieren die Glykoproteine der Organkapsel und der Basalmembran stark positiv. Das Endothel der Blutsinusoiden und die Tunica media der kapsulären Blutgefäße reagieren mit einer deutlich purpurnen Färbung. Somit enthalten die genannten Strukturen neutrale Mucopolysaccharide.

2. Immunhistochemie

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen setzt sich aus drei Komponenten, den Mikrofilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli zusammen. Es dient unter anderem der Aufrechterhaltung der Zellform, ist an Bewegungsvorgängen der Zelle, an Transportprozessen im Zytoplasma und an der Zellteilung beteiligt (SINOWATZ & HEES, 2006). Zytoskelettale Proteine können weiter als Differenzierungsmarker eingesetzt werden, um den Ursprung einer Zelle bestimmen zu können. Da bis heute keine immunhistochemischen Studien zum aviären Zytoskelett der Nebenniere bekannt sind, kann in meiner Arbeit kein Vergleich zwischen dem Zytoskelett der Nebenniere des Straußes und dem anderer Vogelarten angestellt werden. Hall (1997) sowie Hall und Almahbobi (1992, 1997) untersuchen in verschiedenen Studien an murinen Y-1 Adrenaltumorzellen und bovinen Fasciculatazellen die Rolle des Zytoskeletts bei der adrenalen Steroidogenese. Sie beschreiben, dass die Steroidsynthese durch den Transport von Cholesterol zu den Mitochondrien reguliert wird. An dem Transport sind insbesondere Mikrofilamente wie Aktin und Myosin und Intermediärfilamente wie Vimentin beteiligt. Cholesterol wird als Ester in den Lipidtröpfchen gespeichert. In der inneren Mitochondrienmembran ist das Cytochrom P 450-Enzym lokalisiert, das die Reaktion von Cholesterol zu Pregnenolon katalysiert (HALL & ALMAHBOBI, 1992; HALL, 1997; HALL & ALMAHBOBI, 1997).

Aktin gehört zur Gruppe der Mikrofilamente. Aktinfilamente sind zusammen mit Myosin in mechanochemische Funktionen involviert und werden für Zell- und Zytoplasmabewegungen benötigt (POLLARD & WEIHING, 1974). Eine Zellaktivität an der die beiden Proteine beteiligt sind, stellt die Exocytose von Neurotransmittern oder anderen Sekretionsprodukten dar (CREUTZ, 1977). Das Protein α -SMA (Smooth Muscle Actin), das eine Isoform von Aktin ist, und

hauptsächlich in kontraktilen Zellen vorkommt, wird als adäquater Marker für glatte Muskelzellen angesehen (SKALLI et al., 1989). Gabbiani (1975) konnte einen deutlich positiven Nachweis von Aktin an den Nebennierenrindenzellen des Meerschweinchens erbringen (GABBIANI et al., 1975), während Unsicker und Groschel-Stewart das Protein Aktin an der Nebenniere des Meerschweinchens, Ratte und des Rindes vor allem in den Wänden der Blutgefäße, insbesondere in den Endothelzellen und in der Nebennierenkapsel nachweisen konnten (UNSICKER & GROSCHEL-STEWART, 1978). In meiner Arbeit an der Nebenniere des Straußes reagieren ebenfalls die Nebennierenkapsel, die Tunica media der in der Kapsel gelegenen Blutgefäße und das Endothel der kapillären Sinusoide stark SMA-positiv. Weiterhin zeigen die multipolaren Nervenzellen, die ebenfalls in der Nebennierenkapsel liegen, eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper. Das Zytoplasma der kernhaltigen Erythrozyten zeigt eine schwache Färbung.

Nichtmuskel-Myosin lässt sich an der Nebenniere des Straußes mittels des Antikörpers Anti-NMM (Non Muscle Myosin) in Form einer starken Reaktion an der Nebennierenkapsel, der Tunica interna der Blutgefäße und der peripheren Nerven, die in der Kapsel eingebettet liegen, nachweisen. Das Zytoplasma der Adrenalzellen reagiert deutlich immunpositiv, das Zytoplasma der Erythrozyten zeigt ebenso eine deutliche Reaktion mit Anti-Non Muscle Myosin. Unsicker und Groschel-Stewart (1978) weisen an der Nebenniere des Meerschweinchens ebenfalls Myosin in der Nebennierenkapsel und an den Blutgefäßen nach (UNSICKER & GROSCHEL-STEWART, 1978). Creutz (1977) kann an bovinen Nebennierenmarkzellen auch eine starke Reaktion im Zytoplasma ausmachen. In seiner Studie reagieren außerdem die Kortikalzellen der inneren Nebennierenzone stark immunpositiv auf Anti-NMM, die Kortikalzellen der intermediären und peripheren Zone und die Erythrozyten gehen hingegen keine Reaktion mehr ein (CREUTZ, 1977). In meinen Untersuchungen weisen die Interrenalzellen des Straußes keine Reaktion auf Anti-Non Muscle Myosin auf.

Die Gruppe der Intermediärfilamente ist in ihren chemischen Eigenschaften und ihrem Vorkommen nicht einheitlich. Es lassen sich sechs verschiedene Proteinklassen unterscheiden: Cytokeratin, Vimentin, Desmin, Gliafilamente, Neurofilamente, Lamin und Nestin (DEY et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden an der Nebenniere des Straußes immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Vimentin und Cytokeratin durchgeführt. Beim Vimentin-

Nachweis reagieren das Zytoplasma der Adrenalzellen und das Endothel der Blutgefäße stark immunpositiv. Die Basalmembran, die die Interrenalzellgruppen umgibt zeigt ebenfalls eine deutliche Reaktion auf den Antikörper. Weiterhin reagiert das Endoneurium der peripheren Nerven deutlich immunpositiv. Die Nebennierenkapsel reagiert schwach mit Anti-Vimentin, die Interrenalzellen sind nicht angefärbt. Kameda (1996) kann beim Meerschweinchen ebenfalls eine starke Immunreaktion auf den Antikörper am Nebennierenmark ausmachen. Allerdings reagieren hier sogenannte Stützzellen (*sustentacular cells, supporting cells*), die das Nebennierenmark umgeben und ebenso wie die Adrenalzellen neuronalen Ursprungs sind (KAMEDA, 1996). Suzuki und Kachi (1994) beschreiben an der Nebenniere der Ratte eine stark positive Reaktion nach Inkubation mit dem Antikörper gegen Vimentin an den endothelialen Zellen der Blutgefäße, an den Fibroblasten und den Schwann-Zellen im Interstitium der Nebennierenmark- und Nebennierenrindenzellen ebenso wie an den Stützzellen im Parenchym des Nebennierenmarks (SUZUKI & KACHI, 1994).

Bei Cytokeratinen handelt es sich um eine Proteinfamilie, die Intermediärfilamente in Epithelzellen und Derivaten der Epidermis bilden (SINOWATZ & HEES, 2006). Heute sind mehr als 20 verschiedene Cytokeratine bekannt, die man in saure und basische Keratine einteilen kann (EICHNER et al., 1984; SCHWEIZER et al., 2006). In meiner Studie wurde ein Pancytokeratin-Antikörper verwendet, der sowohl mit sauren als auch mit basischen Keratinen reagiert. Auf den Paraffinschnitten reagiert das gesamte Parenchym der Nebenniere des Straußes immunnegativ auf den Antikörper. Lediglich die Tunica interna der Blutgefäße und das Perineurium der peripheren Nerven innerhalb der Nebennierenkapsel zeigen eine stark positive Reaktion auf Anti-Pancytokeratin. Auch das Zytoplasma der Erythrozyten ist deutlich immunmarkiert. Bei den Gefrierschnitten zeigt sich nach Formalin- und Acetonfixierung eine deutlich positive Reaktion des Interrenalzellzytoplasmas auf den Antikörper. Dies könnte auf die bessere Antigenerhaltung bei dieser Methode zurückzuführen sein. Durch die Bouin- und die Formalinfixierung mit anschließender Paraffineinbettung könnten die Epitope, an denen der Antikörper binden soll, hingegen maskiert worden sein.

Mikrotubuli wirken bei intrazellulären Transportvorgängen mit. Bei der Zellbewegung übernehmen sie eine indirekte Rolle. Sie sind nicht

kontraktionsfähig, dienen aber kontraktile Proteine als Ansatz. Ihre Wand ist hauptsächlich aus Molekülen des globulären Proteins Tubulin aufgebaut. Bei Tubulin handelt es sich um ein Heterodimer, das aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht (SINOWATZ & HEES, 2006). In meiner Studie an der Nebenniere des Straußes zeigt sich beim Tubulin-Nachweis eine stark positive Reaktion im Zytoplasma der Adrenalzellen und an den peripheren Nerven. Die Interrenalzellen weisen eine schwach positive zytoplasmatische Reaktion auf, insbesondere im basalen Zelldrittel. An den Blutgefäßen, die sich innerhalb der bindegewebigen Nebennierenkapsel befinden, reagiert das Endothel stark Tubulin-positiv, die Tunica media ist deutlich immunpositiv. Clark und Shay (1981) beschreiben in einer Studie an einer murinen adrenalen Y1-Tumorzelllinie die Rolle Tubulins an der Steroidogenese. Es spielt beim Transport von Cholesterol aus adrenalen Lipidtropfen zu den Mitochondrien eine wichtige Rolle. Indem es den Transport von Cholesterol aus den Lipidtropfen durch Komplexbildung mit diesem hemmt, sinkt die Steroidogenese-Rate. Durch Dissoziation von Tubulin und Cholesterol, die beispielsweise durch Colchicin, das Cholera-Toxin oder auch cAMP initiiert werden kann, wird Cholesterol zu den Mitochondrien transportiert, um dort in Pregnenolon überführt zu werden (CLARK & SHAY, 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nebenniere des Straußes außer mit den zytoskelettalen Markern weiterhin mithilfe zweier neuronaler Marker charakterisiert. Die S100-Proteine gehören einer Multigen-Familie Ca^{2+} -bindender Proteine mit geringem Molekulargewicht (9-13 kDa) an. Es sind Homodimere, die aus zwei gleichen Polypeptidketten aufgebaut sind. Ihre Expression ist zellspezifisch - S100 wird vor allem in Neuralleisten-Abkömmlingen (Schwann Zellen, Melanozyten, Gliazellen) exprimiert, aber auch in Chondrozyten, Adipozyten, Makrophagen, Langerhans-Zellen und weiteren Zellarten. Durch ihre Ca^{2+} -abhängige Regulierung sind sie an vielen intrazellulären Prozessen wie etwa Proteinphosphorylierung, Zellproliferation einschließlich neoplastischer Transformation und Differenzierung beteiligt (GOULD et al., 1986; DONATO, 1999). In meiner Studie konzentriert sich die S100-Expression insbesondere auf das Adrenalzellzytoplasma, das Perineurium und das Endoneurium der peripheren Nerven, die alle stark immunpositiv reagieren. Die multipolaren Nervenzellen sind noch deutlich S100-positiv, vereinzelt ist auch an den Erythrozyten eine

deutliche Färbung zu erkennen. Cocchia und Michetti (1981) haben am Nebennierenmark der Ratte an Satelliten-Zellen, die das Nebennierenmark umgeben, eine starke S100-Expression nachweisen können (COCCHIA & MICHETTI, 1981). Ebenso zeigen Suzuki und Kachi (1995) eine starke Reaktion an den Stützzellen, die sowohl die Noradrenalin- als auch die Adrenalinzellen im Nebennierenmark der Ratte umgeben (SUZUKI & KACHI, 1995). Stützzellen ähneln den Gliazellen im zentralen Nervensystem und können mittels Anti-S100 detektiert werden. In einer weiteren Studie erläutern Suzuki und Kachi (1996) die spezielle Beziehung zwischen Noradrenalin-Zellen und den Stützzellen. Bei Schwein, Pferd, Hund, Katze, Ratte, Rind und Hamster zeigen sie das spezielle Verteilungsmuster der S100-positiven Zellen im Parenchym und vermuten eine tragende Rolle der Stützzellen im Kalziummetabolismus bei der Regulation der Noradrenalin-Freisetzung (SUZUKI & KACHI, 1996). Auch Ücker (1999) weist mittels Anti-S100 Stützzellen im Nebennierenmark des Schweins nach (ÜCKER, 1999). In meinen Untersuchungen an der Nebenniere des Straußes kann ich allerdings keine immunpositiven Stützzellen lokalisieren. Jelinek und Konecny (2011) detektieren an der Nebenniere des Rindes wiederum eine Expression von S100 im kortikalen Gewebe und den Noradrenalin-sezernierenden Zellen des Rindes (JELINEK & KONECNY, 2011). In der Literatur ist somit keine positive Reaktion an Adrenalinzellen oder Nebennierenmarkzellen auf Anti-S100 beschrieben wie ich sie beobachtet habe.

Neuronspezifische Enolase (NSE) ist ein Enzym aus der Enzymgruppe der Enolasen. Enolasen sind glykolytische Homo- und Heterodimere mit drei möglichen Untereinheiten (α , β , γ), die die reversible Reaktion von 2-Phosphoglycerat und Phosphophenolpyruvat katalysieren (SHIMIZU et al., 1983). α -Enolasen sind gewebeunspezifisch, β -Enolasen nur in Muskelzellen und γ -Enolasen nur in Nervengewebe lokalisiert (KANG et al., 1996). Neuronspezifische Enolase kommt in unterschiedlichen Isoformen in Neuronen des Gehirns und des peripheren Nervensystems sowie in neuroendokrinen Geweben vor. Anti-NSE detektiert gesunde und neoplastische Zellen neuronalen oder neuroendokrinen Ursprungs, obwohl es sich nicht um einen exklusiven neuronalen Marker handelt (FEDERSPIEL et al., 1987). In meinen Untersuchungen an der Nebenniere des Straußes ist eine spezifische Bindung mit Anti-NSE in den Zellkernen derjenigen Adrenalinzellen, die in die umliegenden

Sinusoide und größeren Blutgefäße exozytiert wurden, gegeben. Weiterhin reagieren die multipolaren Nervenzellen deutlich immunpositiv. Schmechel et al. (1978) weisen NSE im Zytoplasma der adrenalen chromaffinen Zellen des Rhesus-Affen und des Menschen nach (SCHMECHEL et al., 1978). Cocchia (1981), der Untersuchungen über die Neuronspezifische Enolase an den Chromaffinzellen der Ratte vornimmt, kann einen positiven Nachweis im Zytoplasma der Schwann-Zellen und im Nukleoplasma erbringen (COCCHIA & MICHETTI, 1981). Viores und Marangos (1982) untersuchen ebenfalls die Nebenniere der Ratte auf NSE und können das Enzym mit einem Immunoassay nachweisen (VINOES & MARANGOS, 1982). Beim Huhn detektieren Tanaka et al. (1998) γ -Enolase mRNA mittels Northern Blot in der Nebenniere (TANAKA et al., 1998). Somit konnte bei einer anderen Vogelart bereits Neuronspezifische Enolase in der Nebenniere nachgewiesen werden, allerdings ist in keiner immunhistochemischen Studie eine ähnliche Expression wie in meiner Arbeit an der Nebenniere des Straußes beschrieben.

3. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Nebenniere wurde schon bei einigen Vogelarten mit elektronenmikroskopischen Methoden untersucht. Dabei ergaben sich sowohl Übereinstimmungen als auch Differenzen zur Ultrastruktur der Nebenniere des Straußes. Unsicker (1973) beschreibt die Interrenalzellen des Huhns als Zellen, die auf einer Basalmembran liegen, die die Grenze zu Blutgefäßen, Bindegewebe und Adrenalzellen definiert. Die Zellkerne liegen entweder basal oder apikal und sind rund oder oval geformt. Der Golgi-Apparat liegt überwiegend apikal und ist häufig mit Lysosomen assoziiert. Die Mitochondrien in der inneren Zone sind hauptsächlich vom Tubulus- oder Sacculustyp. Der Cristae-Typ ist in dieser Zone seltener zu sehen. In der subkapsulären Zone beschreibt Unsicker (1973) beim Huhn weiterhin überwiegend Mitochondrien vom Cristae-Typ. Das Endoplasmatische Retikulum kommt sowohl in seiner rauen als auch glatten Form vor. Er erkennt eine Korrelation zwischen dem Auftreten der verschiedenen Mitochondrien-Typen und der Form des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Interrenalzellen, die glattes ER aufweisen, besitzen meist Mitochondrien vom Tubulus-Typ und Zellen, die einen größeren Anteil an rauem ER erkennen lassen,

enthalten eher Mitochondrien vom Cristae-Typ (UNSICKER, 1973). Die Interrenalzellen der Japanischen Wachtel studierten Bhattacharyya (1975), Mikami (1980) und Basha (2004) (BHATTACHARYYA, 1975; MIKAMI et al., 1980; BASHA et al., 2004). Bhattacharyya (1975) fand ebenfalls, dass die Interrenalzellen von einer Basalmembran umgeben werden, die sie von umliegenden Geweben abgrenzt. Er fand außerdem deutliche Interzellularräume zwischen den benachbarten Zellen, in die von der Plasmamembranen gebildete Interdigitationen oder Mikrovilli hineinragen. Er fand außerdem eine große Anzahl an Lipidtropfen und Mitochondrien, die überwiegend im basalen Zellteil liegen. Der Zellkern der Interrenalzellen der Wachtel kann rund, oval oder ellipsoid sein und enthält fein granuliertes Chromatin. Es kommen in der Nebenniere der Wachtel tubuläre als auch vesikuläre Mitochondrien vor. Der Golgi-Apparat liegt entfernt vom Zellkern in der basalen Zellhälfte (BHATTACHARYYA, 1975). Mikami (1980) und Basha (2004) unterscheiden bei den Interrenalzellen der Wachtel vier Zelltypen. Die Typ 1-Zellen, die sich in der subkapsulären Zone befinden, enthalten zahlreiche Lipidtropfen und polymorphe Mitochondrien vom Cristae-Typ. Beide werden von einem glatten ER umgeben. Die Typ 2-Zellen der inneren Zone weisen einen runden Zellkern mit ein bis zwei Nukleoli auf. Auch in diesem Bereich der Wachtelnebeniere beschreiben sie das Auftreten vieler Lipidtropfen sowie Mitochondrien vom Tubulus- und Cristaetyp. Auch hier werden sie von glattem ER umgeben. Der auffällige Golgi-Apparat liegt zusammen mit membranösen Vesikeln und Lysosomen. Die Typ 2-Zellen unterscheiden sich von den Typ 1-Zellen durch das vermehrte Auftreten der Lipidtröpfchen und die unterschiedlichen Feinstruktur der Mitochondrien. Mikami (1980) und Basha (2004) beschreiben weiterhin die Typ 3-Zellen, die einen sphärischen Zellkern mit einem prominenten Nucleolus aufweisen und ebenso in der inneren Zone der Nebenniere der Wachtel auftreten. Ihr Zytoplasma ist weniger dicht als das der vorigen Zellen und enthält glattes ER. Die Mitochondrien vom Cristae-Typ sind größer und liegen häufig in Kontakt mit Liposomen. Der Golgi-Apparat tritt gemeinsam mit Lysosomen auf. Die Typ 4 – Zellen zeigen pleomorphe Zellkerne. Ihr Zytoplasma ist stark elektronendicht und enthält glattes ER, kleine tubuläre Mitochondrien und viele Lysosomen. Der Golgi-Apparat ist weniger stark entwickelt als bei den anderen drei Zelltypen (MIKAMI et al., 1980; BASHA et al., 2004). Bhattacharyya (1975) weist außerdem noch auf Mikrovilli hin, die in den Interzellularraum reichen und mit

benachbarten Zellen Kontakt aufnehmen. Die Interrenalzellen der Taube weisen einen ähnlichen Aufbau auf (BHATTACHARYYA, 1975). Basha (2004) hingegen erwähnt diese Interdigitationen an den Interrenalzellen der Wachtel nicht, beschreibt aber ansonsten die Ultrastruktur der Interrenalzellen an der Nebenniere der Wachtel auf gleiche Art und Weise, ebenso wie Prabhavathi (2011) die Interrenalzellen des Perlhuhns (BASHA et al., 2004; PRABHAVATHI et al., 2011). Knouff (1951) beobachtete, dass sich die Ultrastruktur der Interrenalzellen der Nebenniere des Braunen Pelikans im Unterschied zu den lichtmikroskopischen Befunden in der Zona glomerulosa, der Zona fasciculata und der Zona reticularis lediglich in der Anzahl der vorhandenen Lipidtröpfchen unterschieden. Die Interrenalzellen in der Zona glomerulosa und in der Zona fasciculata weisen mehr Lipidtröpfchen auf als die Zellen in der Zona reticularis. Er erklärt, dass die Anzahl der Lipidtröpfchen mit der Anzahl der Mitochondrien in inverser Beziehung steht. Je mehr Lipidtröpfchen vorkommen, desto weniger Mitochondrien findet man in den Zellen und vice versa. Einen Golgi-Apparat konnte er an den Interrenalzellen des Pelikans nicht nachweisen (KNOUFF & HARTMAN, 1951). Mithilfe der elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten auch in meiner vorliegenden Arbeit die lichtmikroskopischen Befunde an den Interrenalzellen des Straußes präzisiert und erweitert werden. Die Ultrastruktur der Adrenalzellen wird in einer weiteren Dissertation (in Arbeit) am Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München untersucht. Die Interrenalzellen des Straußes in meinen ultrastrukturellen Untersuchungen weisen ebenso wie die der oben beschriebenen Vogelarten zahlreiche Lipidtröpfchen auf. Diese treten häufig in Assoziation mit Mitochondrien vom Tubulus-Typ, glattem Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Lysosomen auf. Somit weisen die Interrenalzellen das charakteristische Bild Steroidhormon produzierender Zellen auf. Es lassen sich weiterhin Mitochondrien vom Cristae-Typ finden, die allerdings in geringerer Anzahl auftreten als die Mitochondrien vom Tubulus-Typ. Einen Golgi-Apparat konnte ich in den Interrenalzellen des Straußes ebenso wie Tang (2009) in den Interrenalzellen des juvenilen Straußes und wie Knouff (1951) in den Interrenalzellen des Braunen Pelikans (KNOUFF & HARTMAN, 1951; TANG et al., 2009) nicht ausmachen. In den Interrenalzellen des Straußes kommen sowohl freie Ribosomen als auch Ribosomen, die an die Membran des rauen ER gebunden sind, vor. Raves ER tritt im Vergleich zu glattem ER seltener auf. Die Zellkerne der Interrenalzellen des

Straußes sind rund oder oval und weisen einen dominanten Nucleolus oder aber zwei, teilweise drei undeutlichere Nucleoli auf. Umgeben werden die Interrenalzellgruppen von einer starken Basalmembran. Untereinander sind die Interrenalzellen sowohl über Zonulae occludentes als auch über Zonulae adherentes verbunden. Die von Unsicker (UNSICKER, 1973) in der Nebenniere des Huhns entdeckten Desmosomen oder Maculae adherentes sind beim Strauß nicht zu finden. Verglichen mit den lichtmikroskopischen Untersuchungen, in denen die drei Zonen der Nebenniere der Strauße sich deutlich morphologisch unterscheiden, ist dies in der elektronenmikroskopischen Auswertung nicht der Fall. Dort lassen sich keine offensichtlichen Differenzen in der Zellorganellausstattung ausmachen. Dies beschreibt ebenso Tang (2009) beim juvenilen Strauß, der auch keine Variationen in den verschiedenen Nebennierenzonen aufweist (TANG et al., 2009). Meine Befunde sind mit denen Tangs (2009) beim juvenilen Strauß konform. Insgesamt ergeben sich somit viele morphologische Gemeinsamkeiten in der Ultrastruktur der Nebenniere des Straußes zu anderen Vogelarten. Allerdings treten auch Strauß-spezifische Merkmale auf. Als ein Charakteristikum an den Nebennierenzellen des Straußes kann festgehalten werden, dass die Ultrastruktur der Interrenalzellen in der peripheren und der zentralen Zone der Nebenniere keine signifikanten Variationen aufweist, obwohl die lichtmikroskopischen Untersuchungen dies zunächst vermuten ließen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nebennieren von 18 weiblichen und männlichen adulten Afrikanischen Straußen mit modernen histologischen Methoden untersucht. Die Morphologie und die Ultrastruktur wurden licht- und elektronenmikroskopisch charakterisiert. Weiterhin wurden mittels immunhistochemischer Technik das Zytoskelett sowie neuronale Elemente der Nebenniere des Straußes analysiert. Makroskopisch können die linke und die rechte Nebenniere des Straußes anhand ihrer Form, Lage und Größe unterschieden werden.

Der histomorphologische Aufbau der Nebenniere des Straußes entspricht grundsätzlich dem anderer Vogelarten. Umgeben von einer bindegewebigen Nebennierenkapsel liegen die Interrenal- und die Adrenalzellgruppen nicht in Rinde und Mark gegliedert, sondern unregelmäßig ineinander verwoben vor. Die kortikalen Interrenalzellen lassen sich in eine periphere Zone, bestehend aus einem subkapsulären und einem inneren Anteil, und eine zentrale Zone einteilen. In der subkapsulären Zone liegen die Interrenalzellgruppen als kugelige Zellbündel vor, in der inneren Zone ziehen sie strangartig perpendikulär zur Kapsel und in der zentralen Zone weisen sie eine diskontinuierliche runde Anordnung auf. Diese Zonierung ähnelt der Gliederung der Nebenniere des Pelikans und erinnert an den Aufbau der Säugernebnieren. Ihre Ultrastruktur weist den typischen Aufbau Steroidhormon produzierender Zellen auf. Es finden sich Lipidtröpfchen, Mitochondrien vom Tubulus-Typ sowie reichlich glattes Endoplasmatisches Retikulum. Die medullären Adrenalzellen liegen in inselartigen Aggregaten irregulär zwischen den Interrenalzellgruppen verteilt und werden durch unregelmäßig auftretende Blutsinusoide separiert. Sie weisen ein homogeneres Bild auf als die Interrenalzellen.

Das adrenale Zytoskelett des Straußes wurde immunhistochemisch auf das Vorhandensein von Aktin, Myosin, Vimentin, Cytokeratin und Tubulin untersucht. Im Zytoplasma der Interrenalzellen konnten Cytokeratine und Tubulin nachgewiesen werden. Die Adrenalzellen ließen eine zytoplasmatische Reaktion auf die Antikörper gegen Myosin, Vimentin und Tubulin erkennen. Des Weiteren wurden die beiden neuronalen Marker S100 und Neuronspezifische Enolase

detektiert. Diese Ergebnisse gestalteten sich als besonders interessant, da ähnliche Reaktionen wie in meiner Studie an der Nebenniere des Straußes bisher nicht beschrieben sind. Das Protein S100 wurde im Zytoplasma der Adrenalzellen exprimiert, wohingegen die Neuronspezifische Enolase eine nukleäre Reaktion an denjenigen Adrenalzellen aufwies, die in die umliegenden Sinusoide exozytiert wurden.

VII. SUMMARY

Histological, immunohistochemical and ultrastructural studies on the adrenal gland of the African ostrich (*Struthio camelus*) with a special focus on the interrenal cells

The aim of my thesis was to describe the functional morphology of the ostrich's adrenal gland using histological, immunohistochemical and electron microscopical techniques. In total, the adrenal glands of eighteen adult ostriches have been investigated.

Macroscopically, the left and right adrenal gland showed differences in shape, location and size. Histologically, typical structures of avian adrenal glands can be found in the adrenal glands of the ostrich. It is surrounded by a connective tissue capsule, however the cortical interrenal cells and medullar chromaffin cells are not separated into different layers, but they appear intermingled throughout the adrenal parenchyma. The interrenal cells have been divided in a peripheral zone, with a subcapsular and an inner layer, and in a central zone. Within the subcapsular zone the interrenal cells are arranged as globular bundles, whereas the cells of the inner zone run perpendicular to the capsule. In the central zone they showed a discontinuous round formation. This zonal organisation is almost similar to the one described for the Brown Pelican and is reminiscent of the mammalian adrenal gland. On the ultrastructural level the interrenal cells display typical characteristics of steroidhormone producing cells. There are numerous intracellular lipid droplets, tubular mitochondria and a smooth endoplasmatic reticulum. The medullar chromaffin cells are irregularly arranged in island groups between the interrenal cell groups and are divided by abundant blood sinusoids. Overall, they show a more homogenous appearance than the interrenal cells.

The cytoskeletal organisation of the adrenal gland of the African ostrich has been studied immunohistochemically by probing for the presence of actin, myosin, vimentin, cytokeratins and tubulin. The interrenal cell cytoplasm contained cytokeratins and tubulin, whereas the adrenal cells were immunolabeled with the antibodies against myosin, vimentin and also tubulin. Furthermore, the two neuronal markers S100 and neuron-specific enolase have been localised. These results have been of particular interest as the protein S100 is expressed in the

adrenal cell cytoplasm and the neuron-specific enzyme enolase shows a nuclear adrenal cell reaction at those cells, which have been exocytated into the nearby sinusoids.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. The cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc. New York and London 1989: 613-29.

Anstey A, Cerio R, Orchard G, Smith N, Jones E. Desmoplastic malignant melanoma. An immunocytochemical study of 25 cases. *The American Journal of Dermatopathology* 1994; 16: 14-22.

Basha S, Vijayaragavan C, Ramesh G. Light and electron microscopic studies on the interrenal tissue of the adrenal gland in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Indian Journal of Animal Sciences* 2004; 74: 1021-3.

Basha S, Ramesh G. Microanatomical studies on the chromaffin tissue (adrenal medulla) of the adrenal gland in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Indian Journal of Animal Sciences* 2007; 77: 1261-4.

Basha S, Venkatesan S, Remesh G. Histochemical reactions of the adrenal gland in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Indian Journal of Animal Sciences* 2008; 78: 47-50.

Basha S, Kannan T, Ramesh G. Age related changes of the adrenal gland in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2009; 5: 198-202.

Bhattacharyya T, Sinha D, Ghosh A. A comparative histological survey of the avian adrenocortical homologue. *Archivum Histologicum Japonicum* 1972; 34: 419-32.

Bhattacharyya T. Fine structure of the interrenal cell in the quail and the pigeon. *Anatomy and Embryology* 1975; 146: 301-11.

Bhujle B, Nadkarni V. Histological and histochemical observations on the adrenal

gland of four species of birds. *Zoologische Beiträge* 1980; 26: 287-95.

Butler D, Wilson J. Cardiovascular function in adrenalectomized pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 1985; 81: 353-8.

Carsia R, Harvey S. Adrenals. In: *Sturkie's Avian Physiology*. Springer New York 2000: 489-537.

Chester J, Phillips J. The adrenal and interrenal glands. In: *Vertebrates Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press New York 1986: 319-50.

Clark M, Shay J. The role of tubulin in the steroidogenic response of murine adrenal and rat Leydig cells. *Endocrinology* 1981; 109: 2261-3.

Cocchia D, Michetti F. S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell and Tissue Research* 1981; 215: 103-12.

Conti M, Kawamoto S, Adelstein R. Non-Muscle Myosin II. In: *Myosins. A Superfamily of Molecular Motors*. Springer Netherlands 2008: 223-64.

Creutz C. Isolation, characterization and localization of bovine adrenal medullary myosin. *Cell and Tissue Research* 1977; 178: 17-38.

de Matos R. Adrenal steroid metabolism in birds: anatomy, physiology, and clinical considerations. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 2008; 11: 35-57.

Deeming D. Anatomy. In: *The Ostrich: Biology, Production and Health*. CABI Pub. USA UK 1999: 13-50.

Dey P, Togra J, Mitra S. Intermediate filament: Structure, function, and applications in cytology. *Diagnostic Cytopathology* 2014; 00.

Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1999; 1450: 191-231.

Dutcher S. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Current Opinion in Cell Biology* 2001; 13: 49-54.

Eichner R, Bonitz P, Sun T. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *The Journal of Cell Biology* 1984; 98: 1388-96.

Federspiel B, Cras P, Gheuens J, Andries D, Lowenthal A. Human $\gamma\gamma$ -Enolase: Two-site immunoradiometric assay with a single monoclonal antibody. *Journal of Neurochemistry* 1987; 48: 22-8.

Freedman S. The innervation of the suprarenal gland of the fowl (*Gallus domesticus*). *Acta Anatomica* 1968; 69: 18-25.

Freeman B. Adrenal glands. In: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. Academic Press London 1983: 191-209.

Gabbiani G, Chaponnier C, Luscher E. Actin in the cytoplasm of adrenocortical cells. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 1975; 149: 618-21.

Gersthofer M. Nebenniere. In: *Crashkurs Physiologie*. Urban & Fischer München Jena: 2004: 154-6.

Ghosh A. Cytophysiology of the avian adrenal medulla. *International Review of Cytology* 1977; 49: 253-84.

Ghosh A. Avian adrenal medulla: structure and function. *Avian Endocrinology*. Academic Press New York 1980: 301-8.

Ghosh A, Carmichael S, Mukherjee M. Avian adrenal medulla: cytomorphology and function. *Acta Biologica Szegediensis* 2001; 45: 1-11.

Gould V, Moll R, Moll I, Lee I, Schwechheimer K, Franke W. The intermediate filament complement of the spectrum of nerve sheath neoplasms. *Laboratory Investigation. A Journal of Technical Methods and Pathology* 1986; 55: 463-74.

Hall P, Almahbobi G. The role of the cytoskeleton in the regulation of steroidogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1992; 43: 769-77.

Hall P, Almahbobi G. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microscopy Research and Technique* 1997; 36: 463-79.

Hall P. The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells. *Steroids* 1997; 62: 185-9.

Hartman F, Brownell K. *The adrenal gland*. Lea and Febiger, Philadelphia 1949: 394.

Hassan A. Histological and histochemical studies on the adrenal glands of geese and ducks. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 1975; 25: 19-26.

Hays V. The development of the adrenal glands of birds. *The Anatomical Record* 1914; 8: 451-74.

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 2000; 12: 79-90.

Hess L. Corticosteroid synthesis and metabolism in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2002; 11: 65-70.

Hodges R. Endocrine glands. In: *Form and function in birds*. Academic Press New York 1981: 149-234.

Hodges R. The adrenal glands. In: *The Histology of the Fowl*. Academic Press New York 1974: 464-474.

Humayun K, Aoyama M, Sugita S. Morphological and histological studies on the adrenal gland of the chicken (*Gallus domesticus*). *The Journal of Poultry Science* 2012; 49: 39-45.

Jelinek F, Konecny R. Adrenal glands of slaughtered bulls, heifers and cows: a histological study. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 2011; 40: 28-34.

Kameda Y. Immunoelectron microscopic localization of vimentin in sustentacular cells of the carotid body and the adrenal medulla of guinea pigs. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1996; 44: 1439-49.

Kang J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek N. Immunoreactive neuron-specific enolase (NSE) is expressed in testicular carcinoma-in-situ. *The Journal of Pathology* 1996; 178: 161-5.

Karnovsky M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 1965; 27: 137-8.

Knouff R, Hartman F. A microscopic study of the adrenal of the brown pelican. *The Anatomical Record* 1951; 109: 161-87.

König H, Korbel R, Liebich H. Endokrine Drüsen. In: *Anatomie der Vögel*, Schattauer Stuttgart New York 2009: 223-8.

Lang G. Histologische Färbung. In: Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Springer Wien New York 2013: 222-6.

Lang G. Immunhistochemie. In: Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Springer Wien New York 2013: 270-304.

Liebich H. Die Zelle (Cellula). In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Schattauer Stuttgart New York: 2004: 21-5.

Lothrop C, Olsen J, Loomis M, Jensen J, Lenhard A. Evaluation of adrenal function in psittacine birds, using the ACTH stimulation test. Journal of the American Veterinary Medical Association 1985; 187: 1113-5.

Madhu N, Sarkar B, Manna C. Biochemical, histochemical and immunocytochemical changes in the adrenal cortex of adult male domestic pigeon, *Columba livia* in relation to annual testicular and environmental cycles. Ceylon Journal of Science (Biological Sciences) 2010; 39: 137-46.

McKean P, Vaughan S, Gull K. The extended tubulin superfamily. Journal of Cell Science 2001; 114: 2723-33.

Michel G. Entwicklung der Organe. In: Vergleichende Embryologie der Haustiere Gustav Fischer Jena 1995: 263.

Mikami S, Takagi T, Farner D. Cytological differentiation of the interrenal tissue of the Japanese quail, *Coturnix coturnix*. Cell and Tissue Research 1980; 208: 353-70.

Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen C, Richard S, Veissier I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology & Behavior 2007; 92: 317-39.

Müller J. Die Nebennieren von Gallus domesticus und Columba livia domestica. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie 1929; 17: 309-52.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Endokrine Drüsen. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Anatomie der Vögel. Parey Stuttgart 2004: 265-82.

Pearce R, Cronshaw J, Holmes W. Evidence for the zonation of interrenal tissue in the adrenal gland of the duck (Anas platyrhynchos). Cell and Tissue Research 1978; 192: 363-79.

Pollard T, Weihing R. Actin and myosin and cell movement. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 1974; 2: 1-65.

Prabhavathi M, Basha S, Venkatesan S, Leela V, Ramesh G. Histomorphology of adrenal cortex (interrenal tissue) in guinea fowl. Indian Journal of Animal Research 2010; 44: 297-9.

Prabhavathi M, Basha S, Venkatesan S, Leela V, Ramesh G. Electron microscopical study of adrenal gland in guinea fowl. Indian Journal of Animal Research 2011; 45: 215-8.

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

Richardson R, Hinton D, Campion D. An improved method for storing and using stains in electron microscopy. Journal of Electron Microscopy 1983; 32: 216-8.

Ritchie B, Harrison G, Harrison L. Endocrinology. In: Avian Medicine: Principles and Applications. Wingers Lake Worth FL 1994: 582-606.

Rizeq M, Van De Rijn M, Hendrickson M, Rouse R. A comparative immunohistochemical study of uterine smooth muscle neoplasms with emphasis on the epithelioid variant. Human Pathology 1994; 25: 671-7.

Romeis B. Präparationsmethoden. In: Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010: 39-180.

Romeis B. Färbungen. In: Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010: 181-298.

Romeis B. Immunlokalisation. In: Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010: 387-418.

Roskopf W, Woerpel R. Diseases of the endocrine system. In: Diseases of Cage and Aviary Birds. Williams & Wilkins. 1996: 368-79.

Rüsse I, Sinowatz F. Nebenniere. In: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey Berlin 1991: 281-6.

Schmechel D, Marangos P, Brightman M. Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. Nature 1978; 276: 834-6.

Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. The American Journal of Pathology 1991; 138: 1233-42.

Schnorr B. Entwicklung der endokrinen Drüsen In: Embryologie der Haustiere Enke Stuttgart 1996: 122.

Schweizer J, Bowden P, Coulombe P, Langbein L, Lane E, Magin T, Maltais L, Omary M, Parry D, Rogers M. New consensus nomenclature for mammalian keratins. The Journal of Cell Biology 2006; 174: 169-74.

Shimizu A, Suzuki F, Kato K. Characterization of $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$ and $\alpha\gamma$ human enolase isozymes, and preparation of hybrid enolases ($\alpha\gamma$, $\beta\gamma$ and $\alpha\beta$) from homodimeric forms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and

Molecular Enzymology 1983; 748: 278-84.

Sinowatz F, Hees H. Endokrine Organe. In: Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Eigenverlag München 2006: 428-54

Sinowatz F, Hees H. Die Zelle. In: Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Eigenverlag München 2006: 35-93.

Sivaram S. Histochemical studies on the developing adrenal gland of *Gallus domesticus*. Histochemie 1968; 12: 316-25.

Skalli O, Pelte M, Pecllet M, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1989; 37: 315-21.

Suzuki T, Kachi T. Differences between adrenaline and noradrenaline cells in cellular association with supporting cells in the adrenal medulla of the pig: an immunohistochemical study. Neuroscience Letters 1994; 176: 217-20.

Suzuki T, Kachi T. Immunohistochemical studies on supporting cells in the adrenal medulla and pineal gland of adult rat, especially on S-100 protein, glial fibrillary acidic protein and vimentin. Kaibogaku Zasshi Journal of Anatomy 1995; 70: 130-9.

Suzuki T, Kachi T. Similarities and differences in supporting and chromaffin cells in the mammalian adrenal medullae: an immunohistochemical study. Anatomical Record 1996; 244: 358-65.

Tanaka M, Taniguchi T, Ohkubo T, Nakashima K. cDNA cloning and characterization of neuron-specific enolase from chicken. Biochimica et Biophysica Acta 1998; 1395: 28-33.

Tang L, Peng K, Wang J, Luo H, Cheng J, Zhang G, Sun Y, Liu H, Song H. The morphological study on the adrenal gland of African ostrich chicks. *Tissue & Cell* 2009; 41: 231-8.

Ücker R. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur postnatalen Entwicklung der Nebenniere beim Schwein. Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München 1999

Unsicker K. Fine structure and innervation of the avian adrenal gland. I. Fine structure of adrenal chromaffin cells and ganglion cells. *Cell and Tissue Research* 1973; 145: 389-416.

Unsicker K. Fine structure and innervation of the avian adrenal gland. II. Cholinergic innervation of adrenal chromaffin cells. *Cell and Tissue Research* 1973; 145: 417-42.

Unsicker K. Fine structure and innervation of the avian adrenal gland. IV. Fine structure of interrenal cells. *Cell and Tissue Research* 1973; 146: 385-402.

Unsicker K. Fine structure and innervation of the avian adrenal gland. V. Innervation of interrenal cells. *Cell and Tissue Research* 1973; 146: 403-16.

Unsicker K, Groschel-Stewart U. Distribution of contractile proteins and adrenergic nerves in the adrenal gland of guinea-pig, rat and ox as revealed by immunofluorescence and the glyoxylic acid technique. *Experientia* 1978; 34: 102-5.

Vinores SA, Marangos PJ. A developmental study of neuron-specific enolase in rat adrenal medulla. *Journal of Neurochemistry* 1982; 39: 1748-50.

Walsh M, Beldegreen R, Clubb S, Chen C. Effect of exogenous ACTH on serum corticosterone and cortisol concentrations in the Moluccan cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *American Journal of Veterinary Research* 1985; 46: 1584.

Westerhof I. Pituitary-adrenocortical function and glucocorticoid administration in pigeons (*Columba livia domestica*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 1998; 167-77.

Wilson J, Butler D. Adrenalectomy inhibits noradrenergic, adrenergic, and vasopressor responses to angiotensin II in the Pekin duck (*Anas platyrhynchos*). *Endocrinology* 1983; 112: 645-52.

Wilson J, Butler D. 6-Hydroxydopamine treatment diminishes noradrenergic and pressor responses to angiotensin II in adrenalectomized ducks. *Endocrinology* 1983; 112: 653-8.

Zenoble R, Kemppainen R, Young D, Clubb S. Endocrine responses of healthy parrots to ACTH and thyroid stimulating hormone. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1985; 187: 1116-8.

Zenoble R, Kemppainen R, Young D, Carpenter J. Effect of ACTH on plasma corticosterone and cortisol in eagles and condors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1985; 187: 1119-20.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1 Afrikanischer Strauß (Struthio camelus)</i>	1
<i>Abb. 2 Mikroskopische Anatomie einer typischen Vogelnebenniere</i>	4
<i>Abb. 3 Biosynthese der Steroidhormone</i>	11
<i>Abb. 4 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>	12
<i>Abb. 5 Schematische Übersicht der Probenentnahmestellen</i>	24
<i>Abb. 6 Nebennieren beim männlichen Tier in situ, Ventralansicht.</i>	37
<i>Abb. 7 Nebennieren beim weiblichen Tier in situ, Ventralansicht</i>	37
<i>Abb. 8 Beide Nebennieren ex situ, SB = 1 cm</i>	38
<i>Abb. 9 Übersicht Nebenniere, Masson Goldner-Färbung</i>	42
<i>Abb. 10 Periphere Zone, Masson Goldner-Färbung</i>	42
<i>Abb. 11 Subkapsuläre Zone, van Gieson-Färbung</i>	42
<i>Abb. 12 Subkapsuläre Zone, H.E.-Färbung</i>	42
<i>Abb. 13 Subkapsuläre Zone, Masson Goldner-Färbung</i>	43
<i>Abb. 14 Subkapsuläre Zone, H.E.-Färbung</i>	43
<i>Abb. 15 Innere Zone, Masson Goldner-Färbung</i>	46
<i>Abb. 16 Innere Zone, van Gieson-Färbung</i>	46
<i>Abb. 17 Innere Zone, H.E.-Färbung</i>	46
<i>Abb. 18 Innere Zone, Masson Goldner-Färbung</i>	46
<i>Abb. 19 Zentrale Zone, H.E.-Färbung</i>	49
<i>Abb. 20 Zentrale Zone, H.E.-Färbung</i>	49
<i>Abb. 21 Zentrale Zone, Masson Goldner-Färbung</i>	49
<i>Abb. 22 Zentrale Zone, van Gieson-Färbung</i>	49
<i>Abb. 23 Epithelhöhe Interrenalzellen in den drei Zonen der Nebenniere</i>	51
<i>Abb. 24 Kerndurchmesser Interrenalzellen in den drei Zonen der Nebenniere</i> ...	52
<i>Abb. 25 Epithelhöhe Adrenalzellen in den drei Zonen der Nebenniere</i>	53
<i>Abb. 26 Kerndurchmesser Adrenalzellen in den drei Zonen der Nebenniere</i>	54
<i>Abb. 27 Subkapsuläre Zone, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5</i>	56
<i>Abb. 28 Periphere Zone, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5</i>	56
<i>Abb. 29 Zentrale Zone, Alcianblau-Färbung bei pH 2,5</i>	56
<i>Abb. 30 Zentrale Zone, Alcianblau-Färbung bei pH 1,0</i>	56
<i>Abb. 31 Periphere Zone, PAS-Reaktion</i>	58
<i>Abb. 32 Zentrale Zone, PAS-Reaktion</i>	58

<i>Abb. 33</i> Zentrale Zone, PAS-Reaktion	58
<i>Abb. 34</i> Periphere Zone, PAS-Reaktion mit Amylaseverdau	58
<i>Abb. 35</i> Periphere Zone, Immunhistochemischer SMA-Nachweis	60
<i>Abb. 36</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer SMA-Nachweis	60
<i>Abb. 37</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer SMA-Nachweis	60
<i>Abb. 38</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer SMA-Nachweis	60
<i>Abb. 39</i> Innere Zone, Immunhistochemischer NMM-Nachweis	63
<i>Abb. 40</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer NMM-Nachweis	63
<i>Abb. 41</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer NMM-Nachweis	63
<i>Abb. 42</i> Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer NMM-Nachweis	63
<i>Abb. 43</i> Innere Zone, Immunhistochemischer Vimentin-Nachweis	66
<i>Abb. 44</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Vimentin-Nachweis	66
<i>Abb. 45</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Vimentin-Nachweis	66
<i>Abb. 46</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer Vimentin-Nachweis	66
<i>Abb. 47</i> Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis	69
<i>Abb. 48</i> Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis	69
<i>Abb. 49</i> Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis	69
<i>Abb. 50</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis	69
<i>Abb. 51</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis	70
<i>Abb. 52</i> Innere Zone, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis	70
<i>Abb. 53</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Pancytokeratin-Nachweis	70
<i>Abb. 54</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Tubulin-Nachweis	73
<i>Abb. 55</i> Innere Zone, Immunhistochemischer Tubulin-Nachweis	73
<i>Abb. 56</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Tubulin-Nachweis	73
<i>Abb. 57</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer Tubulin-Nachweis	73
<i>Abb. 58</i> Innere Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis	76
<i>Abb. 59</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis	76
<i>Abb. 60</i> Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer S100-Nachweis	76
<i>Abb. 61</i> Innere Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis	76
<i>Abb. 62</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis	77
<i>Abb. 63</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer S100-Nachweis	77
<i>Abb. 64</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer NSE-Nachweis	80
<i>Abb. 65</i> Subkapsuläre Zone, Immunhistochemischer NSE-Nachweis	80
<i>Abb. 66</i> Zentrale Zone, Immunhistochemischer NSE-Nachweis	80
<i>Abb. 67</i> Kapsulärer Bereich, Immunhistochemischer NSE-Nachweis	80

<i>Abb. 68 TEM, Überblick über das Epithel der Interrenalzellen.....</i>	<i>84</i>
<i>Abb. 69 TEM, Interrenalzelle.....</i>	<i>85</i>
<i>Abb. 70 TEM, Interrenalzelle.....</i>	<i>86</i>
<i>Abb. 71 TEM, Zellkern einer Interrenalzelle</i>	<i>87</i>
<i>Abb. 72 TEM, Interrenalzellen.....</i>	<i>88</i>
<i>Abb. 73 TEM, Zellkern eines Fibrozyten</i>	<i>89</i>
<i>Abb. 74 TEM, Sinusoid zwischen Interrenalzellen</i>	<i>90</i>
<i>Abb. 75 TEM, Zellkontakte der Interrenalzellen.....</i>	<i>91</i>
<i>Abb. 76 TEM, Zellkontakte der Interrenalzellen.....</i>	<i>92</i>
<i>Abb. 77 TEM, Übergang Interrenalzelle Adrenalzelle</i>	<i>93</i>
<i>Abb. 78 TEM, Übergang Interrenalzelle Adrenalzelle</i>	<i>94</i>

X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tab. 1 Klassen der Intermediärfilamente.....</i>	<i>17</i>
<i>Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Strauße.....</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Antikörper.....</i>	<i>34</i>
<i>Tab. 4 Histomorphologische Befunde der Subkapsulären Zone (SKZ).....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 5 Histomorphologische Befunde der inneren Zone (IZ).....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 6 Histomorphologische Befunde der zentralen Zone (ZZ).....</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 7 Immunhistochemischer Nachweis von α-SMA.....</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 8 Immunhistochemischer Nachweis von NMM.....</i>	<i>64</i>
<i>Tab. 9 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....</i>	<i>67</i>
<i>Tab. 10 Immunhistochemischer Nachweis von Pancytokeratin.....</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 11 Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin.....</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 12 Immunhistochemischer Nachweis von S100.....</i>	<i>78</i>
<i>Tab. 13 Immunhistochemischer Nachweis von NSE.....</i>	<i>81</i>

XI. ANHANG

1. Lösungen für die Lichtmikroskopie

1.1. Fixierungslösungen

Bouin-Lösung:

Gesättigte wässrige Pikrinsäure ¹ (filtriert)	375 ml
37% Formaldehyd ²	125 ml
100 % Essigsäure ²	25 ml

3,7% Formalin:

37% Formaldehyd ²	100 ml
PBS 10x Konzentrat (Phosphate Buffered Saline) ³	90 ml
DEPC-Wasser	810 ml

DEPC-Wasser:

Aqua dest.	2 l
DEPC (Diethylpyrocarbonat) ²	1,5 ml

autoklaviert

Gefrierproben:

Flüssiger Stickstoff

Trockeneis

Abs. Methanol⁴

Aceton⁴

1.2. Histologische Färbelösungen**1.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer**Hämalaun:

Hämatoxylin ⁴	2 g
Natriumjodat ⁴	0,4 g
Kaliumaluminiumsulfat ⁴	100 g
Chloralhydrat ⁴	100 g
Zitronensäure krist. ⁴	2 g
ad Aqua dest.	2 l

*filtrieren*Eosin:1% Stammlösung:

Eosin ⁴	2 g
Aqua dest.	198 ml
37 % Formaldehyd ²	3 Tr.

Verdünnung für Färbung:

Stammlösung	1 Teil
Aqua dest.	10 Teile
100 % Essigsäure ²	3 Tr./100 ml

1.2.2. Resorcinfuchin-van Gieson-FärbungResorcinfuchsinlösung:Lösung A:

Fuchsin ⁴	2 g
Resorcin ⁴	4 g
Aqua dest.	ad 200 ml

erwärmen

Lösung B:

Eisen(III)-chlorid ²	8 g
Aqua dest.	ad 40 ml

Gebrauchslösung:

Lösung A + Lösung B, kochen, filtrieren

+ 37 % Salzsäure ²	2,8 ml
-------------------------------	--------

filtrieren

Eisenhämatoxylin nach Weigert:Lösung A:

Hämatoxylin ⁴	1 g
96 % Ethylalkohol ⁵	100ml

Lösung B:

Eisen(III)-chlorid	2,48 g
Aqua dest.	100 ml
37 % Salzsäure ²	1 ml

Gebrauchslösung: Lösung A + Lösung B 1:1

Pikrinsäure-Thiazinrot-Lösung nach Domagk:

Gesättigte wässrige Pikrinsäure	100 ml
1 % Thiazinlösung	7,5 ml

1.2.3. Trichromfärbung nach Masson und Goldner

Eisenhämatoxylin nach Weigert	s.o.
-------------------------------	------

Azophloxinlösung:

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

filtrieren

1% Essigsäure:

100 % Essigsäure ²	10 ml
Aqua dest.	ad 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
Essigsäure ²	0,2 ml

1.2.4. Alcianblau-FärbungAlcianblau pH 2,5:

Alcianblau 8 GX ²	1 g
3% Essigsäure ²	100 ml

pH-Wert einstellen, filtrieren

Thymol krist. ⁴	0,5 g
----------------------------	-------

Alcianblau pH 1,0:

Alcianblau 8 GX ²	1 g
0,1 N Salzsäure ²	100 ml

ph-Wert einstellen, filtrieren

Thymol krist. ⁴	0,5 g
----------------------------	-------

3% Essigsäure:

100% Essigsäure ²	30 ml
Aqua dest.	ad 1 l

Kernechtrotlösung:

Aluminiumsulfat ⁴	5 g
Aqua dest.	100 ml

erhitzen

Kernechtrot ⁴	0,1 g
--------------------------	-------

1.2.5. PAS-Reaktion nach Mc Manus

0,5 % α -Amylase 10 mg

Aqua dest. ad 2 ml

0,5% wässrige Perjodsäure:

Perjodsäure⁴ 1 g

Aqua dest. 200 ml

Schiff'sches Reagenz (Fuchsinschweflige Säure)⁴

SO₂-Wasser:N-Salzsäure:

37% Salzsäure² 3 ml

Aqua dest. 27 ml

10% Natriumpyrosulfitlösung:

Natriumpyrosulfit⁴ 3,003 g

Aqua dest. 30 ml

Leitungswasser 600 ml

SO₂-Wasser = N-Salzsäure + 10% Natriumpyrosulfitlösung + Leitungswasser

Hämalaun s.o.

1.3. AlkoholeXylol¹Isopropanol⁶96 % Ethanol⁵80 % Ethanol:

96% Ethanol 500 ml

Aqua dest. 104,70 ml

70% Ethanol:

96% Ethanol 500 ml

Aqua dest. 190,70 ml

2. Lösungen für die ImmunhistochemiePuffer:PBS pH 7,4:Natriumchlorid⁴ 42,5 gDi-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat⁴ 6,35 gDi-Natrium-Hydrogenphosphat-Monohydrat⁴ 1,95 g

Aqua dest. ad 5 l

Citratpuffer 10 mM, pH 6,0:Stammlösung A:

Citrat ⁴	0,1 M
(=Citrat	21,01 g
Aqua dest.	ad 1 l)

Stammlösung B:

Natriumcitrat ⁴	0,1 M
(=Natriumcitrat	29,4 g
Aqua dest.	ad 1 l)

Gebrauchslösung:

Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Aqua dest.	ad 500 ml

Vorbehandlungen:

0,1 % Protease ³	10 Min./RT
Trypsin (vom Schweinepankreas) ³	20 Min./RT
Mikrowellenvorbehandlung in Citratpuffer	3 x 10 Min.

7,5% Hydrogenperoxidlösung:

30% Hydrogenperoxid ⁴	50 ml
Aqua dest.	150 ml

Protein Block Serum-Free⁷

Antibody Diluent⁷

Streptavidin-HRP Novocastra⁹

DAB-Hydrogenperoxidlösung:

DAB-Lösung:

DAB-Tabletten¹⁰ (10 mg; pH 7,0) 6 St.

Aqua dest. 60 ml

abdunkeln, magnetrühren, filtrieren

Hydrogenperoxidlösung:

PBS 5 ml

30 % Hydrogenperoxidlösung⁴ 15 µl

Gebrauchslösung:

DAB-Lösung 60 ml

Hydrogenperoxidlösung 400 µl

Primärantikörper:

Rabbit anti-non muscle myosin⁸

Mouse anti-tubulin⁸

Mouse anti-vimentin⁷

Mouse anti-pancytokeratin plus¹¹

Mouse anti-smooth muscle actin⁷

Rabbit anti-S 100⁷

Mouse anti-neuron specific Enolase¹²

Sekundärantikörper:Pig anti-rabbit IgG biot.⁷Rabbit anti-mouse IgG biot.⁷**3. Lösungen für die Elektronenmikroskopie****3.1. Fixierlösung nach Karnovsky**Karnovsky Stammlösung:10% Paraformaldehydlösung:Paraformaldehyd⁴ 10 g

Aqua dest. ad 100 ml

Natriumhydroxid 1 N² 1-2 Tr.

10 % Paraformaldehyd 20 ml

Cacodylat-Puffer 0,2 M¹³; pH 7,2 50 mlKalziumchlorid¹⁴ 0,05 gKarnovsky Gebrauchslösung:

Karnovsky Stock Solution 7 ml

25 % Glutaraldehyd¹⁵ 0,96 ml**3.2. Cacodylat-Puffer**Stammlösung:Natriumcacodylat¹³ 18,256 g

Aqua dest. 200 ml

0,2 M Lösung:

Stammlösung	50 ml
0,2 M HCl ²	einige Tr. bis pH 7,2
Aqua dest.	ad 100 ml

0,1 M Lösung:

0,2 M Lösung pH 7,2	50 ml
Aqua dest.	50 ml

3.3. Kontrastierungslösungen2 % Osmiumtetroxid-Lösung:

4% Osmiumtetroxid ¹⁵	2 ml
0,1 M Caodylat-Puffer ¹³	2 ml

3 % Kaliumferrocyanid-Lösung:

Kaliumferrocyanid ³	0,3 g
0,1 M Cacodylat-Puffer ¹³	ad 10 ml

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

2 % Osmiumtetroxid	4 ml
3 % Kaliumferrocyanid	4 ml

3.4. Einbettmedien

Propylenoxid¹⁵

Polyembed:

Poly/Bed 812¹⁵ 10 ml

DDSA¹⁵ 8 ml

NMA¹⁵ 5 ml

BDMA¹⁵ 0,7 ml

3.5. Färbelösungen

Methylenblau nach Richardson:

1 % Methylenblau:

Methylenblau⁴ 1 g

Aqua dest. ad 100 ml

1% Borax:

Borax (Natriumtetraboratdecahydrat)¹⁴ 1 g

Aqua dest. ad 100 ml

Stammlösung:

1% Methylenblau 100 ml

1% Borax 100 ml

1% Azur:

Azur ¹⁶	2 g
Aqua dest.	ad 200 ml

Gebrauchslösung:

Methylenblau-Borax-Gemisch	200 ml
1 % Azur	200 ml

3.6. NachkontrastierungsmedienUranylacetat¹⁷Bleicitratlösung nach Reynolds (pH ca. 12)

Bleinitrat ³	0,266 g
Natriumcitrat ³	0,352 g
Aqua dest.	6 ml
1 N Natriumhydroxid ²	ca. 1,6 ml

1 Fluka Analytical, Steinheim

2 Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

4 Merck, Darmstadt

5 Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach

6 Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen

7 Dako, Hamburg

8 Abcam, Cambridge, UK

9 Leica Biosystems Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK

-
- 10 Kem En Tec Diagnostics, Taastrup, Dänemark
 - 11 Biocarta, Hamburg
 - 12 Serotec, Kidlington, UK
 - 13 MP Biomedicals, Illkirch, F
 - 14 Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
 - 15 Polysciences Inc., Warrington, USA
 - 16 Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH, Münster
 - 17 Agar Scientific, Stansted, UK

XII. DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Sinowatz für die Überlassung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, seine jederzeit freundliche und hilfsbereite Unterstützung und die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder bedanken.

Familie Engelhardt von der Straußenfarm Donaumoos danke ich für die Möglichkeit der Probenentnahme und die Einführung in die Straußenhaltung ebenfalls vielmals.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Instituts für ihre jederzeit gewährte Hilfe bei labortechnischen Belangen. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Gök, Frau Russmeier, Frau Scholz, Frau Servatius und Frau Mitterer bedanken. Ohne ihr Zutun wäre die Laborarbeit für mich nicht zu bewerkstelligen gewesen.

Den besten Kollegen, die man sich wünschen kann, möchte ich außerdem ein herzliches Dankeschön aussprechen. Den Dres. Andreas Traweger, Herbert Tempfer, Andrea Wagner, Renate Gehwolf, Christine Lehner und Frau Stefanie Korntner. Tausend Dank für eure Unterstützung. Ein besonderes Dankeschön geht außerdem an meinen lieben Chef Herrn Prof. Hans Bauer für die stetigen Ermutigungen und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich meinen lieben Freundinnen Dr. Regina Fitz und Michaela Schwerdt-Zarbock danke dafür sagen, dass sie mich monatelang während der Arbeit am Institut beherbergt haben.

Ein großer Dank geht auch an meine Freundin, Kollegin und Mitdotorandin Christine Weyerer für die tolle gemeinsame Zusammenarbeit. Die gemeinsamen Tage und Nächte im Labor waren eben zu zweit am Schönsten.

Meinem geliebten und geduldigen Lebensgefährten Martin Weißenbacher möchte ich für die Hilfe bei der Formatierung meiner Arbeit und für die bisherigen gemeinsamen Jahre danken, in denen er mich immer unterstützt hat und immer für mich da war.

Zu guter Letzt danke ich meiner lieben Mutti, meiner über alles geliebten Omi und meinem Papa für ihren emotionalen und natürlich auch finanziellen Beistand während des gesamten Studiums und der Doktorandenzeit. Ihr habt immer an

mich geglaubt, ohne euch hätte ich das alles nicht erreichen können. Danke.