

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

Histologische, histochemische und  
ultrastrukturelle Untersuchungen an der  
Leber des Afrikanischen Straußes  
(*Struthio camelus*)

von Cornelia Sabine Heidrich  
aus München

München 2016

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

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 06.Februar.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1 Anatomie der Leber . . . . .	3
2.2 Embryologie der Leber . . . . .	13
2.3 Histologie der Leber . . . . .	18
2.3.1 Bindegewebsstrukturen der Leber . . . . .	18
2.3.2 Gefäßstrukturen innerhalb der Leber . . . . .	18
2.3.3 Histologischer Feinbau der Leberläppchen . . . . .	20
2.4 Physiologie der Leber . . . . .	36
2.5 Histochemie der Leber . . . . .	39
2.5.1 Immunhistochemie, (IHC) . . . . .	39
2.5.2 Glykohistochemie . . . . .	43
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>51</b>
3.1 Untersuchungsmaterial . . . . .	51
3.2 Probenentnahme und Fixierung . . . . .	52
3.3 Konventionelle histologische Färbungen für die Lichtmikroskopie . . . . .	56
3.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung . . . . .	57
3.3.2 Trichromfärbung nach Masson und Goldner . . . . .	57
3.3.3 Alcianblau-Färbung . . . . .	58
3.3.4 Perjodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion nach McManus, mit und ohne Amylase . . . . .	59
3.4 Immunhistochemische Untersuchungen . . . . .	61
3.5 Glykohistochemische Untersuchungen . . . . .	65
3.5.1 FITC markierte Lektine . . . . .	65

---

3.5.2	Biotinylierte Lektine . . . . .	67
3.5.3	Negativkontrolle . . . . .	69
3.5.4	Positivkontrolle . . . . .	69
3.5.5	Zuckerhemmung . . . . .	69
3.6	Elektronenmikroskopie . . . . .	71
3.6.1	Probengewinnung . . . . .	71
3.6.2	Fixierung . . . . .	71
3.6.3	Waschen . . . . .	71
3.6.4	Vorkontrastieren . . . . .	72
3.6.5	Waschen . . . . .	72
3.6.6	Entwässerung . . . . .	72
3.6.7	Epon-Einbettung . . . . .	73
3.6.8	Herstellung von Semidünnschnitten . . . . .	73
3.6.9	Herstellung von Ultradünnschnitten . . . . .	74
3.6.10	Nachkontrastieren der Ultradünnschnitte . . . . .	74
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>75</b>
4.1	Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen an der Leber des Straußes	75
4.2	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen an der Leber des Straußes . . . . .	78
4.2.1	Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin und Masson-Golder .	78
4.2.2	Färbung mit Alcianblau 8GX . . . . .	82
4.2.3	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) nach McManus . . . . .	84
4.3	Ergebnisse der Immunhistochemie . . . . .	86
4.3.1	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin . . . . .	86
4.3.2	Immunhistochemischer Nachweis von Desmin . . . . .	89
4.3.3	Immunhistochemischer Nachweis von „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ ( $\alpha$ -SMA) . . . . .	91
4.3.4	Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin . . . . .	94
4.3.5	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 8 . . . . .	96
4.3.6	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 14 . . . . .	97
4.3.7	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 18 . . . . .	100
4.3.8	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19 . . . . .	101
4.4	Ergebnisse der Glykohistochemie . . . . .	104
4.4.1	Bindungsstellen für <i>Canavalia ensiformis</i> Agglutinin (ConA) . . .	104

4.4.2	Bindungsstellen für <i>Lens culinaris</i> Agglutinin (LCA) . . . . .	105
4.4.3	Bindungsstellen für <i>Pisum sativum</i> Agglutinin (PSA) . . . . .	107
4.4.4	Bindungsstellen für Peanut Agglutinin (PNA) . . . . .	108
4.4.5	Bindungsstellen für <i>Ricinus communis</i> Agglutinin (RCA) . . . . .	109
4.4.6	Bindungsstellen für Wheat Germ Agglutinin (WGA) . . . . .	111
4.4.7	Bindungsstellen für Wheat Germ Agglutinin succinyliert (WGAs) . . . . .	112
4.4.8	Bindungsstellen für <i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin (DBA) . . . . .	115
4.4.9	Bindungsstellen für <i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin I (GSL-I) . . . . .	115
4.4.10	Bindungsstellen für <i>Saphora japonica</i> Agglutinin (SJA) . . . . .	116
4.4.11	Bindungsstellen für Soybean Agglutinin (SBA) . . . . .	116
4.4.12	Bindungsstellen für <i>Sambucus nigra</i> Agglutinin (SNA) . . . . .	118
4.4.13	Bindungsstellen für <i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I (UEA-I) . . . . .	118
4.4.14	Bindungsstellen für <i>Maackia amurensis</i> Leukoagglutinin I (MAL-I) . . . . .	119
4.4.15	Bindungsstellen für <i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin (PHA-E) . . . . .	119
4.4.16	Bindungsstellen für <i>Phaseolus vulgaris</i> Leukoagglutinin (PHA-L) . . . . .	121
4.4.17	Ergebnisse der Zuckerhemmung . . . . .	124
4.5	Ergebnisse der Ultrastrukturellen Untersuchungen . . . . .	126
4.5.1	Hepatozyten . . . . .	126
4.5.2	Gallenkanälchen . . . . .	131
4.5.3	Sinusoidale Endothelzellen . . . . .	133
4.5.4	von-Kupffer-Zellen . . . . .	135
4.5.5	Dissé Raum . . . . .	137
4.5.6	Ito-Zellen oder Fat-Storing-Cells . . . . .	139
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>143</b>
5.1	Konventionelle Lichtmikroskopie . . . . .	144
5.2	Immunhistochemische Untersuchungen . . . . .	148
5.3	Lektinhistochemische Untersuchungen . . . . .	153
5.4	Ultrastrukturelle Untersuchungen . . . . .	158
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> . . . . .	<b>167</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b> . . . . .	<b>169</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> . . . . .	<b>184</b>

---

<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>186</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	<b>188</b>
11.1	Lösungen für die Lichtmikroskopie . . . . .	188
11.1.1	Fixierungslösungen . . . . .	188
11.1.2	Puffer . . . . .	188
11.1.3	Färbelösungen . . . . .	189
11.2	Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen . . . . .	191
11.3	Lösungen für die glykohistochemischen Untersuchungen . . . . .	192
11.4	Lösungen für die Elektronenmikroskopie . . . . .	193
11.4.1	Fixierungslösungen . . . . .	193
11.4.2	Puffer . . . . .	194
11.4.3	Kontrastierungslösungen . . . . .	194
11.4.4	Einbettmedien . . . . .	195
11.4.5	Färbelösungen . . . . .	196
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>198</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria
<b>ABC</b>	Avidin-biotin-complex
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Abk.</b>	Abkürzung
<b>Afrik.</b>	Afrikanisch
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Aqua dest.</b>	Aqua destillata
<b>Bdgew.</b>	Bindegewebe
<b>BDMA</b>	N-Benzyl-dimethylamin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>Chin.</b>	Chinesisch
<b>CK 8</b>	Zytokeratin 8
<b>CK 14</b>	Zytokeratin 14
<b>CK 18</b>	Zytokeratin 18

---

<b>CK 19</b>	Zytokeratin 19
<b>cm</b>	Centimeter
<b>ConA</b>	Canavalia ensiformis Agglutinin
<b>DAB</b>	3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
<b>DBA</b>	Dolichos biflorus Agglutinin
<b>DDSA</b>	Dodecenyyl succinic Anhydride, Dodecenyylbernsteinsäure-anhydrid
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>EM</b>	Elektronenmikroskopie
<b>End</b>	Endothel
<b>Ep.</b>	Epithel,
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>Ery</b>	Erythrozyten
<b>Fa.</b>	Firma
<b>Fibr.</b>	Fibrozyten
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothicyanat
<b>g</b>	Gramm
<b>Gal</b>	Galaktose
<b>GalNAc</b>	N-Acetyl-Galaktosamin
<b>GHC</b>	Glukohistochemie

---

<b>Glc</b>	Glukose
<b>GlcNAc</b>	N-Acetyl-Glukosamin
<b>GSL-I</b>	Griffonia simplicifolia I Agglutinin
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>Hrsg.</b>	Herausgeber
<b>Konz.</b>	Konzentration
<b>l</b>	Liter
<b>L-Fuc</b>	L-Fukose
<b>LCA</b>	Lens culinaris Agglutinin
<b>LM</b>	Lichtmikroskopie
<b>M</b>	Molar
<b>MAA-I</b>	Maackia amurensis I Agglutinin
<b>Man</b>	Mannose
<b>μg</b>	Mikrogramm
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>ml</b>	Milliliter

---

<b>mm</b>	Millimeter
<b>μm</b>	Mikrometer
<b>Musk.</b>	Muskulatur
<b>N</b>	normal
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>Neu5NAc</b>	5-N-Acetyl-Neuraminsäure
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NMA</b>	Nadic-Methyl-Anhydride
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>Olig.</b>	Oligosaccharide
<b>PAS</b>	Periodic-acid-Schiff
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline Solution
<b>PHA-E</b>	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
<b>PHA-L</b>	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
<b>PNA</b>	Peanut Agglutinin
<b>PSA</b>	Pisum sativum Agglutinin
<b>RCA</b>	Ricinus communis Agglutinin
<b>rER</b>	raues Endoplasmatisches Retikulum
<b>RT</b>	Raumtemperatur

<b>SB</b>	Scalebar
<b>SBA</b>	Soybean Agglutinin
<b>sER</b>	smooth/glattes Endoplasmatisches Retikulum
<b>SJA</b>	Sophora japonica Agglutinin
<b>SNA</b>	Sambucus nigra Agglutinin
<b>UEA-I</b>	Ulex europaeus Agglutinin I
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>WGA</b>	Wheat germ Agglutinin
<b>WGAs</b>	succinyliertes Wheat germ Agglutinin
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZP</b>	Zytoplasma

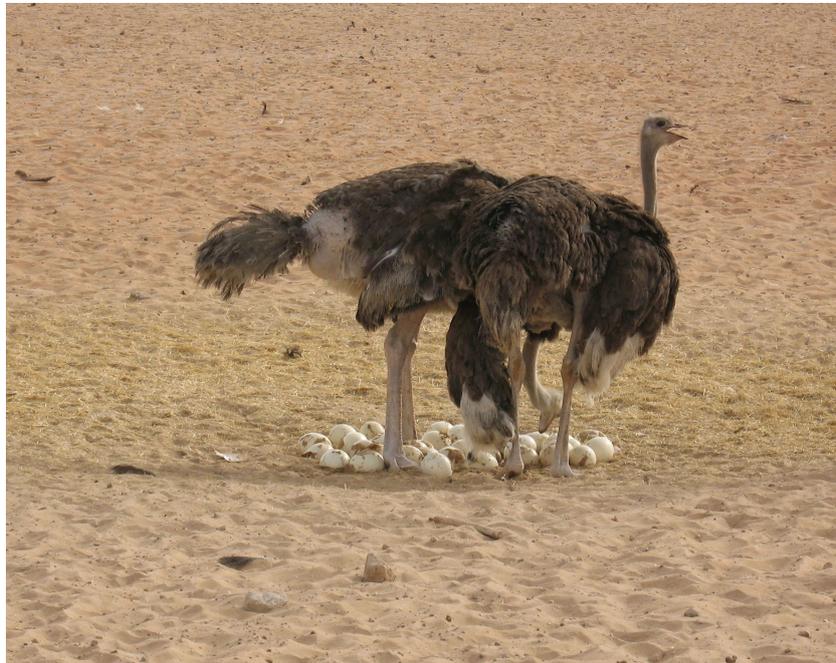
# 1 Einleitung

Über die Struktur der Leber der Säugetiere existiert eine Vielzahl von Arbeiten. Insbesondere unter physiologischen Aspekten war die Ultrastruktur der Leber der Ratte und der Maus sowie des Menschen Bestandteil vieler Arbeiten (z.B. Wake, 1980; De Leeuw et al., 1984; Blomhoff und Wake, 1991; Wisse et al., 1996). Auch über die makroskopische sowie die mikroskopische Struktur der Leber zahlreicher Vogelarten ist eine Vielzahl von Studien zu finden (z.B. Gadow, 1879; Simić und Janković, 1960; Bhatnagar und Singh, 1982; Ohata, Tanuma et al., 1982; Ohata und Ito, 1986; Abdelwahab, 1987; Heidbrink, 2003). Das Haushuhn war dabei besonders häufig unter den untersuchten Vogelarten (z.B. Purton, 1969; Hodges, 1972; Hodges, 1974; Ghodduzi und Kelly, 2004). Arbeiten den Strauß betreffend befassten sich hauptsächlich mit der Topographie, der Anatomie und der Physiologie desselben (z.B. Macalister, 1864; Bezuidenhout, 1986; Wagner und Kirberger, 2001; Cooper und Mahroze, 2004; Iji, 2005; Abidu-Figueiredo et al., 2006). Nur vereinzelt waren Arbeiten über den ultrastrukturellen Aufbau der Leber des Straußes zu finden (Attia und Soliman, 2005).

Der Afrikanische Strauß (*Struthio camelus*) zählt mit dem Kiwi, dem Emu, dem Rhea und dem Kasuar zur Ordnung der Struthioniformes (Cooper, Mahrose et al., 2009) (ITIS, Integrated Taxonomic Information System). Die Familie der Struthionidae beinhaltet als einzigstes die Spezies *Struthio camelus* mit den Subspezies *S. c. syriacus*, *S. c. australis*, *S. c. massaicus* und *S. c. camelus* (ITIS, Integrated Taxonomic Information System). Der Strauß kann eine Größe von 2,7 m erreichen und wird bis zu 154 kg schwer (Roots, 2006). Er ist der größte Vogel und mit einer maximalen Laufgeschwindigkeit von 80 Stundenkilometern auch der schnellste (Roots, 2006).

Während der Strauß früher vor allem wegen seiner Federn gehalten und gezüchtet wurde, wird heutzutage besonders sein Fleisch und sein Leder vermarktet (Roots, 2006). Dabei ist Südafrika mit 75 % Marktanteil Weltmarktführer in der Straußenproduktion (Directorate Marketing, 2014). Infolge von Ausbrüchen der Vogelgrippe in Südafrika

wurde der Handel mit Europa für Straußenprodukte 2011 eingeschränkt. 2014 dominierte Deutschland den Markt von Straußenfleisch in Europa (Directorate Marketing, 2014). Straußenfleisch ist in Europa sehr beliebt (Directorate Marketing, 2014). Das vergleichsweise Fett- und Cholesterinarme Fleisch des Straußes bietet bei gleichem Proteingehalt eine kalorienarme Alternative zu rotem Rindfleisch (Paleari et al., 1998; Andrews et al., 2000). Auch die Leber wird gegrillt, gekocht oder in Form von Leberwurst verwendet. Diese Arbeit wurde erstellt, um einen besseren Einblick in die Struktur der Leber des Straußes zu bekommen. Dafür wurde sie auf ihre histologischen, immunhistochemischen, glykohistochemischen und ultrastrukturellen Besonderheiten hin untersucht. Diese Grundlage könnte für mögliche Vergleiche bei Erkrankungen eines Straußenbestandes herangezogen werden, sowie zum Nachweis von morphologischen und ultrastrukturellen Veränderungen der Leber des Straußes dienen.



**Abb. 1.1** Afrikanischer Strauß, Zuchtfarm, Abu Dhabi

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Anatomie der Leber

Lucas und Denington (1956) haben mehr als hundert Lebern von Hühnern untersucht und konnten dabei keine „typische“ Leber ausmachen, da diese sich alle in ihrer Größe, Form und Ausbildung ihrer Impressionen und Inzisuren unterscheiden. Auch in zahlreichen anderen Arbeiten wurden oft differierende Beschreibungen der Lebern der verschiedenen Arten untereinander gegeben.

Die Leber des Vogels nimmt etwa ein Drittel bis mehr als die Hälfte der Länge der Körperhöhle ein (Ibrahim et al., 1992).

Ibrahim et al. (1992) fanden die Leber bei Haushuhn, Reiher und Taube im mittleren Drittel der Körperhöhle gelegen, bei der Ente in den mittleren zwei Vierteln, beim Falken im kranialen Viertel der kaudalen Hälfte sowie bei der Wachtel in der kranialen Hälfte. Letztere Lagebeschreibung gaben auch Lucas und Denington (1956) für die Position der Leber des „Single-comb White Leghorn“. Die Leber des Blässhuhns liegt im ventralen Teil der Körperhöhle (Selman, 2013). Bezuidenhout (1999) beschrieb die Leber des Straußes im kaudodorsalen Teil des Thorax in einem hepato-peritonealen Hohlraum gelegen. Bei der Houbara Trappe liegt die Leber, zusammen mit dem Herz, außerhalb des von Fett durchsetzten Peritoneums (Bailey et al., 1997).

Die konvexe, glatte, kranioventral gerichtete Facies parietalis passt sich ebenso an die Konturen des Körpers an wie die konkave, kaudodorsal oder dorsal gerichtete Facies visceralis. Die zahlreichen Impressionen Letzterer werden von den anliegenden Organen, wie Ösophagus, Magen, Milz und Darmschlingen, geformt (Lucas und Denington, 1956; Feder, 1969; Ibrahim et al., 1992). Im Gegensatz zu den meisten Vogelarten, wie Waldschnecke (Berlich, 1979), Haushuhn, Wachtel, Reiher, Taube und Falke, bei denen sich die Facies parietalis beidseits an die Rippen anlegt, fanden Ibrahim et al. (1992) für die Ente nur die rechte Seite der Leber von den Rippen umschlossen.

Ventral legt sich die Leber mit ihrer Facies parietalis dem Sternum an (Berlich, 1979; Ibrahim et al., 1992; Heidbrink, 2003) und endet bei den verschiedenen Arten mit ihrem kaudalsten Punkt in unterschiedlicher Entfernung zum kaudalen Ende des Sternums. Beim Fischadler, Rotmilan, Turmfalke, teilweise beim Wespenbussard, mit den Spitzen der beiden Lappen beim Wanderfalken (Heidbrink, 2003) und sogar 2 bis 2,9 cm bei Ente und Reiher (Ibrahim et al., 1992) ragt sie dabei kaudal noch über das Sternum hinaus und liegt dort der Bauchwand an.

Ibrahim et al. (1992) beschrieben für den Falken und das Haushuhn, dass die Leber mit ihrem kaudalen Rand 0,5 bis 1,5 cm kranial des kaudalen Endes des Sternums endet. Auch bei der Taube, der Wachtel (Ibrahim et al., 1992) und dem Strauß (Fowler, 1991) berührt die Leber die Bauchdecke nicht und endet auf Höhe des kaudalen Endes des Sternums. Beim Mäusebussard reicht der linke Leberlappen weiter kaudal als der rechte. Er liegt größtenteils dem Brustbein auf und reichte bei manchen der sezierten Mäusebussarde mit seinem Kaudalrand bis auf die Bauchwand (Heidbrink, 2003).

Des Weiteren befindet sich in der Facies parietalis bei Haushuhn, Wachtel, Falke (Ibrahim et al., 1992), Fischadler, Rohrweihe, Rotmilan, Sperber, Turmfalke, Wanderfalken, Wespenbussard (Heidbrink, 2003), Strauß (Macalister, 1864) und Wellensittich (Feder, 1969) im cranio-ventralen Bereich die tiefe Impressio cardiaca. Beide Leberlappen umschließen in dieser Impression die apikale Hälfte des Herzens. Bei Reiher und Taube dagegen berührt die Leber mit ihren beiden Leberlappen nur die Herzspitze und bei der Ente besteht der Kontakt nur zwischen dem rechten Leberlappen und dem Herzen (Ibrahim et al., 1992).

An der Dorsalfläche der Leber, der konkaven Facies visceralis (Ibrahim et al., 1992), findet sich beim Fischadler eine Impressio splenalis, in welcher die Milz der Leber anliegt (Heidbrink, 2003). Auch beim Rhode Island Red Chick (Al-Dabagh und Abdulla, 1963) und dem Haushuhn (Latimer und Pedersen, 1923) befindet sich die Milz in enger Nähe zur Facies visceralis. Latimer und Pedersen (1923) sowie Kern (1963) beschrieben außerdem, dass beim Haushuhn die Lunge, der Ösophagus und der kraniale Teil des Muskelmagens an die Facies visceralis angrenzen. Des Weiteren finden sich auf dieser zusätzliche Impressionen, verursacht durch anschließende Eingeweide, wie unter anderem Magen, Darm und bei den meisten Vogelarten auch der Gallenblase (Ibrahim et al., 1992). Diese Eingeweide grenzen bei den unterschiedlichen Arten verschieden stark an die Leber. So sind es bei Fischadler, Rotmilan, Sperber, Turmfalke, Wanderfalken und Wespenbussard nur die Lunge, der Drüsenmagen (Proventriculus) und der kraniale Teil

des Muskelmagens (Ventriculus). Die dabei durch die Magenabschnitte entstehenden Eindellungen sind die Impressio partis glandularis ventriculi und die Impressio partis muscularis ventriculi (Heidbrink, 2003). Bei der Rohrweihe grenzt die Leber nur an den Drüsenmagen und den kranialen Teil des Muskelmagens (Heidbrink, 2003). Beim Strauß liegt nur der linke Leberlappen am Ventriculus an (Fowler, 1991). Außerdem hat bei letzterem die Dorsalfläche der Leber Kontakt mit dem Ösophagus und der Lunge (Fowler, 1991).

Auf der Facies visceralis beider Leberlappen findet sich eine querverlaufende Rinne, Fissura transversa (Simić und Janković, 1960), oder Fossa transversa (Nickel et al., 1992), aus der die Gallengänge (Feder, 1969; Berlich, 1979; Bailey et al., 1997) hervortreten und die zuleitenden Gefäße der Leber eintreten (Kern, 1963; Berlich, 1979). Diese Rinne wird auch als Leberhilus oder Porta hepatis bezeichnet (A. S. King und McLelland, 1979: Kapitel VI. S 156ff.).

Am dorsalen Rand des Lobus hepatis dexter kann es eine Impressio testis durch die anliegenden Hoden geben und größere Dotterkugeln der Eierstöcke können sogar den rechten und den linken Leberlappen berühren (Kern, 1963).

In ihrem kaudalen, bei Turmfalke, Wanderfalke und Rohrweihe, oder kaudoventralen, bei Fischadler und Rotmilan, Bereich berührt die Leber das Darmkonvolut bzw den Eingeweidebauchfellsack (Heidbrink, 2003). Beim Wespenbussard (Heidbrink, 2003), beim Haushuhn (Kern, 1963) und beim Strauß (Fowler, 1991) reicht der rechte Leberlappen bis an die Darmschlingen heran und liegt beim Sperber mit seiner Spitze ventral unter der Flexura duodenojejunalis (Heidbrink, 2003).

Die Leber kommt mit allen Luftsäcken in Berührung (Kern, 1963).

Die Leber besteht sowohl bei den von Heidbrink (2003) untersuchten Greifvögeln als auch bei Haushuhn, Wachtel, Reiher, Ente, Taube, Falke (Ibrahim et al., 1992), Singlecomb White Leghorn (Lucas und Denington, 1956), Rhode Island Red Chick (Al-Dabagh und Abdulla, 1963), Nandu (*Rhea americana*) (Feder, 1972), Wellensittich (Feder, 1969) und Blässhuhn (Selman, 2013) aus zwei nebeneinander liegenden Lappen. Einem Lobus hepatis dexter und einem Lobus hepatis sinister, welche durch die Incisura interlobaris cranialis et caudalis getrennt sind (Berlich, 1979; Ibrahim et al., 1992; Nickel et al., 1992; Bailey et al., 1997; Heidbrink, 2003). Beim Sekretär (*Sagittarius serpentarius*), bei der Riesentrappe (*Ardeotis kori*) (Maloiy et al., 1987) und bei der Waldschnepfe (*Scolopax rusticola*) (Berlich, 1979) sind die beiden Leberlappen proximal durch eine Brücke aus Parenchym verbunden.

Diese beiden Lappen sind bei Haushuhn, Wachtel, Ente, Taube, Reiher, Falke (Ibrahim et al., 1992) und Trappen (Bailey et al., 1997) kranial in der Mitte zwischen den zwei Incisuren mit einer Pars interlobularis oder Pars interlobaris verbunden.

Bei den Trappen (Bailey et al., 1997) sowie bei Sperber, Turmfalke und Wanderfalke (Heidbrink, 2003) findet sich keine weitere Unterteilung der beiden Leberlappen.

Eine Unterteilung des linken Leberlappens ist dagegen beim Blässhuhn (Selman, 2013) und beim Nandu zu finden. Bei letzterem findet sich an der Dorsalfläche des linken Leberlappens eine spaltartige Einziehung (Feder, 1972). Auch beim Strauß ist der linke Leberlappen, Lobus hepatis sinister durch eine tiefe seitliche Incision in einen kleinen kaudodorsalen, Pars caudodorsalis, und einen größeren kaudoventralen Lappen, Pars caudoventralis, geteilt (Gadow, 1879; Bezuidenhout, 1986; Nickel et al., 1992; Bezuidenhout, 1999). Bei Haushuhn und Wachtel dagegen ist die Pars caudoventralis kleiner als die Pars caudodorsalis und von dieser durch eine tiefe intralobuläre Fissur getrennt (Ibrahim et al., 1992). Bei der Taube ist der linke Leberlappen in zwei fast gleichgroße Teile und bei der Schellente (*Anas clangula* = *Bucephala clangula*) in drei Teile gespalten (Gadow, 1879).

Zusätzlich gibt es beim Strauß kaudal der Pars caudodorsalis gelegen noch einen kleinen intermediären Abschnitt (Bezuidenhout, 1986), Processus intermedialis sinister (Nickel et al., 1992). Bei der Taube befindet sich der Processus intermedialis auf der Visceralfläche des rechten und bei Wachtel und Haushuhn auf der des rechten und linken Leberlappens (Ibrahim et al., 1992). Ebenso befindet sich beim Helmkasuar (*Casuarus indicus*) ein kleines, spitzes Läppchen zwischen den beiden Leberlappen, sowie beidseits noch ein plattes Läppchen (Gadow, 1879).

Bei den Trappen (Bailey et al., 1997), dem Blässhuhn (Selman, 2013), dem Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*) (Feder, 1969) und üblicherweise auch beim Huhn (Latimer und Pedersen, 1923; Al-Dabagh und Abdulla, 1963) sowie bei den meisten der von Gadow (1879) untersuchten Vogelarten und beim Strauß (Wagner, 2002) ist der rechte Leberlappen größer als der linke. Auch beim Nandu ist der linke Lappen wesentlich größer als der rechte Lappen (Feder, 1972). Lucas und Denington (1956) beschrieben für das Single-comb White Leghorn, dass der linke Leberlappen entweder klein oder mittelgroß ist. In einzelnen Fällen ist dieser größer als der rechte Leberlappen, meistens aber kleiner (Lucas und Denington, 1956). Die gleiche Beobachtung machte Fowler (1991) bei den von ihm untersuchten Haushühnern, bei denen sich der linke Leberlappen auch sehr unterschiedlich in seinem Größenverhältnis zum Rechten zeigte. Ebenso hat Gadow

(1879) bei der Trottellumme (*Uria troile*) und den Pinguinen einen größeren linken Leberlappen beschrieben.

Die Farbe der Leber variiert von gelbbraun bei der Ente, hellbraun beim Haushuhn, rotbraun bei Reiher, Falke (Ibrahim et al., 1992) und Blässhuhn (*Fulica atra*) (Selman, 2013) bis hin zu dunkel-rotbraun bei den Trappen (Bailey et al., 1997) und dunkelbraun beim Wellensittich (Feder, 1969). Beim Schlüpfen hat die Leber des Hausgeflügels und der Taube eine helle blaß-gelbliche Färbung, welche im Lauf der weiteren Entwicklung zu einem tiefen rotbraun, rot-kastanienbraun oder dunkel-rot-gelblich-kastanienbraun wechselt (Kingsbury et al., 1956; Simić und Janković, 1960), (A. S. King und McLelland, 1979: Kapitel VI. S. 156).

Die Leber ist von vier Leberbauchfellsäcken umgeben (Simić und Janković, 1960; Heidbrink, 2003), von denen drei völlig voneinander und vom Eingeweidebauchfellsack abgeschlossen sind und einer sich als Nische des Hauptbauchfellsackes darstellt (Kern, 1963). Es gibt sowohl einen rechten dorsalen und ventralen, als auch einen linken dorsalen und ventralen Leberbauchfellsack (Bittner, 1925; Kern, 1963). Die beiden ventralen, Cavum peritonei hepatis ventrale dextrum et sinistrum (Simić und Janković, 1960), sind etwa gleich groß, enthalten je eine Leberhälfte zwischen Herzspitze und kaudalem Brustbeinrand (Bittner, 1925) und sind durch das Ligamentum falciforme vollständig voneinander abgetrennt (Bittner, 1925; Simić und Janković, 1960; Kern, 1963; Heidbrink, 2003) Die beiden dorsalen, Cavum peritonei hepatis dorsale dextrum et sinistrum (Simić und Janković, 1960), unterscheiden sich voneinander, da der rechte Anteil einen kleinen Teil des Lobus hepatis dexter aufnimmt, durch den die Vena cava caudalis zieht (Bittner, 1925; Simić und Janković, 1960). Der linke Anteil des dorsalen Leberbauchfellsackes hingegen nimmt zusätzlich zu einem kleinen dorsalen Teil des Lobus hepatis sinister (Simić und Janković, 1960) im kaudalen Bereich den Geschlechtsapparat und den Darm auf (Bittner, 1925).

Die Befestigungsbänder des Halteapparates der Leber bestehen aus zwei langen Seitenbändern und einem medianen sichelförmigen Band, dem Ligamentum falciforme (Bittner, 1925). Das Ligamentum falciforme, welches die ventralen Leberbauchfellsäcke voneinander trennt, setzt kranial an der Herzbeutelspitze am Perikard an und zieht bis zur Kloake. Dabei ist es ventral an der Innenseite des Sternums befestigt und spannt sich nach dorsal zwischen die beiden Leberlappen auf (Simić und Janković, 1960; Kern, 1963; Feder, 1969). Das Ligamentum falciforme entlässt kranial die beiden Seitenbänder, die auch am Herzbeutel befestigt sind (Kern, 1963). Sie werden bei Simić und Janković (1960) beide

als dünne Bauchfellduplikaturen bezeichnet, während bei Bittner (1925) zu finden ist, dass der kaudale Teil des inneren Blattes des rechten Seitenbandes vom Bauchluftsack gestellt wird. Das rechte Seitenband (Bittner, 1925), Ligamentum triangulare dextrum (Kern, 1963) oder Plica peritonaei suspensoria hepatis dexter, setzt latero-dorsal am rechten Leberlappen an und teilt somit das Cavum peritonaei hepatis dextrum in einen dorsalen und einen ventralen Anteil (Simić und Janković, 1960; Kern, 1963). Von der Leber zieht dieses zur rechten Thoraxwand und heftet sich dort an (Simić und Janković, 1960). Das linke Seitenband (Bittner, 1925), Ligamentum triangulare sinistrum (Kern, 1963) oder Plica peritonaei suspensoria hepatis sinister verläuft seitenverkehrt zum Rechten und spannt sich zwischen dem linken Leberlappen und der linken Thoraxwand auf (Simić und Janković, 1960).

Bailey et al. (1997) haben den Verdauungstrakt und seine anhängenden Drüsen bei mehreren Trappenarten, der Rotschopftrappe (*Eupodotis ruficrista*), der Senegaltrappe (*Eupodotis senegalensis*), der Kragentrappe (*Chlamydotis undulata*) und der Riesentrappe (*Ardeotis kori*) untersucht und verglichen. Dabei haben sie für die Kragen- und die Riesentrappe herausgefunden, dass das durchschnittliche Gewicht der Leber bei den männlichen Tieren verglichen mit den weiblichen größer ist. Das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht beträgt bei den Trappen 1,41-2,1 %.

Latimer und Rosenbaum (1926) machten eine quantitative Studie zur Anatomie der Pute und stellten ein durchschnittliches Lebergewicht von 92,3 Gramm fest. Das prozentuale Gewicht der Leber (2,25 %) verglichen sie mit dem beim Huhn (2,40 %). Beim weißen Leghorn macht die Leber 2,7 % (Souba, 1923) bzw 1,6 - 2,2 % (Hopkins und Biely, 1935) vom Körpergewicht aus. In einer Arbeit von Ibrahim et al. (1992) über die Leber und das Gallengangssystem verschiedener Vogelarten ist für das Haushuhn ein Leber- zu Körpermasse-Verhältnis von 1,3-1,6 % beschrieben. Simić und Janković (1960) dagegen haben ein Verhältnis von 2,4-3 % angegeben.

Weitere Untersuchungen fanden den prozentualen Anteil des Lebergewichtes an der Gesamtkörpermasse bei 2,2-2,8 % für die Taube (Simić und Janković, 1960), 2-2,3 % für die Wachtel und 2-2,8 % für den Reiher und den Falken (Ibrahim et al., 1992). Fowler (1991) berichtete von einem Lebergewicht von 2,2 kg bei einer 122 kg schweren Straußenhenne. Das entspricht 1,8 % vom Gesamtkörpergewicht.

Es existieren mehrere Arbeiten über die Leber bei verschiedenen Entenarten. Bei der Neuseelandente (*Anas chlorotis*) fanden Moore und Battley (2006) heraus, dass schwerere Enten eine verhältnismäßig größere Lebermasse haben. Im Vergleich macht die Leber

bei wildlebenden Neuseelandenten 2,21 % des Körpergewichts und bei in Gefangenschaft lebenden Neuseelandenten 2,9 % (Moore und Battley, 2006) aus. Bei von Ibrahim et al. (1992) untersuchten Enten betrug das Lebergewicht 2,4-2,7 % der Gesamtkörpermasse und bei normalen Hausenten (*Anas boschas domestica*) 3-4 % (Simić und Janković, 1960). Das Gewicht der Leber der Vögel verändert sich im Zusammenhang mit dem Alter und dem Gewicht des Vogels (Al-Dabagh und Abdulla, 1963). Auch die Jahreszeit spielt eine Rolle. Bei Untersuchungen an Stockenten haben Whyte und Bolen (1985) festgestellt, dass das Gewicht der Leber im Verlauf des Jahres deutlich schwankt. Das niedrigste Gewicht fanden sie im späten Winter und das höchste um die Wintersonnwend her. Bei Meerentenarten, die in Neufundland überwinterten, wurden verhältnismäßig große Lebern gefunden. Diese machen bei der Eiderente (*Somateria mollissima*) und der Prachteiderente (*Somateria spectabilis*) 3,8 %, bei der Trauerente (*Melanitta nigra americana*) 4,0 %, bei der Eisente (*Clangula hyemalis*) 4,96 % und bei der Kragenente (*Histrionicus histrionicus*) 4,42 % vom Gesamtkörpergewicht aus (Goudie und Ryan, 1991).

Bei Untersuchungen an der kleinen Schneegans (*Anser caerulescens caerulescens*) konnte festgestellt werden, dass das Gewicht der Leber sich dem Level der Futteraufnahme und des Stoffwechsels anpasst. Bei der Ankunft vor der Brut wiegt die Leber der weiblichen Schneegans 60 % mehr als zum Ende der Brut hin (Ankney, 1977). Dies konnten Ankney und Scott auch in späteren Studien bestätigen, in denen sie feststellten, dass die Lebern der Weibchen und Männchen nach der Eiablage das größte Gewicht aufweisen (Ankney und Scott, 1980; Ankney und Scott, 1988). Diese Feststellung spiegelt die erhöhte Stoffwechselrate der Tiere in dieser Phase wieder, in welcher sie Fettreserven anlegen.

Bei der Brautente (*Aix sponsa*) kommt es beim weiblichen Tier zu einer Gewichtszunahme der Leber um 50 % zu Beginn der Legeperiode. Während der Eiablage nimmt dieses wieder ab, bedingt durch die große Menge an Fetteinlagerung in die ovarialen Follikel und erreicht ein Tief bei den brütenden Weibchen. Auch bei den männlichen Tieren ist die Leber von brütenden Tieren geringfügig, aber eindeutig, leichter als während der Herbstbalz (Drobney, 1984).

Bei den Vögeln ist die Struktur der galleführenden Gefäße innerhalb der Leber überwiegend gleich. Im linken Leberlappen finden sich der Ramus dorsalis lobi sinistri, der Ramus lateralis lobi sinistri und der Ramus ventralis lobi sinistri, die sich zum Ductus hepaticus sinister vereinen (Miyaki, 1973; Gupta et al., 1982). Der rechte Leberlappen besitzt einen Ramus dorsalis lobi dextri und einen Ramus ventralis lobi dextri, die beide wiederum ein linkes und ein rechtes Einzugsgebiet versorgen und meistens in den Ductus

hepaticus dexter münden (Miyaki, 1973; Gupta et al., 1982).

Im Bereich der Porta hepatis vereinen sich der Ductus hepaticus dexter und der Ductus hepaticus sinister zu einem Sinus (Crompton und Nesheim, 1972), dem Ductus hepatoentericus (Miyaki, 1973; Gupta et al., 1982; Bailey et al., 1997) oder Ductus hepatoentericus communis (Turk, 1982; Metz, 1988; Ibrahim et al., 1992; Nickel et al., 1992), durch welchen ein Austausch der Galle aus den beiden Leberlappen stattfindet (Crompton und Nesheim, 1972). Die Leber entlässt diesen Ductus durch die rechte Leberpforte (Gupta et al., 1982), von wo aus dieser zum distalen Teil des Duodenum ascendens zieht (Crompton und Nesheim, 1972; Ibrahim et al., 1992). Bailey et al. (1997) hat bei der Trappe beobachtet, dass dieser Ductus aus dem linken Leberlappen austritt. Beim Reiher entlässt der Ductus hepaticus dexter einen Ductus hepatoentericus dexter, der im proximalen Teil des Duodenum descendens endet (Ibrahim et al., 1992).

Bei den Vogelarten, die eine Gallenblase besitzen, entlässt der Ductus hepaticus dexter einen Ductus hepatocysticus zur Vesica fellea (Miyaki, 1973; Turk, 1982; Gupta et al., 1982; Maloiy et al., 1987; Ibrahim et al., 1992; Bailey et al., 1997). Vom Gallenblasenhals ausgehend zieht ein Ductus cystoentericus zum distalen Teil des Duodenum ascendens und mündet dort distal der Ausführungsgänge des Pankreas und proximal des Ductus hepatoentericus (Gadow, 1879; Miyaki, 1973; Turk, 1982; Maloiy et al., 1987; Metz, 1988; Ibrahim et al., 1992; Bailey et al., 1997). Latimer und J. L. Osborn (1923) beschrieben für das Haushuhn die Mündung der beiden Gallengänge im Duodenum descendens. Dagegen berichtete Metz (1988) bei der japanischen Wachtel, dass sich die beiden Gallengänge in das Duodenum ascendens entleeren.

Bei den Papageien (Gadow, 1879), dem Wellensittich (Feder, 1969), den Tauben (Gadow, 1879; Ibrahim et al., 1992), den Kolibris (Gadow, 1879), sowie dem Afrikanischen Strauß (*Struthio camelus*) (Macalister, 1864; Gadow, 1879; Fowler, 1991) ist keine Gallenblase vorhanden.

Bei den Arten ohne Gallenblase entlässt der Ductus hepaticus dexter einen Ductus hepatoentericus dexter, der direkt in das Duodenum ascendens mündet (Feder, 1969; Ibrahim et al., 1992). Es sind somit zwei Gallengänge vorhanden, die aus dem rechten Leberlappen nahe des Leberhilus austreten und getrennt in das Duodenum ascendens münden (Feder, 1969).

Die Gallenblase, Vesica felleae kann von unterschiedlicher Größe und Gestalt sein. So besitzt der Helmkasuar eine große Gallenblase mit einer mittigen Einschnürung, aus der der Ductus cysticus hervortritt (Gadow, 1879), der Nandu dagegen eine kleine, deutlich

abgesetzte Blase (Feder, 1972). Bei Haushuhn, Wachtel und Reiher ist sie von zylindrischer Form (Ibrahim et al., 1992), bei Ente und Falke ist sie kugelförmig (Ibrahim et al., 1992), bei der Rohrweihe bohnenförmig (Heidbrink, 2003) und bei den Spechtvögeln ist sie langgestreckt, wurmförmig (Gadow, 1879).

Die Gallenblase liegt der Facies viszeralis an (Al-Dabagh und Abdulla, 1963) und formt dort eine Fossa vesicae felleae (Koch, 1978; Ibrahim et al., 1992). Beim Helmkasuar (Gadow, 1879) befindet sich die Gallenblase auf der Viszeralfläche des rechten Leberlappens und hängt aus diesem herausragend herab. Beim Huhn dagegen befindet sich der vordere Teil der Gallenblase kaudodorsal im rechten Leberlappen und ist bindegewebig mit seiner Umgebung verwachsen, der hintere Teil liegt frei und kann bei Haushuhn und auch bei der Wachtel von der parietalen Seite der Leber aus gesehen werden (Latimer und Pedersen, 1923; Bittner, 1925; Ibrahim et al., 1992). Bei einigen Arten der Greifvögel befindet sich die Gallenblase eingebettet im rechten Leberlappen und ist durch eine dünne Serosafalte mit der Leber verbunden (Gadow, 1879; Heidbrink, 2003). Bei einigen Arten der Pygopodes liegt die Gallenblase in der Mitte zwischen den zwei Lappen (Gadow, 1879) während sie bei manchen anderen Arten, wie zum Beispiel dem Nandu, dem linken Leberlappen dorsal aufliegt (Feder, 1972).

Der rechte Leberhilus wird von Vena portalis hepatica dexter, Arteria hepatica dexter, Ductus hepatoentericus und Ductus hepatocysticus gebildet, der linke von Vena portalis hepatica sinister und Arteria hepatica sinister (Miyaki, 1973).

Als zuleitendes Gefäß zur nutritiven Versorgung der Leber (Nickel et al., 1992) entlässt die Arteria coeliaca, welche sich aus der Aorta descendens abgespalten hat, eine A. gastrica dexter et sinister (Purton, 1969) oder Ramus dexter et sinister (Nickel et al., 1992). Diese entlassen die A. hepatica dexter mit mehreren Ästen und die A. hepatica sinister mit zwei schmalen Ästen (Purton, 1969). Erstere versorgt den Lobus hepatis dexter und letztere den Lobus hepatis sinister (Miyaki, 1973). Die beiden Äste der Leberarterien sind durch einen Ramus communicans miteinander verbunden, welcher mit dem Truncus sinister der Portalvene verläuft (Miyaki, 1973).

Das zuleitende funktionelle Gefäß ist die Vena portalis hepatica (Nickel et al., 1992). Sie sammelt das nährstoffreiche Blut des gesamten Magen-Darm-Traktes von Proventriculus bis Rectum, Milz und Pankreas über eine Vena portalis hepatica dextra und eine schwächere Vena portalis hepatica sinistra (Simić und Janković, 1960; Purton, 1969; Miyaki, 1978; Nickel et al., 1992). Diese beiden anastomosieren im Bereich der Leberpforte durch einen Ramus communicans venae portae dextrae et sinistrae (Simić und Janković,

1960). Die Vena portalis hepatica dextra wird durch die Vereinigung von den Venae mesentericae, Vena proventriculosplenica und Vena gastropancreaticoduodenalis gebildet (Miyaki, 1978). Der Hauptast der großen Pfortader, die Vena portalis hepatica dextra (Simić und Janković, 1960), tritt zusammen mit den Ästen der Leberarterie und den zwei hervortretenden Gallengängen durch die Leberpforte, auch Hilus genannt, in den rechten Leberlappen ein (Bittner, 1925; Simić und Janković, 1960; Kern, 1963; Purton, 1969). Intrahepatisch teilt sich dieser größere Ast in einen Truncus dexter und einen Truncus sinister und versorgt dann neben dem rechten auch den linken Leberlappen (Miyaki, 1973). Der Truncus sinister nimmt über den Ramus lateralis lobi sinistri eine Verbindung zur Vena portalis hepatica sinistra auf (Miyaki, 1973). Über den kleineren linken Ast der Pfortader, Vena portalis hepatica sinistra, der entlang des dorsalen Randes des linken Leberlappens verläuft und diesen mit mehreren Ästen versorgt (Purton, 1969), gelangt Blut aus den Venen des linken, ventralen Teiles des Muskelmagens, Venae gastricae und teilweise auch die des Drüsenmagens, Venae proventriculares in die Leber (Simić und Janković, 1960), (Nickel et al., 1992: S. 220).

Die Vena hepatica dextra nimmt das Blut aus dem rechten Leberlappen (Miyaki, 1973) und die Vena hepatica media aus der Pars interlobaris (Nickel et al., 1992: S. 220) auf. Die rechte und die linke Lebervene münden in die Vena cava caudalis, kurz bevor diese kranial den Rand des rechten Leberlappens wieder verlässt (Kern, 1963; Purton, 1969). Die Vena hepatica accessoria mündet getrennt von den beiden anderen Lebervenen weiter kranial in die Vena cava caudalis (Miyaki, 1973). Die Vena cava caudalis durchbohrt den rechten Leberlappen dorsal an seinem latero-kaudalen Rand und bildet dabei auf der Facies visceralis das Foramen caudale venae cavae caudalis und auf der Facies parietalis das breitere Foramen craniale venae cavae caudalis, welches sich in der Impressio cordis (Simić und Janković, 1960; Kern, 1963) oder Impressio cardiaca (Nickel et al., 1992) befindet. Die Nabelvene, Vena umbilicalia, welche im Ligamentum falciforme verläuft, entleert sich in die Vene hepatica sinistra ohne den linken Leberlappen zu versorgen (Simić und Janković, 1960; Miyaki, 1973).

Miyaki (1973) konnte zahlreiche Variationen in der Aufzweigung der Blutgefäße und Gallengänge bei den verschiedenen Individuen dokumentieren und feststellen, dass es nicht einmal innerhalb einer Art ein einheitliches Verlaufschema der Gefäße gibt.

## 2.2 Embryologie der Leber

Die Leber entwickelt sich beim Vogel aus zwei entodermalen Divertikeln, die im Verlauf der Entwicklung miteinander anastomosieren und den mittleren Teil der Leber bilden. Zu Beginn zeigt sich das vordere Divertikel des Entoderms am Rand der vorderen Darmpforte (dem späteren Duodenum mit seinem hepatopankreatischen Ring (Rüsse und Sinowatz, 1998)), dorsal der Venae omphalomesentericae und des Ductus venosus (Kingsbury et al., 1956). Zu einem etwas späteren Zeitpunkt der Entwicklung entsteht das zweite, kaudal gelegene Divertikel, welches ventral der Venae omphalomesentericae und des Ductus venosus liegt. Dieses Divertikel teilt sich in eine rechte und eine linke Knospe. Die Divertikel wachsen kranial von der vorderen Darmpforte weg (Stephens und Bils, 1967), ins Mesenchym des ventralen Mesenteriums (Kingsbury et al., 1956), das zwischen der Perikardhöhle und dem Dottersackgang gelegen ist und eine breite Platte, das Septum transversum bildet (Rüsse und Sinowatz, 1998). In dieser frühen Entwicklungsphase nimmt die Leber den größten Teil der Zölonhöhle ein (Alcântara et al., 2013). Sowohl in den Entodermalzellen an der vorderen Darmpforte, als auch in den von dieser weggewanderten Zellen, zeigen sich zahlreiche freie Ribosomen, ein kompakter Golgi-Apparat und wenige Mitochondrien (Stephens und Bils, 1967). Es besteht ein Kontakt zwischen den Entodermzellen und den Bestandteilen des Dottersacks (Stephens und Bils, 1967). Am caudalen Ende des hinteren Divertikels kommt es zu einer deutlichen Verdickung des Epithels, aus welcher später die Gallenblase entsteht (Kingsbury et al., 1956).

Auf der Oberfläche der beiden Divertikel bilden sich zahlreiche feste oder hohle Knospen, die miteinander anastomosieren und ein Netzwerk aus Leberzellbalken im Mesenchym bilden. Dieses Netzwerk entsteht ringartig um den mittleren Teil des Ductus venosus herum, welcher buchtartige Fortsätze in die Region der Leberzellen entlässt. Es entsteht eine Verbindung zwischen der zukünftigen Gallenblase und dem Anteil der Leber der von dem vorderen Divertikel gebildet wird. Zwischen den anastomosierenden Zylindern erscheinen große, mit Endothel ausgekleidete Räume (Kingsbury et al., 1956). Während dieser Entwicklungsphase lassen sich dicht gepackte Hepatozyten beobachten, die 0,2  $\mu\text{m}$  große, fadenförmige Mitochondrien, einen Nukleus mit Kernporen, kleine, elektronendichte Lipidtropfen, ein kleines raues Endoplasmatisches Retikulum mit Ribosomen und autophagozytierende Vesikel beinhalten (Stephens und Bils (1967)). Diese kleinen Lipidtropfen unterscheiden sich von den später erscheinenden großen Lipidtropfen. Gallengänge sind noch keine zu erkennen (Stephens und Bils, 1967). Das raue Endoplasmatische

Retikulum besteht nur aus wenigen, kurzen Zisternen mit einer Länge von  $1,5\ \mu\text{m}$  und liegt im Zytoplasma ohne Verbindung zu den Mitochondrien, der Zellmembran oder dem Zellkern (Sandström und Westman, 1971).

In der medianen Masse des Septum transversum bilden sich buchtartige und kapilläre Strukturen des Endothels bevor die Leberknospen einwandern. Die Buchten gehen vom Ductus venosus aus und bilden entweder eine offene Verbindung oder abgegrenzte Hohlräume mit endothelialer Auskleidung. Dadurch entstehen typische Sinusoide mit einer Auskleidung aus Endothelzellen. Es beginnt ein sehr starkes Wachstum der Leber, bei dem der vordere Anteil in die Zölomhöhle hineinwächst. Während dieses Wachstums formen sich die Leberzellanhäufungen zu den typischen Leberzellbalken um. Gleichzeitig infiltrieren die Sinusoide diese Anhäufungen aktiv und beteiligen sich so an der Bildung der Leberzellbalken. In den zylinderartigen Leberzellbalken erscheinen Lumina (Kingsbury et al., 1956).

Aus den ursprünglich vorhandenen Divertikeln entstehen die zwei Haupt-Gallengänge. Um die Lumina der Leberknospen erhalten die Zellen eine kubische Form. Zwischen den Leberzellbalken und diesen Lumina werden Verbindungen sichtbar. Die beiden Leberlappen werden durch das dorsale Ligamentum gastrohepaticus und das ventrale Ligamentum falciforme getrennt (Kingsbury et al., 1956).

Etwa zu dem Zeitpunkt, zu dem Kingsbury et al. (1956) beim linken Lappen den Ductus hepato-entericus und beim rechten den Ductus hepato-cysticus beobachteten, die getrennt in das Duodenum mündeten, erschienen die ersten Canaliculi biliferi in den histologischen Untersuchungen von Stephens und Bils (1967). Die Canaliculi biliferi zeigen sich als Trennung zwischen zwei Zellen und es sind sechs oder mehr Zellen rund um einen Canaliculus biliferus herum angeordnet (Stephens und Bils, 1967). Auch bei Kingsbury et al. (1956) entstehen Zylinder rund um ein Lumen herum, die anfangs aus 8-10 Zellen bestehen. Später reduziert sich ihre Anzahl auf sechs (Kingsbury et al., 1956). Am biliären Pol zeigen sich die Mikrovilli als einfache Vorwölbung der Plasmamembran. Im Zytoplasma der Zellen um die Canaliculi biliferi herum lässt sich ein deutlicher Anstieg der Zahl der Mitochondrien, nur wenig raues Endoplasmatisches Retikulum, viele freie Ribosomen und ein etwas größer gewordener Golgi-Apparat mit drei verschiedenen Arten von Vesikeln nachweisen (Stephens und Bils, 1967). Die einen Vesikel besitzen eine einfache Membran und sind mit moderat elektronendichten Granula gefüllt. Außerdem gibt es noch zahlreiche kleine Vesikel mit dichten Partikeln im Zentrum und Vesikel mit großflächigen hellen Bereichen (Stephens und Bils, 1967).

Nach dieser Entwicklung nimmt die Vaskularisation des Parenchyms weiter zu. Die

Leberarterie wandert sekundär, entlang des die Portalvene begleitenden Bindegewebes, in das Lebergewebe ein und die Leber erscheint etwas röter in ihrer Farbe. Retikuläre Fasern bilden sich um die Leberzellbalken herum (Kingsbury et al., 1956).

Die Canaliculi biliferi vergrößern sich. In ihrer Nachbarschaft können Lysosomen beobachtet werden. Verteilt im Zytoplasma findet sich jetzt deutlich mehr endoplasmatisches Retikulum, hauptsächlich in vesikulärer Form, teils auch als kurze Zisternen zu sehen. Glykogen ist zum ersten Mal zu erkennen und liegt in seinen Ansammlungen in enger Beziehung zu den kleinen Lipidtröpfchen. Es sind drei Formen von Glykogen vorhanden. Die  $\gamma$ -Form mit circa 3 nm, die sich zu den  $\beta$ -Granula von 20-40 nm Größe zusammenlagern. Aus diesen wiederum entstehen durch Anlagerung die  $\alpha$ -Rosetten, mit einem Durchmesser von 150 nm oder mehr (Stephens und Bils, 1967).

Die Mitochondrien, deren Zahl deutlich zugenommen hat, haben sich von Fäden zu Stäbchen umgeformt und lagern sich der Länge nach zur langen Achse der Hepatozyten (biliärer zu sinusoidalem Pol) (Dalton, 1934).

Im Septum transversum liegt jetzt die Leber in ihrer gesamten Ausdehnung zwischen lateralem Mesocardium und der Nabelvene. Die Vena cava caudalis wird von Teilen des Leberparenchyms umschlossen. Das Lebergewebe erhält eine kompaktere Konsistenz durch die Zunahme der Anzahl der Leberzellbalken und der Sinusoide (Kingsbury et al., 1956).

In einigen Zellen finden sich erste Glykogendepots, durchzogen von glattem Endoplasmatischem Retikulum. Zu diesem Zeitpunkt haben die Mitochondrien einen Durchmesser von  $0,5 \mu\text{m}$  (Stephens und Bils, 1967). Verzweigungen der Vena porta und Vena hepatica wachsen in das Leberparenchym ein und es entstehen die ersten Zentralvenen (Kingsbury et al., 1956). Die Gallenblase mit einer epithelialen Auskleidung aus einem einfachen, kubischen Epithel ist zu erkennen (Alcântara et al., 2013). Gleichzeitig sind vereinzelt Lipidtröpfchen von  $1 \mu\text{m}$  Größe zu finden, die Glykogenareale nehmen an Zahl und Ausdehnung zu und die Mitochondrien verlieren ihre elektronendichten Granula in ihrem Inneren (Stephens und Bils, 1967). In der weiteren Entwicklung finden sich erste eosinophile Lymphozyten intra- und extravaskulär im Leberparenchym (Kingsbury et al., 1956). Letzteres breitet sich weiter aus und enthält jetzt spaltartig verengte Sinusoide (Kingsbury et al., 1956). Es entsteht ein gut ausgebildetes Gefäßnetz (Kingsbury et al., 1956), dessen Blutgefäßwände an Dicke zunehmen (Pal et al., 1991). In den mit ihrer Basis zu den Sinusoiden und der Spitze zu den Canaliculi biliferi gelagerten Hepatozyten (Kingsbury et al., 1956) finden sich jetzt ausgedehnte Glykogendepots (Stephens und Bils, 1967). Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Zahl der Lipidtropfen in den Hepatozyten

deutlich zu (Kingsbury et al., 1956; Stephens und Bills, 1967). Anfangs sind sie noch verhältnismäßig klein mit 1-2  $\mu\text{m}$ , erreichen aber schnell ihre maximale Größe von 3-4  $\mu\text{m}$ , mit der sie nun nahezu die Größe des Zellkerns der Hepatozyten erreicht haben (Stephens und Bills, 1967).

Das raue Endoplasmatische Retikulum ist in Form von einzelnen Zisternen vor allem in der Peripherie der Zelle zu finden. Teilweise liegt es den Mitochondrien an. Die in vesikulärer Form vorliegenden Golgi-Apparate nehmen an Zahl zu. Die Canaliculi biliferi erscheinen im Querschnitt geordneter, besitzen aber noch keine gut entwickelten Mikrovilli (Stephens und Bills, 1967).

Zu diesem Zeitpunkt ist der Dissé-Raum vollständig entwickelt (Sandström und Westman, 1971).

Die Mikrovilli der Canaliculi biliferi, die von zehn oder mehr Zellen geformt werden, entwickeln sich, bis sie als normale Fortsätze der Plasmamembran zu erkennen sind. Die Mitochondrien strecken sich und erreichen eine Länge von 1  $\mu\text{m}$ . Es tauchen zahlreiche Mikrobodies auf, die von einer einfachen Membran begrenzt werden und in ihrer homogenen Matrix eine kleine elektronendichte Region im Zentrum enthalten (Stephens und Bills, 1967).

Zu diesem Zeitpunkt können Lymphozyten und eosinophile Granulozyten im interlobulären Bindegewebe nachgewiesen werden (Yasuda, 1962). Kurz vor dem Schlupf, zum Ende der Embryonalphase hin, können in den von-Kupffer-Zellen phagozytierte Zellbestandteile beobachtet werden (Yasuda, 1962). Die Menge an Glykogen nimmt bis kurz vor dem Schlupf weiter deutlich zu (Stephens und Bills, 1967), eine Beobachtung die auch Pal et al. (1991) mittels PAS-Färbung machten, um dann bis kurz nach dem Schlüpfen stark abzunehmen (Stephens und Bills, 1967). Danach nehmen die Glykogendepots wieder deutlich zu und enthalten in ihrem Umfeld Mikrobodies und Gruppen von Polyribosomen. Gleichzeitig werden die sehr großen Lipidtropfen weniger und kleiner. Während der Weiteren Entwicklung des Kükens bilden die großen Lipidtropfen kleinere Tröpfchen an ihrer Peripherie und werden weniger. Die Mitochondrien werden wieder kleiner. Sie haben eine langgestreckte Form, eine Größe von 0,5  $\mu\text{m}$  und enthalten teilweise wieder elektronendichte Granula in ihrem Inneren. Erst einige Tage nach dem Schlüpfen legt sich das raue Endoplasmatische Retikulum in Zisternenform und ist dann meistens benachbart zu den Mitochondrien zu finden. Das glatte Endoplasmatische Retikulum ist nicht mehr in den Glykogenareas zu finden. Die Mikrovilli der Canaliculi biliferi sind jetzt gut entwickelt und ragen in ihr Lumen hinein. Die Zahl der Mikrobodies nimmt ab (Stephens und Bills, 1967).

Die Farbe der Leber wandelt sich von hellem Gelb am Anfang zu einem dunklen Rot, nachdem die Vaskularisation begonnen hat. An dem Tag, an dem die Anzahl der Lipidtröpfchen in den Hepatozyten zunimmt, färbt sich die Leber in einem kräftigen Gelb. Diese Farbe verliert sich wieder zugunsten eines roteren Farbtons nach dem Schlüpfen, wenn die Lipidtröpfchen wieder kleiner und weniger werden bis die Fettdepots verschwunden sind (Kingsbury et al., 1956; Stephens und Bils, 1967).

Die Struktur der Leber entsteht sowohl aus der Proliferation der anastomosierenden Leberzellbalken als auch durch die Einwanderung der Gefäße in die verdichtete Masse von Leberzellen. Dadurch entsteht ein gleichmäßiges Netzwerk aus Leberzellbalken und Sinusoiden. Kurz vor dem Schlupf ist die Struktur der Leber gleich der eines ausgewachsenen Vogels (Kingsbury et al., 1956).

## 2.3 Histologie der Leber

Bei einer umfangreichen Untersuchung der Leber zahlreicher Greifvogelarten konnte Heidbrink (2003) keine individuellen und speziesspezifischen Unterschiede im histologischen Aufbau erkennen.

### 2.3.1 Bindegewebsstrukturen der Leber

An der Oberfläche wird die Leber von einer einschichtigen Tunica serosa bedeckt (Nickel et al., 1992; Liebich, 2010), die über ein Gekröse in die Wand des Leberbauchfellsackes übergeht (Heidbrink, 2003). Unter dieser befindet sich eine vergleichsweise dünne, kompakte Bindegewebschicht, die Glisson-Kapsel (Malewitz und Calhoun, 1958; Al-Dabagh und Abdulla, 1963; Feder, 1969; Hodges, 1974; Selman, 2013), Capsula fibrosa hepatis (Hees und Sinowatz, 2000) oder Tunica fibrosa (Heidbrink, 2003). Sie besteht aus Kollagenfasern und teilweise auch aus elastischen Fasern (Liebich, 2010). Von dieser Bindegewebskapsel ausgehend ziehen lockere Kollagenfaserbündel, als Bindegewebssepten, in das Leberparenchym, begleitet von den zu- und abführenden Gefäßen, Gallengängen und Nervenfasern (Hodges, 1974; Liebich, 2010: S. 241ff.).

Das Bindegewebs skelett ist, genau wie die sehr dünne äußere Kapsel, im ganzen Organ vermindert und nur im Umfeld der größeren Zweige der Vena porta und Arteria hepatica deutlich zu sehen. Da diese interlobularen Septen beim Vogel sehr undeutlich sind, erscheint die Leber im histologischen Schnitt als eine mehr oder weniger homogene Masse, bestehend aus Leberparenchym mit durchgehend unregelmäßig verteilten intralobulären Venen und interlobulären Gefäßen sowie ohne klar erkennbare Läppchenzeichnung (Malewitz und Calhoun, 1958; Al-Dabagh und Abdulla, 1963; Feder, 1969), (Hodges, 1974: Kapitel 2.II. S.88ff.), (Heidbrink, 2003; Nishimura et al., 2009).

### 2.3.2 Gefäßstrukturen innerhalb der Leber

Eine Läppchenzeichnung ist im Leberparenchym nicht sichtbar (Feder, 1969). Aber Heidbrink (2003) konnte bei den von ihr untersuchten Greifvögeln einen Lebertrias feststellen, wie er auch in der Säugetierleber vorkommt. Eine Beschreibung der Gefäßstrukturen in

der Leber des Vogels findet sich bei Purton (1969); Miyaki (1978); Nickel et al. (1992) sowie Liebich (2010). Die Pfortader verläuft ausgehend vom Hilus in die Peripherie (Purton, 1969) und verzweigt sich dort über Venae interlobulares bis hin zu kleinsten Kapillaren (Liebich, 2010). Am Hilus teilt sich die Vena portae hepatica in einen Ast für den rechten und einen Ast für den linken Leberlappen. Das Verzweigungsmuster dieser zwei Äste ist schon innerartlich sehr unterschiedlich. Teilweise versorgt der rechte Ast nur den rechten Leberlappen und der linke Ast den linken Leberlappen. Bei manchen Individuen teilen sich der rechte und der linke Ast der Pfortader ein Versorgungsgebiet (Miyaki, 1978). Arteriell Blut gelangt über die Arteria hepatica in die Leber, die sich dort parallel zu den Venae interlobulares in Arteriae interlobulares und weiter bis hin zu Kapillaren teilt, die zusammen mit den venösen Kapillaren rechtwinkelig in das Leberparenchym eindringen (Liebich, 2010). Zusätzlich zweigen von der Arteria hepatica Kapillaren ab, die miteinander anastomosieren und so Netzwerke um die Vena portae und die Gallengänge herum bilden, den peribiliären Plexus (PBP) und den periportalen Plexus (PPP) (Yoshida et al., 2010). Yoshida et al. (2010) fanden eine gemeinsame Aufzweigung der terminalen Äste der Pfortader und der Leberarterie und des peribiliären Plexus (PBP) und des periportalen Plexus (PPP) in die Sinusoide. Diese anastomosierenden Endstrombahnen begrenzen Leberläppchen (Liebich, 2010), die keine eigenständigen vaskulären Einheiten bilden, weil die Sinusoide benachbarter Lämpchen miteinander anastomosieren (Nickel et al., 1992).

Die Sinusoidalen Gefäße bilden ein dreidimensionales Netzwerk aus anastomosierenden Kapillaren. Dieses umgibt Hohlräume mit einem Durchmesser von 20,3 - 21,1  $\mu\text{m}$ . Die Sinusoide verlaufen höchstens 30  $\mu\text{m}$  gerade, bevor sie sich wieder verzweigen (Yoshida et al., 2010). Danach laufen sie in den Aufzweigungen der Lebervene, den Venae centrales zusammen (Yoshida et al., 2010; Liebich, 2010). Diese Zentralvenen münden in die Venae sublobulares und von dort in die Venae hepaticae (Liebich, 2010).

Besonders in der Leber junger Vögel, aber auch in anderen normalen Lebern, finden sich Ansammlungen von basophilen Lymphozyten, gemischt mit einigen eosinophilen Zellen. Diese Ansammlungen finden sich besonders um die Äste der Vena portae aber auch um die Zentralvenen herum (Al-Dabagh und Abdulla, 1963; Kingsbury et al., 1956).

### 2.3.3 Histologischer Feinbau der Leberläppchen

Im Feinbau teilt sich die Leber in die Leberläppchen (Lobuli hepatici) mit den Zentralvenen in der Mittelachse und mit auf sie zulaufenden, radiär verzweigten, anastomosierenden Strängen von Leberzellen (Nickel et al., 1992; Heidbrink, 2003; Selman, 2013). Zwischen den Leberzellbalken liegen die unregelmäßig weiten, anastomosierenden Lebersinusoiden (Elias und Bengelsdorf, 1952; Purton, 1969) mit einem Durchmesser bis zu  $30\ \mu\text{m}$ , die durch den perisinuidalen Raum (Dissé Raum) von den Hepatozyten getrennt werden (Abdelwahab, 1987). Diese beiden Netzwerke werden miteinander vernetzt und bilden ein Geflecht, das zwischen den Verzweigungen der Portal- und der Lebervene liegt (Abdelwahab, 1987).

#### A. Leberzellbalken

Elias und Bengelsdorf (1952) sowie Hickey und Elias (1954) konnten beobachten, dass die niedriger entwickelten Vögel, wie die *Galliformes* oder die *Anseriformes*, entweder ein- oder zweischichtige Leberzellbalken, oder einschichtige und zweischichtige Leberzellbalken aufwiesen. Die höher entwickelten, wie die *Passeriformes*, besitzen nur einschichtige Leberzellbalken (Elias und Bengelsdorf, 1952; Hickey und Elias, 1954). Purton (1969) fand beim Haushuhn (*Gallus gallus*), dass die Leberzellbalken zwei Zellen breit sind. Auch bei den von Heidbrink (2003) untersuchten Greifvogelarten, dem Blässhuhn (Selman, 2013) und dem Truthahn (Bhatnagar und Singh, 1982) lagen die Hepatozyten in zweischichtigen Platten zusammen. Diese Leberzellbalken haben beim Huhn einen Durchmesser von  $23\ \mu\text{m}$  (Hodges, 1972) und bei der Taube sind sie  $30\ \mu\text{m}$  breit (David, 1961).

Die Hepatozyten sind als sich verzweigende Röhren angelegt (David, 1961). Diese bestehen bei der Taube aus vier bis fünf (David, 1961), bei Huhn (Ghoddusi und Kelly, 2004) und Ente (Abdelwahab, 1987) aus vier bis sechs sowie beim Truthahn (Bhatnagar und Singh, 1982) aus vier oder mehr Hepatozyten, die kreisförmig um ein zentrales Gallenkanälchen angeordnet sind (Abdelwahab, 1987; Ghoddusi und Kelly, 2004). Dabei befinden sich zwischen den Sinusoiden nie mehr als zwei Hepatozyten (Ghoddusi und Kelly, 2004) und diese grenzen mit einer Oberfläche an die benachbarten Lebersinusoiden (Heidbrink, 2003).

Die großen Hepatozyten besitzen eine unregelmäßig polygonale Form mit einem Zytoplasma aus schwach elektronendichter, feingekörnter Matrix (Purton, 1969;

Bhatnagar und Singh, 1982; Heidbrink, 2003; Selman, 2013). Sie haben an ihrer längsten Stelle, vom vaskulären zum biliären Pol gemessen, einen Durchmesser von  $12\ \mu\text{m}$  (Hodges, 1972). Ihre Zellmembran besteht aus einer normalen Plasmamembran (Hodges, 1972), die sich in drei funktionell und räumlich differierende Bereiche gliedern lässt (Bhatnagar und Singh, 1982). Erstens in den großflächigen, vaskulären Teil, der auf der Seite der Sinusoide liegt und heterogene Mikrovilli verschiedenster Länge entlässt (David, 1961; Abdelwahab, 1987; Ghodduzi und Kelly, 2004). Hauptsächlich finden sich hier  $700\ \text{nm}$  lange,  $40\ \text{nm}$  dicke, sich teilende Mikrovilli (Abdelwahab, 1987). Zweitens in den interzellulären Bereich zwischen den einzelnen Hepatozyten, die dort mittels zahlreicher „gap junctions“ miteinander in Verbindung stehen (Bhatnagar und Singh, 1982; Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghodduzi und Kelly, 2004) und drittens in den schmalen, biliären Pol zum Lumen der Canaliculi biliferi hin. Diese biliären Pole sind mit  $300\text{-}330\ \text{nm}$  langen,  $85\text{-}120\ \text{nm}$  breiten Mikrovilli besetzt und stehen zwischen benachbarten Hepatozyten mittels „tight junctions“ und einer kurzen Zonula adherens miteinander in Kontakt (Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982; Abdelwahab, 1987; Ghodduzi und Kelly, 2004). Im Bereich der aneinandergrenzenden Hepatozyten beträgt die Breite des Interzellulärspaltes beim Huhn  $17\text{-}26\ \text{nm}$  (Hodges, 1972) und bei der Taube  $70\text{-}200\ \text{nm}$  (David, 1961). Die Leberzelle ist in diesem Abschnitt von einer einfachen osmiophilen Membran umgeben, der Doppelmembransysteme des glatten Endoplasmatischen Retikulums anliegen (David, 1961). Hodges (1972) hat im Bereich des interzellulären Spaltes „pits“ mit einer elektronendichten inneren Auskleidung gefunden, die sich in den Interzellulärspalt öffnen und scheinbar Bestandteile aus dem Spalt aufnehmen.

Meistens enthalten die Hepatozyten einen einzigen, am vaskulären/perisinusoidalen Pol der Zelle gelagerten, großen Zellkern (Purton, 1969; Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982; Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghodduzi und Kelly, 2004). Der Nukleus ist ungefähr  $1\text{ - }5,5\ \mu\text{m}$  groß (Hodges, 1972) und von runder bis ovaler Form (Heidbrink, 2003; Selman, 2013). Er enthält feingranuläres Chromatin und elektronendichtere Nukleoli (Bhatnagar und Singh, 1982). Die Kernmembran besteht aus einer glatten Doppelmembran die in ihrer gesamten Ausdehnung mit einem Diaphragma verschlossene Poren enthält (Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982). Diese können einen Durchmesser von  $58\ \text{nm}$  haben (Hodges, 1972). Wie von Hodges (1972) außerdem beschrieben ist der Zwischenraum zwischen den zwei Membranschichten der Kernmembran etwa  $33\ \text{nm}$  breit und kann sich bis auf  $60\ \text{nm}$  weiten.

Die Struktur des Zellkerns besteht aus einer zentral liegenden, feingranulären Pars fibrosa und einer peripher liegenden, grobkörnig granulären Pars granulosa (Hodges, 1972).

Das raue Endoplasmatische Retikulum (rER) breitet sich zu einer gleichmäßigen Fläche entlang der Zellmembran des interzellulären Abschnittes aus oder ist in ihrer Nähe zu finden (Abdelwahab, 1987). In den Bereichen der Zellmembran, an denen diese Mikrovilli ausbildet, ist es nicht zu finden (Abdelwahab, 1987). Des Weiteren bildet das rER schmale Stapel aus ein oder zwei Zisternen rund um die einzelnen Mitochondrien herum und auch zwischen diesen (Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982; Ohata, Tanuma et al., 1982; Abdelwahab, 1987; Ghoddusi und Kelly, 2004). Da über die ganze Länge der Zisternen Vesikel entstehen können, zeigt sich das rER in sehr unterschiedlicher Größe und Form (Hodges, 1972). Auch an ihren Enden weiten sich die Zisternen und geben Ribosomen ab (Bhatnagar und Singh, 1982), die in großer Zahl im gesamten Zytoplasma und auf den Membranen des rER zu finden sind (Schildmacher et al., 1968; Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982). Im Zytoplasma liegen sie einzeln oder in einer „polyribosomen Konfiguration“ vor (Bhatnagar und Singh, 1982).

Am auffälligsten sind die, in den Hepatozyten am häufigsten vorkommenden, Mitochondrien, die von einer Doppelmembran begrenzt werden (Hodges, 1972; Abdelwahab, 1987; Ghoddusi und Kelly, 2004) und eine gleichmäßig granuläre (Hodges, 1972), mäßig elektronendichte (Bhatnagar und Singh, 1982) Matrix beinhalten. Sie nehmen nahezu die Hälfte des Volumens des Zytoplasmas ein (Ohata, Tanuma et al., 1982). In diesem kommen die Mitochondrien dicht beieinander liegend vor allem im elektronendichten Teil der Hepatozyten vor (Abdelwahab, 1987; Ghoddusi und Kelly, 2004). Mit einer Länge von 1-10  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  unterscheiden sie sich sehr in ihrer Größe (Abdelwahab, 1987). Sie können viele Formen annehmen, von rund über oval und birnenförmig bis hin zu hantelförmig. Am häufigsten sind unregelmäßig stäbchenförmige Mitochondrien zu sehen (Hodges, 1972; Ohata, Tanuma et al., 1982; Bhatnagar und Singh, 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Die Doppelmembran dieser Zellorganellen stülpt sich nach innen zu Leisten ein (Hodges, 1972), die hauptsächlich in transversaler Richtung angeordnet sind (Ghoddusi und Kelly, 2004). In der Matrix der Mitochondrien findet sich einige elektronendichte Granula mit einem Durchmesser von 35 nm, die von deutlich kleineren, elektronendichten Granula umgeben sind (Hodges, 1972).

Bhatnagar und Singh (1982) konnten beim Truthahn eine gewisse Polarität in der Lokalisation des Golgi-Apparates beobachten, der häufig nahe dem Nukleus gelegen ist. Auch Ghodducci und Kelly (2004) beschrieben beim Huhn mehrere Golgi-Komplexe, die um den Zellkern herum und in seiner Nähe zu finden sind und aus abgeflachten Zisternen bestehen. Diese Beobachtungen passen zu den von Abdelwahab (1987) gemachten, dass der Golgi-Apparat nur in den dunklen Zonen zu finden ist, welche sich laut diesem immer um den Zellkern herum befinden. Diese flachen und glattwandigen (Hodges, 1972) Zisternen bilden Stapel aus vier bis sechs von ihnen, die sich s- oder c-förmig, oder in einer relativ geraden Form anordnen (Abdelwahab, 1987). Die sich an ihren Enden, oder teilweise an anderen Stellen, zu Vakuolen weitenden Zisternen (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghodducci und Kelly, 2004) schnüren raue, elipsenförmige Vesikel ab, die in ihrem Inneren kleine Granula von 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  Größe enthalten (Abdelwahab, 1987). Hodges (1972) beschrieb, dass die Golgi-Komplexe an ihrer konvexen Seite unregelmäßig verteilte Ausbeulungen besitzen, die zu granulär gefüllten Vesikeln abgeschnürt werden. Beim weiblichen Truthahn sind deutlich ausgeprägtere Golgi-Komplexe zu finden, die in ihren geweiteten Zisternen „very low density lipoproteins“ (VLDL) enthalten (Bhatnagar und Singh, 1982).

Das glatte endoplasmatische Retikulum (sER) zeigt eine rundliche, gewölbte oder gestreckte Form (Hodges, 1972) und ist in geringerer Zahl als das rER im Zytoplasma vorhanden (Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982). Ersteres lässt sich insbesondere im Umfeld der Glykogendepots (Bhatnagar und Singh, 1982; Ghodducci und Kelly, 2004) und am biliären Pol (Bhatnagar und Singh, 1982) beobachten. An manchen Stellen ist eine Verbindung der Tubuli des sER untereinander oder mit denen des rER zu finden (Hodges, 1972). Ohata, Tanuma et al. (1982) konnten dagegen in ihren Untersuchungen kein sER im Zytoplasma der Hepatozyten beobachten.

Glykogengranula bilden unterschiedlich große, elektronendichte Depots (Karrer, 1961; Bhatnagar und Singh, 1982; Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghodducci und Kelly, 2004). Diese finden sich sowohl in den dunklen als auch den hellen Zonen des Zytoplasmas der Hepatozyten (Abdelwahab, 1987). In den hellen Zonen erscheint das Glykogen diffus verteilt, während es in den dunklen Zonen größere Ansammlungen bildet (Adamiker, 1969). Die Depots sind über das Zytoplasma verteilt und scheinen oft mit dem glatten Endoplasmatischen Retikulum gemeinsam aufzutreten (Hodges, 1972; Ghodducci und Kelly, 2004). Diese Beobachtung machte auch Karrer (1960), der

feststellte, dass sich im Elektronenmikroskop in Bereichen, die mittels Perjod-Säure-Schiff-Reaktion als glykogenhaltig identifiziert worden sind, Zisternen des ERs und kleine Granula zeigen. Die Glykogengranula lagern sich in unterschiedlicher Menge zu Haufen oder Rosetten zusammen (Karrer, 1960; Adamiker, 1969) und sind in verschiedenen Formen zu finden. Es gibt kleine von 33 nm Größe, die sich zu größeren Haufen mit einem Durchmesser von 100-140 nm zusammenlagern oder gleichmäßig verteilt liegen. In anderen Regionen sind die Granula von nicht so gut definierter Gestalt mit einer Größe von 50-130 nm und nicht so elektronendicht wie Erstere (Karrer, 1961).

Beim weiblichen Geflügel finden sich öfter Lipid-Tropfen im Zytoplasma, als beim männlichen (Bhatnagar und Singh, 1982). Auch beim Jungtier kommen sie in großer Zahl vor (Adamiker, 1969). Diese finden sich vor allem in den dunklen Zonen des Zytoplasmas (Abdelwahab, 1987). Ohata, Tanuma et al. (1982) haben bei mehreren Vogelspezies Lipidtropfen unterschiedlichster Größe gefunden. Beim Huhn sind sie sehr klein und nur von geringer Anzahl (Ohata, Tanuma et al., 1982), eine Beobachtung, die auch Hodges (1972) machte, bei dem die kleinen Lipidtröpfchen einen Durchmesser von 1-2  $\mu\text{m}$  haben. Schildmacher et al. (1968) fanden in der Leber der Bergfinken wenige, oft herdförmig auftretende tropfenförmige Fettablagerungen, die häufig eine enge Lagebeziehung zu den Mitochondrien eingehen. Außerdem sind kleine Fettpartikel in den Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums zu finden (Schildmacher et al., 1968). Bei der Taube machen die Lipidtropfen etwa 0,7 % des Volumens des Zytoplasmas aus (Silverman und Hikida, 1977).

Im Zytoplasma der Hepatozyten finden sich, vor allem in den Bereichen zum Dissé Raum hin, pinozytische Vesikel, die teilweise elektronendichtes Material enthalten und vermutlich Endozytose betreiben (Ghoddusi und Kelly, 2004). Desmosomen sind ebenfalls vorhanden und lassen sich im Bereich um die Canaliculi biliferi herum und besonders im Bereich der Heringschen Kanälchen beobachten (Ghoddusi und Kelly, 2004).

Des Weiteren sind im gesamten Zytoplasma noch zahlreiche elektronendichte Lysosomen zu erkennen, die zu den Canaliculi biliferi hin gehäuft auftreten (Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982; Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Die von einer Membran begrenzten Lysosomen stellen sich sehr variabel in Form und Größe dar, wobei die meisten mit 0,27-0,80  $\mu\text{m}$  kleiner als die Mitochondrien sind (Hodges, 1972).

Die in deutlich geringerer Zahl vorkommenden Peroxisomen stellen sich als von einer einfachen Membran begrenzte Mikrobodies dar und sind deutlich weniger elektronendicht als die Lysosomen (Hodges, 1972; Ghodduki und Kelly, 2004), aber elektronendichter als die Mitochondrien (Ohata, Tanuma et al., 1982). Ihre Matrix zeigt sich feingranulär und sie enthalten keine Kernkörperchen (Hodges, 1972). Sie sind mit 290 nm etwa halb bis ein Drittel so groß wie die Mitochondrien (Hodges, 1972). Teilweise besteht Kontakt zwischen ihnen und den Zisternen des sER (Bhatnagar und Singh, 1982).

Als weitere Organellen enthält das Zytoplasma der Hepatozyten noch paarige Zentriolen und Mikrotubuli (Hodges, 1972). Erstere finden sich am biliären Pol der Hepatozyten, nahe dem Rand der Canaliculi biliferi (Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982). Die Mikrotubuli sind ebenfalls am biliären Pol vorhanden und stellen sich dort in großer Menge als Bündel aus sehr langen Bahnen dar, die die Strecke vom Rand der Canaliculi biliferi bis zu den Golgi-Komplexen überwinden und von dort ausgehend zum Zellkern und dem vaskulären Pol ziehen (Bhatnagar und Singh, 1982).

Abdelwahab (1987) bestätigte in seiner Arbeit die Berichte über helle und dunkle Hepatozyten mit hellen („electron-lucent“) und dunklen („electron-dense“) Zonen im Zytoplasma. Auch Purton (1969) und Adamiker (1969) berichteten von diesem Phänomen. Bei den dunklen Zellen ist das Zytoplasma zum größten Teil elektronendicht und enthält kleine Bereiche mit hellerem Zytoplasma (Abdelwahab, 1987). Bei den hellen Zellen verhält es sich genau anders herum (Abdelwahab, 1987). Bei beiden Zelltypen finden sich die meisten der Zellorganellen im Bereich der dunklen Zone (Abdelwahab, 1987). Auch Hodges (1972) berichtet von wenigen schwach angefärbten Hepatozyten, bei denen dies mit einer verminderten Anzahl an Organellen einhergeht. Außerdem findet sich bei beiden Zelltypen eine dunkle Zone, die reich an Mitochondrien und rauem Endoplasmatischem Retikulum ist und um den Zellkern herum und entlang der Zellmembran gelagert ist (Abdelwahab, 1987). Adamiker (1969) stellte die Vermutung an, dass diese Differenzierung als Folge unterschiedlicher Aktivität des Stoffwechsels dieser Zellen vorkommt und nicht als Fixationsartefakt. Für Ersteres spricht, dass das Glykogen in hellen Zellen verstreut liegt und in dunklen an einzelnen Stellen lokalisiert ist. Gegen Zweiteres spricht, dass bei anderen Tierarten mit der gleichen Fixation das Phänomen nicht auftritt. Aber Abdelwahab (1987)

fand noch keine befriedigende Erklärung für diese Aufteilung in helle und dunkle Zellen in der Vogelleber.

## B. Gallengänge

Die Spitzen von drei bis sechs, beim Wellensittich fünf, benachbarten Hepatozyten bilden einen schmalen interzellulären Raum, der in Form der sogenannten Canaliculi biliferi den Anfang des Gallengangsystems darstellt (Purton, 1969; Feder, 1969; Ohata, Tanuma et al., 1982; Abdelwahab, 1987; Ghoddusi und Kelly, 2004). Im Bereich der Canaliculi biliferi ist der interzelluläre Spaltraum zwischen den Hepatozyten düsenartig verengt (David, 1961) und mittels spezieller Schlussleistensysteme, „tight junctions“ Zonulae occludentes und „intermediate junctions“ Zonulae adhaerens, gesichert (Purton, 1969; Hodges, 1972; Bhatnagar und Singh, 1982; Abdelwahab, 1987).

Die Gallekanälchen verlaufen mit den sich verzweigenden Leberzellbalken und stellen sich als schmale Röhren von 1-4  $\mu\text{m}$  Durchmesser dar (Abdelwahab, 1987). Beim Huhn haben sie einen Durchmesser von 1,5  $\mu\text{m}$  (Hodges, 1972). In das Lumen dieser Canaliculi biliferi entlässt der schmale apikale Pol der Hepatozyten zahlreiche Mikrovilli in unterschiedlicher Anzahl, Form und Größe (David, 1961; Purton, 1969; Ohata, Tanuma et al., 1982; Abdelwahab, 1987) deren Plasmamembran sich stark elektronendicht darstellt (Hodges, 1972). Das Zytoplasma der Hepatozyten gibt sich in diesem Bereich granulär (David, 1961) und grobkörnig fibrillär und ist eindeutig elektronendichter als in angrenzenden Gebieten (Hodges, 1972). In den Mikrovilli selbst zeigt sich das Zytoplasma mit zahlreichen längs angeordneten Fibrillen (Hodges, 1972). Im Lumen der Canaliculi biliferi befindet sich eine feingranuläre Substanz, die in fibrillärer Form angeordnet ist (Hodges, 1972).

Die Canaliculi biliferi münden periportal in die Heringschen Kanälchen, die von Gallengangszellen und Hepatozyten begrenzt werden (Ghoddusi und Kelly, 2004). Die Heringschen Kanälchen beginnen außerhalb der periportalen Felder und sind bereits mit einem einschichtigen kubischen Epithel ausgekleidet (Purton, 1969; Feder, 1969; Nickel et al., 1992; Ghoddusi und Kelly, 2004). Diese Epithelzellen enthalten einen runden bis ovalen Zellkern, weniger Organellen als die benachbarten Hepatozyten und sind mittels „tight junctions“ verbunden (Ghoddusi und Kelly, 2004). Die Heringschen Kanälchen führen dann im weiteren Verlauf die Galle in Richtung der Area interlobularis, wo sie in den interlobulären Gallengang, Ductus interlobularis, münden (Purton, 1969; Feder, 1969; Nickel et al., 1992).

Die Ductus interlobulares verlaufen parallel zu den Zweigen der Portalvene und der Leberarterien (Ibrahim et al., 1992). Ihre Wände bestehen in diesem Bereich aus einem einfachen kubischen oder iso- bis hochprismatischen Epithel, mit in das Lumen ragenden Mikrovilli und einem verhältnismäßig großen Zellkern von geringer Dichte (Purton, 1969; Heidbrink, 2003). Unter den Epithelzellen ist eine Basalmembran wechselnder Dicke zu finden, die sich dem Füllzustand des Gallengangs anpasst (Purton, 1969).

Vom Ductus interlobularis fließt die Galle in die Ductuli biliferi, die im rechten Leberlappen in den Ductus hepaticus dexter und im linken Leberlappen in den Ductus hepaticus sinister münden (Ibrahim et al., 1992; Nickel et al., 1992). Die Anzahl der lobulären Gallengänge, Ductuli biliferi, unterscheidet sich bei den von Ibrahim et al. (1992) untersuchten Vogelarten. Sie fanden bei Haushuhn und Ente fünf bis sechs für den rechten Lappen und drei bis vier für den linken Leberlappen. Bei Taube, Wachtel, Reiher und Falke waren es dagegen zwei bis drei für den rechten und den linken Lappen. Die Gallengangsepithelzellen, die nur wenige Organellen enthalten, zeigten bei Ghoddusi und Kelly (2004) die Fähigkeit große Mengen an Fett in ihrem Zytoplasma zu speichern. Diese Fetttropfchen besitzen eine ähnliche Elektronendichte wie die im Zytoplasma der Hepatozyten.

Die Gallengänge liegen meist in der Nähe einer Vene und werden häufig auch von einer Arterie begleitet (Feder, 1969; Heidbrink, 2003). Sie treten als Ductus hepatoentericus und Ductus hepatocysticus aus der Leber aus und besitzen hier ein einschichtig hochprismatisches Epithel mit basalständigem Kern (Feder, 1969). Außerdem besitzen diese von hier an eine kräftige Zirkulärmuskelschicht. Die Schleimhaut zeigt starke Primär- und Sekundärfalten (Feder, 1969; Weyrauch und Schnorr, 1978).

Weyrauch und Schnorr (1978) haben an der Basis der Mukosafalten gelegentlich isoprismatische Zellen gefunden. Sie haben außerdem weitere Untersuchungen am Epithel der Gallengänge unternommen und dabei verschiedene Zelltypen nachgewiesen. Zum Einen die am häufigsten auftretenden Zellen mit apikalen Sekretgranula. Ihr Hauptmerkmal sind kleine, 0,2-0,9  $\mu\text{m}$  messende, unregelmäßig runde Granula, die sich histologisch mittels PAS- bzw Alcianblau-Färbung anfärben und von einer zweischichtigen Membran umgeben sind. Diese Granula können sich im apikalen Zellbereich zu einer Art Sekretpfropfen zusammenlagern und nach Verschmelzung mit der Zelloberfläche vermutlich ihren Inhalt in das Ganglumen entleeren. Der Zellkern liegt im mittleren oder unteren Zelldrittel und enthält in seinem aufgehellten Kernplasma einen deutlichen Nukleolus. Des Weiteren enthalten diese Zellen noch

Mitochondrien vom Cristae-Typ, raues Endoplasmatisches Retikulum und einen deutlich sichtbaren, supranukleär gelagerten Golgi-Apparat, der im Lumen seiner Schläuche Sekretgranula bildet. Außerdem sind am apikalen Ende der Zelle Mikrovilli zu beobachten, die in das Ganglumen hineinragen (Weyrauch und Schnorr, 1978).

Als weitere Zellart treten unspezifische Gangzellen auf, die den Zellen mit apikalen Sekretgranula sehr ähnlich sind, außer, dass ihnen die Granula fehlen und sie mehr Mitochondrien enthalten. Außerdem gibt es noch Geißelzellen und Wanderzellen. Bei den Geißelzellen handelt es sich um unspezifische Gangzellen oder Zellen mit apikalen Sekretgranula, die eine Zilie tragen. Die Wanderzellen sind im Interzellularraum zu finden, wo sie sich zwischen die Epithelzellen schieben und diese teilweise verformen. Diese haben keinen Kontakt zu den Nachbarzellen und gehören möglicherweise zu den lymphoiden Zellen. Sie besitzen einen kleinen chromatinreichen Kern und ein im Vergleich helleres Zytoplasma mit kleinen runden bis ovalen Mitochondrien (Weyrauch und Schnorr, 1978).

Die Ductus hepatici sind nun nicht mehr von den Ductus pancreatici zu unterscheiden. An der Eintrittsstelle in den Darm ist kein Sphinkter ausgebildet (Feder, 1969).

### C. Gallenblasenstruktur

Die Gallenblase kann Längsfalten (Crompton und Nesheim, 1972) oder eine ungefaltete Schleimhaut besitzen (Feder, 1972). Ihre Wand besteht aus Zylinderepithelzellen mit einem zentralständigen, längsovalen Kern. Die Zellen tragen häufig in der apikalen Hälfte einen Schleimpfropf. Außer den Epithelzellen finden sich in der Wand der Gallenblase zwischen Ersteren noch sekretleere Zellen mit einem dunkleren, schmalen Zellkörper und einem stäbchenförmigen Zellkern. Des Weiteren besteht die Blasenwand aus einer Lamina propria, die reich an Kapillaren ist und einer Subserosa mit größeren Gefäßen. Eine Lamina muscularis mucosae ist nicht vorhanden (Feder, 1972).

### D. Sinusoide

Zwischen den Leberzellen befindet sich ein Labyrinth aus unregelmäßig weiten Sinusoiden (Purton, 1969). Sie werden auch sinusoide Kapillaren genannt und haben einen Durchmesser von 4-15 (Nickel et al., 1992) oder sogar 30  $\mu\text{m}$  (Abdelwahab, 1987). Die bis zu 0,5 mm langen Sinusoide anastomisieren miteinander und besitzen unregelmäßige Ausbuchtungen, die dazu führen, dass sich der Blutstrom verlangsamt und somit der Stoffaustausch erleichtert wird (Liebich, 2010). Sie formen eine dreidimensionales Netzwerk, das mit dem der Leberzellbalken korrespondiert (Abdelwahab, 1987). Die

perforierten Wände der Sinusoide bestehen aus Endothelzellen und verteilt liegenden von-Kupffer-Zellen und stellen eine Verbindung zwischen dem sinusoidalen und dem perisinusoidalen Raum dar (Purton, 1969).

Die flachen Endothelzellen der Vögel setzen sich aus einem Zellkörper mit dem Zellkern und dünnen membranähnlichen Zytoplasmaausläufern zusammen (Purton, 1969; Ohata, Tanuma et al., 1982). Die Ausläufer bilden den größten Teil der Sinusoidwand (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Im Bereich des großen, ovalen oder spindelförmigen (Ohata, Tanuma et al., 1982) Zellkerns entsteht eine Ausbuchtung in dem schmalen Band aus Zytoplasma (Purton, 1969). Ansonsten wölben sich die Endothelzellen nicht in das Lumen der Sinusoide hinein (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Der Nukleus beinhaltet in seiner Matrix ein oder zwei elektronendichte Nukleoli, ein kleines Kernkörperchen von geringerer Elektronendichte und einen charakteristischen hellen Ring (Ohata, Tanuma et al., 1982). In den dünneren Abschnitten ihrer Zytoplasmaausläufer besitzen die Endothelzellen zahlreiche Poren (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004), die häufig als kleine Gruppe die sogenannten Siebplatten bilden (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Teilweise kommt es auch zu intrazellulären Öffnungen. Durch diese und die Poren kann Plasma aus den Sinusoiden in den perisinusoidalen Raum gelangen (Purton, 1969; Ghoddusi und Kelly, 2004). Blutzellen können nicht übertreten (Hees und Sinowatz, 2000: S.278). Außerdem fehlt eine geschlossene Basalmembran als Grenzschicht, wodurch der Übertritt zusätzlich erleichtert wird (Purton, 1969; Ghoddusi und Kelly, 2004; Liebich, 2010).

Zwischen benachbarten Endothelzellen bilden sich an manchen Stellen gut entwickelte Desmosomen aus (Purton, 1969; Ohata, Tanuma et al., 1982). Gelegentlich überlappen die Ränder der Ausläufer über eine kurze Strecke (Purton, 1969; Ghoddusi und Kelly, 2004).

Die Endothelzellen sind auffallend reich an Organellen, die sich vor allem im Bereich des Zellkörpers, aber auch in breiteren Abschnitten der Zytoplasmaausläufer befinden (Ohata, Tanuma et al., 1982). Ghoddusi und Kelly (2004) andererseits konnten in den sinusoidalen Endothelzellen nicht sehr viele Zellorganellen feststellen und nutzten dieses Merkmal unter anderem, um diese von den von-Kupffer-Zellen unterscheiden zu können. Ohata, Tanuma et al. (1982) haben verschiedene Vogelspezies untersucht und bei diesen im Zytoplasma als auffälligste Organelle gewundene, glattwandige tubuläre Strukturen gefunden, die elektronendichtes Material enthalten. Dabei

handelt es sich vermutlich um glattes Endoplasmatisches Retikulum. Eine weitere auffällig häufige Struktur sind „bristle-coated“ mikropinozytische Vesikel, die im Durchmesser etwa 130 nm groß sind und entlang der Membran des Zellkörpers, aber auch auf der Oberfläche der Ausläufer zu finden sind (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004).

Außerdem ist noch eine beträchtliche Anzahl an makropinozytischen Vesikeln mit einem mäßig elektronendichten Inhalt und einem Durchmesser von circa 630 nm vorhanden (Ohata, Tanuma et al., 1982). Diese wurden von Ghoddusi und Kelly (2004) auch auf der Oberfläche der Endothelzellen gefunden. Sowohl die mikro- als auch die makropinozytischen Vesikel sind an der Endozytose beteiligt (Ohata, Tanuma et al., 1982).

Die verstreut liegenden Mitochondrien der Endothelzellen sind von runder, ovaler oder länglicher Gestalt. Auf einer Seite des Zellkerns befindet sich der Golgi-Komplex mit seinen Stapeln aus flachen, manchmal langgezogenen Zisternen und Vesikeln. Zudem sind im Endothelzellzytoplasma noch Zisternen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums und freie Ribosomen zu finden. Die elektronendichten Körper, bei denen es sich vermutlich um Lysosomen handelt, kommen nicht in allen Endothelzellen in gleicher Anzahl und Größe vor. Die hier ebenfalls vorhandenen Mikrotubuli bilden, anders als in den Hepatozyten, keine Bündel und ziehen gemeinsam mit Mikrofilamenten in die Zytoplasmaausläufer hinein (Ohata, Tanuma et al., 1982).

Zwischen den Endothelzellen, die den größten Teil der Sinusoid-Wand bilden, finden sich von-Kupffer-Zellen (benannt nach von-Kupffer (1876)) (Ghoddusi und Kelly, 2004). Zwischen diesen beiden Zelltypen besteht ein enger Kontakt (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Die von-Kupffer-Zellen sind die stationären Makrophagen der Sinusoidalwand der Leber (Ohata, Tanuma et al., 1982).

Das eindeutigste Unterscheidungsmerkmal (Ohata, Tanuma et al., 1982) zu den Endothelzellen sind die zahlreichen ungleich geformten Pseudopodien (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004) der von-Kupffer-Zellen, da diese beiden sinusoidalen Zellen annähernd gleich viele Zellorganellen besitzen (Ohata, Tanuma et al., 1982). Ghoddusi und Kelly (2004) nutzen dagegen die zahlreichen Poren und intrazellulären Öffnungen in den Ausläufern der Endothelzellen und die Tatsache, dass sie in den Endothelzellen weniger Zellorganellen als in den von-Kupffer-Zellen gefunden haben, zur Unterscheidung dieser beiden Zelltypen.

Mit ihren Pseudopodien dringen die von-Kupffer-Zellen in das Lumen der Sinusoide und auch in den Dissé-Raum vor (Ohata, Tanuma et al., 1982; Abdelwahab, 1987; Ghoddusi und Kelly, 2004). Beim Huhn findet man die von-Kupffer-Zellen verhältnismäßig oft (Ohata, Tanuma et al., 1982), während Abdelwahab (1987) beim Truthahn nur wenige beobachten konnte. Sie haben meistens nur einen unregelmäßig geformten Zellkern (Purton, 1969; Ghoddusi und Kelly, 2004) mit stark elektronendichten Nukleoli und eine ähnliche Dichte der Matrix wie bei den Endothelzellen (Ohata, Tanuma et al., 1982). Bei den von-Kupffer-Zellen ist das Verhältnis zwischen Zytoplasma und Zellkern größer als bei den Endothel- und den Ito-Zellen (Ohata, Tanuma et al., 1982).

Im Zytoplasma der von-Kupffer-Zellen findet sich ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat, der sich in der Umgebung des Zellkerns auf einer großen Fläche mit seinen Stapeln aus zahlreichen flachen Zisternen und Vesikeln ausbreitet (Ohata, Tanuma et al., 1982). Ghoddusi und Kelly (2004) konnten nicht in allen von-Kupffer-Zellen einen Golgi-Apparat beobachten.

Die von-Kupffer-Zellen haben relativ wenige Mitochondrien (Purton, 1969). Diese sind von runder oder ovaler Form und, genauso wie der Golgi-Komplex, größer als bei den Endothel- und den Ito-Zellen (Ohata, Tanuma et al., 1982).

Die Phagolysosomen, mit elektronendichtem Material in ihrem Inneren, können sehr groß werden und kommen in unterschiedlicher Anzahl vor (Ghoddusi und Kelly, 2004). Das elektronendichte Material lässt eine aktive Phagozytose vermuten (Ghoddusi und Kelly, 2004). Beim Huhn kann Erythrophagozytose beobachtet werden, bei der oftmals auch zwei oder mehr Erythrozyten gleichzeitig aufgenommen werden (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Dabei heften sich die Erythrozyten im Sinusoidalraum an die von-Kupffer-Zellen an, werden von den Pseudopodien umschlossen und dann in die phagozytischen Vakuolen aufgenommen, in denen sie verdaut werden (Ohata, Tanuma et al., 1982).

Es sind außerdem große elektronendichte Körperchen, sowie kleine Vakuolen, ähnlich den macropinozytotischen Vesikeln der Endothelzellen, und kleine Fettvakuolen vorhanden (Ohata, Tanuma et al., 1982). Zahlreiche Polysomen sind im ganzen Zytoplasma, außer um den Golgi-Apparat herum, verteilt zu finden (Ohata, Tanuma et al., 1982). Die von-Kupffer-Zellen besitzen zudem zahlreiche langgestreckte, flache Zisternen des rauen Endoplasmatischen Retikulums mit vielen Ribosomen (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Die tubulären Zisternen des glatten

Endoplasmatischen Retikulums sind dagegen selten zu sehen (Ohata, Tanuma et al., 1982). Die Tubuli enthalten elektronendichtes Material in ihrem Lumen. Beim Huhn ist eine „worm-like“ Struktur im Zytoplasma der von-Kupffer-Zellen beschrieben, die Ohata, Tanuma et al. (1982) bei anderen untersuchten Vogelarten nicht nachweisen konnten. Diese Struktur stellt sich als ein von einer Membran begrenzter Tubulus mit einer elektronendichten Mittellinie dar. Ghodduzi und Kelly (2004) konnten für das Huhn keine „worm-like“ Struktur beobachten.

Sowohl auf der perisinusoidalen als auch auf der sinusoidalen Seite der von-Kupffer-Zellen befinden sich „bristle-coated“ mikropinozytotische Pits und Vesikel (Ohata, Tanuma et al., 1982).

### E. Dissé Raum

Der perisinusoidale Raum, oder auch Dissé Raum, befindet sich zwischen den Endothelzellen der Lebersinusoide und dem vaskulären Pol der Hepatozyten (Purton, 1969; Hodges, 1972; Purton, 1976). Wie bei David (1961); Purton (1976); Ohata, Tanuma et al. (1982) und Abdelwahab (1987) beschrieben ragen in den Dissé Raum, ausgehend von der Zellmembran des vaskulären Pols der Leberzellen, eine große Anzahl von Mikrovilli hinein. Diese zeigen sich um einiges länger, gewundener und schmaler, als die Mikrovilli des biliären Pols (Hodges, 1972; Abdelwahab, 1987). Sie zeigen sich in sehr unterschiedlicher Form und Größe und auch die Anzahl differiert bei den verschiedenen Vogelarten (Ohata, Tanuma et al., 1982). Die Mikrovilli erhöhen die Oberfläche der Hepatozyten im Bereich des vaskulären Pols um ein vielfaches und erleichtern so den Stoffaustausch (David, 1961). Die Weite des perisinusoidalen Raumes lässt sich nicht genau bestimmen, da sie sehr vom funktionellen Zustand der Leber abhängt (Purton, 1976) Abdelwahab (1987) maß für den Dissé Raum eine Weite von  $1\ \mu\text{m}$ . In seinem Lumen können, neben den Ito-Zellen und den „intercalated cells“ dünne Kollagenfasern und mäßig elektronendichtes Material gefunden werden. Bei Letzterem handelt es sich vermutlich um Proteine aus dem Sinusoidalraum (Ghodduzi und Kelly, 2004). Purton (1969) hat einige retikuläre Kollagenfasern im perisinusoidalen Raum gefunden.

Die Aufgabe des Dissé Raums ist der Stoffaustausch zwischen den Leberzellen und dem Blut (Nickel et al., 1992) in den Sinuskapillaren. Der Dissé-Raum stellt dabei einen strukturellen und funktionellen Reaktionsraum dar, der die Phagozytose, Transportvorgänge und die Mikrozirkulation beeinflusst (Liebich, 2010).

Beim Huhn konnte Purton (1976) zwei Zelltypen im perisinusoidalen Raum beobachten.

Zum einen die Ito-Zellen, die 1876 erstmals von von Kupffer (1876) als „Sternzellen“ erwähnt wurden. Dieser konnte sie lichtmikroskopisch mittels Gold-Methode nachweisen. Zu einem späteren Zeitpunkt beschrieb Toshio Ito beim Säugetier einen neuen perisinusoidalen Zelltyp der reich an Fettvakuolen ist (Wake, 1971). Für diesen konnte Wake (1971) mittels der von von Kupffer verwendeten Gold-Imprägnierung, einer Silber-Imprägnierung, Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie zeigen, dass die bei von Kupffer beschriebenen Sternzellen und die fettspeichernden Ito-Zellen die gleichen Zellen sind. Gleichzeitig wurde noch nachgewiesen, dass diese Zellen Vitamin A speichern (Wake, 1971).

Die Ito-Zellen, auch als „hepatic stellate cells“ (Handharyani et al., 2001), „fat-storing-cells“ oder „Lipozyten“ bezeichnet, sind in der aviären Leber häufiger zu finden als in der der Säugetiere (Ohata, Tanuma et al., 1982). Sie befinden sich im Dissé Raum (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004) und werden durch die Endothelzellen und deren Ausläufer vom Sinusoidalraum abgetrennt (Ohata, Tanuma et al., 1982). Bei der Ratte beschrieb Wake (1971), dass die Ito-Zellen ihre Gestalt verändern und sich ihrer Umgebung anpassen. Ebenso konnten Ohata, Tanuma et al. (1982) bei Hühnern, Wachteln, Tauben und Finken sowie Ghoddusi und Kelly (2004) beim Huhn beobachten, dass die Sternzellen sehr unterschiedlich in ihrer Gestalt sind.

Ihr Zellkern ist von ovaler Form mit häufigen Deformationen durch die Fetttröpfchen (Ghoddusi und Kelly, 2004) und besitzt in seinem Inneren ein oder zwei elektronendichte Nukleoli (Ohata, Tanuma et al., 1982).

Das auffälligste Merkmal der Ito-Zellen sind die zahlreichen großen und kleinen Fetttröpfchen in ihrem Zytoplasma, die sehr häufig kleiner sind als die der Hepatozyten (Purton, 1976; Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Ihre Fetttröpfchen haben eine ähnliche Elektronendichte wie die in den Hepatozyten, können aber teilweise auch elektronendichter erscheinen und besitzen keine begrenzende Membran (Ghoddusi und Kelly, 2004). Wake (1971) konnte in seinen Untersuchungen nachweisen, dass in den Fetttröpfchen Vitamin A gespeichert wird. Teilweise werden auch sogenannte leere Ito-Zellen ohne die typischen Fetttröpfchen gefunden (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004).

Die Sternzellen bilden mit ihrem Zytoplasma langgestreckte Ausläufer, die sich entlang des perisinusoidalen Raumes (Purton, 1976) subendothelial ausbreiten (Ohata,

Tanuma et al., 1982). Es wurden bipolare, tripolare, tetra- und sogar pentapolare Sternzellen beobachtet. Letztere scheint die typische Form darzustellen (Wake, 1971). Neben den sehr auffälligen Fetttröpfchen enthalten die Ito-Zellen ein großes raues Endoplasmatisches Retikulum mit zahlreichen abgeflachten Zisternen und freien Ribosomen (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Im Bereich des gut ausgebildeten Golgi-Komplexes findet sich kein rER (Ohata, Tanuma et al., 1982). Die flachen Stapel des Golgi-Komplexes mit kleinen Vesikeln lassen sich in der Umgebung des Zellkerns nachweisen (Ohata, Tanuma et al., 1982). Die nur spärlich vorhandenen Mitochondrien der Ito-Zellen sind über das gesamte Zytoplasma verteilt zu finden (Ghoddusi und Kelly, 2004) und sind genauso groß wie die der Endothelzellen der Sinusoide (Ohata, Tanuma et al., 1982). Schon für die Ratte konnten im Zytoplasma der Ito-Zellen Zentriolen nachgewiesen werden (Wake, 1971). Ohata, Tanuma et al. (1982) beschrieben später für verschiedene Vogelarten paarige Zentriolen, die sich in der Nähe des Golgi-Komplexes befinden und von denen ausgehend sich beim Huhn eine einzelne Zilie bildet, die in den Dissè hineinragt. Außerdem wurden bei diesen Vogelarten im Zytoplasma noch Mikrotubuli und Mikrofilamente gefunden, die bis in die Zytoplasmafortsätze ziehen. Des Weiteren sind wenige kleine und vereinzelt auch große Lysosomen vorhanden.

Purton (1976) beschrieb noch einen weiteren Zelltyp im perisinusoidalen Raum, der ein typisches unregelmäßiges Aussehen hat, mit langen Fortsätzen seines Zytoplasmas. Diese Zellen können sich auch zwischen zwei Hepatozyten befinden und scheinen teilweise an der Bildung der Canaliculi biliferi beteiligt zu sein. Purton (1976) bezeichnete diesen Zelltyp als mesenchymale Zelle oder Histiozyt. Ohata und Ito (1986) bestätigten später das Auftreten dieses Zelltyps und bezeichneten diesen als extrasinusoidalen Makrophagen. Ghoddusi und Kelly (2004) beschrieben einen ähnlichen Zelltyp, und nannte ihn „intercalated cell“. Auch in dieser Studie befinden sich diese Zellen hauptsächlich im Dissè Raum und teilweise zwischen den Hepatozyten. Sie können aber auch im Sinusoidalraum beobachtet werden.

Ihr Zytoplasma ist elektronenoptisch durchsichtig und enthält neben dem ovalen Zellkern noch einige wenige Organellen (Ghoddusi und Kelly, 2004). Diese sind vor allem ein paar relativ große Mitochondrien, die in etwa so groß sind wie die der von-Kupffer-Zellen (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ohata und Ito, 1986), kleine Lysosomen, zahlreiche Polysomen, kurze Zisternen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums und einen Golgi-Apparat, der sich in der Nähe des Zellkerns befindet (Ohata und Ito,

1986; Ghoddusi und Kelly, 2004). Des Weiteren enthalten sie häufig noch große Fetttröpfchen (Purton, 1976). Sie bilden ein paar dünne Zytoplasmafortsätze aus (Ohata, Tanuma et al., 1982). Letztere können sich durch die endotheliale Abgrenzung bis in den sinusoidalen Raum erstrecken (Ohata und Ito, 1986).

Purton (1976) vermutete, dass die mesenchymalen Zellen sich zu Ito-Zellen umformen können. Ohata und Ito (1986) dagegen vermuteten, dass die intralobulären Makrophagen in den Sinusoidalraum einwandern und sich dort zu von-Kupffer-Zellen umwandeln. Diese Vermutung wird durch die Feststellung verstärkt, dass diese Makrophagen, wenn sie den Hauptteil ihres Zellkörpers durch die endotheliale Abgrenzung gebracht haben, charakteristische Eigenschaften der von-Kupffer-Zellen zeigen, wie Pseudopodien, zahlreiche Lysosomen und Anheftung von Farbpartikeln an die Plasma-Membran.

## 2.4 Physiologie der Leber

Die Leber spielt als Anhangsdrüse des Verdauungstrakts nicht nur eine Rolle im Intermediärstoffwechsel (Hummel, 2000), sondern als Hauptstoffwechselorgan auch bei der Resynthese von Energieträgern, der Proteinsynthese (Engelhardt und Ahrens, 2005: s.423) und der Biotransformation (Heinrich et al., 2014: Kapitel 62, S.770-). Dabei laufen die metabolischen Aktivitäten vor allem in den Hepatozyten ab. Die Leber besteht, mit 60-70 % der Gesamtzellzahl, zum größten Teil aus Hepatozyten (Engelhardt und Ahrens, 2005).

Aufgrund der anatomischen Lage der Leber gelangt das, mit Nährstoffen angereicherte, Blut zunächst zu den Hepatozyten, wo Ab- und Umbauprozesse ablaufen, bevor es über die Vena cava an die anderen Organe weitergeleitet wird (Whittow, 2000), (Engelhardt und Ahrens, 2005: Kapitel 16). Die Leber sorgt für die Glukosehomöostase. Während der Resorptionsphase wird Glukose, aber auch andere Monosaccharide wie Fruktose, zu Glykogen umgewandelt und gespeichert (Heinrich et al., 2014: Kapitel 62). Während Phasen des Hungerns werden anfangs diese Glykogendepots (Heinrich et al., 2014: Kapitel 62) durch Glukagon aus der Bauchspeicheldrüse (Hazelwood, 1973) mobilisiert und bei der Glykogenolyse von Glucose-6-Phosphatase bis zu Glukose abgebaut (Hazelwood, 1973) (Mehner und Hartfiel, 1983: S.713-734). In längeren Hungerphasen beginnt in der Leber die Glukoneogenese aus Nicht-Kohlenhydrat-Vorstufen (Aminosäuren), um eine kontinuierliche Energieversorgung zu gewährleisten (Engelhardt und Ahrens, 2005: Kapitel 16).

Als weiteren Teil der Beteiligung der Leber am Intermediärstoffwechsel sind die Abläufe der Fettsäureoxidation und die Synthese von Lipoproteinen und Lipiden zu nennen (Engelhardt und Ahrens, 2005: Kapitel 16). Diese findet beim Vogel zum größten Teil im Zytoplasma und den Mitochondrien der Hepatozyten statt (Farner und J. R. King, 1972: Chapter 8) und kann in Legeperioden noch deutlich zunehmen (Mehner und Hartfiel, 1983: S.691-710). Östrogen stimuliert die Enzyme der Leber zu einer übersteigerten Fettsynthese bei gleichzeitiger Drosselung des Mitochondrienstoffwechsels. Der Fettgehalt der Leber nimmt stark zu und diese produziert Dotterproteine (z.B. Vitellin) und Dotterlipoproteine (z.B. Cholesterin) (Mehner und Hartfiel, 1983: S. 703f. und 953ff.). Die Biosynthese einer Vielzahl von Plasmaproteinen, wie die meisten der Blutgerinnungsfaktoren, Proteine der Fibrinolyse, Transportproteine sowie Hormone und Prohormone, ist ebenfalls ein Teil der Aufgaben des Leberparenchyms (Heinrich et al., 2014: Kapitel 62). Diese findet in den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums statt

(Nickel et al., 1992).

Eine weitere wichtige Aufgabe der Leber ist die Engiftung des Blutes (Hummel, 2000). Da bei den Vögeln die Carbamylphosphat-Synthetase nicht vorhanden ist, wird Ammoniak, der im Zusammenhang mit der Energiegewinnung aus Aminosäuren entsteht, auf dem gleichen Weg wie die Nukleinsäuren (über die Synthese von Purinbasen und den Abbau zu Harnsäure) ausgeschieden (Mehner und Hartfiel, 1983: S. 741). Im glatten Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten befinden sich die meisten der für die Biotransformation von Endo- und Xenobiotika zuständigen Enzyme (Heinrich et al., 2014: Kapitel 62). Zu den Xenobiotika zählen körperfremde Stoffe wie Arzneimittel und Umweltgifte. Endobiotika sind körpereigene Stoffe wie Hormone und auch Bilirubin (Engelhardt und Ahrens, 2005: Kapitel 16). Letzteres wird beim Vogel aufgrund der nur wenig vorhandenen Glucoronyl-Transferase und der wenig bis garnicht vorhandenen Biliverdin-Reduktase als Biliverdin ausgeschieden (Lin et al., 1974). Somit ist die Ausscheidungsrate von Biliverdin im Verhältnis zu Bilirubin sehr hoch und der Kot des Geflügels wird grün gefärbt (Whittow, 2000).

In den Hepatozyten werden neben Glykogen und Lipiden auch manche Vitamine und Spurenelemente gespeichert (Heinrich et al., 2014: Kapitel 62). Vitamin D<sub>3</sub> wird mit Hilfe der Gallensäuren aus dem Darm resorbiert, bei erhöhtem Ca-Bedarf im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten zu einem wirksamen Metaboliten hydroxyliert und bei Überschuss wieder über die Galle ausgeschieden (Mehner und Hartfiel, 1983: S.779ff.). Vitamin A wird in größeren Mengen von den Ito-Zellen aufgenommen, gespeichert und bei Bedarf wieder freigesetzt (Wake, 1971). Eine Fähigkeit die sie als primitive Sternzellen schon ab dem neunten Tag der Entwicklung im Hühnerembryo besitzen (Tatsumi und Fujita, 1983).

Die in der Leber synthetisierten und von dieser sezernierten Gallensäuren gelangen über zwei Gallengänge in das Duodenum, wo sie maßgeblich an der Fettverdauung beteiligt sind (Whittow, 2000) und die Resorption vieler Vitamine erleichtern (Mehner und Hartfiel, 1983: S.768-850). Die in der Galle enthaltenen Gallensalze bilden mit den Fettsäuren Mizellen. Diese erleichtern durch die niedrigere Oberflächenspannung die Lösung und Absorption derselben (Mehner und Hartfiel, 1983: S. 633-634) und werden zu bis zu 90 % der Leber wieder zur Verfügung gestellt, indem sie im Jejunum und Ileum reabsorbiert werden (Hurwitz et al., 1973).

Anders als beim Säugetier ist die Leber der Vögel in der Embryonalentwicklung nicht an der Hämatopoese beteiligt. Diese findet stattdessen in den extraembryonalen Blutinseln des Dottersackes und in der Keimblase statt (Mehner und Hartfiel, 1983: S.287; Zon,

1995). Dieterlen-Lièvre und Martin (1981) beschrieben zahlreiche Stellen mit Hämatopoese in embryonalen Hühner und Wachteln. In der embryonalen Anlage der Leber haben sie keine beobachten können. Andererseits haben Wong und Cavey (1993) in einer Studie nachgewiesen, dass in der Vogelleber durchaus Granulopoese und Erythropoese stattfinden. Auch Kingsbury et al. (1956) fanden einzelne eosinophile Leukozyten extra- und intravaskulär in der embryonalen Leber.

Unter normalen Bedingungen sind die Ito-Zellen durch Kollagen- und Laminin-Synthese an der Produktion der extrazellulären Matrix des Dissè-Raums beteiligt (Engelhardt und Ahrens, 2005) und sind dabei die Hauptquelle für Kollagen (Tsukada et al., 2006). Sie können sich, unter anderem bei Leberfibrose oder -zirrhose, in aktivierte, myofibroblasten-ähnliche, fortsatzreiche Zellen umwandeln, die intensiv Proteoglykane und Kollagenfibrillen produzieren und so den Dissè-Raum damit anfüllen (Handharyani et al., 2001; Tsukada et al., 2006; Welsch und Sobotta, 2006). Handharyani et al. (2001) zeigten, dass zwischen der Anzahl an Ito-Zellen und dem Fortschritt der Fibrosierung der Leber ein Zusammenhang besteht. In ultrastrukturellen Untersuchungen konnten sie um die Ito-Zellen herum neugebildete kollagene Fasern nachweisen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Ito-Zellen eine zentrale Rolle in der Fibrosierung mit einer Verstärkung der Immunreaktion spielen. Diese Beobachtungen machte auch Wake (1980).

## 2.5 Histochemie der Leber

### 2.5.1 Immunhistochemie, (IHC)

#### A. Definition, Anwendung und Technik

Bei der Immunhisto- oder Immunzytochemie werden antigene Strukturen auf oder in Zellen und Geweben mittels daran bindender, markierter Antikörper sichtbar gemacht (Pschyrembel, 2004).

Dem spezifischen Nachweis von Makromolekülen, wie z.B. Proteinen, Polysacchariden und Lipiden, mittels Antikörpern kommt eine zentrale Bedeutung in der Medizin und der Forschung zu. Dort werden sie unter anderem in der Tumordiagnostik, Genforschung und Pathologie eingesetzt (Mulisch et al., 2010).

Für den histochemischen Nachweis eines bestimmten Antigens werden spezifische Antikörper aus Tieren gewonnen und für die licht- oder elektronenmikroskopische Darstellung an einen Marker gekoppelt. Häufig verwendete Markersubstanzen sind Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Enzyme wie Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase) oder elektronendichtes kolloidales Gold. Letzteres wird insbesondere für die Elektronenmikroskopie verwendet (Sinowatz und Hees, 2012).

Durch die Umsetzung eines geeigneten Substrates in ein farbiges Endprodukt werden die sehr häufig verwendeten enzymgekoppelten Antikörper sichtbar (Mulisch et al., 2010).

Ein schnelleres immunhistochemisches Verfahren ist die sogenannte direkte Methode, bei der sich der markierte Antikörper direkt an das Antigen bindet. Wesentlich häufiger wird dagegen die indirekte Methode verwendet, bei der zunächst ein unmarkierter Primärantikörper an das gesuchte Antigen bindet. In einem zweiten Schritt wird diese Bindung durch einen gegen den Primärantikörper gerichteten, markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht (Sinowatz und Hees, 2012).

Durch diese mehrfache Bindung kommt es zu einer Signalverstärkung. Dies macht die indirekte Methode wesentlich sensitiver als die direkte. Eine weitere Signalverstärkung kann man durch die (Strept-)Avidin-Biotin- oder ABC-Technik erreichen. Diese Methode ist sehr sensitiv und macht es möglich auch geringe Antigenmengen zu lokalisieren. Sowohl das aus Hühnereiweiß gewonnene Avidin als auch das Streptavidin, ein Protein aus *Streptomyces avidinii*, haben eine hohe Affinität für Biotin. Durch

Mischung von Streptavidin oder Avidin mit einem biotinylierten Marker entsteht ein (Strept-)Avidin-Biotin-Enzymkomplex der nach der Antikörperinkubation an den biotinylierten Antikörper bindet (Mulisch et al., 2010).

## B. Antigene Strukturen

Von den antigenen Strukturen in Geweben und Zellen eignen sich für die immunhistochemische Untersuchung besonders die Intermediärfilamente aus der Gruppe der komplexen Proteinstrukturen des Zytoskeletts. Die Intermediärfilamente bilden neben den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten die dritte Hauptkomponente des Zytoskeletts. Im Gegensatz zu den zwei anderen, sich ständig im Umbau befindlichen kugelförmigen Komponenten des Zytoskeletts, sind die Intermediärfilamente permanent stabile Strukturelemente aus fadenförmigen Protein-Untereinheiten (Liebich, 2010; Wendl, 2012) mit einem Durchmesser von 10 nm (Alberts et al., 2011).

Die Intermediärfilamente werden in zelltypspezifischer, und somit auch gewebsspezifischer, Weise exprimiert und eignen sich deshalb besonders gut zur Identifizierung bestimmter Zellarten (Heinrich et al., 2014).

Bei den Intermediärfilamenten lassen sich sechs Typen unterscheiden (Wendl, 2012). Typ I und II umfassen die Zytokeratine. Wobei zu Typ I die Zytokeratine (CK) 9-28 und 31-40 gehören und zu Typ II CK 1-8, 71-74 und 81-86 (Schweizer et al., 2006; Kim und Coulombe, 2007). Beide Typen werden vor allem in einfachen Epithelien und epidermalen Zellen gefunden. Fuchs und Coulombe (1992) sowie Fuchs und Weber (1994) haben nachgewiesen, dass Zytokeratine paarweise auftreten und je aus einem Typ I und einem Typ II Keratin bestehen.

Zu den Intermediärfilamenten vom Typ III gehören Vimentin und Desmin. Ersteres ist in Zellen mesenchymalen Ursprungs zu finden und letzteres in Muskelzellen (Kim und Coulombe, 2007). Bei den Typ IV Filamenten handelt es sich hauptsächlich um Bestandteile des Nervensystems und Typ V sind die Lamine (Lamin B1, B2, A und C), die nicht im Zytoplasma sondern im Zellkern vorkommen (Fuchs und Weber, 1994; Kim und Coulombe, 2007). Zu Typ VI zählen die Intermediärfilamente Phakinin und Filensin, die nur in der Linse des Auges vorkommen (Kim und Coulombe, 2007; Wendl, 2012).

Die kleinen Mikro- oder Aktinfilamente mit einem Durchmesser von 5-9 nm legen die Form der Zelloberfläche fest und sind hauptsächlich direkt unter der Oberfläche der Plasmamembran der Zellen zu finden (Alberts et al., 2011). Die Aktinfilamente

verleihen der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran Festigkeit und Form. Teilweise bilden die Aktinfilamente dynamische Strukturen, die eine Zelle zur eigenen Bewegung nutzen kann. Dabei kann das Aktin-Zytoskelett rasch auf- und wieder abgebaut werden (Alberts et al., 2011).

Das Protein Aktin kann in „ $\alpha$ -smooth-muscle-actin“, „ $\gamma$ -smooth-muscle-actin“ (glatte Muskelzellen), „ $\alpha$ -skeletal-actin“ (Skelettmuskelzellen) und „ $\alpha$ -cardiac-actin“ (Herzmuskel) unterschieden werden (Vandekerckhove und Weber, 1981). " $\alpha$ -smooth muscle actin" ( $\alpha$ -SMA) ist vorwiegend in kontraktile Zellen zu finden und eignet sich deshalb sehr gut als Marker für glatte Muskelzellen (Skalli, 1986; Skalli et al., 1989).

### C. Antigene Strukturen in der Leber

Immunhistochemische Untersuchungen an der Leber befassen sich oftmals nur mit einzelnen Zellen des Leberparenchyms und beschreiben für diese die Bindung verschiedener Antikörper.

Für die Ito- oder Sternzellen haben Handharyani et al. (2001) mittels der oben beschriebenen ABC-Technik Bindungsstellen für Vimentin, Desmin, „mouse anti-muscle-actin“ (HHF35) und Zytokeratine mit hohem und mit niedrigem Molekulargewicht nachgewiesen. Liebich (2010) beschrieb die Ito-Zellen als Abkömmlinge undifferenzierter Mesenchymzellen des embryonalen Septum transversum mit kontraktile Eigenschaften durch die Einlagerung von Desmin und Actin. Miyazaki et al. (1986) haben, bei ihren Untersuchungen zu den Sternzellen in verschiedenen Wirbeltierlebern, für die Wachtel und eine Finkenunterart eine positive Reaktion mit dem Desmin-Antikörper entlang der Sinusoidwand in Form von sternförmigen Zellen mit fingerförmigen Fortsätzen festgestellt. Beim erwachsenen Huhn konnten Fujimoto und Singer feststellen, dass neben den Ito-Zellen auch die Endothelzellen für Desmin positiv reagieren (Fujimoto, 1986; Fujimoto und Singer, 1987).

Bei Ratten haben Yokoi et al. (1984) als Erste das Zytoskelett der Sternzellen untersucht. Dabei fanden sie in diesen das Intermediärfilament Desmin, indem sie einen polyklonalen Antikörper gegen Hühnermagen-Desmin benutzten, der mit „Horse-Radish-Peroxidase,, markiert wurde. Sie beschrieben die gefundenen Zellen als spindelförmig mit einem dunkelbraunem Zytoplasma und lichtdurchlässigen Fettvakuolen. Später bestätigten Tsutsumi et al. (1987) sowie Rockey et al. (1992) das Vorhandensein von Desmin in den Sternzellen der Leber bei der Ratte.

Durch die Eigenschaft der Sternzellen Desmin zu binden, kann dieses als Marker genutzt werden, um die Sternzellen im Lichtmikroskop darzustellen (Burt et al., 1986).

Auch Kiassov et al. (1995) benutzten Desmin in Kombination mit  $\alpha$ -SMA als Marker für Ito-Zellen, da diese unter bestimmten Bedingungen  $\alpha$ -SMA enthalten (Tsukada et al., 2006). Bei Untersuchungen an Broilern konnten Ochiai et al. (2002) feststellen, dass zwei unterschiedliche Typen von Sternzellen vorliegen. Der eine Typ, der oft in fibrosiertem Gewebe und seinem Umfeld vorkommt, reagiert stark mit „mouse anti-muscle-actin“ (HHF35) und Desmin. Der zweite Typ zeigt eine starke Reaktion mit HHF35 und mit GFAP („glial fibrillary acidic protein“) sowie eine schwache mit Desmin. Dieser Typ ist im Bereich der nicht-fibrosierten Perisinusoidalräume zu finden. Beide Zelltypen zeigen eine Bindungsaffinität zu Vimentin.

Keine Reaktion zeigt sich mit dem Desmin-Antikörper in den Hepatozyten der Rattenleber. Dafür reagiert dieser im Lebertrias positiv mit den glatten Muskelzellen der Tunica media der Portalvene, der Leberarterie und der größeren Äste der Lebervene. Diese Gefäßstrukturen sind anders als die Parenchymzellen auch positiv für  $\alpha$ -SMA (Kiassov et al., 1995).

Fujimoto (1986) konnte in den von-Kupffer-Zellen nur Vimentin, aber kein Desmin nachweisen. Die Ito-Zellen sind nicht nur Desmin-positiv, sondern enthalten auch Vimentin (Fujimoto und Singer, 1987).

Ochiai et al. (2002) konnten beim Broiler in den glatten Muskelzellen der Gefäße „mouse anti-muscle-actin“ (HHF35), Vimentin und Desmin nachweisen. Fujimoto (1986) hat in Untersuchungen nachgewiesen, dass die Endothelzellen der Venae interlobulares Desmin-positiv und Vimentin-negativ und die der Arteriae interlobulares Vimentin-positiv und Desmin-negativ sind. In einer späteren Untersuchung von Handharyani et al. (2001) für die Gefäßendothelien waren alle der mittels der oben beschriebenen ABC-Technik untersuchten Bindungsstellen für Vimentin, Desmin, HHF35 und Zytokeratine mit hohem und mit niedrigem Molekulargewicht negativ. Für die Cholangiozyten beim Huhn waren die von Handharyani et al. (2001) mittels der ABC-Technik untersuchten Bindungsstellen für Vimentin, Desmin, HHF35 und Zytokeratine mit hohem und mit niedrigem Molekulargewicht negativ.

In den sekretorischen Epithelien der Leber finden sich hauptsächlich die Zytokeratine (CK) 8 und 18 sowie 19 (Omary und Ku, 1997). Zytokeratin 8 zeigt eine stark positive Reaktion in den Epithelzellen der Ductus interlobulares und Ductuli biliferi der Ratte (Sanzen et al., 1995). Auch in den Hepatozyten und in Zellen der Glisson-Kapsel ist CK 8 positiv (Blouin et al., 1992). Zytokeratin 14 positive Zellen zeigen sich in der Leber der Ratte in allen Teilen, aber vor allem im Portalbereich und der

Glisson-Kapsel. Im ersteren Bereich zeigen sich alle CK 14 positiven Zellen negativ für Vimentin, während die positiven Zellen in der Glisson-Kapsel auch Vimentin positiv sind. Die Hepatozyten sind in allen Bereichen der Leber negativ für CK 14. Die Gallengangsepithelzellen sind nicht alle positiv für CK 14, meist finden sich die positiv reagierenden Zellen im Portalbereich (Blouin et al., 1992). Die Hepatozyten der Leber der Ratte und der Maus enthalten neben CK 8 auch CK 18 (Blouin et al., 1992; Fickert et al., 2009), sind aber negativ für CK 14 und CK 5 (Blouin et al., 1992). Deshalb benutzten Kiassov et al. (1995) in ihrer Untersuchung CK 8 und CK 18 als Marker für Hepatozyten.

## 2.5.2 Glykohistochemie

### A. Definition und Vorkommen

Im 19.ten Jahrhundert hat Hermann Stillmark erstmals aus Samen von *Rizinus communis* eine toxische Substanz gewonnen, die er Rizin nannte und die die Eigenschaft besaß Erythrozyten zu agglutinieren (H. J. Gabius, 2009: Kapitel 15). Damit war der Grundstein in der Lektinforschung gelegt und es wurden in den folgenden Jahren weitere Lektine, sogenannte Phythämagglutinine, entdeckt. Landsteiner, der schon die AB0-Blutgruppen des Menschen charakterisierte, zeigte später, dass Lektine Proteine sind (Franz, 1990; Rüdiger und H. J. Gabius, 2001). Boyd und Shapleigh (1954) prägten den Namen Lektine, welcher sich vom lateinischen „legere“, auswählen, ableitet. In den folgenden Jahren definierte Goldstein et al. (1980) die Lektine als zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nicht-immunogenen Ursprungs die Zellen agglutinieren und/oder Glykokonjugate präzipitieren. Leider reicht diese Definition heute nicht mehr aus um ein Lektin zu beschreiben. Deshalb definierten Rüdiger und H. J. Gabius (2001) drei eindeutige Voraussetzungen, die ein Lektin gleichzeitig erfüllen muss. Zum Einen ist ein Lektin ein (Glyko)protein, das Kohlenhydrate bindet. Des Weiteren werden Lektine von den Immunglobulinen abgegrenzt, da sie selbst keinen Stimulus benötigen, um gebildet zu werden. Als letzte Bedingung für die Lektine ist zu nennen, dass sie die Kohlenhydrate mit ihrer Bindung nicht biochemisch verändern. Damit sind Enzyme wie Glykosidasen oder Glykosyltransferasen ausgeschlossen..

Die Lektine kommen in unterschiedlicher Konzentration in Pflanzen, Pilzen, Mikroorganismen (Roth, 2011), Tieren und Menschen vor (H. J. Gabius, 2009). Die

größte Quelle für die Lektine sind die Pflanzen und bei diesen vor allem die Samen. Aber auch in den Knollen, Wurzeln und Blättern werden Lektine gefunden (Rüdiger und H. J. Gabius, 2001). Mehr als die Hälfte aller bisher beschriebenen Lektine aus Pflanzen stammen aus Leguminosen (H. J. Gabius, 2009: Kapitel 18), die diese unter anderem als sogenannte Erkennungsproteine nutzen, um stickstofffixierende Bakterien der Gattung *Rhizobium* an sich zu binden (Rüdiger, 1981). Des Weiteren nutzen die Pflanzen wie z.B. *Ricinus communis* Lektine um sich gegen Fressfeinde und Pilze zu schützen (Rüdiger und H. J. Gabius, 2001).

Aufgebaut sind die Lektine in der Regel aus mehreren Protein-Untereinheiten, welche wiederum aus den üblichen Proteinamino­säuren bestehen. Die meisten der Lektine sind Glykoproteine und enthalten zu mind 5 % Monosaccharide. Wenige Ausnahmen sind z.B. Concanavalin A und das Weizenkeim-Lektin WGA, die kohlenhydratfrei sind (Rüdiger, 1978).

## B. Anwendung und Technik

Auch heute noch finden die Lektine Anwendung in der Medizin bei der Blutgruppendiagnostik, aber auch zur Analyse des normalen und pathologischen Kohlenhydratmusters von Zellen (Mulisch et al., 2010). Auch als Zellmarker zu diagnostischen Zwecken einschließlich der Erkennung von Infektionserregern wie Viren, Bakterien und Pilzen werden sie genutzt (Rüdiger und H. J. Gabius, 2001). Durch die gute Verfügbarkeit einer Vielzahl von Lektinen mit verschiedenen Kohlenhydrat-Spezifitäten werden diese heute in der Wissenschaft zur Identifizierung von Zellen verwendet (Lis und Sharon, 1986). In der Zellforschung dienen sie als Modells­substrat für Studien über Zellaggregation und -adhäsion (Rüdiger und H. J. Gabius, 2001). Des Weiteren werden sie in der Zellforschung als Sonden in verschiedenen Analysetechniken, wie Zelltypisierung und -sortierung, Geldiffusionstechniken und Affinitätsreinigung, und im morphologischen Bereich in der Lektin­histochemie verwendet (Mulisch et al., 2010: s. 233ff.). Für die Detektion von Glykanen in Zellen und Geweben mittels Licht- oder Elektronenmikroskopie werden die Lektine mit einem Marker versehen, ähnlich wie Antikörper in der Immunhistochemie. Dieser Marker kann ein Enzym oder ein Fluoreszenzfarbstoff sein, oder es werden biotinylierte (mit Biotin markierte) Lektine verwendet. Diese verbinden sich wiederum mit Avidin oder Streptavidin, an das ein Marker gekoppelt ist (Mulisch et al., 2010: s. 233).

### C. Einteilung der Lektine und dazugehörige Zuckerspezifitäten

Laut Roth (2011) ist es möglich die Lektine entsprechend ihrer nominalen Zuckerspezifität in Gruppen einzuteilen. Debray et al. (1981) zeigten in ihrer Untersuchung über die Spezifität von zwölf Lektinen, dass die stärksten spezifischen Hemmzucker für ein bestimmtes Lektin nicht zwingend die tatsächlichen Zelloberflächenglykokonjugate repräsentieren müssen, an welche dieses Lektin bindet.

Zu den Glucose/Mannose bindenden Lektinen gehören ConA, LCA und PSA. ConA bindet an  $\alpha$ -Mannopyranosyl und  $\alpha$ -Glucopyranosyl (Soares et al., 2011) und hat die höchste Affinität zu Mannose (Hardman und Ainsworth, 1976). LCA bindet am stärksten an Mannose-präsentierende Strukturen mit einem Fucoserest in  $\alpha$ -1,6-glykosidischer Bindung (Roth, 2011).

PNA zeigt eine Zuckerspezifität für Galaktose (Henry, 1995) und Gal $\beta$ (1-3)GalNAc (Lotan et al., 1975), aber seine Bindung an diesen Liganden kann durch die Anwesenheit von Neuraminsäure verhindert werden (Lotan et al., 1975). Das zweite verwendete Lektin aus der Gruppe der Galaktose-bindenden Lektine, RCA, erkennt  $\beta$ -D-Galaktose Reste (Nicolson, Blaustein und Etzler, 1974; Takahashi und Howes, 1986). Nicolson und Blaustein (1972) konnten außerdem für RCA-II eine starke Affinität für N-Acetyl-D-Galaktosamin nachweisen.

Zu den L-Fucose bindenden Lektinen gehört das hier verwendete UEA-I (Henry, 1995). Dieses zeigt eine stärkere Affinität zu  $\alpha$ -L-Fucose als zu deren  $\beta$ -Anomeren (H. J. Allen et al., 1977).

Das stark basische (Monsigny, Sene et al., 1979) WGA bindet an N-acetyl-glucosamine (Burger und Goldberg, 1967; A. K. Allen et al., 1973) und zeigt außerdem, im Gegensatz zu dem succinylierten WGA (Monsigny, Sene et al., 1979; Monsigny, Roche et al., 1980), eine Bindungsaffinität zu N-Acetyl-Neuraminsäure (Greenaway und Levine, 1973). DBA bindet an N-Acetylgalaktosamin mit einer Präferenz für N-Acetylgalaktosamin- $\alpha$ (1,3)-N-Acetylgalaktosamin-Gruppen, SBA zeigt die stärkste Bindungsaffinität für  $\alpha$ - und  $\beta$ -N-Acetyl-D-Galaktosamin (Hammarstrom et al., 1977; Henry, 1995).

Die Lektine PHA-E und PHA-L binden beide in ähnlicher Weise an komplexe Oligosaccharide, deren Galaktose-Reste eine wichtige Rolle in dieser Verbindung spielen (Cummings und Kornfeld, 1982). MAA-I zeigt ebenfalls eine Affinität für Oligosaccharide mit  $\alpha$ -2,3-gebundener Neuraminsäure (Wang und Cummings, 1988; Roth, 2011).

Die folgende Tabelle 2.1 zeigt eine nach Rüdiger (1978); Monsigny, Roche et al. (1980); Rüdiger (1981); Spicer und Schulte (1992); Rüdiger und H. J. Gabius (2001); H.-J. Gabius et al. (2004); H. J. Gabius (2009) sowie Habermann et al. (2011) modifizierte Einteilung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzenlektine.

Tabelle 2.1 Lektine

Zuckerbindungs-spezifität	Herkunft des Lektins	Name des Lektins	Abk.
Mannose/Glukose	Canavalia ensiformis (Jackbohne)	Concanavalin Agglutinin	ConA
	Lens culinaris (Linse)	Lens culinaris Agglutinin	LCA
	Pisum sativum (Gartenerbse)	Pisum sativum Agglutinin	PSA
Galaktose	Arachis hypogaea (Erdnuss)	Peanut Agglutinin	PNA
	Ricinus communis (Rizinusbohne)	Ricinus communis Agglutinin	RCA
L-Fucose	Ulex europaeus (Stechginster)	Ulex europaeus Agglutinin	UEA-I
N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure	Triticum vulgare (Weizen)	Wheat germ Agglutinin	WGA
	Triticum vulgare (Weizen)	Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs
N-Acetyl-Galaktosamin	Dolichos biflorus (Afrik. Pferdebohne)	Dolichos biflorus Agglutinin	DBA
	Saphora japonica (Chin. Schnurbaum)	Saphora japonica Agglutinin	SJA
	Griffonia simplicifolia (Afrik. Schwarzbohne)	Griffonia simplicifolia Agglutinin-I	GSL-I
	Glycine max (Sojabohne)	Soybean Agglutinin	SBA
	Sambucus nigra (Schwarzer Holunder)	Sambucus nigra Agglutinin	SNA
kein Monosaccharid als Li- gand bekannt	Maackia amurensis (Asiatisches Gelbholz)	Maackia amurensis Agglutinin	MAA-I
	Phaseolus vulgaris (Gartenbohne)	Phaseolus vulgaris Erythro-Agglutinin	PHA-E
	Phaseolus vulgaris (Gartenbohne)	Phaseolus vulgaris Leuko-Agglutinin	PHA-L

#### D. Lektinbindungsstellen in der Leber

Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen hängen von verschiedenen Faktoren ab. Witt und Klessen (1989) erzielten gute Ergebnisse der Lektinbindung nach der Fixierung der Proben in einer Bouin-Lösung. Murnane et al. (1989) berichteten für die Lektine RCA-I, DBA und SBA von einem unterschiedlichen Reaktionsmuster bei Gefrier- oder Paraffinschnitten. Bernard et al. (1982) konnten bei Untersuchungen an Hühnerembryonen keine Veränderungen der Bindungsreaktionen abhängig von der Versuchstemperatur feststellen.

Die Lektinhistochemie wird in der Leber zur Analyse der Zuckerstrukturen der verschiedenen Zellen derselben eingesetzt. Für das Lektin ConA konnten Bernard et al. (1982) eine positive Reaktion mit embryonalen Fibroblasten des Huhnes feststellen. Auch mit Kollagen, Retikulin und Basalmembranen der Maus (Kiernan, 1975) und Plasmamembranen in der Leber der Ratte (Chandramouli et al., 1977) findet eine positive Reaktion statt. Ebenso zeigt sich eine positive Reaktion von WGA mit den Plasmamembranen der Leber gesunder Ratten (Chandramouli et al., 1977). Kawakami und Hirano (1984) konnten bei Untersuchungen zu den Bindungsstellen auf Plasmamembranen der Leberzellen der Ratte keine Bindung mit UEA-I und PNA nachweisen. Auch beim Schaf reagiert ConA, ebenso wie UEA-I, positiv mit Strukturen der Leber. DBA und SBA dagegen verhalten sich negativ (Murnane et al., 1989).

Ausführliche Untersuchungen sind über die Bindung von Lektinen an Strukturen in der Leber von Maus und Ratte gemacht worden. Bei der Ratte (Kawakami und Hirano, 1984; McMillan et al., 1988) wird von einer starken bis sehr starken Bindung von ConA an die Oberfläche der Hepatozyten berichtet. Kawakami und Hirano (1984) verwendeten dabei Ferritin-fixiertes ConA, dass sowohl an die sinusoidale als auch an die biliäre Oberfläche der Hepatozyten bindet.

Auch für RCA und WGA konnten Kawakami und Hirano (1984) bei der Ratte eine Bindung an die Hepatozytenoberfläche nachweisen. Am stärksten fällt die Reaktion für beide Lektine auf der biliären Seite der Hepatozyten aus (McMillan et al., 1988). WGAs, welches ausschließlich  $\beta$ -NAc-Glukosamin-Gruppen bindet, bleibt dagegen auf der Hepatozytenoberfläche negativ bei (McMillan et al., 1988). WGA wird vermutlich hauptsächlich durch Reste der Sialinsäure gebunden (McMillan et al., 1988). Beim Schaf fällt die Reaktion mit RCA in formalinfixierten Proben ebenso wie die Bindung an PNA und WGA negativ aus (Murnane et al., 1989).

Für die Ratte existieren unterschiedliche Ergebnisse zu den Bindungsstellen von DBA an die Endothelzellen der Lebersinusoiden und an die Hepatozyten. Bei McMillan et al. (1988) bindet DBA nicht an die genannten Zellen, wohingegen Kawakami und Hirano (1984) feststellten, dass DBA an die Oberfläche der Endothelzellen und auf der sinusoidalen Seite an die Zellmembran der Hepatozyten bindet. Erstere vermuten, dass diese unterschiedliche Reaktion mit den verschiedenen verwendeten Lektinkonzentrationen zusammenhängt.

Darüber hinaus konnten McMillan et al. (1988) für PHA eine starke bis sehr starke und für LCA eine starke Reaktion mit den sinusoidalen Zellwandabschnitten der Hepatozyten nachweisen. LCA band außerdem schwach an die interzellulären Flächen, während sich mit der biliären Seite keine Reaktion zeigt.

Das Zytoplasma der Hepatozyten reagiert positiv mit PSA, WGA, UEA-I. Eine schwache Reaktion zeigt es mit DBA und RCA-I und keine Reaktion wird mit PNA, SBA und WGAs erreicht (Witt und Klessen, 1989).

SBA war bei McMillan et al. (1988) auch negativ auf der Oberfläche der Hepatozyten. Dagegen konnten Kawakami und Hirano (1984) eine Bindung von SBA an die Mikrovilli der sinusoidalen Seite der Hepatozyten nachweisen.

Für FITC-markiertes ConA kann eine positive Reaktion mit Glykogen in der Leber der Maus nachgewiesen werden (Kiernan, 1975).

Witt und Klessen (1989) haben Bindungsstellen verschiedener Lektine in den Canaliculi biliferi und den Ductuli biliferi untersucht. Sie konnten keine Bindung von PSA an die Epithelzellen der Canaliculi biliferi, aber eine schwache an die der Ductuli biliferi feststellen.

SBA und PNA reagieren bei der Ratte nicht mit den Canaliculi biliferi und erst nach Neuraminidasevorbehandlung mit den Ductuli biliferi (Witt und Klessen, 1989). Ein ähnliches Bindungsverhalten beobachteten auch Sanzen et al. (1995), bei denen sich nach Neuraminidasebehandlung eine starke Bindungsaffinität an die luminale Oberfläche der Epithelzellen der Canaliculi biliferi und der Ductuli biliferi sowie eine positive Reaktion mit dem Zytoplasma derselben zeigte. Ohne Neuraminidase bleibt die Bindung von SBA und PNA aus.

Witt und Klessen (1989) wiesen keine Bindung von DBA und UEA-I mit den Epithelzellen der Canaliculi biliferi und den Ductuli biliferi nach, wohingegen sich bei den Untersuchungen von Sanzen et al. (1995) eine positive Reaktion des Zytoplasmas der Ductus interlobularis und Ductulus biliferus Epithelzellen mit UEA-I zeigt.

DBA ist auch in dieser Untersuchung negativ für die Epithelzellen der untersuchten Gallengänge.

Für WGA und WGAs konnten Witt und Klessen (1989) eine deutliche Reaktion in den Canaliculi biliferi feststellen. In den Ductuli biliferi erhielten sie dagegen nur eine schwache Reaktion für WGAs und keine Bindung an WGA. Auch Sanzen et al. (1995) konnten eine schwach positive Reaktion mit WGAs im Zytoplasma der Zellen der Ductuli biliferi und in den Ductus interlobulares nachweisen. Dagegen zeigte sich in dieser Untersuchung auf der zum Lumen hin gerichteten Oberfläche dieser Zellen eine stark positive Reaktion mit WGAs.

Im Zytoplasma der Zellen der Ductus interlobulares und den Ductuli biliferi der Ratte konnten Sanzen et al. (1995) eine deutlich positive Reaktion mit ConA feststellen, während die luminale Oberfläche dieser Zellen nur schwach positiv reagiert.

Für das Lektin RCA-I wird von einer starken Reaktion in den Canaliculi biliferi, aber nur einer deutlichen in den Ductuli biliferi berichtet (Witt und Klessen, 1989).

In Muskelzellen von Hühnern und Wachteln binden SNA-I, MAA und WGA gleichermaßen an die Endothelzellen von Kapillaren, Arterien und Venen (Naňka et al., 2001). GSA-I (*Griffonia simplicifolia*) bindet nicht. In den Mikrogefäßen embryonaler Hühner zeigt RCA-I eine starke Bindungsaffinität an das Zytoplasma und die abluminale Oberfläche der Endothelzellen (Nico et al., 1998). Für WGA ist beim Huhn eine bevorzugte Bindung an die luminale Oberfläche der Endothelzellen festzustellen (Nico et al., 1998). Bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens verschiedener Lektine während der normalen Angiogenese beim Hühnerembryo konnten Henry (1995) verschiedene Zuckerstrukturen in den Kapillaren und den anschließenden Gefäßen finden. Neben Fucose, Galaktose und Neuraminsäure fanden sie auch N-Acetylglukosamin und -galaktosamin. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Angiogenese adulter Rinder. Dort finden sich an den Endothelzellen Mannose, N-Acetylglukosamine, Neuraminsäure und Galaktose (Augustin-Voss und Pauli, 1992). Bei einer Studie über die differierenden Lektin-bindungs-Muster in den Lebersinusoïden der Maus konnten Barberá-Guillem et al. (1991) feststellen, dass es in den Gefäßwänden der zu- und ableitenden Blutgefäße in der Leber keine Bindungsstellen für SJA, SBA, PNA und DBA gibt. Eine deutliche Bindung konnte mit ConA und RCA in allen Strukturen des Gefäßsystems der Maus erreicht werden. PHA-E, PSA und WGA haben bevorzugt Bindungsstellen in einem bestimmten funktionellen Abschnitt des Acinus.

Einige Untersuchungen befassen sich mit den Bindungsstellen der von-Kupffer-Zellen für verschiedene Lektine. In einer Arbeit von Witt und Klessen (1989) zeigte sich eine sehr starke Reaktion mit SBA und WGAs, eine deutliche mit RCA-I und PNA und eine schwache mit PSA. Alle diese Lektine banden erst nach Neuraminidasevorbehandlung. Keine Reaktion kann mit DBA, WGA und UEA-I erzielt werden. Murnane et al. (1989) erhielten für die von-Kupffer-Zellen der Schafsleber eine schwache Reaktion mit RCA-I und WGA.

Die Endothelzellen der Sinusoide in der Leber der Ratte reagieren sehr stark mit RCA-I und zeigen eine deutliche Bindungsaffinität zu WGA, PSA und WGAs (Witt und Klessen, 1989). McMillan et al. (1988) konnten eine starke Reaktion von RCA und WGA mit der Oberfläche der Endothelzellen feststellen. Bei der Untersuchung an Ratten konnten Masson et al. (1986) nachweisen, dass WGA außer an die Endothelzellen der Sinusoide nur noch in Gallengangszellen bindet. Kawakami und Hirano (1984) haben das Bindungsverhalten von RCA und WGA an die Endothelzell-Oberfläche genauer untersucht und konnten sowohl auf der sinusoidalen Seite als auch zum Dissé Raum hin eine positive Reaktion darstellen. Beim Schaf dagegen konnten Murnane et al. (1989) nur eine schwache Reaktion mit RCA-I und WGA feststellen. Mit PNA und SBA reagieren sie erst nach Neuraminidasevorbehandlung und für DBA und UEA-I kann keine Reaktion erzielt werden (Witt und Klessen, 1989). Kawakami und Hirano (1984) stellten eine positive Reaktion von SBA mit der Endothelzell-Plasmamembran fest, wohingegen McMillan et al. (1988) von einer negativen Reaktion berichteten.

Bei der Ratte wird von einer starken bis sehr starken Bindung von ConA an die Oberflächen von Endothelzellen berichtet (Kawakami und Hirano, 1984; McMillan et al., 1988). Außerdem zeigt LCA eine starke Bindungsaffinität an dieselben (McMillan et al., 1988).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten die Lebern von dreizehn frisch geschlachteten Afrikanischen Straußen (*Struthio camelus*) der Straußenfarm Donaumoos (Familie Engelhardt, Herdweg 2, 89340 Leipheim). Dort wurden sie gezüchtet, aufgezogen und geschlachtet. Von den dreizehn verwendeten Tieren im Alter von ca. 15 - 17 Monaten waren sieben männliche und sechs weibliche Tiere. Die Tiere zeigten keine Symptome einer Erkrankung und die Lebern erschienen makroskopisch unauffällig. Eine Übersicht der verwendeten Tiere ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

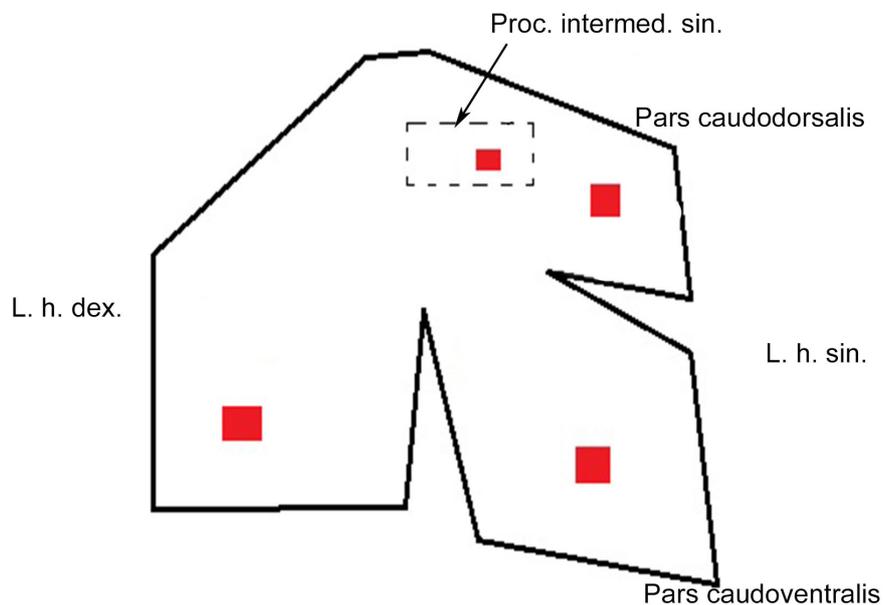
**Tabelle 3.1** Übersicht über die, für die Untersuchungen verwendeten, Strauße

Proben Nr.	Geschlecht	Fixierung	LM	EM	GHC	IHC
1	männlich	F + B	X		X	X
2	weiblich	F + B	X		X	X
3	männlich	F + B	X		X	X
4	männlich	F + B	X		X	
5	männlich	F + B	X		X	X
6	weiblich	F + B	X		X	X
7	weiblich	F + B	X			
8	männlich	F + B	X			
9	weiblich	B	X		X	X
10	weiblich	F + B	X		X	X
11	männlich	-		X		
12	männlich	-		X		
13	weiblich	-		X		

Nr.: Nummer; LM: Lichtmikroskopie; EM: Elektronenmikroskopie;  
GHC: Glukohistochemie; IHC: Immunhistochemie

## 3.2 Probenentnahme und Fixierung

Nach elektrischer Betäubung und Ausblutung durch Hals- und Herzstich wurden die Tiere gerupft und im Zuge der Dekapitation gehäutet. Unmittelbar darauf erfolgte das Eröffnen der Körperhöhle und die Entnahme der inneren Organe. Nach der Entfernung des Magen-Darm-Traktes erfolgte die Entnahme der Lebern aus dem Schlachttierkörper. Daraufhin wurden bei jeder Leber an vier verschiedenen Stellen Gewebewürfel der Kantenlänge  $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$  entnommen. Eine schematische Übersicht der Probenentnahmestellen ist der Abbildung 3.1 zu entnehmen.



**Abb. 3.1** Probenentnahmestellen, Leber, Strauß, skizziert  
 L. h. dex: Lobus hepatis dexter; L. h. sin.: Lobus hepatis sinister;  
 Proc. intermed. sin.: Processus intermedius sinister

Die Proben für die lichtmikroskopischen, glykohistochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Probenbehälter mit Bouin'scher Lösung (gesättigte wässrige Pikrinsäure : Formalin 37% : Eisessig im Verhältnis 15:5:1) und 3,7%igem,

PBS-gepuffertem Formalin verbracht (Mulisch et al., 2010) und 24 Stunden bei Raumtemperatur immersionsfixiert. Die genaue Zusammensetzung der Fixierungs- und Einbettungsmedien sowie aller anderen im Laufe der Arbeit erwähnten Lösungen, Puffer und Chemikalien sowie deren Herstellungsfirmen befinden sich unter Kapitel 11., *Anhang*.

Die in Bouin'scher Lösung fixierten Gewebelöcke wurden danach in 70 %igem Alkohol verbracht. Letzterer wurde zusätzlich drei Mal alle 24 Stunden erneuert. Am folgenden Tag wurden die Proben nochmals auf eine Kantenlänge von ca.  $0,5 \times 0,5 \times 0,5 \text{ cm}^3$  zugeschnitten, in kleine Einbettkassetten (TissueTek<sup>®</sup>, Firma Sakura, Staufen) verbracht und nochmals für 24 Stunden in 70 %igem Alkohol auf dem Rüttler gelagert.

Das Formalin in den Gefäßen der Gewebeproben wurde am folgenden Tag und weiteren drei Tagen mit 3,7 %igem Formalin erneuert. Dazwischen wurden die Proben auf dem Rüttler gelagert. Anschließend wurden die Proben auf eine Kantenlänge von ca.  $0,5 \times 0,5 \times 0,5 \text{ cm}^3$  zugeschnitten, eingekapselt (siehe Bouin'sche Lösung) und nochmals in PBS-gepufferte Formalin-Lösung eingelegt. Darauf folgte die Auswaschung des Fixans mittels DEPC-Wasser und 70 %igem Alkohol. Dazu wurden die Proben zunächst drei Mal alle 40 Minuten in frisches DEPC-Wasser und danach drei Mal alle 40 Minuten in frischen 70 %igem Alkohol verbracht.

Anschließend wurden die Einbettkassetten mit den Proben für 22,5 (Formalin) bzw. 24 (Bouin) Stunden zur Einbettung in je einen Einbettautomaten (*Shandon Citadel 2000*, Firma Shandon, Frankfurt) gebracht. Dort wurden sie zunächst mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 80 %iger Alkohol, 2 x 96 %iger Alkohol, 2-3 x Isopropanol und 3 x Xylol; genaue Verweildauer in den einzelnen Alkoholen siehe Tabellen 3.2 und 3.3) dehydriert und anschließend mit 56 °C warmem, flüssigem Paraplast<sup>®</sup> (*Monoject Scientific Inc. Kildare, Irland*) durchtränkt.

**Tabelle 3.2** Verweildauer in der aufsteigenden Alkoholreihe, Bouin

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

**Tabelle 3.3** Verweildauer in der aufsteigenden Alkoholreihe, Formalin

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

An das Durchlaufen der Einbettautomaten schloss sich in beiden Fällen das Ausblocken der Präparatewürfel mit Hilfe des Ausblockautomaten Histostat Tissue Embedding Center<sup>®</sup> (Firma Reichert-Jung, Wien) an. Dazu wurden Metallformen aus dem Wärmeschrank entnommen, die Proben mit einer Pinzette vorsichtig aus ihren Plastikkapseln herausgelöst, zentral in die Metallformen gelegt und mit flüssigem Paraplast<sup>®</sup> aufgefüllt. Darauf wurden zu Kennzeichnung die beschrifteten Hälften der Einbettkassetten gelegt. Die Metallform wurde ca. eine Stunde auf eine Kälteplatte gestellt bis das Paraplast erstarrt war und die fertigen Paraffinblöcke aus den Formen gelöst werden konnten.

Die Probenblöcke wurden am Rotationsmikrotom Mikrom<sup>®</sup> Typ HM340E (*Firma Leitz, Wetzlar*) mit einer Schichtdicke von  $5\ \mu\text{m}$  geschnitten und je nach Verwendungszweck auf unbeschichtete (SuperFrost<sup>®</sup>, *Carl Roth Karlsruhe*) oder beschichtete (SuperFrost Ultra Plus<sup>®</sup>, *Menzel-Gläser Braunschweig*) Objektträger aufgetragen. Diese Objektträger wurden zunächst für zehn Minuten auf einer Wärmeplatte (*Firma Medax*) bei  $40\ ^\circ\text{C}$  angetrocknet. Anschließend folgte eine mindestens 24 Stunden dauernde Trocknungszeit im Wärmeschrank (*Firma Bender & Hobein, Karlsruhe*), bei ca.  $37\ ^\circ\text{C}$ .

### 3.3 Konventionelle histologische Färbungen für die Lichtmikroskopie

Für die fünf verschiedenen verwendeten Übersichtsfärbungen wurden Schnitte von zehn Tieren verwendet. Zur Vorbereitung für alle Färbungen wurden diese in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die genauen Verweildauern sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen. Nach der Färbung wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (in umgekehrter Reihenfolge) wieder dehydriert. Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt<sup>®</sup> Quick Hardening Mounting Medium (*Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim*) und dünnen Deckglasplättchen (*Roth, Karlsruhe*) eingedeckelt und dadurch langfristig fixiert. Anschließend wurden sie in Objektträgerkästen dunkel aufbewahrt.

**Tabelle 3.4** Vorbereitung der Proben in einer absteigenden Alkoholreihe

	<b>Alkohol</b>	<b>Verweildauer</b>
1.	Xylol	10 Min
2.	Xylol	10 Min
3.	Isopropanol	kurz schwenken
4.	Isopropanol	kurz schwenken
5.	96 %iger Alkohol	kurz schwenken
6.	70 %iger Alkohol	kurz schwenken
7.	A. dest.	10 Min

Die einzelnen Färbungen wurden nach Protokollen aus „Romeis Mikroskopische Technik“ (Mulisch et al., 2010) durchgeführt.

Die Untersuchung und Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte unter dem Lichtmikroskop Leitz Aristoplan<sup>®</sup> (*Leitz, Wetzlar*). Die Erstellung von digitalen Fotoaufnahmen erfolgte mit Hilfe der, an das Mikroskop angeschlossenen, Kamera Lumenera USB Camera<sup>®</sup> Release 3.8 (*Lumenera Corporation, Ottawa, Ontario Canada*).

### 3.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die wichtigste Färbung in der Histologie um Übersichtsbilder des gewonnenen Gewebes zu erhalten. Durch den basischen Farbstoff Hämalalaun färben sich die Zellkerne, Knorpelgrundsubstanz und Bakterien blau-violett an, während durch den sauren Farbstoff Eosin das Zytoplasma der Zellen, Kollagenfasern und Erythrozyten in einem roten Farbton erscheinen (Vgl Mulisch et al., 2010: S.214; Sinowatz und Hees, 2012: S. 14).

In Tabelle 3.5 sind die einzelnen Schritte der HE-Färbung dargestellt:

**Tabelle 3.5** Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1.	Kernfärbung mit Hämalalaun	20 Min
2.	Abspülen mit Aqua dest.	kurz 1-2 mal durchschwenken
3.	Leitungswasser fließend	20 Min
4.	Eosin	10 Min
5.	Abspülen in Aqua dest.	kurz 1-2 mal durchschwenken

### 3.3.2 Trichromfärbung nach Masson und Goldner

Bei der Trichromfärbung nach Masson und Goldner werden durch Eisenhämatoxylin nach Weigert die Zellkerne blauschwarz gefärbt (Mulisch et al., 2010: S.204). Azophloxin verleiht dem Zytoplasma und der Muskulatur eine ziegelrote Farbe. Durch Phosphormolybdänsäure-Orange und Lichtgrün werden Erythrozyten orange-gelb sowie Bindegewebe und saure Mucine grün angefärbt (Mulisch et al., 2010: S. 216, 217).

**Tabelle 3.6** Trichromfärbung nach Masson und Goldner

1.	Eisenhämatoxylin nach Weigert (Zeit exakt einhalten!)	1 Min
2.	Abspülen mit Aqua dest. (3 separate Küvetten und jeweils gut spülen)	3 x
3.	Leitungswasser fließend	10 Min
4.	Azophloxin	5 Min
5.	1 %ige Essigsäure (gut ausspülen)	kurz durchschwenken
6.	Phosphormolybdänsäure-Orange (unter mikroskopischer Kontrolle entfärben)	15 Sek. - 30 Min.
7.	1 %ige Essigsäure (gut ausspülen)	kurz durchschwenken
8.	Gegenfärbung mit Lichtgrün	5 Min
9.	1 %ige Essigsäure (gut ausspülen)	kurz durchschwenken
10.	96 %iger Alkohol (2 separate Küvetten, kurz ausspülen)	2 x
11.	Isopropanol (3 separate Küvetten, kurz ausspülen)	3 x
15.	Xylol	5 Min
16.	Xylol	5 Min

### 3.3.3 Alcianblau-Färbung

Die Alcianblau 8GX Färbung wird verwendet um saure Muzine, Heparin und Glykosaminoglykane darzustellen. Durch den Phthalocyaninfarbstoff färben sich diese leuchtend blau an, während das Kernechtrot die Kerne hellrot und der Hintergrund zartrosa erscheinen lässt (Mulisch et al., 2010: S. 228). Zur Differenzierung zwischen Carboxyl- und Sulfatgruppen wird nach einer Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 nocheinmal dieselbe Färbung bei einem pH-Wert von 1,0 vorgenommen. Nur stark sulfatierte Muzine und Glykosaminoglykane färben sich in der Folge leuchtend blau.

**Tabelle 3.7** Alcianblau-Färbung bei pH 2,5

1.	3%ige Essigsäure	3 Min
2.	1% Alcianblau 8GX (in 3% Essigsäure, pH 2,5)	
3.	3%ige Essigsäure	kurz abspülen
4.	Aqua dest.	kurz abspülen
5.	Kernechtrot	3-5 Min
6.	Aqua dest.	kurz abspülen

**Tabelle 3.8** Alcianblau-Färbung bei pH 1,0

1.	0,1 N Salzsäure	3 Min
2.	1% Alcianblau 8GX (in 0,1 N Salzsäure, pH 1,0)	
3.	0,1 N Salzsäure	kurz abspülen
4.	Aqua dest.	kurz abspülen
5.	Kernechtrot	3-5 Min
6.	Aqua dest.	kurz abspülen

### 3.3.4 Perjodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion nach McManus, mit und ohne Amylase

Die PAS-Reaktion ist ein allgemeiner histochemischer Test zum Nachweis von Kohlenhydraten. PAS-positive Substanzen, wie Glykogen, Kollagen Typ III, Basalmembranen und Glykolipide, färben sich leuchtend rot (magenta, pink, violettrot).

Die  $\alpha$ -Amylase baut eventuell vorhandenes Glykogen ab und im Folgenden können von PAS-positiv-gefärbte Substanzen differenziert werden (Mulisch et al., 2010: S. 227, 228, 232).

**Tabelle 3.9** Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McManus

1.	0,5 % wässrige Perjodsäure	5 Min
2.	Aqua dest.	kurz spülen
3.	Schiff'sches Reagenz (Fuchsinschweflige Säure)	15 Min
4.	SO <sub>2</sub> -Wasser (3 separate Küvetten)	3x2 Min
5.	Leitungswasser fließend	5 Min
6.	Hämalaun (nur bei Bedarf, zur Kernfärbung)	3-5 Min
7.	Leitungswasser fließend (nur nach Hämalaun, ansonsten von 5. direkt zur aufsteigenden Alkoholreihe)	15 Min

Bei der PAS-Reaktion mit Amylasevorbehandlung wird wie oben beschrieben verfahren. Nach erfolgter Dehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe werden die Objektträger in feuchte Kammern gelegt und auf jeden Schnitt 100  $\mu$ l der 0,5 %igen Amylase pipettiert. Danach kommen die Feuchtkammern bei 37 °C für zehn Minuten in den Brutschrank. Mit Aqua dest. kurz abspülen und die PAS-Reaktion bei Punkt eins wieder fortsetzen.

## 3.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Durch die bei der Immunhistochemie angewendete Antigen-Antikörper-Komplexbindung können bestimmte Makromoleküle sehr genau und spezifisch innerhalb einer Zelle lokalisiert werden (Mulisch et al., 2010). In dieser Arbeit wurden alle immunhistochemischen Untersuchungen mittels der sehr sensitiven ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) nach Hsu et al. (1981) mit enzymgekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt. Das hier verwendete Enzym war Horseradish Peroxidase. Für die Untersuchungen wurden je verwendetem Antigen acht Bouin fixierte Schnitte auf unbeschichteten Objektträgern SuperFrost UltraPlus<sup>®</sup> ausgewählt. Avidin kann vier Moleküle Biotin binden und besitzt eine sehr hohe Bindungsaffinität zu demselben. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde Avidin durch Streptavidin, ein biotechnologisch aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnenes Produkt, ersetzt (Mulisch et al., 2010).

An den Komplex aus Primärantikörper und gesuchtem Antigen bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper. Dieser ermöglicht wiederum die Bindung eines ABC-Komplexes aus Streptavidin und einem biotinylierten Marker (HRP, Meerrettich-(Horseradisch) Peroxidase). Die Peroxidase spaltet das hinzugegebene Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in Wasser ( $H_2O$ ) und Sauerstoff ( $O_2$ ). Der Sauerstoff oxidiert das zugegebene 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB-Hydrogenperoxidlösung, *Firma Sigma-Adrich, Steinheim*) und es entsteht eine Braunfärbung der positiven Strukturen (Mulisch et al., 2010).

Parallel zu den zu untersuchenden Proben liefen je eine Negativ- und eine Positivkontrolle mit, um Rückschlüsse auf die Spezifität der Ergebnisse und eventuelle Fehler in der Methodik zu ziehen. Für die Negativkontrolle wurde jeweils ein Schnitt der auf das ausgewählte Antigen zu untersuchenden Probe verwendet. Dabei wurde dieser Schnitt statt mit der Primärantikörperlösung nur mit der Verdünnungslösung (Antibody Diluent, *Dako, Hamburg*) versehen und im weiteren Verlauf der Untersuchung genauso wie die anderen Schnitte behandelt. Bei den Positivkontrollen handelte es sich um bekanntermaßen positiv reagierende Gewebe.

**Tabelle 3.10** Labortechnische Daten der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

<b>Primär-AK</b>	<b>Verd.</b>	<b>Herkunft Hersteller</b>	<b>Sekundär-AK Verdünnung</b>	<b>Herkunft Hersteller</b>
Vimentin	1:500	Maus Dako	Anti Maus IgG 1:300	Kaninchen Dako
CK 8	1:500	Maus Novus Biologicals	Anti Maus IgG 1:300	Kaninchen Dako
K 14	1:100	Meerschweinchen Progen	Anti Meerschwein IgG 1:300	Ziege Vector
PanCK	1:100	Maus Biocarta	Anti Maus IgG 1:300	Kaninchen Dako
K 18	1:200	Meerschweinchen Progen	Anti Meerschwein IgG 1:300	Ziege Vector
K 19	1:200	Meerschweinchen Progen	Anti Meerschwein IgG 1:300	Ziege Vector
Desmin	1:200	Maus Gene Tex	Anti Maus IgG 1:300	Kaninchen Dako
$\alpha$ -SMA	1:40	Maus Dako	Anti Maus IgG 1:300	Kaninchen Dako

AK: Antikörper; Verd.: Verdünnung; CK: Zytokeratin; K: Keratin;  $\alpha$ -SMA: „ $\alpha$ -smooth-muscle-actin“

Dako, Heidelberg; Novus Biologicals, Cambridge, UK; Progen, Heidelberg; Gene Tex, Irvine, California, USA; Vector Laboratories, Burlingame, USA; Biocarta, Hamburg;

Die Untersuchungen wurden nach den Färbeprotokollen des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Bezeichnungen der Primär- und Sekundärantikörper, Konzentrationen, zur Antikörperisolierung verwendete Tierarten sowie Hersteller der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind der Tabelle 3.10 zu entnehmen. Für die Antigennachweise Zytokeratin 8 und Vimentin wurde ein zusätzlicher Behandlungsschritt nach Schritt 5 mit 0,1%iger

Protease, sowie für den Nachweis von Panzytokeratin an gleicher Stelle eine Vorbehandlung mit Trypsin eingefügt. Die Protease dient der Antigendemaskierung zur besseren Antigenerkennung.

**Tabelle 3.11** Protokoll für den Antikörpernachweis

1.	Xylol	30 Min
2.	Xylol	30 Min
3.	Absteigende Alkoholreihe	kurz durchschwenken
4.	Aqua dest.	5 Min
5.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
5A.	Vorbehandlung mit 0,1 % Protease, 100 $\mu$ l, in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur	10 Min
	oder mit Trypsin	20 Min
5B.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
6.	Endogene Peroxidase in 7,5%iger Hydrogenperoxidlösung hemmen, bei Raumtemperatur	10 Min
7.	Leitungswasser fließend	10 Min
8.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
9.	Dako Protein Block Serum-Free (Dako) (danach nur abgießen)	10 Min
10.	Primär-Antikörper verdünnt in Antibody Diluent (Dako) (siehe Tabelle 3.10)	über Nacht bei 6 °C
11.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
12.	Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3.10)	30 Min
13.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
14.	Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase Complex (Leica)	30 Min
15.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
16.	DAB-Hydrogenperoxidlösung	5 Min
17.	in Leitungswasser waschen	1 Min
18.	evtl. Kerne in Hämalaun gegenfärben	30 Sec - 1 Min
19.	in Leitungswasser wässern	10 Min
20.	Aufsteigende Alkoholreihe	kurz durchschwenken
21.	Xylol	5 Min
22.	Xylol	5 Min
23.	Eindecken mit Eukitt <sup>®</sup>	

Die Untersuchung und Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte unter dem Lichtmikroskop Leitz Aristoplan<sup>®</sup> (Leitz, Wetzlar). Die Erstellung von digitalen

---

Fotoaufnahmen erfolgte mit Hilfe der, an das Mikroskop angeschlossenen, Kamera Lumenera USB Camera<sup>®</sup> Release 3.8 (*Lumenera Corporation, Ottawa, Ontario Canada*).

## 3.5 Glykohistochemische Untersuchungen

Die bei der Lektinhistochemie oder glykohistochemischen Untersuchung angewendete Methodik ähnelt den bei der Immunhistochemie verwendeten Techniken. Anstelle eines Primärantikörpers wird ein spezifisches Lektin eingesetzt, welches an einen Mono- oder Oligosaccharid auf Zelloberflächen oder in der Gewebematrix bindet. Der Nachweis der Bindung der Lektine an ihre spezifischen Kohlenhydrate erfolgt entweder direkt, durch eine Markierung der Lektine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinthioisocyanat (FITC), oder indirekt. Bei der indirekten Methode werden die Schnitte zunächst mit biotinylierten, also an ein Biotinmolekül gekoppelten, Lektinen inkubiert. Diese Bindung wird dann in einem weiteren Arbeitsschritt sichtbar gemacht, indem die Präparate mit einer FITC-markierten Streptavidin-Lösung bedeckt werden. Das Streptavidin bindet an die Biotinmoleküle der biotinylierten Lektine und FITC zeigt die erfolgte Bindung durch Fluoreszenz an (Mulisch et al., 2010).

Für die Glykohistochemische Untersuchung wurden sechs bis zwölf Formol und Bouin fixierte Schnitte auf unbeschichteten Objektträgern (SuperFrost Ultra Plus<sup>®</sup>, Menzel-Gläser, Braunschweig) ausgewählt.

Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes wurden die fertigen Präparate bis zur Auswertung in abgedunkelten Boxen bei ca. 7 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Ausgewertet wurden die Präparate am Auflichtfluoreszenzmikroskop Leitz Dialux 20 EB (Firma Leitz, Wetzlar). Die Fotoaufnahmen wurden mit der Kamera ProgRes<sup>®</sup>CF cool (Firma Jenoptik, Jena) angefertigt.

### 3.5.1 FITC markierte Lektine

Für dreizehn an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelte Pflanzenlektine (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde die Bindungsaffinität an die Strukturen der Straußenleber in Präparaten von acht Tieren untersucht. Tabelle 3.12 zeigt die hier verwendeten FITC-markierten Lektine und ihre Zuckerspezifitäten. In Tabelle 3.13 ist das entsprechende Protokoll zu finden.

**Tabelle 3.12** Verwendete FITC-markierte Lektine

<b>Herkunft des Lektins</b>	<b>Name des Lektins</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Zuckerbindungsspezifität</b>
Canavalia ensiformis (Jackbohne)	Concanavalin Agglutinin	ConA	Man > Glc
Lens culinaris (Linse)	Lens culinaris Agglutinin	LCA	Man > Glc
Pisum sativum (Gartenerbse)	Pisum sativum Agglutinin	PSA	Man/Glc
Arachis hypogaea (Erdnuss)	Peanut Agglutinin	PNA	Gal
Ricinus communis (Rizinusbohne)	Ricinus communis Agglutinin	RCA	Gal
Ulex europaeus (Stechginster)	Ulex europaeus Agglutinin	UEA-I	L-Fuc
Triticum vulgare (Weizen)	Wheat germ Agglutinin	WGA	GlcNAc/Neu5NAc >
Triticum vulgare (Weizen)	Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs	GlcNAc
Dolichos biflorus (Afrik. Pferdebohne)	Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	GalNAc
Griffonia simplicifolia (Afrik. Schwarzbohne)	Griffonia simplicifolia Agglutinin-I	GSL-I	GalNAc
Glycine max (Sojabohne)	Soybean Agglutinin	SBA	GalNAc
Phaseolus vulgaris (Gartenbohne)	Phaseolus vulgaris Erythro-Agglutinin	PHA-E	Olig.
Phaseolus vulgaris (Gartenbohne)	Phaseolus vulgaris Leuko-Agglutinin	PHA-L	Olig.

größere Affinität; Man: Mannose; Glc: Glukose; Gal: Galaktose; L-Fuc: L-Fukose; GlcNAc: N-Acetyl-Glukosamin; Neu5NAc: 5-N-Acetyl-Neuraminsäure; GalNAc: N-Acetyl-Galaktosamin; Olig.:

Oligosaccharide, hier sind keine Monosaccharide als Bindungspartner bekannt

Tabelle modifiziert nach Rüdiger, Monsigny, Gabius, Mulisch und Welsch sowie Habermann ((Rüdiger, 1978; Monsigny, Roche et al., 1980; Rüdiger, 1981; Rüdiger und H. J. Gabius, 2001; H.-J. Gabius et al., 2004; H. J. Gabius, 2009; Mulisch et al., 2010; Habermann et al., 2011)).

**Tabelle 3.13** Protokoll für die Färbungen mit FITC-markierten Lektinen

1.	Xylol	30 Min
2.	Xylol	30 Min
3.	Absteigende Alkoholreihe	nur kurz durchschwenken
4.	Aqua dest.	5 Min
5.	Aqua dest.	5 Min
6.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
7.	Verdünnung der Lektine für Schritt 8 herstellen (siehe Anhang Tabelle 11.1)	
→	ab hier im Dunkeln arbeiten	
8.	Objektträger vorsichtig mit fusselfreiem Papier trocknen, Schnitte in eine mit Alufolie abgedunkelte Feuchtkammer legen	
9.	je 100 $\mu$ l der jeweiligen Verdünnung des Lektins auf den Schnitt pipettieren	60 Min bei Zimmertemperatur
10.	PBS-Puffer (pH 7,4), Küvetten mit Alufolie abgedunkelt	3x5 Min
11.	mit DAPI eindeckeln und mit handelsüblichem Nagellack versiegeln	

### 3.5.2 Biotinylierte Lektine

Für drei biotinylierte Pflanzenlektine (*Firma Vector, Burlingame, USA*) wurde die Bindungsaffinität an die Strukturen der Straußenleber mittels der Streptavidin-Biotin-Methode untersucht. Dazu wurden Präparate von acht Tieren verwendet.

Tabelle 3.14 und 3.15 zeigen die verwendeten biotinylierten Lektine sowie das Protokoll für Färbung mit denselben.

**Tabelle 3.14** Verwendete biotinylierte Lektine

Herkunft des Lektins	Name des Lektins	Abk.	Zuckerbindungsspezifität
Saphora japonica (Chin. Schnurbaum)	Saphora japonica Agglutinin	SJA	Gal
Sambucus nigra (Schwarzer Holunder)	Sambucus nigra Agglutinin	SNA	Gal/GalNAc
Maackia amurensis (Asiatisches Gelbholz)	Maackia amurensis Agglutinin	MAA-I	Olig

Abk.: Abkürzung; Gal: Galaktose; GalNAc: N-Acetyl-Galaktosamin; Olig: Oligosaccharide, hier sind keine Monosaccharide als Bindungspartner bekannt

Tabelle modifiziert nach Rüdiger, Gabius, Mulisch und Welsch sowie Habermann

(Rüdiger, 1978; Rüdiger, 1981; Rüdiger und H. J. Gabius, 2001; H.-J. Gabius et al., 2004)

(H. J. Gabius, 2009; Mulisch et al., 2010; Habermann et al., 2011).

**Tabelle 3.15** Protokoll für die Färbungen mit biotinylierten Lektinen

1.	Xylol	10 Min
2.	Xylol	10 Min
3.	Absteigende Alkoholreihe	nur kurz durchschwenken
4.	Aqua dest.	5 Min
5.	Aqua dest.	5 Min
6.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
7.	Verdünnung der Lektine für Schritt 8 herstellen (siehe Anhang Tabelle 11.2)	
→	ab hier im Dunkeln arbeiten	
8.	Objektträger vorsichtig mit fusselfreiem Papier trocknen, Schnitte in eine mit Alufolie abgedunkelte Feuchtkammer legen, mit Dako-Protein-Block-Serum-Free den Schnitt bedecken	10 Min
9.	Objektträger vorsichtig mit fusselfreiem Papier trocknen, je 100 $\mu$ l der jeweiligen Verdünnung des biotinylierten Lektins auf den Schnitt pipettieren	60 Min bei Zimmertemperatur
10.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min
11.	Objektträger trocknen und 100 $\mu$ l aufgetautes Streptavidin/ FITC (1:500) aufpipettieren	30 Min bei Zimmertemperatur
12.	PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5 Min

Anschließend an die Färbung wurden alle Präparate mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI, *Vector Laboratories Inc., Burlingame*) eingedeckelt und mit klarem Nagellack versiegelt.

### 3.5.3 Negativkontrolle

Zur Absicherung, dass es sich tatsächlich um Fluoreszenz aus gebundenen Lektinen und nicht um Eigenfluoreszenz des untersuchten Gewebes handelt, wurde bei jedem Lektin ein Schnitt als Negativkontrolle mit untersucht. Dazu wurde bei Punkt neun anstelle des verdünnten Lektins nur 100  $\mu$ l PBS-Puffer aufpipettiert.

### 3.5.4 Positivkontrolle

Um falsch negative Ergebnisse ausschließen zu können wurde ein Schnitt eines Gewebes ausgewählt, an das die Bindung des zu testenden Lektins bereits nachgewiesen worden ist (Nebenhoden Hund für WGA, LCA, PHA E, PHA L, CON A, PSA, UEA, WGAs, PNA; Hoden Rind für RCA und SBA; Ovar Rind für MAL-I und SNA; Ovar Schwein für DBA und GSL-1; Niere Rind für SJA).

### 3.5.5 Zuckerhemmung

Zur Überprüfung der Spezifität der deutlich positiv reagierenden Lektine wurde eine kompetitive Hemmung mit den jeweils korrespondierenden Zuckern durchgeführt. Dazu wurden die Lektinverdünnungen (siehe Anhang Tabelle 11.1 und 11.2) mit dem zugehörigen Hemmzucker dreißig bzw. sechzig Minuten (siehe Tabelle 3.16) vorinkubiert und dann weiterverfahren wie oben. Anstelle der reinen Lektinverdünnung wurde die Lektin-Hemmzuckermischung verwendet. Zur Kontrolle wurde je Lektin ein Präparat nur mit der Lektinverdünnung inkubiert.

**Tabelle 3.16** Verwendete Hemmzucker

Lektin	Zuckerspezifität	Hemmzucker	Konz.	Zeit (Min)
WGA	N-Acetyl-Glukosamin	Chitin-Hydrolysat	1:4	30
WGAs	N-Acetyl-Glukosamin	Chitin-Hydrolysat	1:4	30
PNA	N-Acetyl-Galaktosamin	Methyl- $\alpha$ -D-Galaktopyranoside	172,4 mg/ml	60
GSL-1	N-Acetyl-Galaktosamin	Methyl- $\alpha$ -Galaktopyranoside	84,8 mg/ml	60
PHA-E	Oligosaccharide	Essigsäure	24 $\mu$ l/ml	60
PHA-L	Oligosaccharide	Essigsäure	24 $\mu$ l/ml	60
PSA	Glukose, Mannose	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside	84,8 mg/ml	60
LCA	Glukose, Mannose	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside	84,8 mg/ml	60
SBA	N-Acetyl-Galaktosamin	N-Acetyl-D-Galaktosamin	172,4 mg/ml	60

Die hier verwendeten Hemmzucker stammen von folgenden Herstellern: N-Acetyl-D-Galaktosamin, Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside, Methyl- $\alpha$ -Galaktopyranoside und Chitin-Hydrolysat von *Sigma Aldrich, Deisenhofen*; Essigsäure von *Roth, Karlsruhe*

## 3.6 Elektronenmikroskopie

### 3.6.1 Probengewinnung

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde Probenmaterial von sechs Straußenlebern und je vier Leberlappen gewonnen. Es wurde an den gleichen Lokalisationen wie für die Lichtmikroskopie Gewebe mit einer Skalpellklinge herausgeschnitten und in mindestens fünf bis sechs kleinste Würfel mit einer Kantenlänge von  $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$  zerkleinert.

Die fertigen Grids wurden zur Aufbewahrung in eine Gridbox (*Plano GmbH, Wetzlar*) einsortiert.

Die Auswertung und Photodokumentation der Präparate erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (*Firma Zeiss, Oberkochen*).

### 3.6.2 Fixierung

Die hier verwendete Fixierung ist eine sogenannte Immersionsfixierung mit vernetzenden Fixanzien um die Feinstruktur des Gewebes zu erhalten. Das Glutaraldehyd reagiert insbesondere mit den Aminogruppen und bildet innerhalb von Sekunden bis Minuten irreversible Quervernetzungen der zellulären Proteine (Mulisch et al., 2010). Nach dem Zuschneiden wurden die Würfelchen in 2 ml - Eppendorf-Röhrchen mit rundem Boden verbracht und mit der auf circa  $4^\circ\text{C}$  gekühlten Fixierungslösung nach Karnovsky (2% Glutaraldehyd in Karnovsky-Stock-Solution, gepuffert mit 0,2 molarem Natriumcacodylatpuffer) versetzt. Dabei sollte die Fixierungslösung etwa das zwanzigfache Volumen der Proben einnehmen (Mulisch et al., 2010). Die Karnovskylösung wurde über Nacht belassen.

### 3.6.3 Waschen

Für die Kontrastierung ist es notwendig überschüssige Fixierungsmittel mit mehrfach gewechseltem ( $3 \times 10$  Minuten (Mulisch et al., 2010))  $4^\circ\text{C}$  kaltem 0,1 molarem Natriumcacodylat-Puffer von pH 7,2 gründlich auszuwaschen.

### 3.6.4 Vorkontrastieren

Zum Vorkontrastieren wurden die Probenwürfel für zwei Stunden bei 4 °C und im Dunkeln in eine 1 %ige Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ )- und 1,5 %ige Kaliumferrocyanid ( $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ )-lösung verbracht.

### 3.6.5 Waschen

Danach folgte ein dreimaliger Wechsel in 4 °C kaltem 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 zur Beseitigung der Osmiumtetroxid- und Kaliumferrocyanidlösung.

### 3.6.6 Entwässerung

Nachdem die vorhergehenden Schritte bei 4 °C erfolgten wurde im weiteren Verlauf bei Raumtemperatur unter dem Abzug gearbeitet.

Der Schritt der Entwässerung entzieht dem Gewebe das darin befindliche Zellwasser, um die Proben in nicht mit Wasser mischbare Einbettmedien übertragen zu können. Zur Vermeidung von Zerreißen und Schrumpfungen erfolgte dieser Schritt mittels Inkubation in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration (je 20 Minuten in 30 und 50 %igen Alkohol, dann je 30 Minuten in 70, 90 %igen und zuletzt noch dreimal 30 Minuten in absolutem Alkohol (100 %iger Ethanol)) (Mulisch et al., 2010).

Im Anschluss an das Entwässern wurden die Proben auf die Kunstharzeinbettung vorbereitet, indem sie zweimal 15 Minuten in Propylenoxid (*Merck, Darmstadt*) getaucht wurden. Propylenoxid dient als Zwischenmedium zur Vermeidung von Polymerisationsartefakten, da Alkoholreste Gasbläschen bilden würden und somit die Schneidbarkeit beeinträchtigt wäre.

### 3.6.7 Epon-Einbettung

Um eine gleichmäßige Durchsetzung der Gewebeproben mit dem Einbettmedium (in diesem Fall Poly/Bed<sup>®</sup> 812, identisch mit Epon 812 nach Luft (1961)) zu erreichen, erfolgte die Einbettung in drei Schritten. Zunächst kamen die Proben für eine Stunde in ein zuvor aufgetautes Propylenoxid-Polyembed-Gemisch im Verhältnis 2:1 auf den Schüttler. Danach, auch auf dem Schüttler, über Nacht in ein Propylenoxid-Polyembed-Gemisch im Verhältnis 1:1. Am nächsten Tag wurde Polyembed laut Tabelle (siehe *Anhang*) neu angesetzt. Anschließend wurden die Proben noch für eine Stunde in reinen Polyembed auf den Schüttler verbracht.

Nach dieser weiteren Stunde im Einbettmedium wurden die Gewebewürfel mit dem Igelstachel gefasst und gleichmäßig auf die Flacheinbettungsformen (*Plano, Wetzlar*) verteilt. Die Nummerierung der Flachbettform und der Proben wurde protokolliert. Die Polymerisation des Kunstharzes erfolgte nach Glauert nun für 48 Stunden bei 60 °C im Wärmeschrank. Unterstützt wurde die Härtung durch die Verwendung von BDMA als Katalysator (Beschleunigung der Härtung) und von NMA als Härter (Vernetzung der Kunstharzmoleküle). Danach wurden die Blöcke vorsichtig aus den Flachbettformen gelöst und in durchsichtige Plastikboxen verpackt. Der Originalzettel wurde mit in die Box gelegt.

### 3.6.8 Herstellung von Semidünnschnitten

Die Semidünnschnitte der Schnittdicke 1  $\mu\text{m}$  wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut E, *Firma Reichert-Jung, Wien*) erstellt. Dabei wurden die Blöcke zuerst mittels eines Glasmessers zurechtgetrimmt und dann mit einem Diamantmesser (Diatome Histo-Diamantmesser 45° 6 mm, *Reichert-Jung, Wien*) geschnitten. Nach der Herstellung eines Semidünnschnitts wurde dieser mit der Färbelösung nach Richardson (1960) (Mulisch et al., 2010) gefärbt. Zur Durchführung der Färbung wurden die getrockneten Schnitte auf dem Objektträger mit einigen Tropfen Färbelösung bedeckt und auf einer Wärmeplatte für circa 30 Sekunden auf 70 °C erhitzt. Danach wurde die Färbelösung gründlich mit  $\text{H}_2\text{O}$  aus einer Spritzflasche abgespült und die Schnitte erneut auf der Wärmeplatte getrocknet (Mulisch et al., 2010: S.139). Anhand dieses gefärbten Semidünnschnitts wurden qualitativ hochwertige und optimale Abschnitte für die Anfertigung von Ultradünnschnitten ausgewählt.

### 3.6.9 Herstellung von Ultradünnschnitten

Für die Herstellung von Ultradünnschnitten mit einer Schnittdicke von 40-60 nm wurde am Ultramikrotom (Ultracut E, *Firma Reichert-Jung, Wien*) mit einem Diamantmesser (Diatome Ultra-Diamantmesser 45° 3 mm, *Reichert-Jung, Wien*) gearbeitet. Die erstellten Ultradünnschnitte wurden auf Kupfernetzen, sogenannten Grids (*hexagonal, 150 mesh, Copper, Polyscience*) aufgefangen.

### 3.6.10 Nachkontrastieren der Ultradünnschnitte

Da eine Vorkontrastieren der Blöcke mit Osmiumtetroxid/Kaliumferrocyanid nicht ausreichend ist, erfolgte im letzten Schritt eine Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte mit Schwermetallionen. Dabei wurden in der vorliegenden Arbeit Uranylacetat, welches Membranen und insbesondere Kernchromatin kontrastiert, und Bleicitrat nach Reynolds (1963) (Herstellung siehe Anhang) verwendet. Letzteres kontrastiert Ribosomen und Zytoplasmagrundsubstanzen. Die beiden Kontrastierungslösungen werden in Alubüchsen bei 4°C gelagert und nur mit Handschuhen gehandhabt.

Zur Nachkontrastierung mit Uranylacetat wurden 80-100 µl Uranylacetat für jeden Grid auf eine in einer Petrischale gelagerte Haftplatte (*Plano GmbH, Wetzlar*) aufpipettiert. Danach wurden die Grids mit der matten Seite nach unten auf die vorbereiteten Haftplatten aufgelegt und mindestens 20 Minuten belassen. Das überschüssige Uranylacetat wurde mittels dreimaligem Waschen in drei verschiedenen Bechergläsern mit Aqua dest. entfernt und die Grids zum kurzen Trocknen auf Filterpapier gelagert. Für den nächsten Schritt wurden die Grids mit der matten Seite nach oben auf eine zweite Haftplatte platziert.

Anschließend erfolgte das Nachkontrastieren mit Bleicitrat, welches vor Gebrauch für zehn Minuten bei 11.400 Umdrehungen zentrifugiert und dann filtriert werden muss, um sogenannte schwere Störfaktoren auszuschalten. Anschließend wurden 80-100 µl Bleicitrat auf die Grids aufgetropft und zwei Natriumhydroxid-Pellets in die Petrischale gelegt, um ein Ausfällen des Bleicitrats zu verhindern. Die Zeit von drei bis fünf Minuten muss genau eingehalten werden. Danach wurden die Grids erneut dreimal in drei verschiedenen Bechergläsern mit Aqua dest. gewaschen und zum kurzzeitigen Trocknen auf Filterpapier ausgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen an der Leber des Straußes

Die rotbraune Leber des Afrikanischen Straußes (*Struthio camelus*) liegt im kaudoven-tralen Teil des Thorax, eingebettet in einen hepato-peritonealen Hohlraum. Kranial wird sie begrenzt vom Herz und kaudal vom Magen. Das Herz hinterlässt in den Leberlappen eine tiefe Einbuchtung in die es zu Teil in Situ gelagert ist. Siehe Abbildung 4.1.

Durch zwei tiefe Einziehungen kann die Leber in zwei große Lappen, einen Lobus hepatis dexter und einen Lobus hepatis sinister, unterteilt werden. Der linke Leberlappen ist durch eine kleine Einziehung in eine Pars caudodorsalis und eine Pars caudoventralis gegliedert. Dazu siehe auch Abbildung 4.2.

Des Weiteren findet sich auf der viszeralen, dem Magen zugewandten Seite des linken Lappens ein kleiner zungenförmiger Lappen (Abbildung 4.2) mit einer durchschnittlichen Größe von 3,4 cm x 8,2 cm ( $\pm 1,4$  cm x 2,0 cm) und einer Höhe von 1,4 cm. Unterhalb dieses Lappens befindet sich eine horizontal verlaufende, bindegewebige Brücke, in welche eingebettet große Gefäße zu finden sind.

Die Leber ist medial mit 6,5 bis 8,5 cm am höchsten und verjüngt sich lateral zu scharfen und flachen Rändern. Der rechte Leberlappen ist mit einer durchschnittlichen Größe von 24,8 cm x 15,6 cm ( $\pm 5,0$  cm x 3,0 cm) etwas größer als der linke Lappen, der im Ganzen durchschnittlich 23,5 cm x 12,8 cm ( $\pm 5,0$  cm x 3,0 cm) groß ist. Dabei entfallen an den kranialen Teil der zwei Teillappen des linken Leberlappens 7,7 cm x 12,8 cm ( $\pm 2,0$  cm x 3,0 cm) und an den kaudalen Teil 15,8 cm x 12,7 cm ( $\pm 3,0$  cm x 3,0 cm).

Die Lebern der untersuchten Tiere wiegen zwischen 1254 und 2583 Gramm. Siehe auch Tabelle 4.1 und 4.2. Sie macht damit etwa 1,8 % der Gesamtkörpermasse aus.

**Tabelle 4.1** Erhobene Daten über das Gewicht und die Gesamtgröße der Leber des Straußes.

Tier Nr	Geschlecht	Gewicht in g	Breite in cm	Länge in cm	Höhe in cm
1	männlich	1254	28,0	23,5	7,0
2	weiblich	1686	32,0	32,0	6,5
3	männlich	1300	26,0	26,0	7,5
4	männlich	1411	30,0	25,0	8,5
5	männlich	2002	31,0	22,0	8,5
6	weiblich	2250	32,0	25,0	7,5
7	weiblich	2583	33,0	31,0	8,0
8	männlich	1733	27,5	27,0	8,0
9	weiblich	2218	32,0	29,0	8,0
10	weiblich	1664	29,0	26,0	7,5
11	männlich	1636	30,0	27,0	7,0
12	männlich	1662	27,5	25,0	7,5
13	weiblich	1872	31,0	25,0	8,0
<b>Ges.</b>		<b>1790</b>	<b>29,92</b>	<b>26,42</b>	<b>7,65</b>

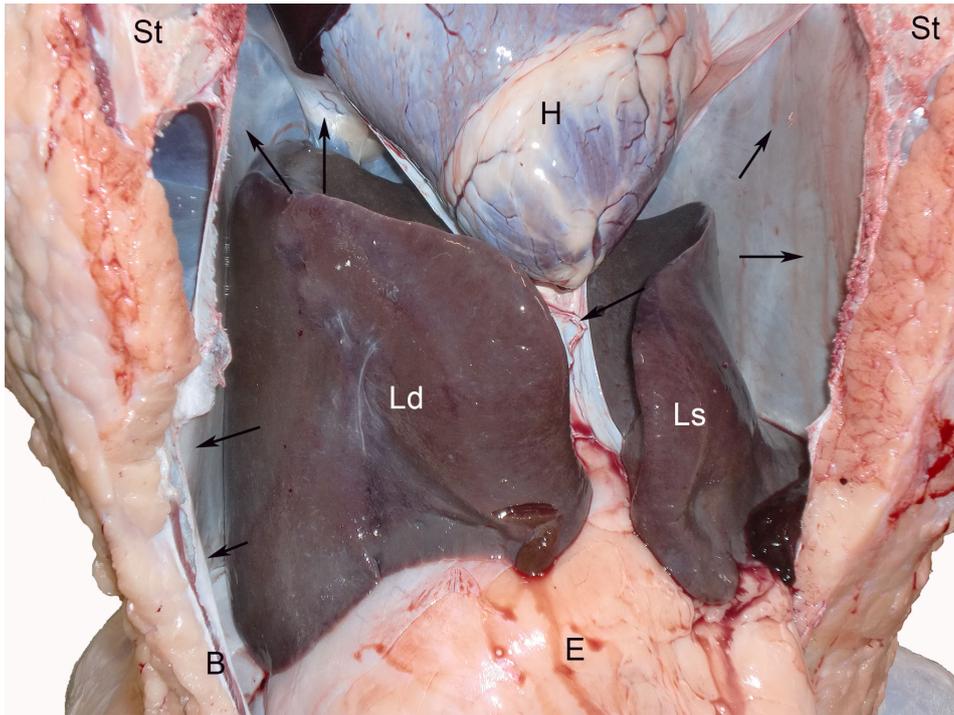
Nr: Nummer; g: Gramm; cm: Zentimeter; Ges.: Gesamtdurchschnitt

**Tabelle 4.2** Erhobene Messdaten der Abmessungen an den Leberlappen des Straußes

Tier Nr	L. hep. sin.	L. hep. sin.	L. hep. sin.	L. hep. dex.
	Pars caudodors.	Pars caudoventr.	Proc. intermed.	
	l   b	l   b	l   b	l   b
1	8,0   11,0	12,5   12,0	3,5   8,0	20,0   13,0
2	5,5   11,0	26,5   12,5	3,5   8,5	28,0   15,0
3	10,5   10,0	15,5   11,0	2,5   7,5	22,0   12,0
4	7,0   15,0	13,0   10,0	1,5   7,0	23,0   15,0
5	6,0   12,5	16,0   13,0	2,0   7,5	24,0   18,0
6	8,5   11,0	17,0   15,0	3,6   9,0	27,5   17,0
7	9,0   14,0	16,5   14,0	2,0   7,8	30,0   18,0
8	6,5   14,0	15,0   13,5	5,0   9,0	24,0   15,0
9	10,0   15,0	14,5   16,0	4,0   12,0	24,0   17,5
10	7,0   13,0	13,5   14,0	4,5   9,0	23,0   16,0
11	6,0   12,0	16,0   12,0	3,5   6,0	27,0   17,0
12	7,0   13,0	14,0   10,0	4,5   8,0	25,0   12,5
13	8,5   15,0	15,0   12,0	4,0   7,0	25,0   17,0
<b>Ges.</b>	<b>7,7   12,8</b>	<b>15,8   12,7</b>	<b>3,4   8,2</b>	<b>24,8   15,6</b>

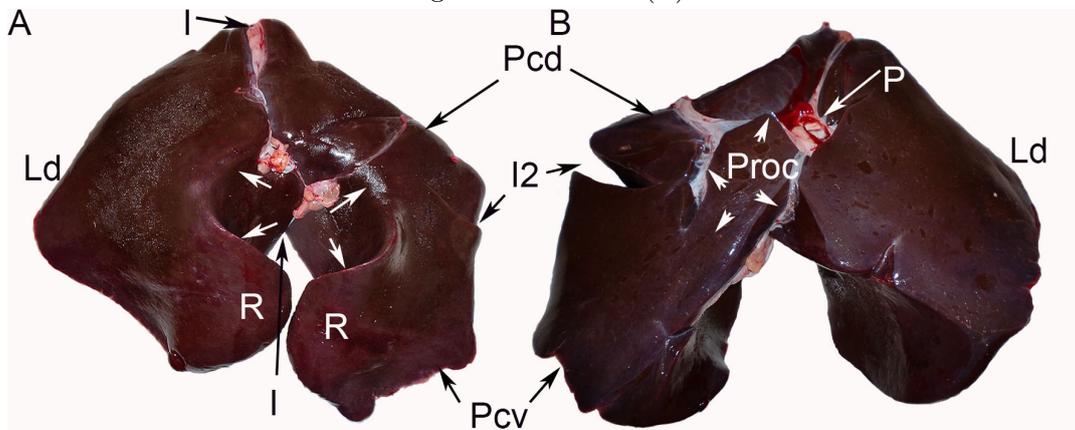
L. hep. sin.: Lobus hepatis sinister; L. hep. dex.: Lobus hepatis dexter; Pars caudodors.:

Pars caudodorsalis; Pars caudoventr.: Pars caudoventralis; Proc. intermed.: Processus intermedius sinister; l: Länge; b: Breite; Ges: Gesamtdurchschnitt



**Abb. 4.1** Leber, Strauß, weiblich, 16 Monate, In situ.

Die beiden Leberlappen, Lobus hepatis dexter (Ld) und Lobus hepatis sinister (Ls), liegen kaudal vom Herz (H) eingebettet in seröse Bauchfellsäcke (Pfeile), die lateral an der Bauchwand (B) und ventral am Sternum (St) befestigt sind. Kaudal der Leber stellt sich der Eingeweidesack dar (E).



**Abb. 4.2** Leber, Strauß, weiblich, 16 Monate, makroskopische Betrachtung

A: Kraniale, konvexe Leberfläche; Zwei tiefe Einziehungen (I) teilen die Leber in den Lobus hepatis dexter (Ld) und den Lobus hepatis sinister (Ls). Letzterer ist durch eine weitere Einziehung (I2) in eine Pars caudoventralis (Pcv) und eine Pars caudodorsalis (Pcd) geteilt. Der kranioventrale Rand (R) beider Lappen formt und umschließt die Einbuchtung des Herzens (Pfeile).

B: Kaudale, konkave Leberfläche; Auf dieser Fläche ist am Lobus hepatis sinister ein weiterer, akzessorischer Lappen zu sehen, Processus intermedius sinister (Proc, Abgrenzung durch Pfeile angedeutet), sowie eine bindegewebige Brücke (P) mit der Leberpforte. Die Einziehung (I2) teilt den linken Leberlappen.

## 4.2 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen an der Leber des Straußes

### 4.2.1 Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin und Masson-Golder

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die Masson-Goldner-Färbung geben einen ersten Eindruck der Struktur und der Bausteine der Leber des Straußes. Das Leberparenchym wird von außen von straffen Bindegewebsfasern eingefasst, die von Peritoneum bedeckt sind und eine bindegewebigen Kapsel, die Glisson-Kapsel, bilden (Abb. 4.3). Von dieser Kapsel ausgehend ziehen sehr dünne bindegewebige Septen in die Tiefe zwischen das Parenchym (Abb. 4.3 B). Durch das nur schwach ausgebildete Bindegewebe ist keine Unterteilung des Leberparenchyms in einzelne Läppchen zu erkennen.

Das Leberparenchym stellt sich als homogene Masse dar, die zum größten Teil aus polygonalen Hepatozyten mit einem 3-5  $\mu\text{m}$  großen Zellkern besteht (Abb. 4.4 A und C). Als Grundgerüst sind Leberzellbalken zu erkennen, bestehend aus zwei nebeneinander liegenden Leberzellen und in der Länge eine unterschiedliche Anzahl von Zellen (Abb. 4.5 D). Zwischen diesen verlaufen sinusoidale Hohlräume (Abb. 4.4 B). Die Leberzellbalken verlaufen unregelmäßig verteilt (Abb. 4.5 A).

Die Sinusoide werden von einer dünnen, bindegewebigen Membran ausgekleidet (Abb. 4.5 A und C) und weiten sich in ihrem Lumen zur ableitenden Vena intralobularis hin, in die sie sich entleeren (Abb. 4.4 B und 4.5 A). Das Lumen der Sinusoide beträgt in der Nähe der Zentralvene 12  $\mu\text{m}$ . Zwischen den anastomosierenden Sinusoiden befinden sich nie mehr als zwei Hepatozyten. Die nicht immer eindeutig zu identifizierende Vena intralobularis ist von einem einschichtigen Endothel, mit gelegentlichen Fenestrationsen, ausgekleidet (Abb. 4.5 A).

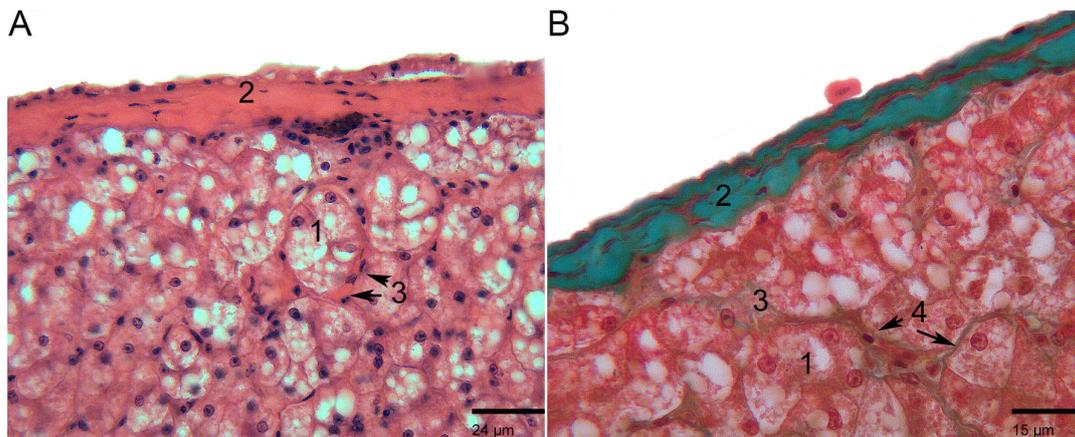
Im Leberparenchym finden sich größere Venen, die Venae sublobulares, die eine Dreischichtung der Venenwand zeigen. Die Dreischichtung zeigt eine für Venen untypische ungleichmäßige Dicke ihrer bindegewebigen Begrenzung (Abb. 4.5 D).

Das von der Glisson-Kapsel in die Tiefe ziehende Bindegewebe weitet sich im Bereich der Area interlobularis flächig aus und beinhaltet in diesem Bereich die zueinander parallel verlaufende Lebervene (Vena interlobularis), Leberarterie (Arteria interlobularis) und den Gallengang (Ductus interlobularis) (Abb. 4.5 B). Dabei können in diesem Bereich

auch mehrere Ductus vorkommen.

Die Gallekanälchen beginnen als tubuläres Abflusssystem welches von vier bis acht Hepatozyten gebildet wird (Abb. 4.5 C). Der Zellkern der Hepatozyten liegt tubulusfern und enthält ein bis drei Nukleoli (Abb. 4.4 C und 4.5 C). Der Canaliculus biliferus besitzt keine eigene Wand sondern wird von der Zellmembran der Hepatozyten begrenzt. Im Bereich der Area interlobularis besitzen die Ductuli interlobulares ein einschichtig, isoprismatisches Epithel mit einem runden Zellkern von 3-5  $\mu\text{m}$  Durchmesser (Abb. 4.4 C). Größere Gallengänge werden von einem hochprismatischen Epithel ausgekleidet (Abb. 4.4 D), dessen Zellkerne lumenfern gelagert sind.

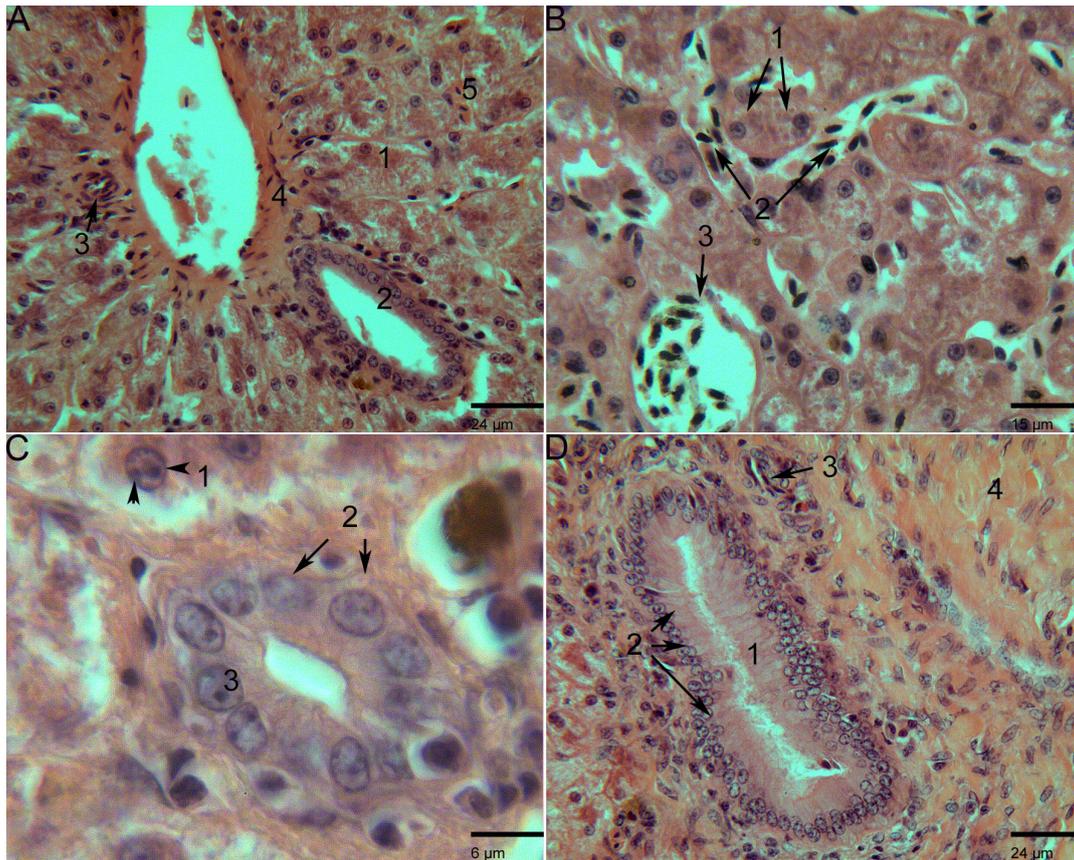
In der vorliegenden Arbeit wurden Proben aus verschiedenen Bereichen der Leber des Straußes verwendet. Sowohl bei den in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung als auch bei den in der Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner gefärbten Präparaten lassen sich bezüglich des Parenchyms, der Gallengänge, der Glisson-Trias und der sinusoidalen Zwischenräume mikroskopisch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Leberlappen beobachten.



**Abb. 4.3** Leber, Strauß, weiblich, Bindegewebskapsel

A: Kapselwand, Leber, Strauß, Processus intermedialis sinister, HE-Färbung. Von der Leberkapsel (2) ziehen Bindegewebsfasern zwischen die Hepatozyten (1). Zwischen diesen finden sich Sinusoide (3) mit Erythrozyten.

B: Kapselwand, Leber, Strauß, Processus intermedialis sinister, Masson-Goldner-Färbung. Die bindegewebige Leberkapsel (2) besteht aus verschiedenen Schichten. Von dieser ausgehend ziehen Bindegewebsfasern (4) zwischen die Hepatozyten (1) und kleiden auch die zwischen diesen liegenden Sinusoide (3) aus.



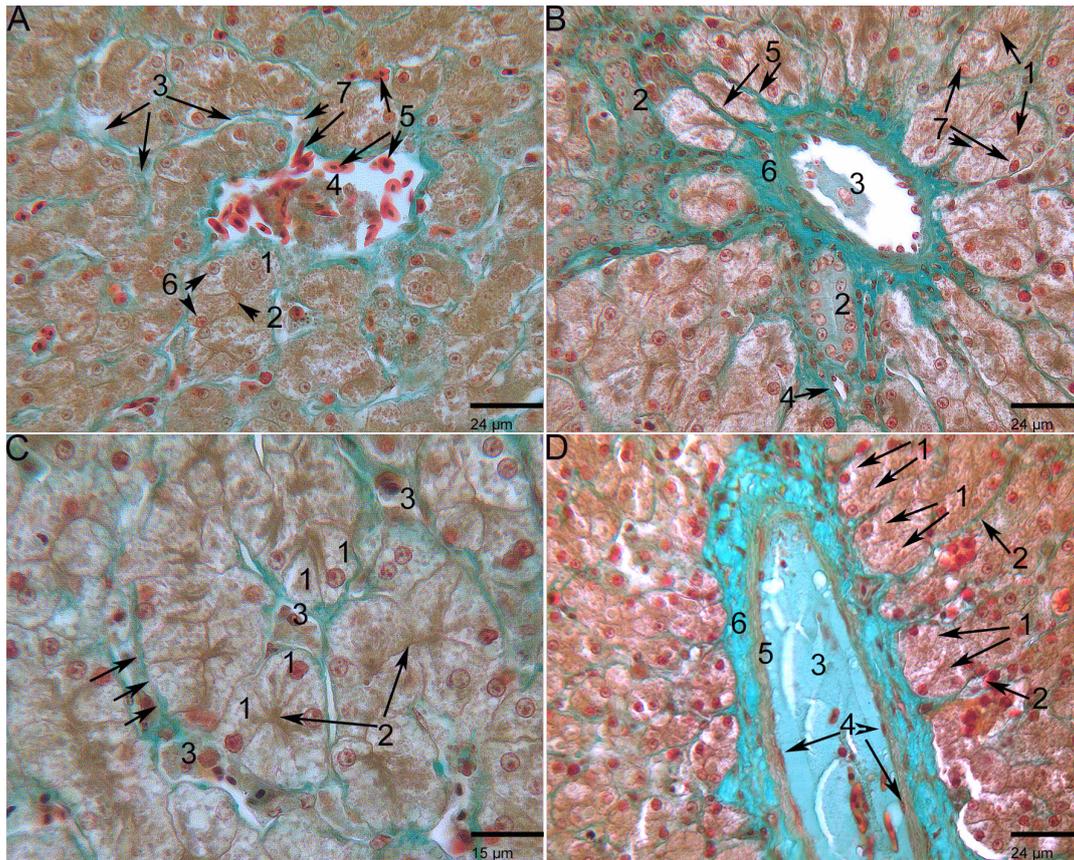
**Abb. 4.4** Aufbau und Bestandteile des Leberparenchyms, HE-Färbung

A: Leber, Strauß, weiblich, Lobus hepatis dexter, Area interlobularis mit Lebertrias. Die Hepatozyten (1) bilden zwei Zellen breite Leberzellbalken zwischen welchen die anastomosierenden Sinusoide (5) verlaufen. In der Area interlobularis verlaufen Gallengang (2), ein Ast der Pfortader/Vena interlobularis (4) und der Arteria interlobularis (3).

B: Leber, Strauß, männlich, Lobus hepatis sinister, Pars caudodorsalis, Zentralvene mit Sinusoiden. Nie mehr als zwei Hepatozyten (1), mit sinusoidnah gelagertem, rundem Zellkern, liegen zwischen den untereinander anastomosierenden sinusoidalen Zwischenräumen (2). In letzteren befinden sich kernhaltige Erythrozyten. Die Sinusoide weiten sich zu der mit einschichtigem Endothel ausgekleideten Zentralvene (3) hin.

C: Leber, Strauß, weiblich, Lobus hepatis dexter, Gallengang. In frühen Abschnitten der Ductuli interlobulares besitzen diese ein einschichtig, isoprismatisches Epithel (2) mit großem, rundem Zellkern (3). Der Zellkern der Hepatozyten besitzt meist zwei Nukleoli (1).

D: Leber, Strauß, männlich, Lobus hepatis sinister, Pars caudoventralis, Area interlobularis. Die größeren Gallengänge (1), Ductus interlobulares, besitzen ein hochprismatisches Epithel (2). Die Zellkerne liegen tubulusfern und sind rund-oval. Eingebettet in das Interstitium (4) der Area interlobularis liegen Arteriae interlobulares (3) mit einem einschichtigem Endothel.



**Abb. 4.5** Aufbau und Bestandteile des Leberparenchyms, Masson-Goldner-Färbung

A: Leber, Strauß, weiblich, Processus intermedius sinister, Vena intralobularis/Zentralvene. Polygonale Hepatozyten (1) bilden einen Tubulus (2). Der runde Zellkern (6) der Hepatozyten liegt peripher des Tubuluslumens. Zwischen den Hepatozyten befinden sich sinusoidale Gangsysteme (3) mit bindegewebiger Auskleidung. Die Sinusoide erweitern sich, bis sie sich in die Zentralvene (4) entleeren (7). In den Sinusoiden befinden sich kernhaltige Erythrozyten (5).

B: Leber, Strauß, weiblich, Lobus hepatis dexter, Area interlobularis. Die Hepatozyten (7) bilden tubuläre Systeme (1). Im sich flächig ausbreitenden Interstitium (6) eingebettet finden sich die Gefäße der Area interlobularis, der Ductus interlobularis (2), die Vena interlobularis (3) und die Arteria interlobularis (4). Die Sinusoide sind bindegewebig ausgekleidet (5).

C: Leber, Strauß, weiblich, Lobus hepatis dexter, Leberzellbalken. Vier bis acht Hepatozyten (1) bilden einen Canaliculus biliferus (2). Die Zellkerne der Hepatozyten liegen peripher des Tubuluslumens zu den Sinusoiden (3) hin. Bindegewebige Auskleidung (Pfeile) der Sinusoide.

D: Leber, Strauß, männlich, Lobus hepatis sinister, Pars caudodorsalis, Vena sublobularis. Zwei Zellen dicke Leberzellbalken (1) getrennt durch Bindegewebe und Sinusoide (2). Vena sublobularis (3) mit dreischichtiger Wandauskleidung (Tunica intima mit Endothelzellen (4), Tunica media (5) und Tunica externa aus Bindegewebe und einzelnen Muskelzellen (6)).

### 4.2.2 Färbung mit Alcianblau 8GX

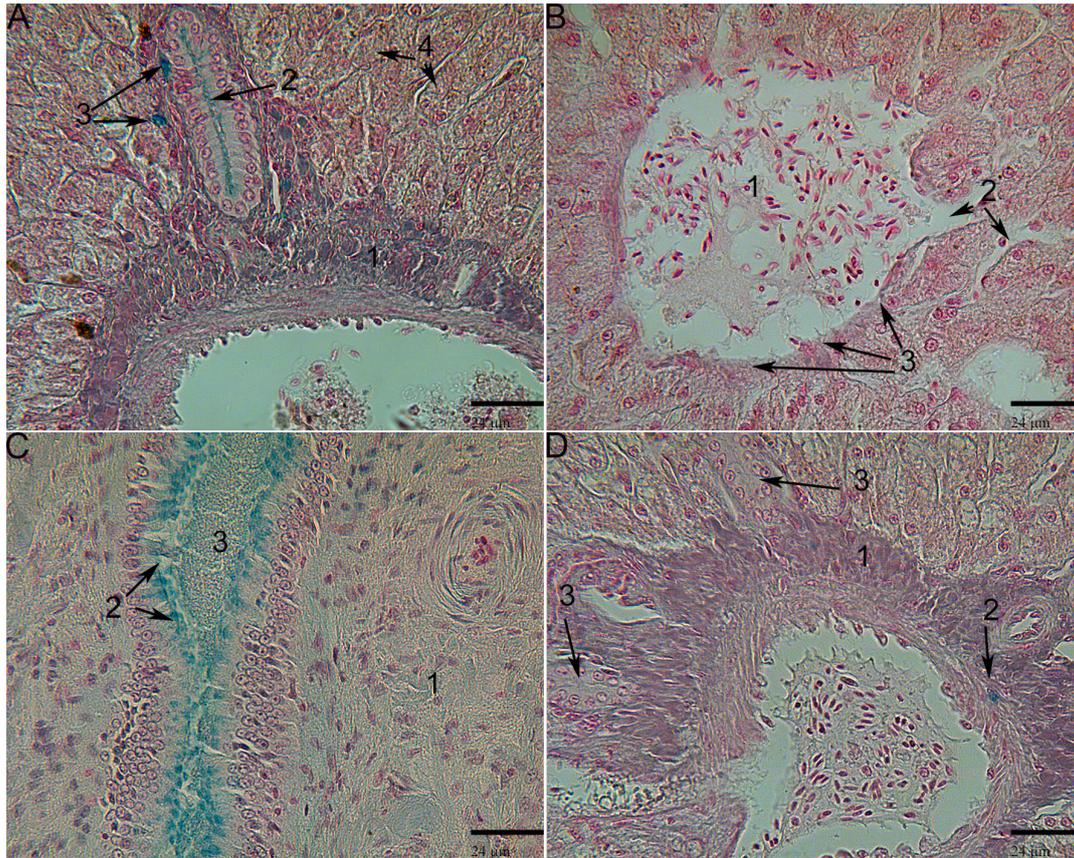
Bei der Färbung mit Alcianblau 8GX, mit einem pH-Wert von 2,5, werden die Hepatozyten nicht angefärbt (Abb. 4.6 A).

Im Gegensatz zu der negativ ausfallenden Färbung des Leberparenchyms zeigt sich das Bindegewebe der Leber im Bereich der Area interlobularis schwach bis deutlich positiv (Abb. 4.6 A und C). Besonders gut zu sehen im näheren Umfeld der Gefäße in diesem Bereich.

In den Gallengängen färbt sich das begleitende Bindegewebe schwach Alcianblau-positiv, wohingegen die apikalen Anteile der Epithelzellen der Gallengänge und darin enthaltenes Sekret stark positiv reagieren (Abb. 4.6 A und C). Das die Vena intralobularis umgebende Bindegewebe reagiert sehr schwach positiv auf Alcianblau 8GX (Abb. 4.6 B).

Im Parenchym der Leber, insbesondere im Bereich der Area interlobularis, färbt sich vereinzelt das Zytoplasma in Zellen stark Alcianblau-positiv an (Abb. 4.6 A).

Auch bei der Alcianblau 8GX-Färbung unter pH 1,0 zeigt sich das Bindegewebe der Gefäße und der Gallengänge in der Area interlobularis schwach bis deutlich positiv. Die apikalen Anteile der Gallengänge und das im Lumen enthaltene Sekret verhalten sich bei pH 1,0 negativ. Das Zytoplasma der unter pH 2,5 stark positiven Zellen zeigt sich auch bei Alcianblau 8GX pH 1,0 schwach bis deutlich positiv angefärbt.



**Abb. 4.6** Alcianblau-Färbung, pH 2,5 und 1,0

A: Leber, Strauß, weiblich, pH 2,5, Lobus hepatis dexter, Area interlobularis. Deutlich positive Reaktion im Lumen der Ductuli interlobulares (2) und im Interstitium der Area interlobularis (1). Negative Reaktion bei den Hepatozyten (4). Vereinzelt auftretende stark positive Reaktion im Zytoplasma von Zellen (3).

B: Leber, Strauß, weiblich, pH 2,5, Lobus hepatis sinister, Pars caudoventralis, Vena intralobularis. In die Zentralvene/Vena intralobularis (1) entleeren sich die Sinusoide (2). Das Bindegewebe (3) der Zentralvene reagiert sehr schwach positiv.

C: Leber, Strauß, weiblich, pH 2,5, Lobus hepatis sinister, Pars caudoventralis, Area interlobularis. Schwach positives Bindegewebe der Area interlobularis (1). Stark positive Reaktion im apikalen Bereich der Epithelzellen des Ductus interlobularis (2) und deutlich positive Reaktion im Lumen des Ductus (3).

D: Leber, Strauß, männlich, pH 1,0, Lobus hepatis sinister, Pars caudodorsalis, Area interlobularis. Vereinzelt schwach bis deutlich Alcianblau-positive Zellen im schwach positiven Interstitium der Area interlobularis (1). Negative Reaktion der Ductus-Lumina (3).

### 4.2.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) nach McManus

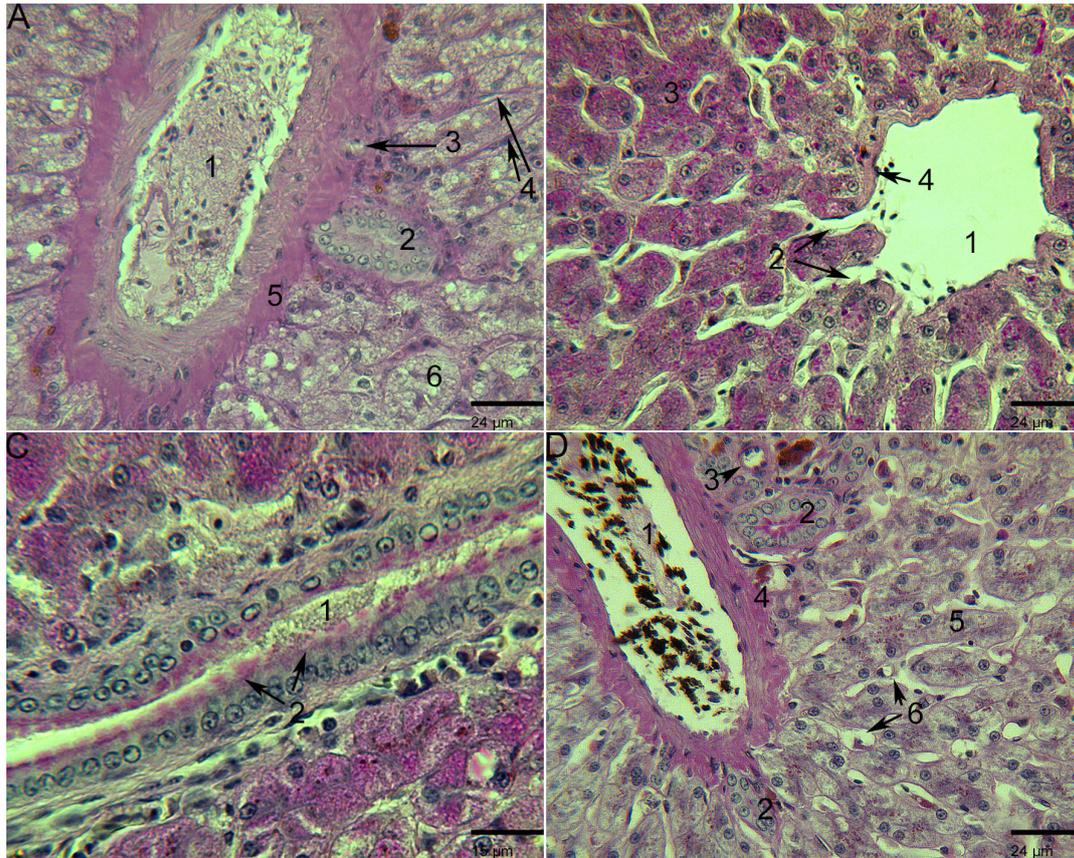
Die Perjodsäure-Schiff-Reaktion als histochemischer Nachweis von Kohlenhydraten wie Glykogen, Kollagen Typ III, Basalmembranen und Glykolipiden reagiert mit den verschiedenen Strukturen der Leber des Straußes auf unterschiedliche Weise. Das Zytoplasma der Hepatozyten reagiert insbesondere in der Region um die Vena intralobularis, aber auch in anderen Bereichen, stark PAS-positiv (Abb. 4.7 B und C). In den weiteren Arealen des Parenchyms ist das Zytoplasma der Hepatozyten schwach bis deutlich positiv anfärbt (Abb. 4.7 A und C).

Das Bindegewebe im Bereich der Area interlobularis zeigt eine stark positive Reaktion (Abb. 4.7 A), wohingegen das die Vena intralobularis umgebende Bindegewebe nur schwach positiv reagiert (Abb. 4.7 B).

Die apikalen Anteile des Zytoplasmas der Epithelzellen der Gallengänge reagieren stark positiv (Abb. 4.7 C).

Die Sinusoide sind stellenweise deutlich PAS-positiv (Abb. 4.7 A), während sie an anderer Stelle eine negative Reaktion zeigen (Abb. 4.7 B).

In der unter Amylase-Vorbehandlung durchgeführten PAS-Reaktion reagiert das Zytoplasma der Hepatozyten negativ. Bei den übrigen Strukturen bleiben die Reaktionen unverändert stark positiv (Abb. 4.7 D).



**Abb. 4.7** PAS-Färbung mit und ohne Amylase

A: Leber, Strauß, weiblich, PAS-Färbung, Lobus hepatis dexter, Area interlobularis. Das die Vena interlobularis (1), den Ductus interlobularis (2) und die Arteria interlobularis (3) umgebende Bindegewebe (5) reagiert stark PAS-positiv. Die Sinusoide (4) färben sich deutlich positiv an. Das Zytoplasma der Hepatozyten (6) zeigt eine schwach positive Reaktion.

B: Leber, Strauß, weiblich, PAS-Färbung, Lobus hepatis dexter, Vena intralobularis. Das Bindegewebe (4) der Vena intralobularis (1) reagiert schwach positiv. Die Reaktion im Zytoplasma der Hepatozyten (3) ist stark positiv. Die sinusoidalen Räume (2) sind im Umfeld der Zentralvene negativ.

C: Leber, Strauß, männlich, PAS-Färbung, Processus intermedius sinister, Ductus interlobularis. Die Epithelzellen der Gallengänge (1) reagiert insbesondere im apikalen Abschnitt (2) deutlich positiv.

D: Leber, Strauß, männlich, PAS-Färbung mit Amylasevorbehandlung, Lobus hepatis dexter, Area interlobularis. Das Bindegewebe der Area interlobularis (4) (mit Vena (1), Arteria (3) und Ductus (2) interlobularis) reagiert ebenso wie die Epithelzellen des Ductus unverändert stark positiv. Das Zytoplasma der Hepatozyten (5) und die Sinusoide (6) zeigen eine negative Reaktion nach der Amylase-Vorbehandlung.

## 4.3 Ergebnisse der Immunhistochemie

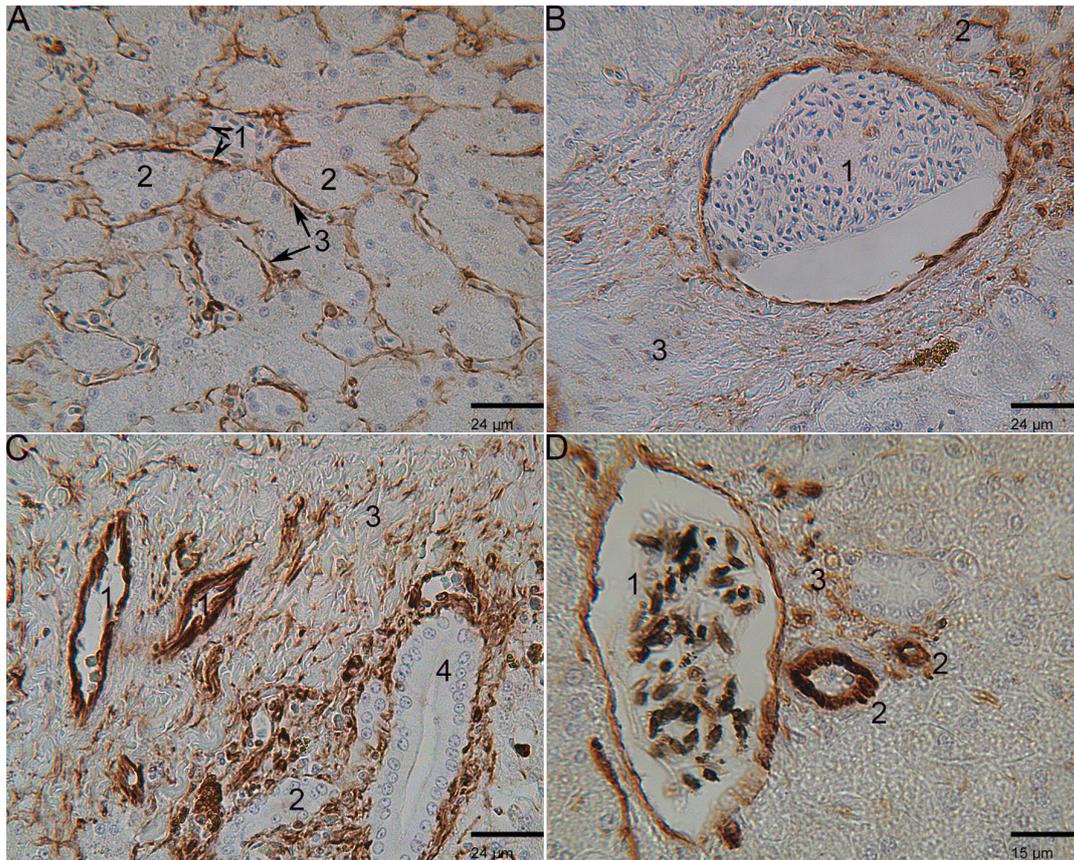
### 4.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Beim immunhistochemischen Nachweis von Vimentin zeigt die Auskleidung der Sinusoide stellenweise eine deutlich positive Reaktion. Die Endothelzellen der Intima der Venen färben sich deutlich positiv an. Ihre Bindegewebsfasern zeigen eine vergleichsweise schwache Reaktion. In der Tunica intima der Arterien hingegen färben sich die Endothelzellen, Fibroblasten und Bindegewebsfasern stark positiv an. Die dünnen Bindegewebsfasern, die zwischen den Muskelzellen der Tunica media der Arterien verlaufen, zeigen eine schwach positive Reaktion, bei den Venen reagieren sie deutlich Vimentin-positiv. Die arterielle und die venöse Adventitia zeigt eine schwach bis deutlich positive Reaktion. Im umgebenden Interstitium ist eine deutlich bis stark positive Reaktion der Fibroblasten und deren Fasern zu beobachten. Aber nur eine kaum bis schwach positive Reaktion der Matrix. Die Gallengänge sind von einer deutlich bis stark positiv reagierenden Lamina propria umgeben. (Abb. 4.8 und Tab. 4.3 )

**Tabelle 4.3** Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

	<b>Struktur</b>	<b>Reaktionsintensität</b>
Arterien	Intima	3
	Media	1
	Adventitia	1-2
Venen	Intima	1-2
	Media	2
	Adventitia	1-2
Zentralvene	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Sinusoide	Endothelzellen	1-2
	Bindegewebe	1-2
Interstitium	Bindegewebszellen	2-3
	Bindegewebsfasern	1-3
	Matrix	1
	Glatte Muskelzellen	0
Hepatozyten	Zellkerne	0
	Zytoplasma	0
	Zellmembran	0
Gallengänge	Zellkerne	0
	Zytoplasma	0
	Zellmembran	0

0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv



**Abb. 4.8** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

A: Vena intralobularis; Deutlich positive Reaktion der Endothelzellen (Pfeilspitzen) der Vena intralobularis (1) und der Sinusoidwände (3). Kein Nachweis in den Hepatozyten (2).

B: Vena interlobularis; Deutlich Vimentin-positives Endothel und nur schwach positives Bindegewebe in der Intima der Vena interlobularis (1). Deutlich Vimentin-positives Bindegewebsfasern und Fibroblasten in der Media und der Adventitia. Deutlich bis stark positive Fibroblasten und Fasern im Interstitium (3) der Area interlobularis und den Ductus interlobularis (2) umgebend.

C: Arteria und Ductus interlobularis; Sehr stark Vimentin-positives Endothel und Bindegewebe in der Tunica intima der Arteria interlobularis (1). Schwach positive, einzelne Fasern zwischen den Muskelzellen der Tunica media. Vereinzelt stark positive Fasern in der Adventitia. Deutlich bis stark positive Fibroblasten und Fasern im Interstitium (3). Stark positive Reaktion in der Bindegewebsschicht um den Ductus interlobularis (2) und Ductulus biliferus (4) herum.

D: Area interlobularis; Stärker Vimentin-positiver Reaktion der Intima der Arteria interlobularis (2) im Vergleich zur Intima der Vena interlobularis (1). Schwach bis deutlich Vimentin-positiv Fasern im Interstitium (3).

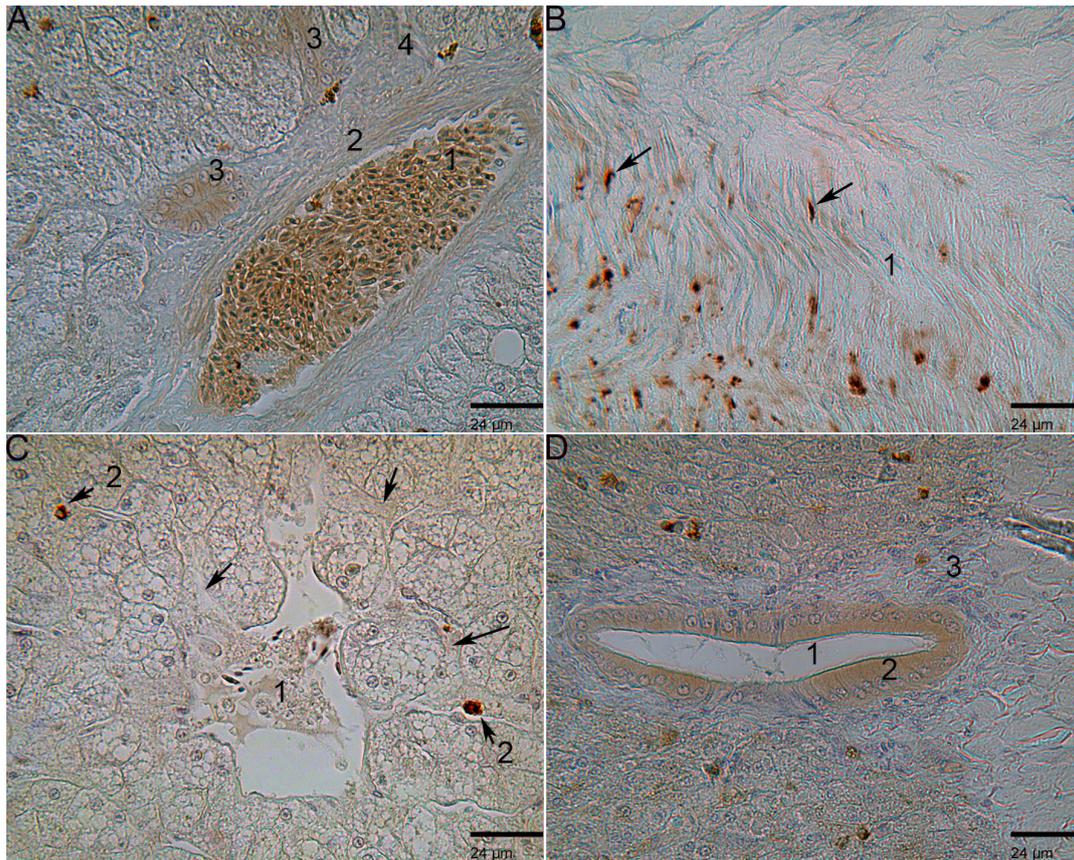
### 4.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Desmin

Der immunhistochemische Nachweis von Desmin zeigt eine deutlich bis stark positive Reaktion im Zytoplasma der Epithelzellen der Ductus interlobulares sowie auch der Ductuli biliferi. Die Muskelzellen der Tunica media der Venae interlobulares reagieren deutlich Desmin-positiv. In den größeren Ästen der Vena portae hepatis zeigen diese eine stark positive Reaktion. Ihre Fasern sind schwach bis deutlich positiv. An den Wänden der Sinusoide zeigen sich vereinzelt ovale bis längliche Zellen mit einer stark positiven Reaktion (Abb. 4.9 C). Die Zentralvene, Vena intralobularis und die anastomosierenden Sinusoide zeigen keine Reaktion mit Desmin. Das Interstitium der Area interlobularis reagiert negativ. (Abb. 4.9 und Tab. 4.4)

**Tabelle 4.4** Immunhistochemischer Nachweis von Desmin

	<b>Struktur</b>	<b>Reaktionsintensität</b>
Arterien	Intima	0
	Media	0
	Adventitia	0
Venen	Intima	0
	Media	2-3
	Adventitia	0
Zentralvene	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Sinusoide	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Interstitium	Bindegewebszellen	0
	Bindegewebsfasern	0
	Matrix	0
	Glatte Muskelzellen	0
Hepatozyten	Zellkerne	0
	Zytoplasma	0
	Zellmembran	0
Gallengänge	Zellkerne	0
	Zytoplasma	2-3
	Zellmembran	0

0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv



**Abb. 4.9** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Desmin

A: Area interlobularis; Deutlich Desmin-positive Reaktion des Zytoplasmas der Epithelzellen der Ductus interlobulares (3). Schwach bis deutlich positive Reaktion der Muskelzellen der Tunica media (2) der Vena interlobularis (1). Deutlich bis stark positive Erythrozyten im Lumen der Vene. Das umgebende Bindegewebe (4) ist negativ.

B: Venenwand; Stark positive Reaktion der Muskelzellen (Pfeile) zwischen den Bindegewebsfasern der Tunica media größerer Äste der Vena portae hepatis. Schwach bis deutlich positive Reaktion der Fasern der Muskelzellen (1).

C: Vena intralobularis; Negative Reaktion der Vena intralobularis (1) und der angeschlossenen Sinusoide (Pfeile). Stark positive Reaktion einzelner ovaler bis länglicher Zellen (2) an den Wänden der Sinusoide.

D: Ductulus biliferus; Deutlich bis stark Desmin-positive Reaktion des Zytoplasmas der Epithelzellen (2) des Ductulus biliferus (1). Das umgebende Interstitium (3) zeigt keine Reaktion.

### 4.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ ( $\alpha$ -SMA)

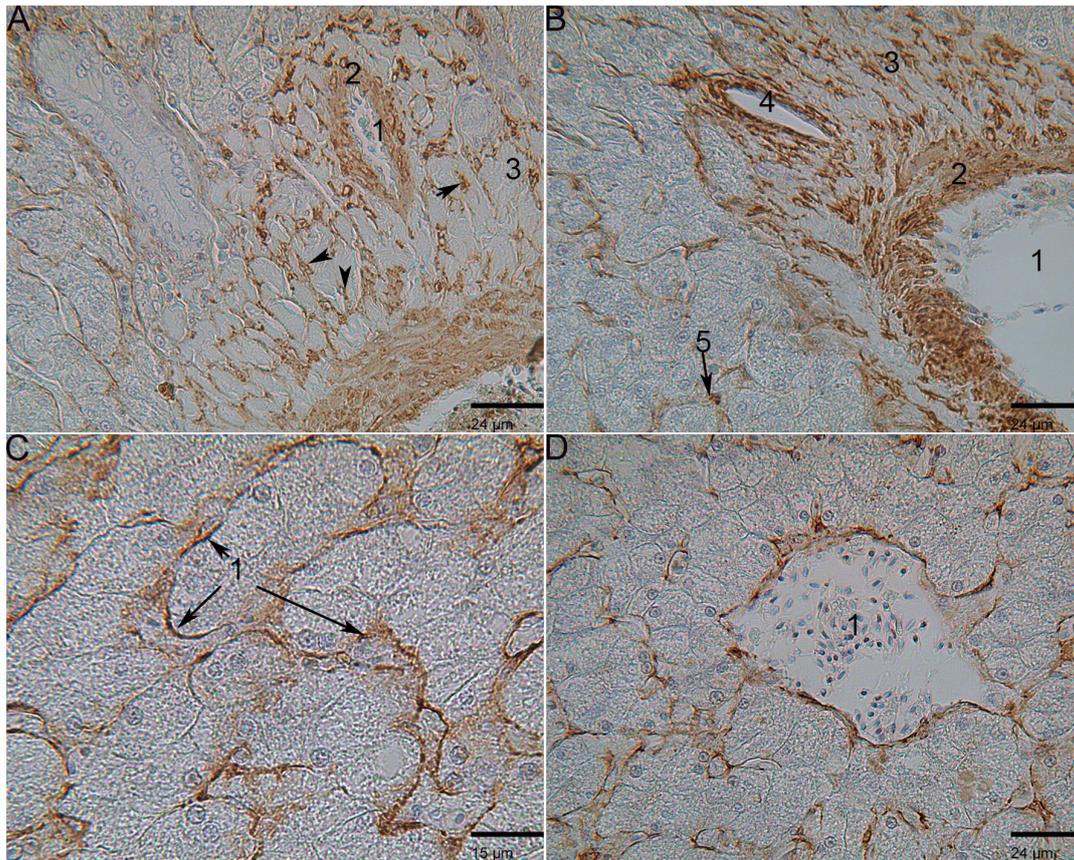
In der Tunica media der zuleitenden Gefäße der Straußenleber ist eine stark positive Reaktion mit dem  $\alpha$ -SMA-Antikörper zu sehen (Abb. 4.10 A und B) während sich die Intima negativ verhält. In der Adventitia der Gefäße und im Interstitium der Area interlobularis sind einzelne Zellen und Fasern zu beobachten, die eine deutliche bis starke Bindung mit  $\alpha$ -SMA eingehen. Die Bindegewebsstrukturen sind von dieser Reaktion ausgenommen.

Die Vena intralobularis besitzt in ihrer Endothelauskleidung deutlich bis stark  $\alpha$ -SMA-positive Zellen (Abb. 4.10 D). Eine deutliche bis starke Bindung an den  $\alpha$ -SMA-Antikörper ist auch in den Wandstrukturen der Sinusoide zu beobachten (Abb. 4.10 C). Sehr vereinzelt lassen sich dunkelbraun angefärbte, runde Zellen in der Wand der Sinusoide beobachten (Abb. 4.10 B). Siehe dazu auch Tabelle 4.5.

**Tabelle 4.5** Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -SMA

	<b>Struktur</b>	<b>Reaktionsintensität</b>
Arterien	Intima	0
	Media	2-3
	Adventitia	2
Venen	Intima	0
	Media	2-3
	Adventitia	2
Zentralvene	Endothelzellen	2-3
	Bindegewebe	2-3
Sinusoide	Endothelzellen	2-3
	Bindegewebe	0
Interstitium	Bindegewebszellen	0
	Bindegewebsfasern	0
	Matrix	0
	Glatte Muskelzellen	2
Hepatozyten	Zellkerne	0
	Zytoplasma	0
	Zellmembran	0
Gallengänge	Zellkerne	0
	Zytoplasma	0
	Zellmembran	0

0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv



**Abb. 4.10** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von  $\alpha$ -SMA

A: Arteria interlobularis; Deutlich bis stark  $\alpha$ -SMA-positive Reaktion der Tunica media (2) der Arteria interlobularis (1). Vereinzelt stark positive Zellen (Pfeile) zwischen den Bindegewebsfasern (3) der Area interlobularis.

B: Area interlobularis; Deutlich bis stark positive Immunreaktion der Tunica media (2) der Vena interlobularis (1). Einzelne stark  $\alpha$ -SMA-positive Zellen und Fasern in der Adventitia der Vene und dem Interstitium (3). Stark positive Tunica media der Arteria interlobularis (4). Einzelne stark positive runde Zellen (5) in der Sinusoidwand.

C: Leberparenchym; Deutlich bis stark positive reagierende Zellen in den Sinusoidwänden (1).

D: Vena intralobularis; Stark  $\alpha$ -SMA-positive Reaktion der Media der Vena intralobularis (1).

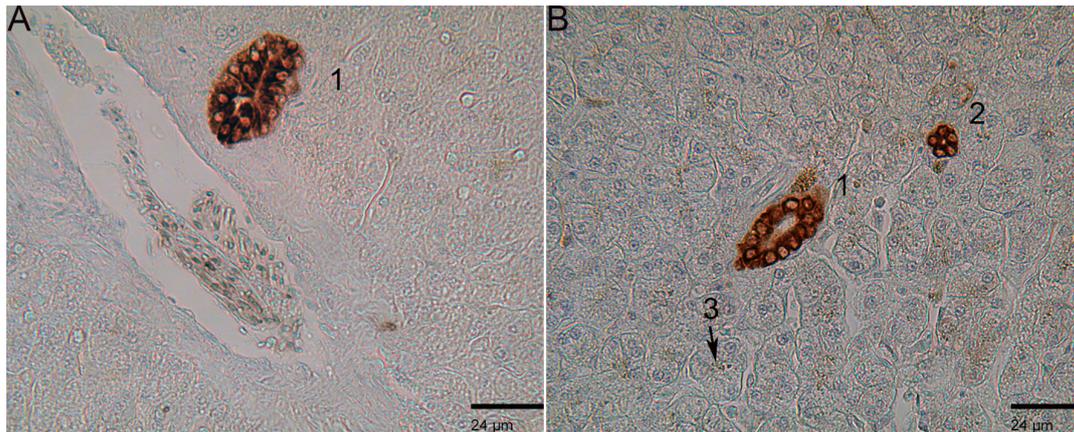
### 4.3.4 Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin

Beim immunhistochemischen Nachweis von Panzytokeratin zeigen die kubischen Epithelzellen der Heringschen Kanälchen und Ductus interlobulares und die hochprismatischen Epithelzellen der Ductuli biliferi eine starke Bindung an den Antikörper. Ihre Zellkerne sind von dieser Reaktion ausgenommen. Eine deutlich positive Reaktion ist auch an den biliären Polen der Hepatozyten in Form von dunkelbraunen Granula im Zytoplasma zu beobachten. Alle weiteren Strukturen des Leberparenchyms sind bezüglich dem Nachweis von Panzytokeratin negativ. (Abb. 4.11 und Tab. 4.6)

**Tabelle 4.6** Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin

	<b>Struktur</b>	<b>Reaktionsintensität</b>
Arterien	Intima	0
	Media	0
	Adventitia	0
Venen	Intima	0
	Media	0
	Adventitia	0
Zentralvene	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Sinusoide	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Interstitium	Bindegewebszellen	0
	Bindegewebsfasern	0
	Matrix	0
	Glatte Muskelzellen	0
Hepatozyten	Zellkerne	0
	Zytoplasma	0
	Zellmembran	0
Gallengänge	Zellkerne	0
	Zytoplasma	3
	Zellmembran	0

0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv



**Abb. 4.11** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin  
A: Ductulus biliferus; Stark Panzytokeratin-positive Epithelzellen des Ductulus biliferus (1).  
B: Ductus interlobularis; Stark Panzytokeratin-positive Epithelzellen des Ductus interlobularis (1) und eines Heringschen Kanälchens (2). Deutlich positive granuläre Zeichnung am biliären Pol der Hepatozyten (3).

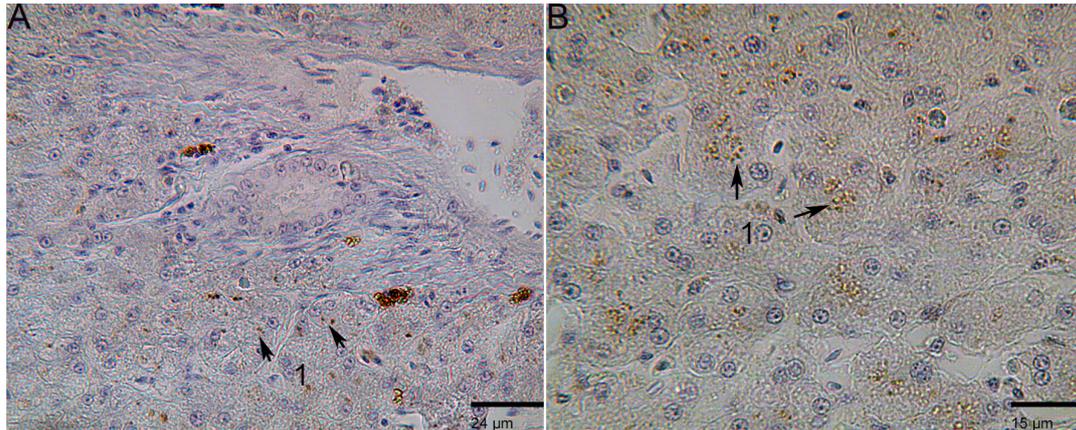
### 4.3.5 Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 8

Der immunhistochemische Nachweis von Zytokeratin 8 ist ausschließlich in den biliären Abschnitten der Hepatozyten positiv. Dort zeigt sich eine positive granuläre Reaktion im Zytoplasma derselben. Alle weiteren Strukturen der Straußenleber zeigen keine Bindung an Zytokeratin 8. (Abb. 4.12 und Tab. 4.7)

**Tabelle 4.7** Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 8

	<b>Struktur</b>	<b>Reaktionsintensität</b>	<b>Besonderheiten</b>
Arterien	Intima	0	
	Media	0	
	Adventitia	0	
Venen	Intima	0	
	Media	0	
	Adventitia	0	
Zentralvene	Endothelzellen	0	
	Bindegewebe	0	
Sinusoide	Endothelzellen	0	
	Bindegewebe	0	
Interstitium	Bindegewebszellen	0	
	Bindegewebsfasern	0	
	Matrix	0	
	Glatte Muskelzellen	0	
Hepatozyten	Zellkerne	0	
	Zytoplasma	1-2	granulär am biliären Pol
	Zellmembran	0	
Gallengänge	Zellkerne	0	
	Zytoplasma	2-3	
	Zellmembran	0	

0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv



**Abb. 4.12** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 8  
 A: Area interlobularis; Schwach positive Granula (Pfeile) in den biliären Abschnitten der Hepatozyten (1).  
 B: Parenchym; Schwach bis deutlich positive Granula (Pfeile) in den biliären Abschnitten der Hepatozyten (1).

### 4.3.6 Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 14

Beim immunhistochemischen Nachweis von Zytokeratin 14 zeigt das Zytoplasma der Epithelzellen der Gallengänge als einzigste Struktur der Leber des Straußes eine starke Bindung an den Antikörper. Die kubischen Epithelzellen des Ductus interlobularis (Abb. 4.13 A) und die hochprismatischen Epithelzellen des Ductulus biliferus (Abb. 4.13 B) sind in ihrer Reaktion etwas stärker positiv als die Epithelzellen der Heringschen Kanälchen (Abb. 4.13 A).

Alle weiteren Strukturen der Leber sind negativ bezüglich des immunhistochemischen Nachweises von Zytokeratin 14.

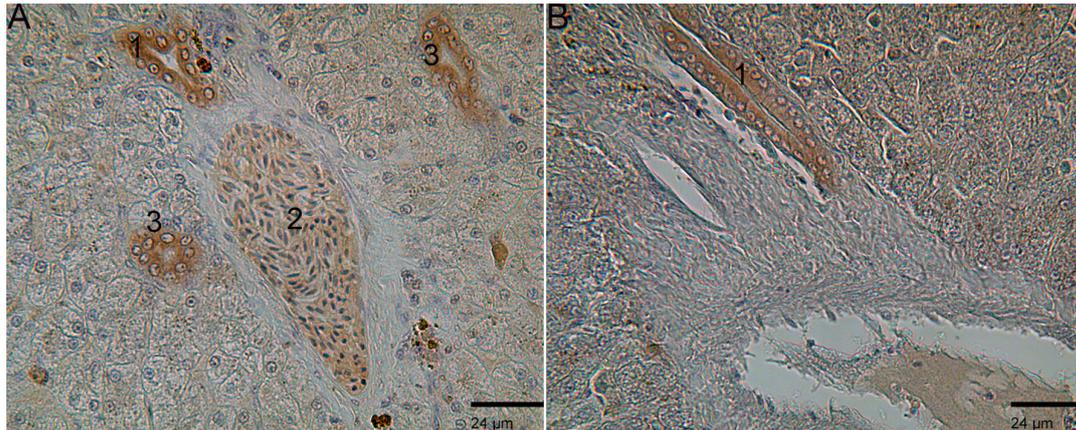
Gut darstellen lassen sich die kernhaltigen Erythrozyten, die eine deutlich positive Reaktion in ihrem Zytoplasma aufweisen.

(Abb. 4.13 und Tab. 4.8)

**Tabelle 4.8** Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 14

	<b>Struktur</b>	<b>Reaktionsintensität</b>
Arterien	Intima	0
	Media	0
	Adventitia	0
Venen	Intima	0
	Media	0
	Adventitia	0
Zentralvene	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Sinusoide	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Interstitium	Bindegewebszellen	0
	Bindegewebsfasern	0
	Matrix	0
	Glatte Muskelzellen	0
Hepatozyten	Zellkerne	0
	Zytoplasma	0
	Zellmembran	0
Gallengänge	Zellkerne	0
	Zytoplasma	2-3
	Zellmembran	0

0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv



**Abb. 4.13** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 14  
A: Area interlobularis; Stark Zytokeratin 14-positives Zytoplasma der Ductus interlobularis Epithelzellen (1). Etwas schwächer positive Reaktion der Heringschen Kanälchen (3). Deutlich positives Zytoplasma der Erythrozyten (2).  
B: Area interlobularis; Deutlich positive Reaktion der hochprismatischen Epithelzellen des Ductulus biliferus (1).

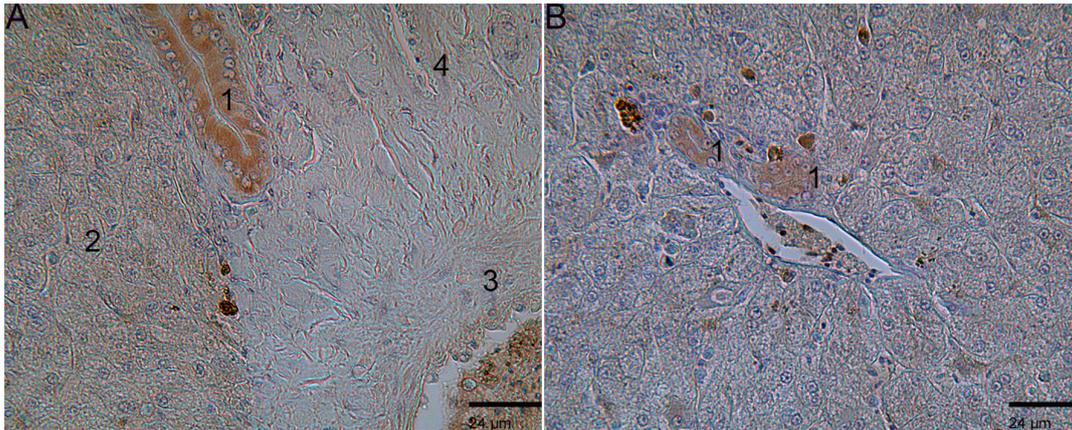
### 4.3.7 Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 18

Zytokeratin 18 ist in mehreren Abschnitten der Gallengänge der Leber des Straußes zu finden. Eine starke Bindung erhält man in den Epithelzellen der Ductuli biliferi, während die Epithelzellen der Ductus interlobulares etwas schwächer positiv reagieren. (Abb. 4.14 und Tab. 4.9)

**Tabelle 4.9** Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 18

	<b>Struktur</b>	<b>Reaktionsintensität</b>
Arterien	Intima	0
	Media	0
	Adventitia	0
Venen	Intima	0
	Media	0
	Adventitia	0
Zentralvene	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Sinusoide	Endothelzellen	0
	Bindegewebe	0
Interstitium	Bindegewebszellen	0
	Bindegewebsfasern	0
	Matrix	0
	Glatte Muskelzellen	0
Hepatozyten	Zellkerne	0
	Zytoplasma	0-1
	Zellmembran	0
Gallengänge	Zellkerne	0
	Zytoplasma	2-3
	Zellmembran	0

0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv



**Abb. 4.14** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 18  
 A: Area interlobularis; Stark Zytokeratin 18-positives Zytoplasma der Epithelzellen des Ductulus biliferus (1).  
 B: Area interlobularis; Deutlich positive Epithelzellen der Ductus interlobulares (1).

### 4.3.8 Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19

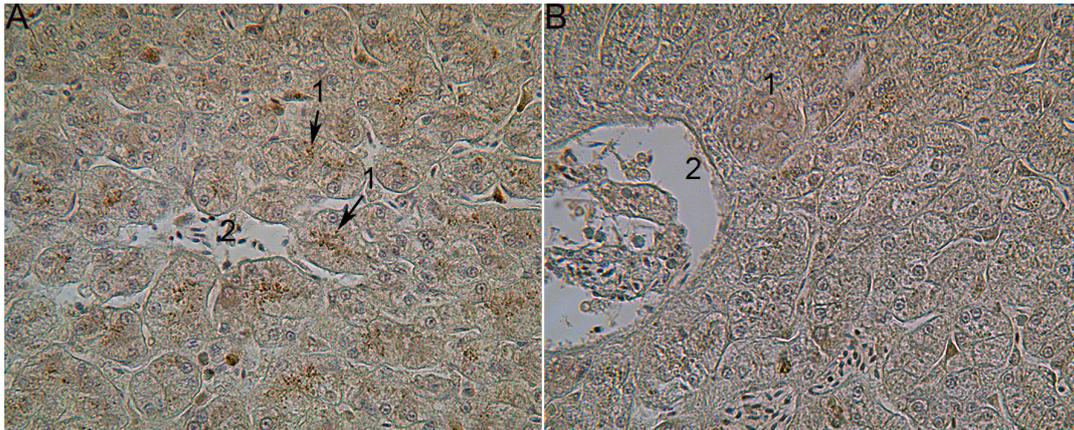
Bei der Bindung von Anti-Zytokeratin 19 reagieren die Bestandteile der Straußenleber ähnlich wie mit den Antikörpern der anderen untersuchten Zytokeratine. Die Gallengänge reagieren insgesamt deutlich schwächer positiv als bei den Untersuchungen auf Zytokeratin 14 und 18. Die Epithelzellen der Ductuli biliferi zeigen eine starke Bindung an den Antikörper, die der Ductus interlobulares eine schwächer positive Reaktion. Bei den Heringschen Kanälchen ist nur eine sehr schwach positive Reaktion der Epithelzellen zu beobachten. Bei den Hepatozyten zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Untersuchung auf Zytokeratin 8. Eine schwach positive, granuläre Reaktion ist am biliären Pol des Zytoplasmas zu beobachten.

In der Tunica media der Venen zeigen sich sehr schwach positiv angefärbte Fasern. (Abb. 4.15 und 4.16 und Tab. 4.10)

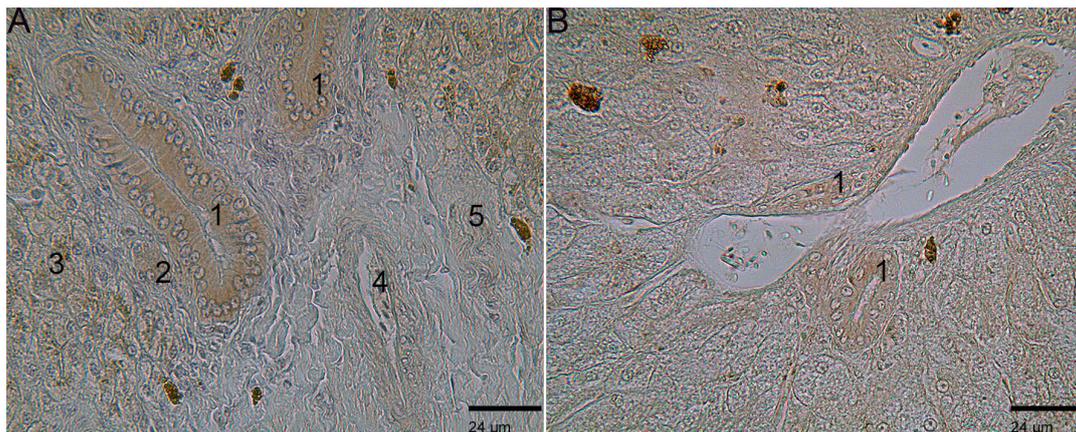
**Tabelle 4.10** Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19

	<b>Struktur</b>	<b>Reaktionsintensität</b>	<b>Besonderheiten</b>
Arterien	Intima	0	
	Media	0-1	
	Adventitia	0	
Venen	Intima	0	
	Media	0	
	Adventitia	0	
Zentralvene	Endothelzellen	0	
	Bindegewebe	0	
Sinusoide	Endothelzellen	0	
	Bindegewebe	0	
Interstitium	Bindegewebszellen	0	
	Bindegewebsfasern	0-1	
	Matrix	0	
	Glatte Muskelzellen	0	
Hepatozyten	Zellkerne	0	
	Zytoplasma	0-1	granulär am biliären Pol
	Zellmembran	0	
Gallengänge	Zellkerne	0	
	Zytoplasma	1-2	
	Zellmembran	0	

0: negativ; 1: schwach positiv; 2: deutlich positiv; 3: stark positiv



**Abb. 4.15** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19  
 A: Parenchym mit Zentralvene (2); Deutlich Zytokeratin 19-positive Granula im biliären Zytoplasma der Hepatozyten (1).  
 B: Heringscher Kanal; Sehr schwach positive Reaktion der Epithelzellen des Heringschen Kanals (1) in Nachbarschaft zu einer negativ reagierenden Vena intralobularis (2).



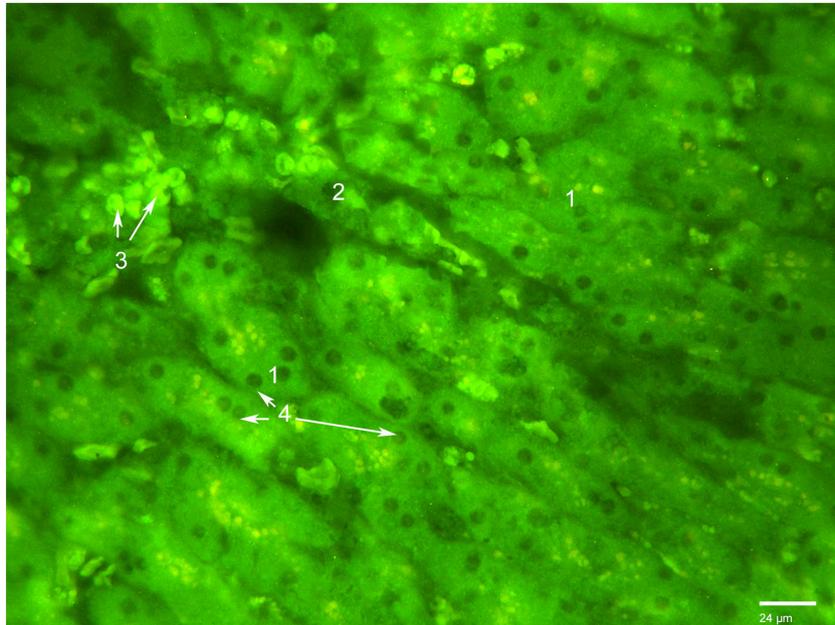
**Abb. 4.16** Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19  
 A: Area interlobularis; Deutlich positives Zytoplasma der Epithelzellen (1) des Ductulus biliferus. Schwach positives Zytoplasma der Epithelzellen des Ductus interlobularis (2). Schwach positive, granulär verteilte Reaktion am biliären Pol der Hepatozyten (3). Keine bis sehr schwach positive Reaktion der Tunica media der Vena interlobularis (4) und von Fasern im Interstitium (5).  
 B: Area interlobularis; Schwach bis deutlich positive Reaktion der Epithelzellen der Ductus interlobulares (1).

## 4.4 Ergebnisse der Glykohochemie

### 4.4.1 Bindungsstellen für *Canavalia ensiformis* Agglutinin (ConA)

*Zuckerspezifität:  $\alpha$ -D-Mannose >  $\alpha$ -D-Glukose*

Bei der Untersuchung der Bindungsstellen von *Canavalia ensiformis* Agglutinin (ConA) in der Leber des Straußes zeigt sich im Zytoplasma der Hepatozyten eine stark positive, diffus verteilte Reaktion, von welcher der Nucleus ausgeschlossen ist (Abb. 4.17). Deutlich zu sehen ist die positive Reaktion der kernhaltigen Erythrozyten des Straußes. Die Gefäßwände weisen ebenso wie die Epithelzellen der Gallengänge und das Interstitium eine negative Reaktion mit ConA auf.



**Abb. 4.17** Leber, Strauß, Vena intralobularis, Bindung von ConA-FITC

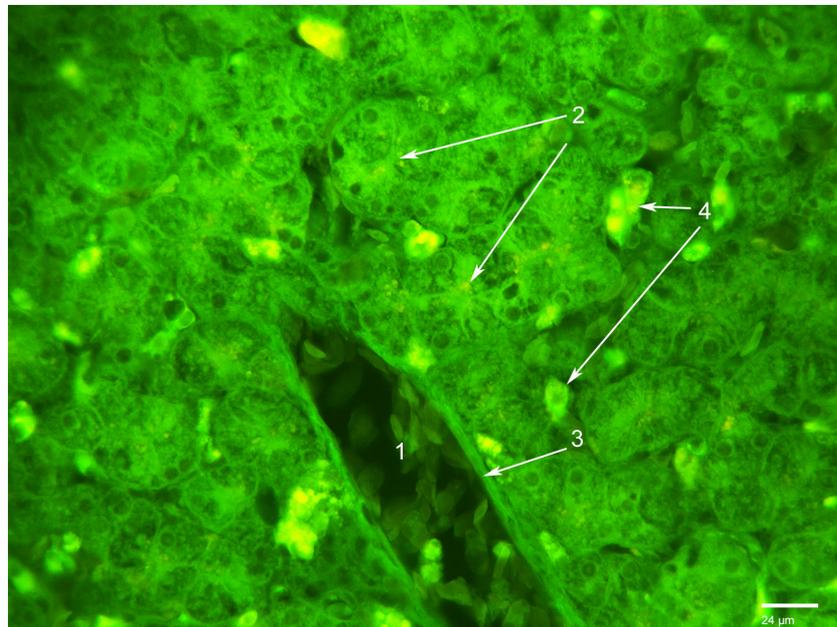
Das Zytoplasma der Hepatozyten (1) weist eine diffuse Reaktion mit ConA auf. Dabei zeigt der Nucleus (4) der Hepatozyten eine negative Reaktion. Die kernhaltigen Vogelerythrozyten (3) zeigen eine deutlich positive Reaktion.

#### 4.4.2 Bindungsstellen für *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)

*Zuckerspezifität:  $\alpha$ -D-Mannose >  $\alpha$ -D-Glukose*

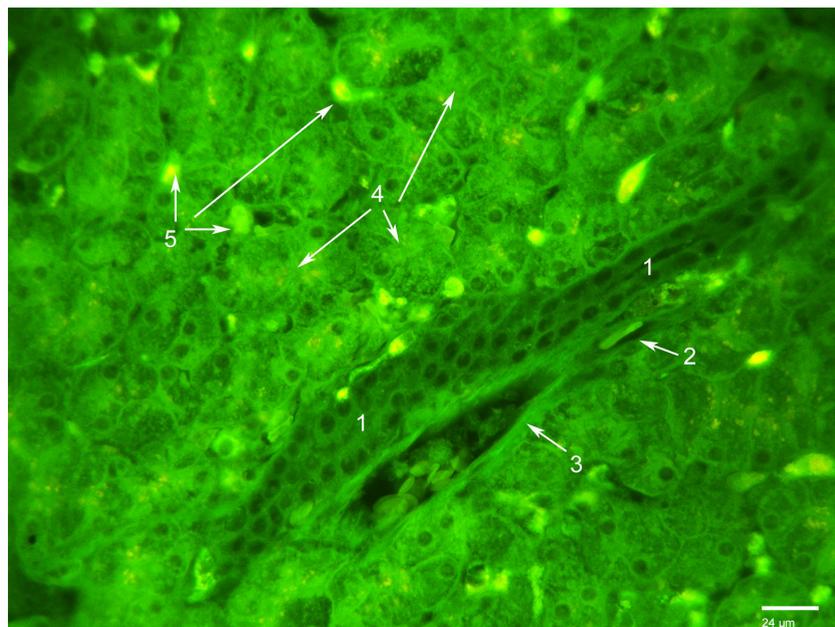
Eine stark positive Reaktion zeigen sinusoidale oder perisinusoidale Zellen, die von ovaler Gestalt sind und keine Ausläufer besitzen (Abb. 4.18 und 4.20). Das Zytoplasma der Hepatozyten reagiert deutlich positiv mit einer schwächeren Reaktion auf der sinusoidalen Seite und einer stärkeren zu den Gallekanälchen hin (Abb. 4.18 und 4.19).

Eine schwach bis deutlich positive Reaktion erhält man von den Wänden der Vena interlobularis und Vena intralobularis (Abb. 4.18, 4.19 und 4.20), wohingegen das Bindegewebe der Arteria interlobularis und des Ductus interlobularis eine schwache Bindung an LCA zeigt.



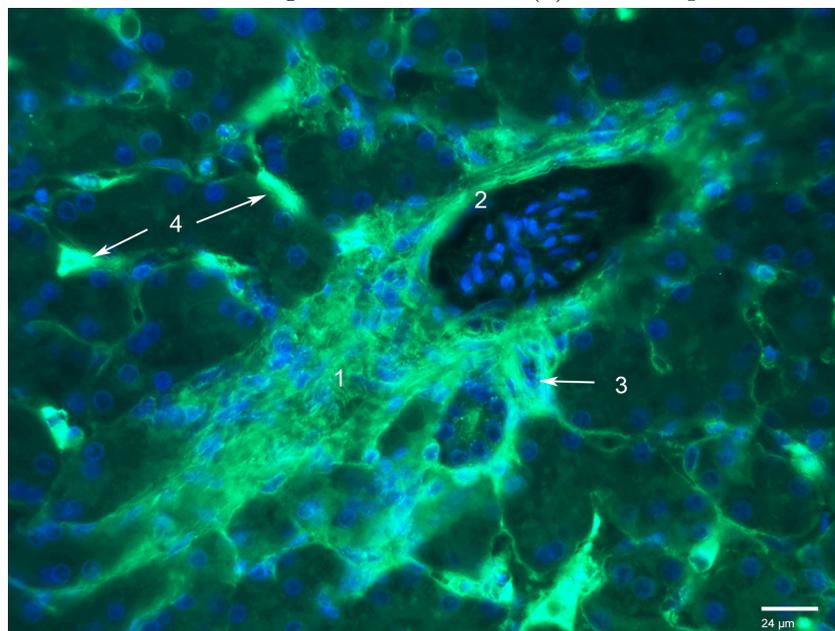
**Abb. 4.18** Leber, Strauß, Vena intralobularis, Bindung von LCA-FITC

Das Bindegewebe (3) der Vena intralobularis (1) reagiert schwach positiv. Im Zytoplasma der Hepatozyten reagieren insbesondere die den Canaliculi biliferi zugewandten Anteile (2) deutlich positiv. Sinusoidale oder perisinusoidale Zellen (4) reagieren auf LCA stark positiv.



**Abb. 4.19** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von LCA-FITC

Starke Reaktion von sinusoidalen oder perisinusoidalen Zellen (5). Schwach positive Reaktion des Bindegewebes der Vena interlobularis (3). Sehr schwach positive bis negative Reaktion des Bindegewebes von Arteria (2) und Ductus interlobularis (1). Im Zytoplasma der Hepatozyten reagieren die den Canaliculi biliferi zugewandten Anteile (4) deutlich positiv.



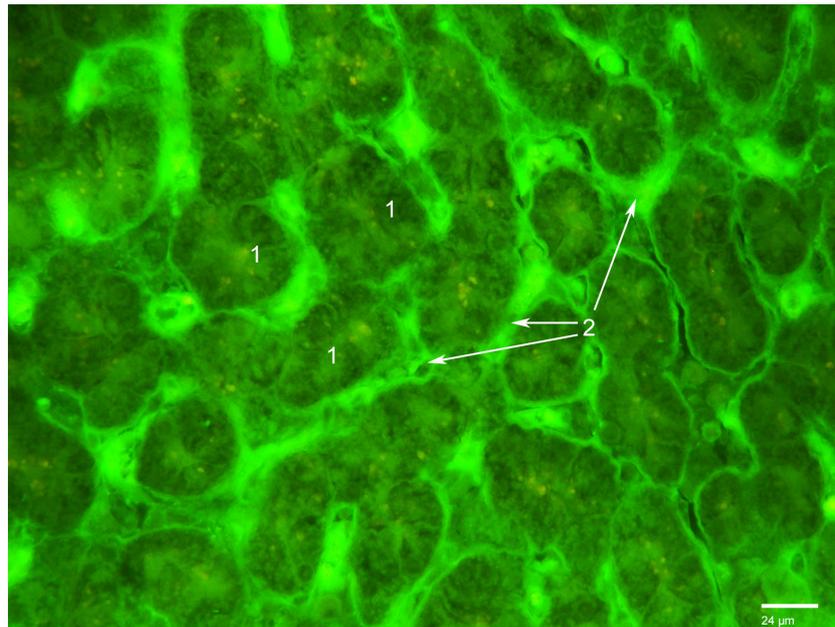
**Abb. 4.20** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI

Stark positive Reaktion des Interstitiums (1) der Area interlobularis. Stark positive Reaktion in den Wänden der Vena (2) und Arteria (3) interlobularis. Sehr stark positive Reaktion sinusoidaler und perisinusoidaler Zellen (4).

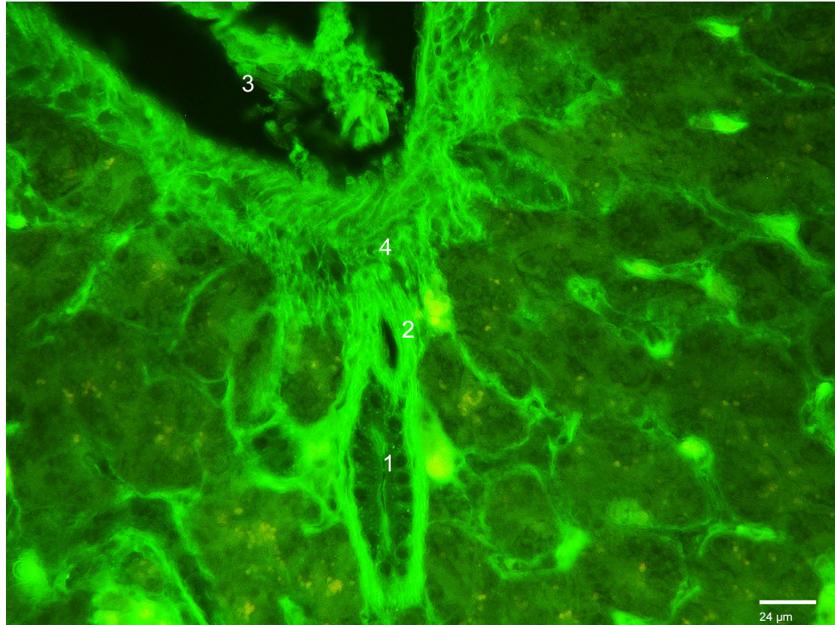
### 4.4.3 Bindungsstellen für *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

*Zuckerspezifität: Glukose/Mannose*

Stark positiv reagiert PSA mit Zellen im gesamten sinusoidalen Raum. An den Wänden ist fast in allen Sinusoiden eine fadenförmige Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 4.21). Eine deutlich bis stark PSA-positive Reaktion ist im Bindegewebe der Gefäßwände und um die Gallengänge herum zu sehen (Abb. 4.22). Die Hepatozyten zeigen durchgehend eine negative Reaktion mit PSA (Abb. 4.21 und 4.22).



**Abb. 4.21** Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von PSA-FITC  
Stark PSA-positive Reaktion sinusoidaler Zellen (2)  
mit fadenförmiger Ausbreitung entlang der Sinusoid-  
wände. Negative Reaktion der Hepatozyten (1).

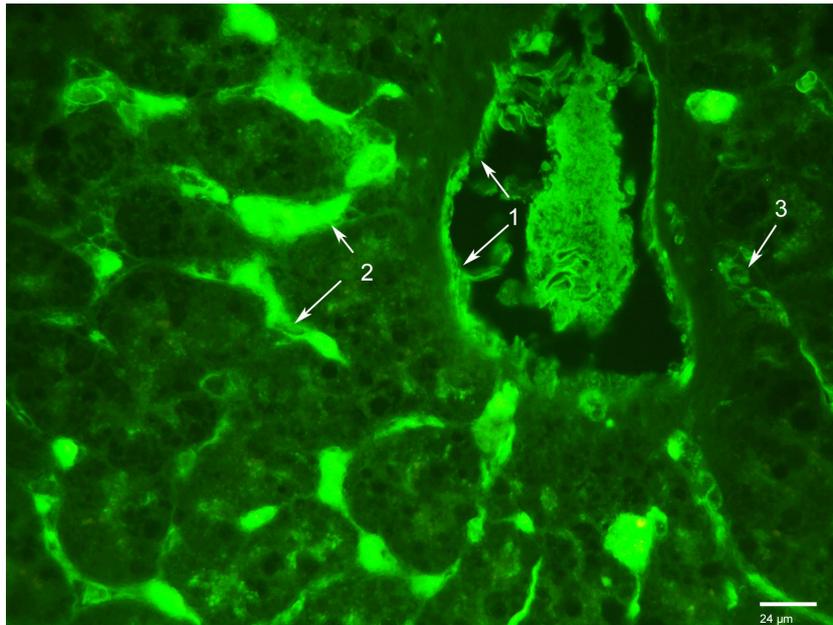


**Abb. 4.22** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von PSA-FITC  
Deutlich bis stark PSA-positive Reaktion des Bindegewebes (4) der Arterien- (2), Venen- (3) und Gallengangswände (1).

#### 4.4.4 Bindungsstellen für Peanut Agglutinin (PNA)

*Zuckerspezifität: Gal $\beta$ (1-3)GalNAc*

Bei der Untersuchung auf Bindungsstellen mit dem Lektin Peanut Agglutinin (PNA) lässt sich in der Straußenleber eine besonders starke Reaktion mit Zellen des sinusoidalen oder perisinusoidalen Raumes feststellen. Diese stellen sich länglich mit teilweise vorkommenden negativ reagierendem nahezu rundem Inhalt im Zytoplasma dar. Eine schwach positive Reaktion erhält man von den Endothelzellen der Intima der Gefäßwände. Die Hepatozyten und Gallengänge zeigen genauso wie das Bindegewebe der Leber keine Reaktion. (Abb. 4.23)

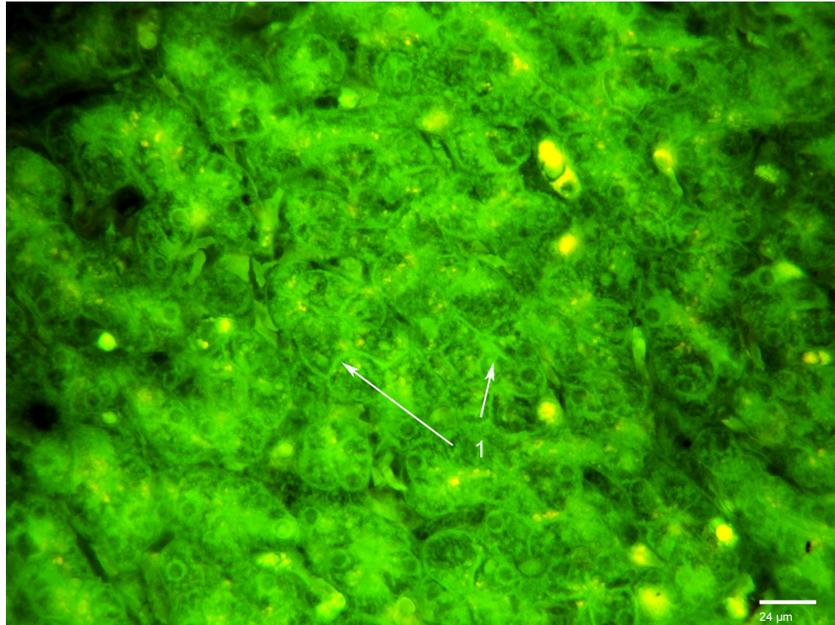


**Abb. 4.23** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von PNA-FITC  
Stark PNA-positive Reaktion sinusoidaler oder perisinusoidaler Zellen (2) mit teilweise vorkommender negativer Reaktion im Zytoplasma derselben. Schwach positive Reaktion der Intima der Venen- (1) und Arterienwand (3).

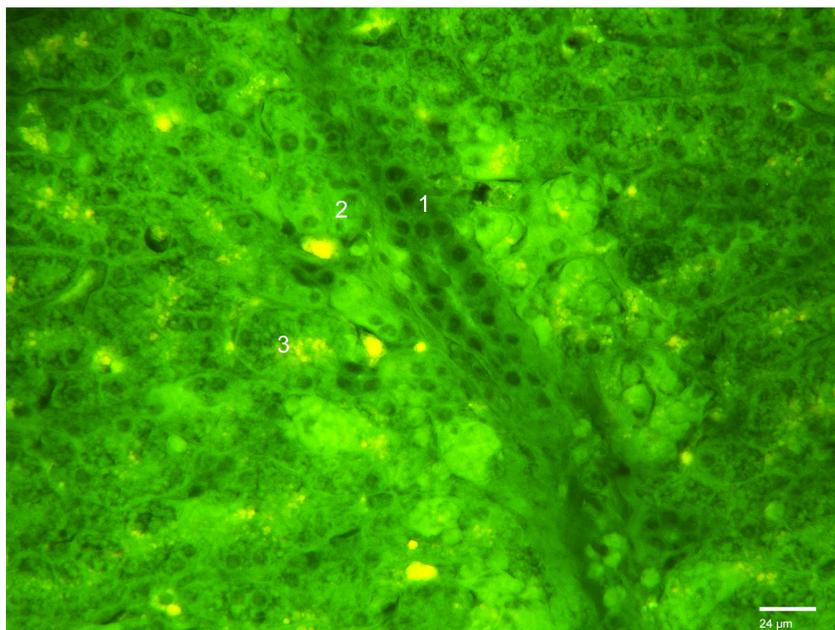
#### 4.4.5 Bindungsstellen für *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

*Zuckerspezifität:  $\beta$ -D-Galaktose*

Bei der Inkubation mit dem *Ricinus communis* Agglutinin (RCA) wiesen die Hepatozyten eine deutlich bis stark positive Reaktion auf. Diese erscheint im Zytoplasma in granulärer Form und zeigt eine stärkere Fluoreszenz im Bereich der Zellmembranoberfläche (Abb. 4.24). Eine schwach RCA-positive Reaktion zeigt das Lumen des Ductus interlobularis. Die Epithelzellen desselben zeigen eine negative Reaktion (Abb. 4.25). Die Hepatozyten in unmittelbarer Nähe des Ductus interlobularis wiesen eine diffus verteilte, stark positive Reaktion ihres Zytoplasmas auf. Die Zellkerne der Hepatozyten binden nicht an das Lektin RCA. In der Peripherie des Ductus zeigen die Hepatozyten wieder eine deutlich RCA-positive, granuläre Reaktion mit einer stärkeren Fluoreszenz im Bereich der Zellmembran (Abb. 4.25).



**Abb. 4.24** Leber, Strauß, Hepatozyten, Bindung von RCA-FITC  
Die Hepatozyten (1) zeigen eine deutlich bis stark RCA-positive Reaktion, besonders im Bereich der Zellmembranoberfläche.

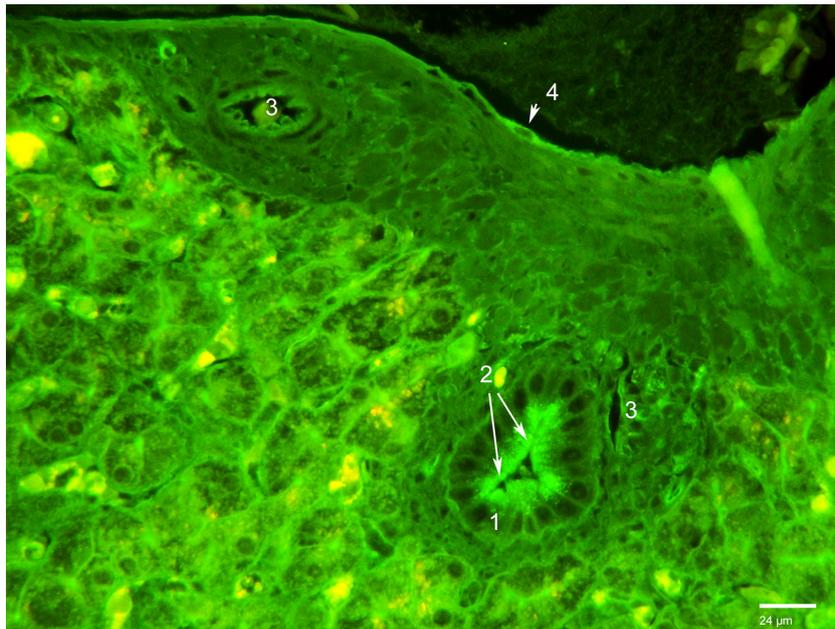


**Abb. 4.25** Leber, Strauß, Ductus interlobularis, Bindung von RCA-FITC  
Schwach positive Reaktion im Lumen des Ductus interlobularis (1). Die Hepatozyten im Ductus nahen Bereich (2) zeigen eine stark RCA-positive Reaktion des gesamten Zytoplasmas, bei den peripher gelegenen (3) ist eine deutlich positive, granuläre Reaktion zu erkennen, die besonders stark im Bereich der Zellmembran zu sehen ist.

#### 4.4.6 Bindungsstellen für Wheat Germ Agglutinin (WGA)

*Zuckerspezifität: GlcNAc/Neu5NAc*

Bindungsstellen für Wheat Germ Agglutinin (WGA) sind unter anderem in den Epithelzelle der Gallengänge zu finden. Diese zeigen in ihren apikalen Anteilen eine starke Bindungsaffinität zu WGA. Die Endothelzellen der Vena und Arteria interlobularis reagieren nur schwach positiv auf WGA. Die übrigen Strukturen der Straußenleber zeigen keine Fluoreszenz. (Siehe Abb. 4.26)



**Abb. 4.26** Leber, Strauß, Ductus interlobularis, Bindung von WGA-FITC

Die Epithelzellen des Ductus interlobularis (1) reagieren apikal (2) stark positiv auf das Lektin WGA. Bei den Endothelzellen der Arteria interlobularis (3) zeigt sich nur eine schwache Fluoreszenz, ebenso bei der Vena interlobularis (4).

#### 4.4.7 Bindungsstellen für Wheat Germ Agglutinin succinyliert (WGAs)

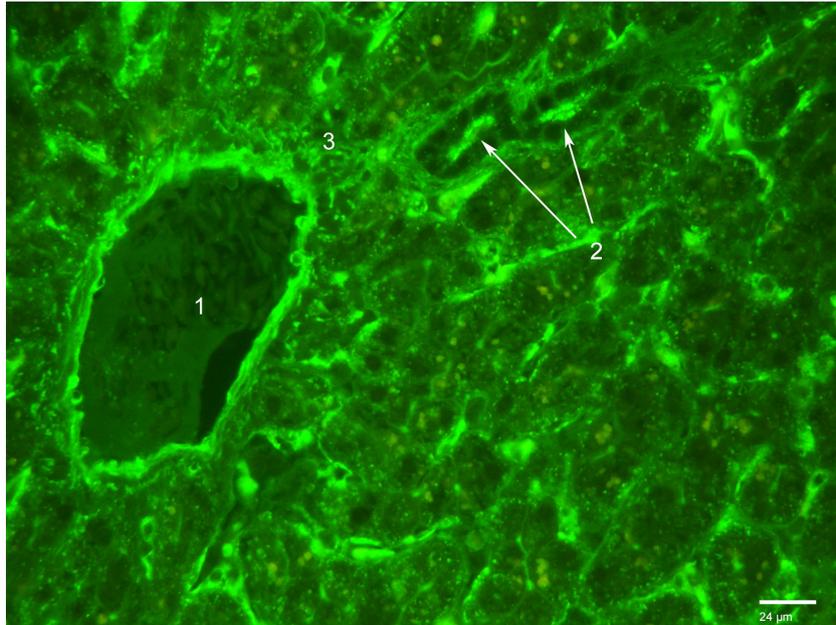
*Zuckerspezifität: GlcNAc*

Insgesamt reagieren zahlreiche Strukturen der Leber des Straußes positiv mit dem succinylierten Wheat germ Agglutinin (WGAs). In den Ductus interlobulares zeigen die apikalen Anteile der Epithelzellen eine starke Fluoreszenz (Abb. 4.27). Mit der gleichen Intensität zeigt sich auch die Reaktion der Endothelzellen der Intima der Vena interlobularis und der Vena intralobularis (Abb. 4.27 und 4.30). Eine schwach positive Reaktion ist in der Intima der Arteria interlobularis zu beobachten (Abb. 4.29).

In den Sinusoiden sind Zellen mit einer starken Bindungsaffinität zu WGAs zu beobachten. Diese sind länglich-oval mit negativ reagierenden runden Einschlüssen. Die Wandauskleidung der Sinusoide reagiert stark WGAs-positiv (Abb. 4.30).

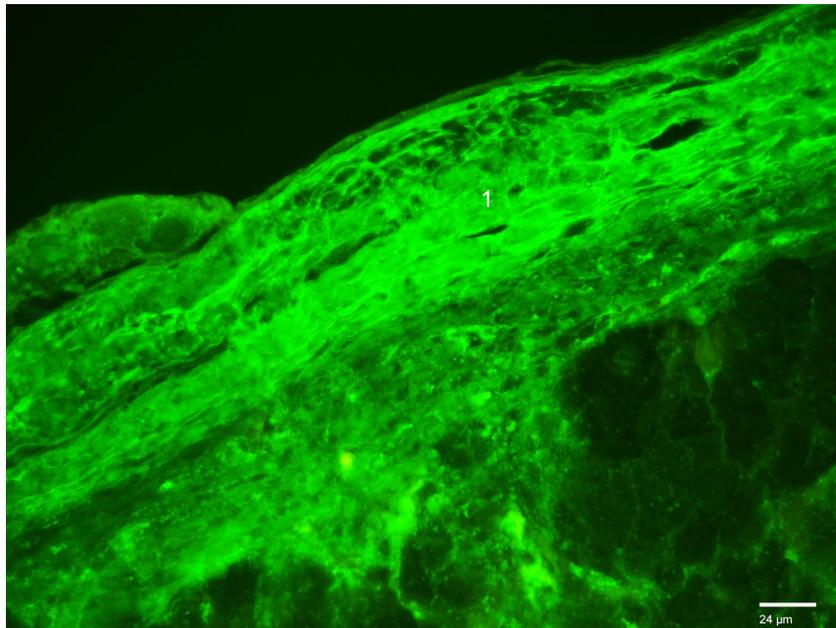
Die kollagenen Fasern des Bindegewebes der Leber zeigen ebenfalls eine stark positive Reaktion nach Inkubation mit WGAs. Besonders deutlich zu sehen ist diese Reaktion in der Glissonschen Kapsel (Abb. 4.28).

In den Hepatozyten ist keine Bindung mit dem succinylierten WGA (WGAs) zu beobachten.



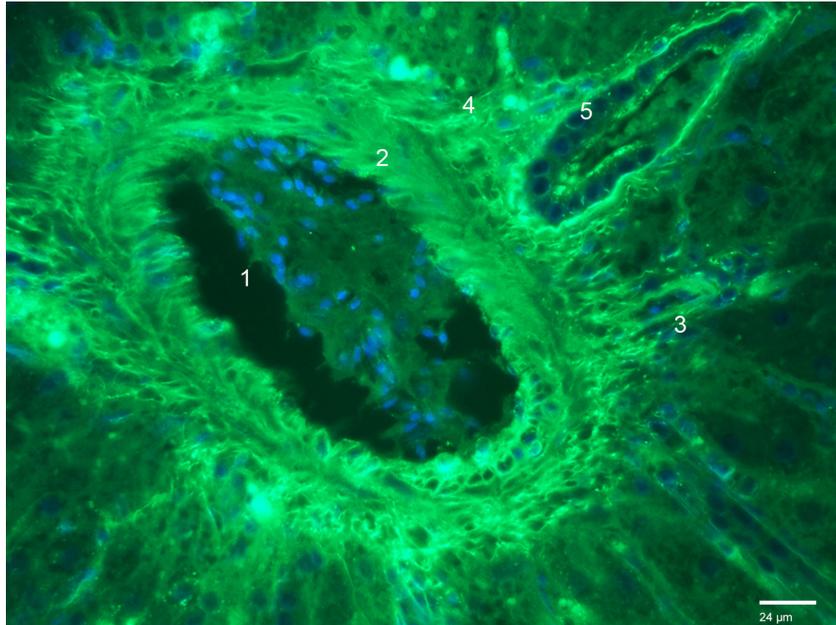
**Abb. 4.27** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von WGAs-FITC

Die Endothelzellen der Vena interlobularis (1) und die apikalen Anteile der Epithelzellen der Ductus interlobulares (2) sind stark positiv. Vereinzelt zeigen sich deutlich positive Fasern im Interstitium (3) der Area interlobularis.



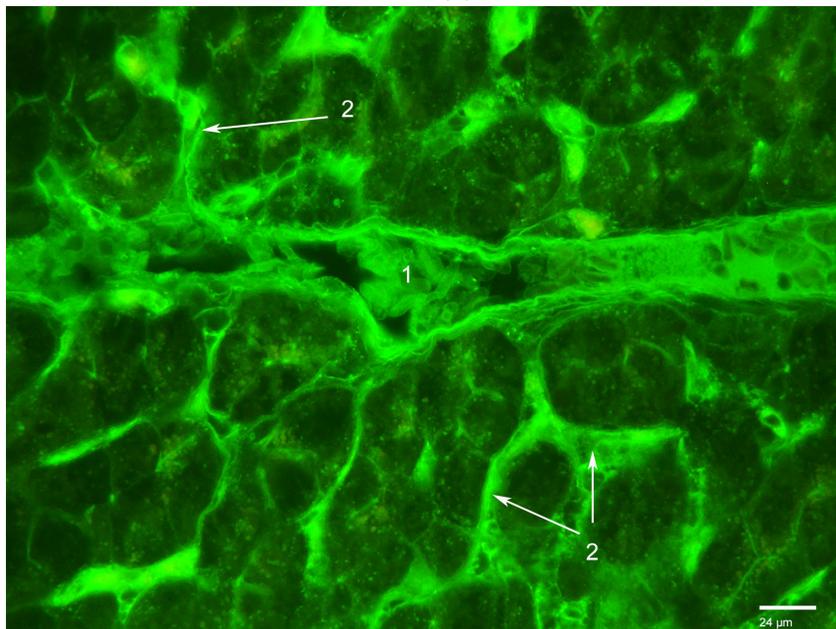
**Abb. 4.28** Leber, Strauß, Glisson-Kapsel, Bindung von WGAs-FITC

Die kollagenen Bindegewebsfasern der Glissonschen Kapsel stellen sich stark positiv dar (1).



**Abb. 4.29** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI

Die Tunica intima der Vena interlobularis (1) und die Arteria interlobularis (3) zeigen eine schwache bis deutliche Fluoreszenz. Deutlich positive Fasern im Interstitium (4) der Area interlobularis und um den Ductus interlobularis (5) herum stark positiv.



**Abb. 4.30** Leber, Strauß, Vena intralobularis, Bindung von WGAs-FITC

Die Endothelauskleidung der Vena intralobularis (1) zeigt eine stark positive Reaktion mit WGAs. Auf die gleiche Weise verhalten sich sinusoidale Zellen und Teile der Sinusoidwände (2).

#### 4.4.8 Bindungsstellen für Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

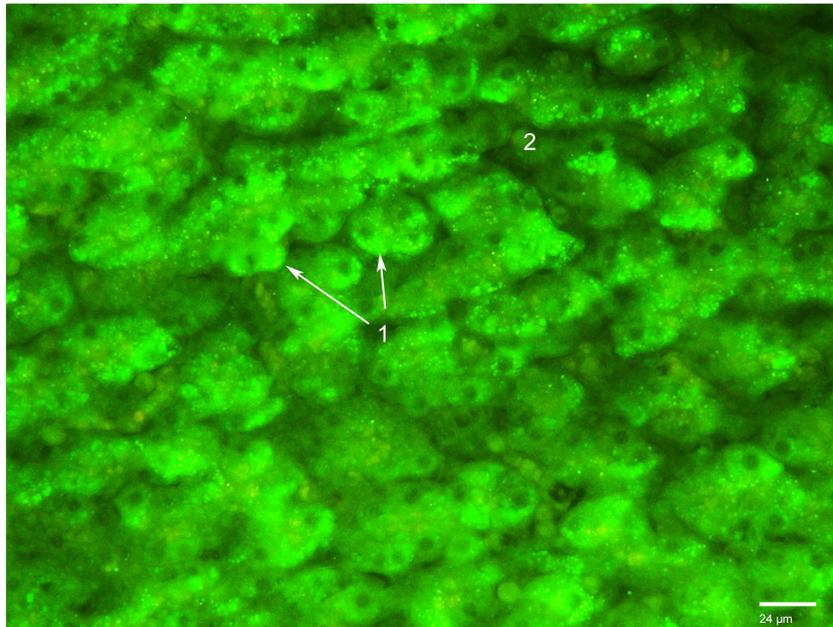
*Zuckerspezifität: GalNAc- $\alpha$ (1,3)-GalNAc*

Die Inkubation mit dem Lektin Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) war für alle Strukturen der Leber des Straußes negativ.

#### 4.4.9 Bindungsstellen für Griffonia simplicifolia Agglutinin I (GSL-I)

*Zuckerspezifität: GalNAc*

Die Hepatozyten zeigen eine stark positive Reaktion auf Griffonia simplicifolia I Agglutinin (GSL-I) mit einer granulären Verteilung und stellenweise verstärkter Fluoreszenz. Ihre Nuklei sind von dieser Reaktion ausgenommen. Die zwischen den Hepatozyten verlaufenden Sinosoide weisen eine negative Reaktion auf (Abb. 4.31). Alle weiteren Strukturen der Straußenleber, wie Gefäßwände, Gallengänge und Bindegewebe reagieren nicht mit GSL-I.



**Abb. 4.31** Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von GSL-I-FITC  
Teile des Zytoplasmas der Hepatozyten (1) zeigen eine stark GSL-I-positive Reaktion. Die Sinusoide (2) sind negativ.

#### 4.4.10 Bindungsstellen für *Saphora japonica* Agglutinin (SJA)

*Zuckerspezifität: GalNAc*

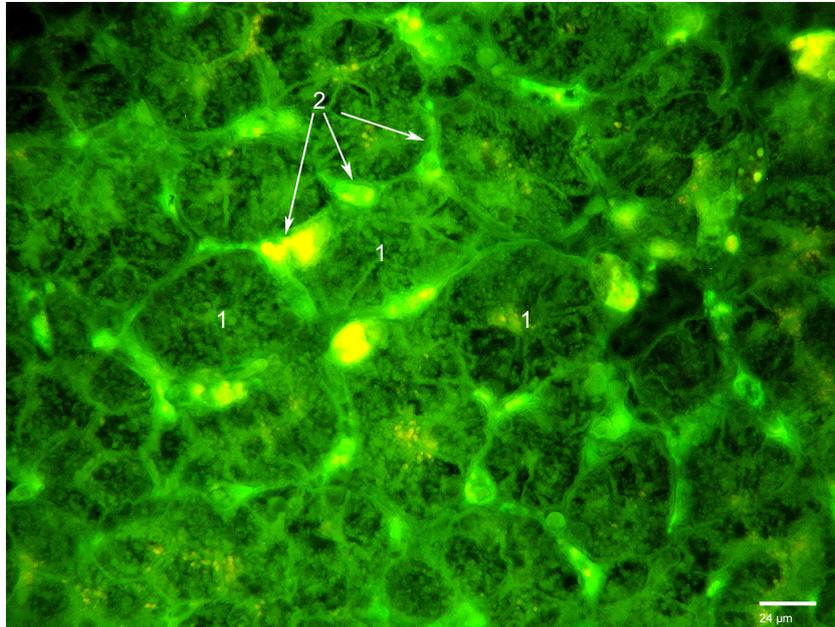
Die Inkubation mit dem Lektin *Saphora japonica* Agglutinin (SJA) war für alle Strukturen der Leber des Straußes negativ.

#### 4.4.11 Bindungsstellen für Soybean Agglutinin (SBA)

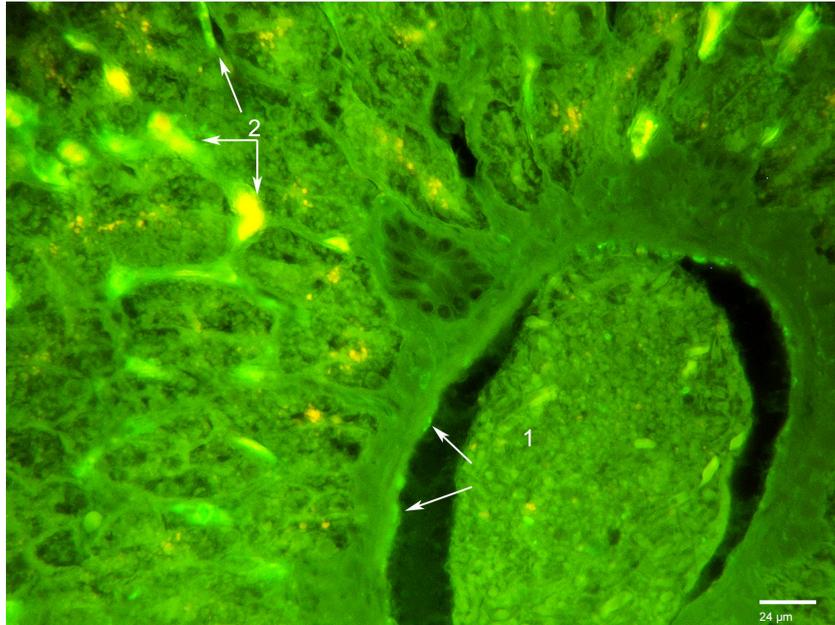
*Zuckerspezifität:  $\alpha$ - und  $\beta$ -GalNAc*

Im Sinusoidalraum zeigen Zellen eine deutlich bis stellenweise stark positive Reaktion auf die Inkubation mit Soybean Agglutinin (SBA). Diese sind von ovaler Form und zeigen teilweise in ihrem Zytoplasma SBA-negative Vakuolen (Abb. 4.32). In den dazwischen liegenden Hepatozyten zeigt sich keine Bindung an SBA.

Die Endothelzellen der Intima der Venenwände zeigen eine schwache Fluoreszenz nach der Inkubation mit SBA (Abb. 4.33). Die weiteren Schichten der Venenwände, sowie auch die Gallengangs- und Arterienwände gehen keine Bindung mit SBA ein. Das Bindegewebe der Straußenleber reagiert negativ.



**Abb. 4.32** Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von SBA-FITC  
Deutlich bis stark positive Reaktion einzelner Zellen  
(2) im Sinusoidraum. Negative Reaktion der Hepato-  
zyten (1).



**Abb. 4.33** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von SBA-FITC  
Deutlich bis stark positive Reaktion des Sinusoidendothels (2). Schwach positive Reaktion der Endothelzellen (Pfeile) der Vena interlobularis (1).

#### 4.4.12 Bindungsstellen für *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)

*Zuckerspezifität: Galaktose/GalNAc*

Nach der Inkubation mit dem Lektin *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA) zeigt sich in keiner der Strukturen der Leber des Straußes eine Fluoreszenz.

#### 4.4.13 Bindungsstellen für *Ulex europaeus* Agglutinin I (UEA-I)

*Zuckerspezifität:  $\alpha$ -L-Fucose*

Das Lektin *Ulex europaeus* I Agglutinin (UEA-I) reagiert mit keiner Struktur in der Leber des Straußes.

#### **4.4.14 Bindungsstellen für Maackia amurensis Leukoagglutinin I (MAL-I)**

*Zuckerspezifität: Oligosaccharid mit  $\alpha$ -NeuAc*

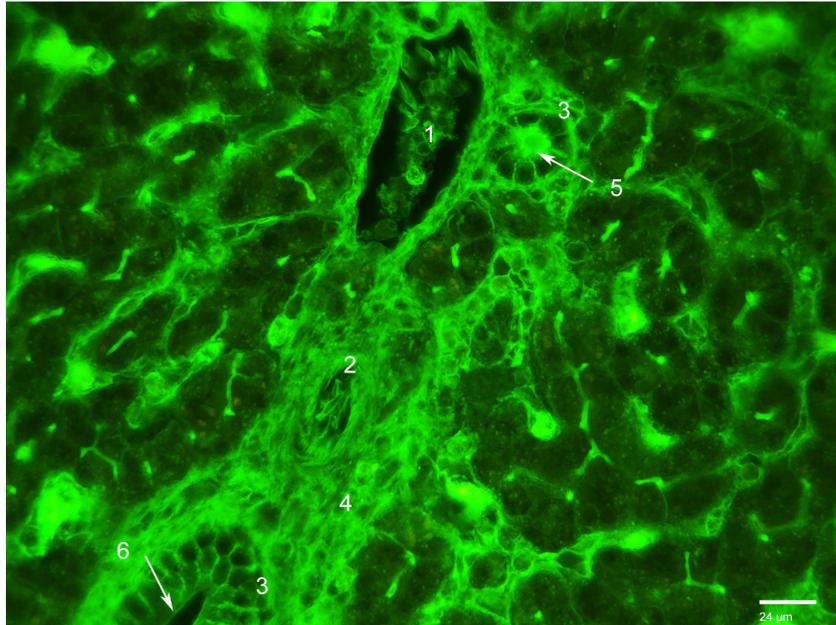
Bei der Inkubation mit dem Lektin Maackia amurensis Leukoagglutinin I (MAL-I) reagierten alle Strukturen der Leber des Straußes negativ.

#### **4.4.15 Bindungsstellen für Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)**

*Zuckerspezifität: Oligosaccharid mit Galaktoserest*

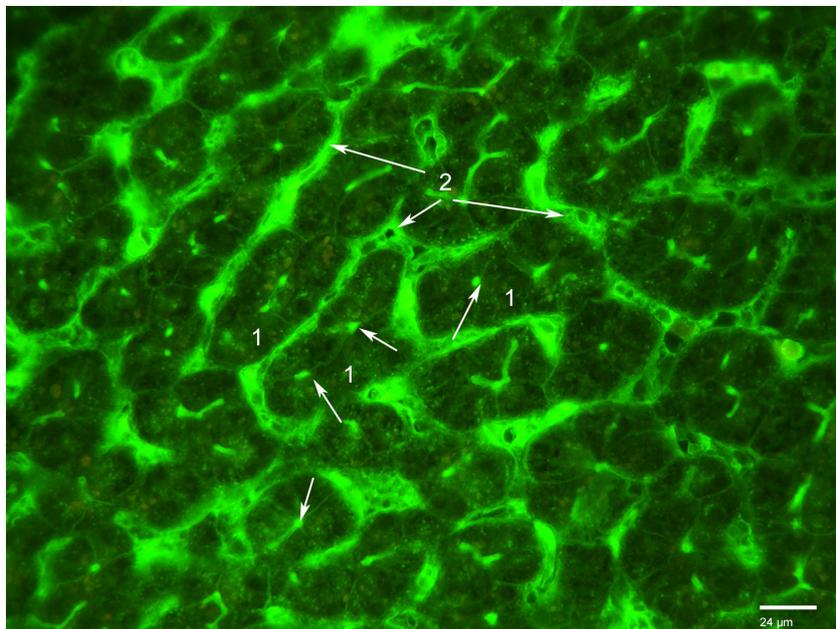
Die Inkubation mit Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) ruft in der Leber zahlreiche positive Reaktion hervor. Im Ductus interlobularis zeigt sich eine stark positive Reaktion der apikalen Anteile der Epithelzellen, wohingegen sich diese im Ductulus biliferus nur schwach positiv bis negativ zeigen (Abb. 4.34).

Das Bindegewebe der Area interlobularis ist, genauso wie die Endothelwände der Vena und Arteria interlobularis, deutlich PHA-E-positiv (Abb. 4.34). Auf die gleiche Weise reagieren die Endothelzellen der Vena intralobularis, sie zeigen eine deutliche Fluoreszenz (Abb. 4.36). Außerdem zeigen sinusoidale oder perisinusoidale Zellen eine deutlich bis stark positive Reaktion (Abb. 4.35). Die Leberzellbalken weisen im Lumen der von ihnen gebildeten Canaliculi biliferi eine stark positive Reaktion auf (Abb. 4.35).



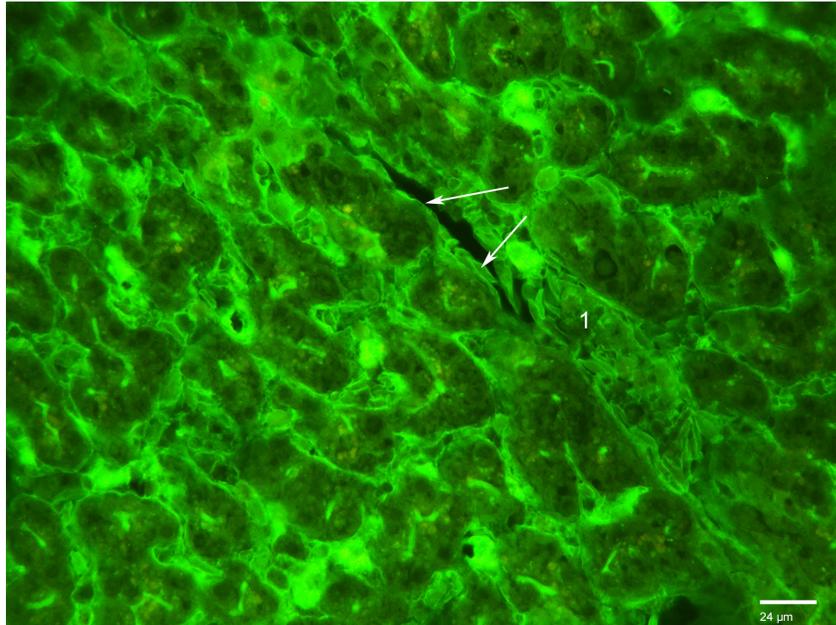
**Abb. 4.34** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von PHA-E-FITC

Deutlich PHA-E-positive Reaktion des Bindegewebes (4) der Area Interlobularis, der Wände der Vena (1) und Arteria (2) interlobularis und der Wände der Epithelzellen der Ductus interlobulares (3). Stark positive Reaktion der apikalen Bereiche des Ductus interlobularis (5), nur schwach positive Reaktion im apikalen Anteil des Ductulus biliferus (6).



**Abb. 4.35** Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von PHA-E-FITC

Stark PHA-E-positive Reaktion im Lumen der von den Hepatozyten (1) gebildeten Canaliculi biliferi (Pfeile). Deutlich bis stark positive Reaktion des Sinusoidendothels (2).

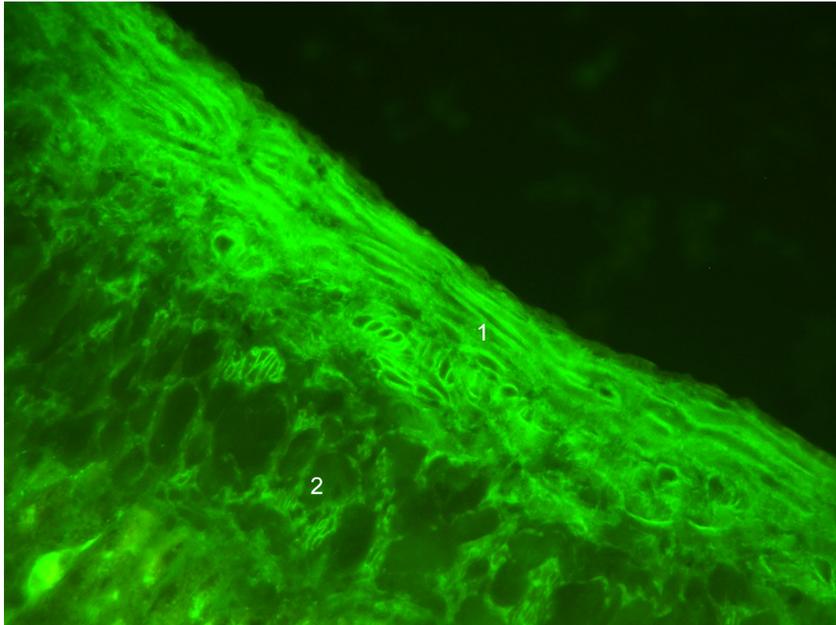


**Abb. 4.36** Leber, Strauß, Vena intralobularis, Bindung von PHA-E-FITC  
Deutlich positive Reaktion der Endothelzellen (Pfeile)  
der Vena intralobularis (1).

#### 4.4.16 Bindungsstellen für Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L)

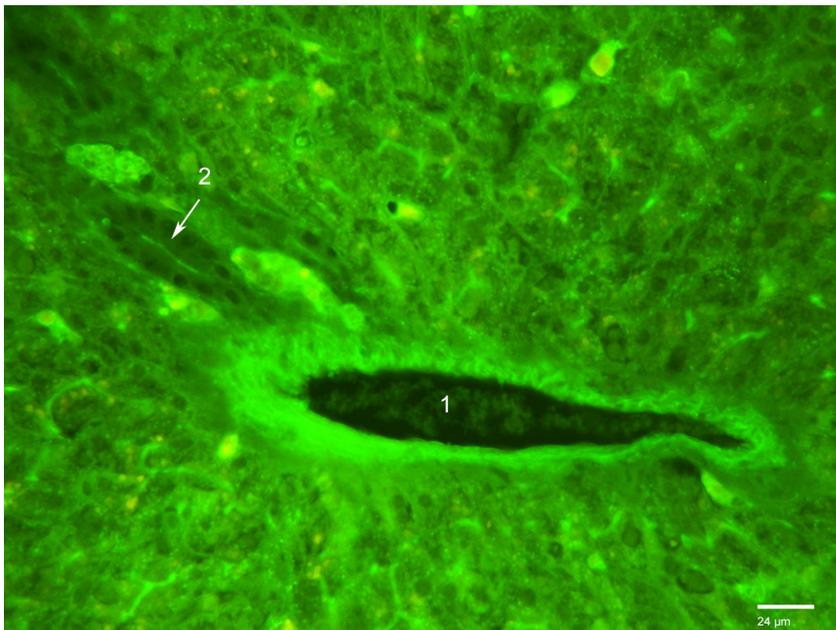
*Zuckerspezifität: Oligosaccharid mit Galaktoserest*

Die Leber des Straußes weist für das Lektin Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L) andere Bindungsstellen auf, als für das Lektin PHA-E. Die Fibrozyten der venösen Gefäße zeigen eine stark positive Reaktion mit PHA-L, während die der Arterienwände negativ reagieren (Abb. 4.37 und 4.38). Im Lumen der Ductus interlobulares zeigt sich eine schwach PHA-L positive Reaktion (Abb. 4.38). Die weiteren Strukturen der Straußenleber zeigen keine Bindungsfähigkeit mit PHA-L.



**Abb. 4.37** Leber, Strauß, Venenwand, Bindung mit PHA-L-FITC

Stark positive Reaktion der Fibrozyten zwischen den Endothelzellen der Tunica intima (1) der Venenwand. Deutlich positive Reaktion der Fibrozyten zwischen den Muskelfasern der Tunica media (2).



**Abb. 4.38** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung mit PHA-L-FITC

Stark positive Reaktion der Fibrozyten der Vena interlobularis (1). Schwach positive Reaktion im Lumen des Gallengangs (2).

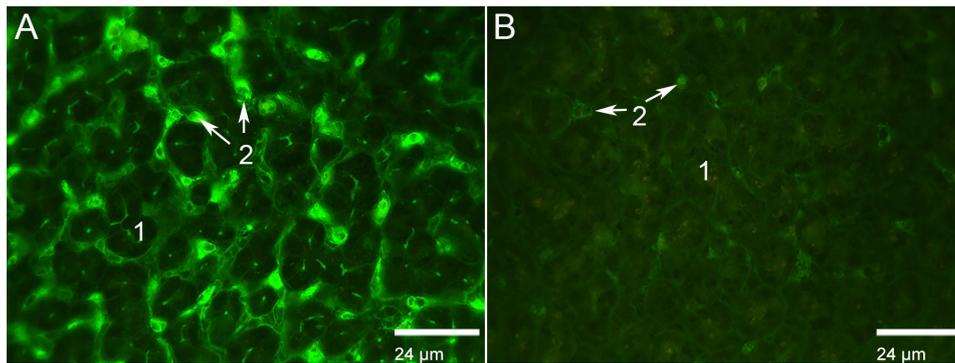
Tabelle 4.11 Bindungsstellen der verwendeten Lektine in der Straußenleber

Lektin	Hepatozyten		Sinusoide		Blutgefäße			Gallengänge		Interstitium
	ZP	Kern	Zellen	Wand	End.	Bdgew.	Musk.	Ep.	Bdgew.	
ConA	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LCA	2	0	3	0	0	V:2,A:1	0	0-1	0	2
PSA	0	0	3	3	0	2-3	0	0	2-3	3
PNA	0	0	3	0-1	1	0	0	0	0	0
RCA	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WGA	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0
WGAs	0	0	0	3	3	3	0	2-3	2-3	3
DBA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GSL-1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SBA	0	0	2-3	0	V:1,A:0	0	0	0	0	0
SNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UEA-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAL-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHA-E	0	0	2-3	0	2	2	0	1-3	0	2
PHA-L	0	0	0	0	0	V:3,A:0	0	0	0	0

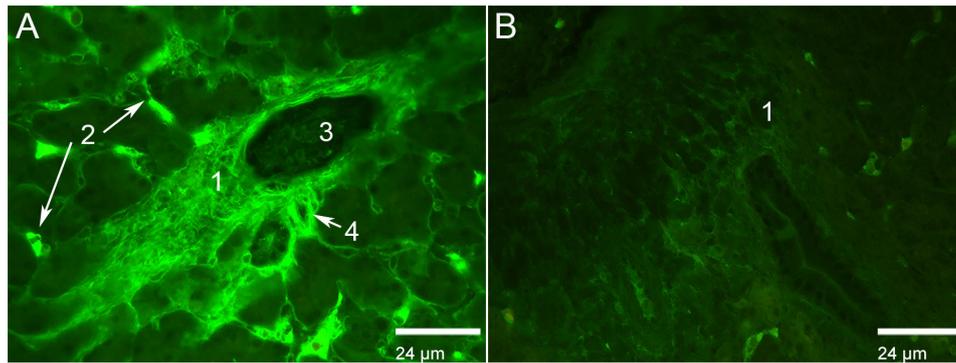
ZP: Zytoplasma, Bdgew.: Bindegewebe, Musk.: Muskulatur, End.: Endothel, Ep.: Epithel, Fibr.: Fibrozyten;  
0: negativ, 1: schwach positiv, 2: deutlich positiv, 3: stark positiv

#### 4.4.17 Ergebnisse der Zuckerhemmung

Die stark positiv reagierenden FITC-markierten Lektine LCA, PHA-E, PHA-L, PNA, PSA, SBA, WGA und WGAs wurden nach Vorinkubation mit den für sie spezifischen Hemmzuckern (siehe Tabelle 3.16) erneut bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit untersucht. Nach dieser Vorbehandlung kann eine deutlich schwächere Bindung von PHA-E (Abb. 4.39) und PHA-L als in den gleichzeitig erstellten Positivkontrollen beobachtet werden. Für die Lektine LCA (Abb. 4.40), PNA, PSA, SBA, WGA und WGAs erfolgt eine vollständige Hemmung der Bindung an die Strukturen der Leber des Straußes.



**Abb. 4.39** Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von PHA-E-FITC  
A: ohne Hemmzucker-Vorbehandlung: keine Reaktion der Hepatozyten (1). Stark positive Reaktion sinusoidaler Zellen (2).  
B: mit Hemmzucker-Vorbehandlung: keine Reaktion der Hepatozyten (1). Sehr schwach positive Reaktion der sinusoidalen Zellen (2).



**Abb. 4.40** Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung mit LCA-FITC  
A: ohne Hemmzucker-Vorbehandlung: Stark positive Reaktion des Interstitiums (1) der Area interlobularis. Sehr stark positive Reaktion sinusoidaler Zellen (2). Stark positive Reaktion in den Wänden der Vena (3) und Arteria (4) interlobularis.  
B: mit Hemmzucker-Vorbehandlung: Keine Reaktion des Interstitiums (1) und der Gefäße (2).

## 4.5 Ergebnisse der Ultrastrukturellen Untersuchungen

### 4.5.1 Hepatozyten

Die Länge der Außenkanten der großen, polygonalen Hepatozyten unterscheidet sich individuell bei den einzelnen Zellen. Die Zellmembran der Leberzellen besteht aus einer einfachen Membran die sich in drei Abschnitte unterteilen lässt: 1) den Sinusoiden zugewandte Bereiche, 2) Abschnitte des Kontaktes zwischen den Hepatozyten und 3) biliärer Bereich dem Canaliculus biliferus zugewandt. Der interzelluläre Spalt zwischen zwei benachbarten Hepatozyten ist mit einem Durchmesser von 41-51 nm deutlich zu erkennen.

Die Hepatozyten besitzen einen großen Zellkern, der meistens der sinusoidalen Seite zugewandt gelagert ist. Im Schnitt hat er einen Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$ . Der Zellkern ist in der Regel von runder Form, kann aber auch eine leicht gewellte Zellmembran aufweisen oder manchmal Einbuchtungen in dieser besitzen (Abb. 4.41 und 4.42). Im Inneren des Nukleus lässt sich zum einen fein granuläres Euchromatin finden und zu circa einem Viertel verdichtetes Euchromatin. Das stark elektronendichte Heterochromatin ist vor allem in kleinen, aber auch vereinzelt in großen Ansammlungen an den Randbereichen des Nukleus der Kernmembran angelagert (Abb. 4.42 und 4.43). Das Heterochromatin kann aber auch in seltenen Fällen fransige oder flächige Ansammlungen im Zentrum des Zellkerns bilden. Hier finden sich auch die Nucleoli der Zellkerne, von denen häufig einer, in den überwiegenden Fällen aber zwei vorhanden sind. Diese setzen sich aus einer sehr kompakt wirkenden, elektronendichten Matrix zusammen, die elektronenoptisch leere oder dem Kernplasma gleichende Hohlräume einschließt. Die Kernmembran, die aus einer Doppelmembran mit einem mehr oder weniger gleichmäßig weitem Zwischenraum besteht, stellt sich generell glatt mit regelmäßig verteilt auftretenden Poren dar (Abb. 4.43). Die Poren haben einen Durchmesser von etwa 80 nm und sind von einem dünnen Diaphragma verschlossen.

Außen an die Zellkernmembran und in ihrer direkten Nachbarschaft lagern sich mehrere Zisternen des rauen Endoplasmatischen Retikulums mit nur zwei oder drei Stapeln an (Abb. 4.43). In der Nähe zu den Zellmembranen, vor allem in den Abschnitten zweier aneinandergrenzender Parenchymzellen, bilden sich größere Stapel des rauen Endoplasmatischen Retikulums aus bis zu neun parallel angeordneten Tubuli. Die Tubuli bestehen

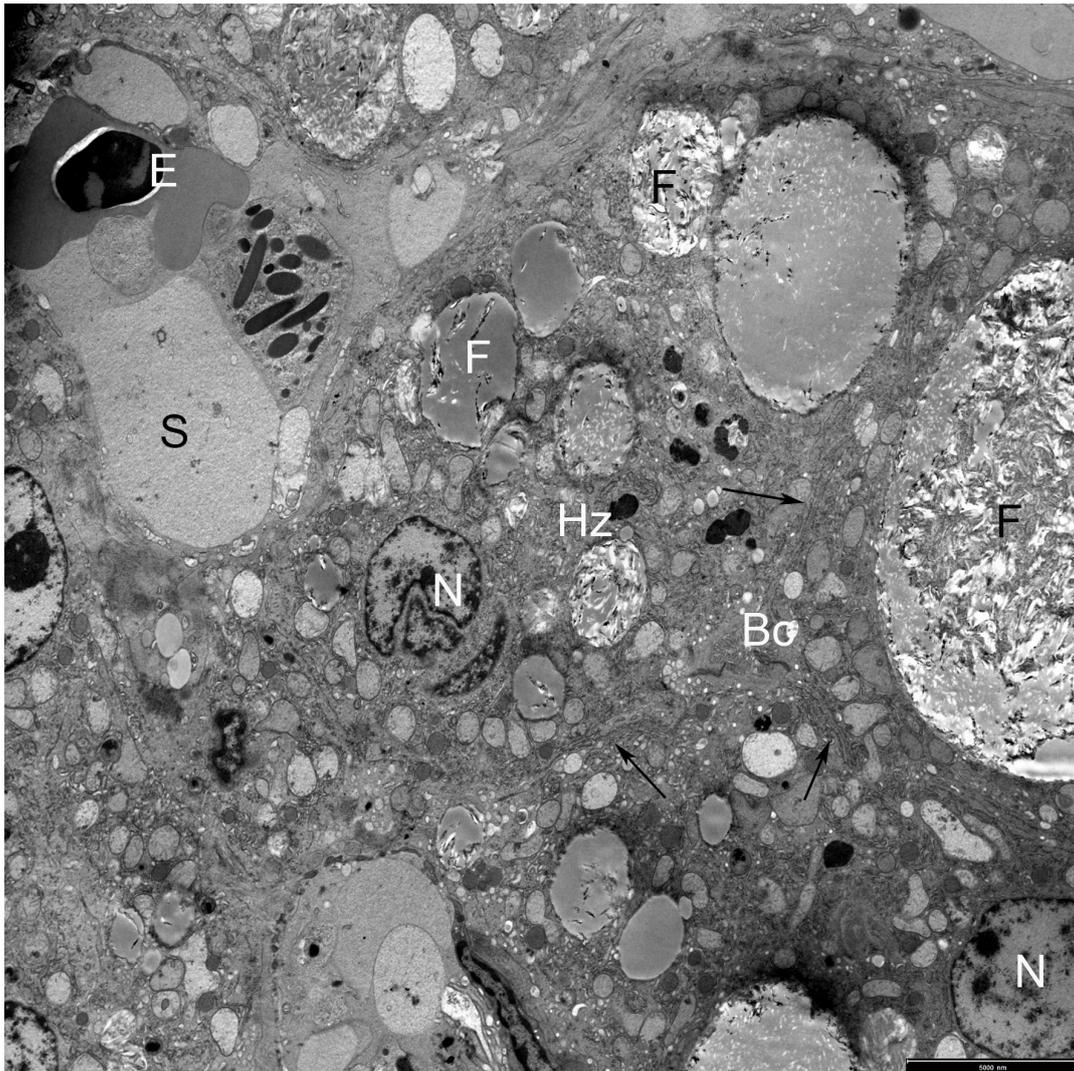
aus langgestreckten, dünnen, mit mäßig elektronendichtem Material gefüllten rohrartigen Strukturen, die von einer dünnen, mit runden, stark elektronendichten Ribosomen besetzten Membran begrenzt werden (Abb. 4.44). Diese Ribosomen finden sich auch teilweise an der Außenfläche der Kernmembran.

Rund um den Nukleus und insbesondere im Bereich der Canaliculi biliferi finden sich Mitochondrien vom Cristae-Typ, die im überwiegenden Fall von ein oder zwei Zisternen des rauen Endoplasmatischen Retikulums umschlossen werden. Der Durchmesser dieser Organellen beträgt etwa 850 nm. Sie sind die am häufigsten beobachteten Zellorganellen im Zytoplasma der Hepatozyten und haben meistens eine runde oder ovale Form. Sie können aber auch längliche oder birnenförmige Gestalt annehmen. Die Mitochondrien bestehen aus einer mäßig elektronendichten, granulären Matrix. Begrenzt wird diese von einer Zelldoppelmembran, die sich stellenweise einstülpt und Cristae formt. Vereinzelt finden sich in den Mitochondrien elektronendichtere Granula die sich aus kleineren Granula zusammensetzen. (Abb. 4.42 , 4.44 und 4.45)

Als weitere Struktur findet sich in den Leberzellen ein eher wenig entwickelter Golgi-Apparat aus mehreren Doppelmembran-Säckchen, die Vesikel abschnüren (Abb. 4.42, 4.44, 4.48 und 4.50). Es sind zahlreiche Peroxisomen zu sehen. Diese haben eine elektronendichte, feinkörnige Matrix mit einer stark elektronendichten, kernähnlichen, kristallinen Struktur in dieser. Die Peroxisomen haben einen Durchmesser von 500-800 nm.

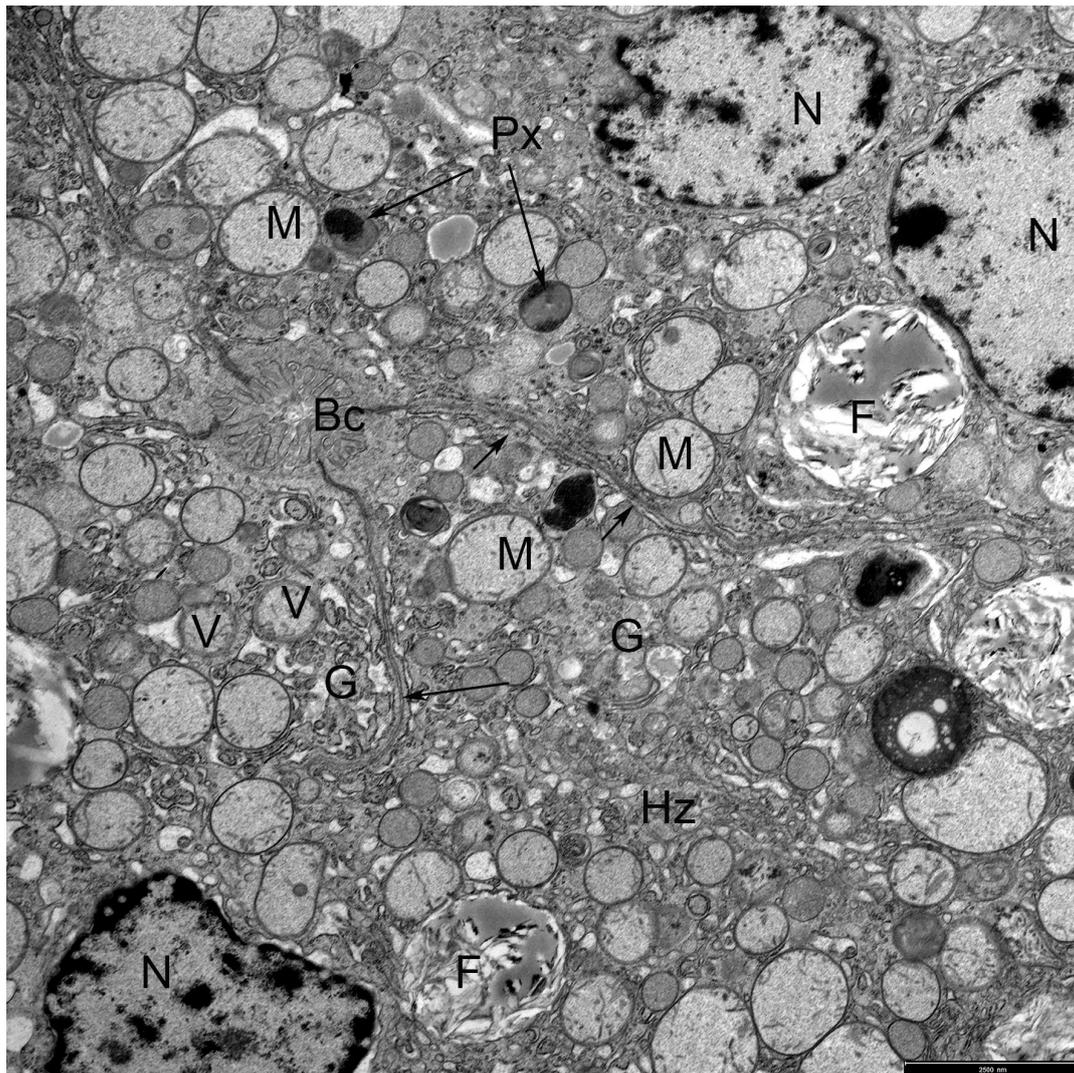
In unterschiedlich starker Ausprägung sind Glykogengranula zu beobachten. Diese sind deutlich dunkler als Ribosomen und deutlich größer als diese. Zu finden sind sie über das gesamte Zytoplasma der Leberzelle verteilt.

Die runden Lysosomen, mit einem Durchmesser von 300-500 nm, stellen sich deutlich elektronendichter als das umliegende Zytoplasma dar. Die Lysosomen werden von einer Membran begrenzt.



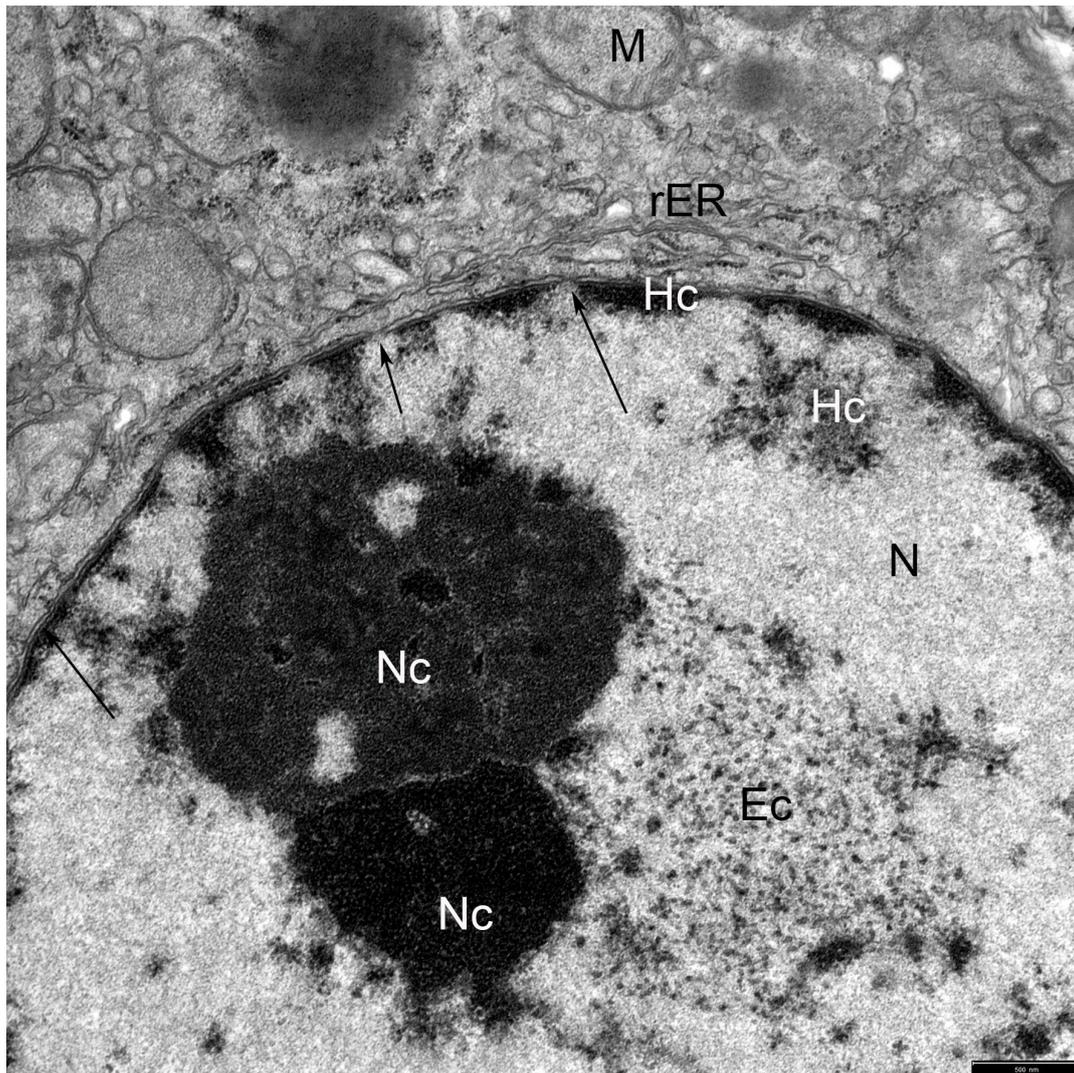
**Abb. 4.41** Leber, Strauß, Parenchym, TEM

Mehrere Hepatozyten (Hz) bilden einen Canaliculus biliferus (Bc). Zwischen den Hepatozyten finden sich die Sinusoide (S). N: Nukleus; E: Erythrozyt mit Zellkern; F: Fett, teilweise gelöst; Pfeile: Zellmembranen zwischen den Hepatozyten; SB = 5000 nm

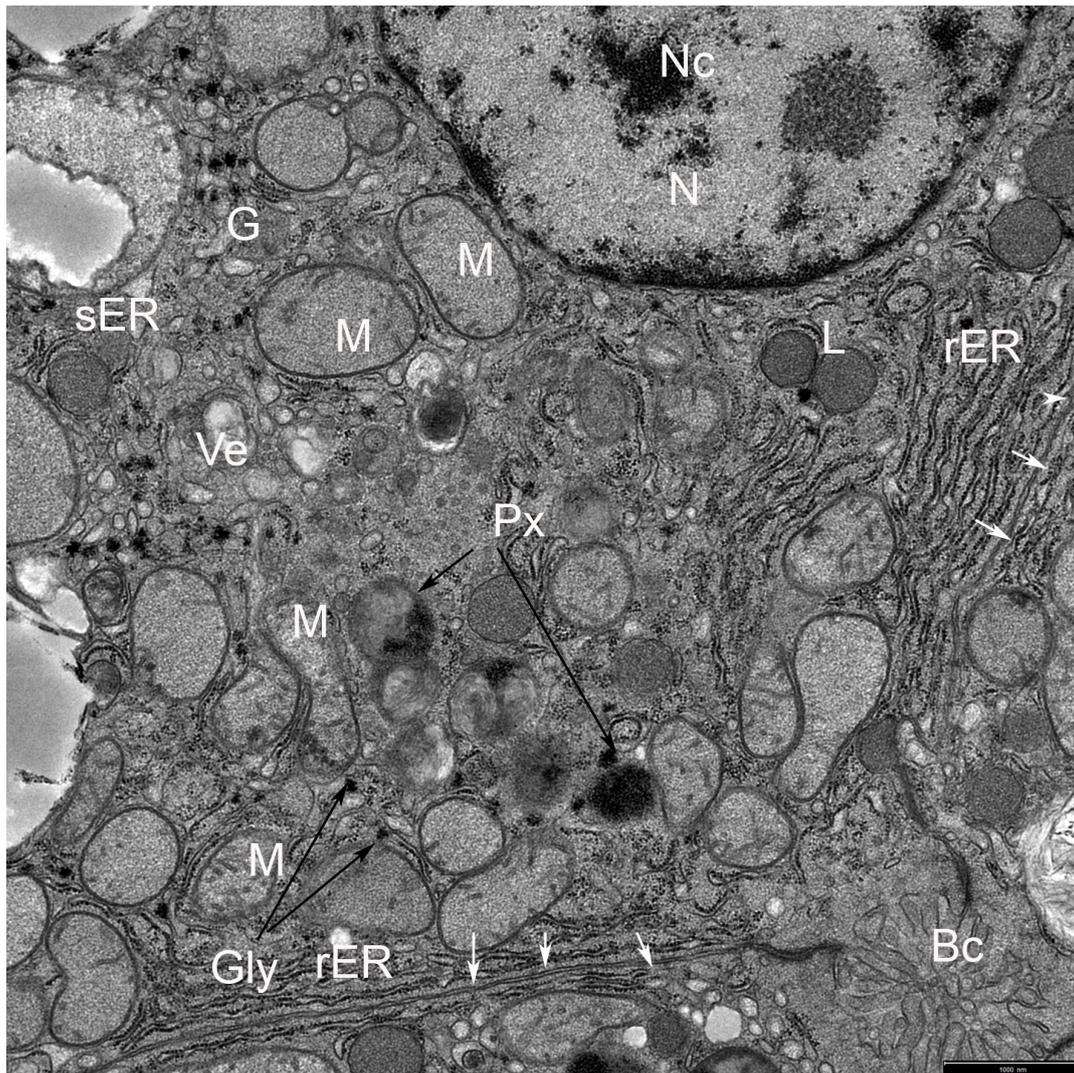


**Abb. 4.42** Leber, Strauß, Parenchym, TEM

Mehrere (hier vier) Hepatozyten (Hz) bilden einen Canaliculus biliferus (Bc). M: Mitochondrium; N: Nukleus; Px: Peroxisomen; V: Vakuolen; G: Golgi-Apparat; F: Fett, teilweise gelöst; Pfeile: Zellmembranen zwischen den Hepatozyten; SB = 2500 nm



**Abb. 4.43** Leber Strauß, Hepatozytenkern, TEM  
Nucleus (N) mit zwei Nucleoli (Nc). Ec: Euchromatin; Hc: Heterochromatin; Pfeile: Kernmembran mit Fenestrae; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; M: Mitochondrium; SB = 500 nm

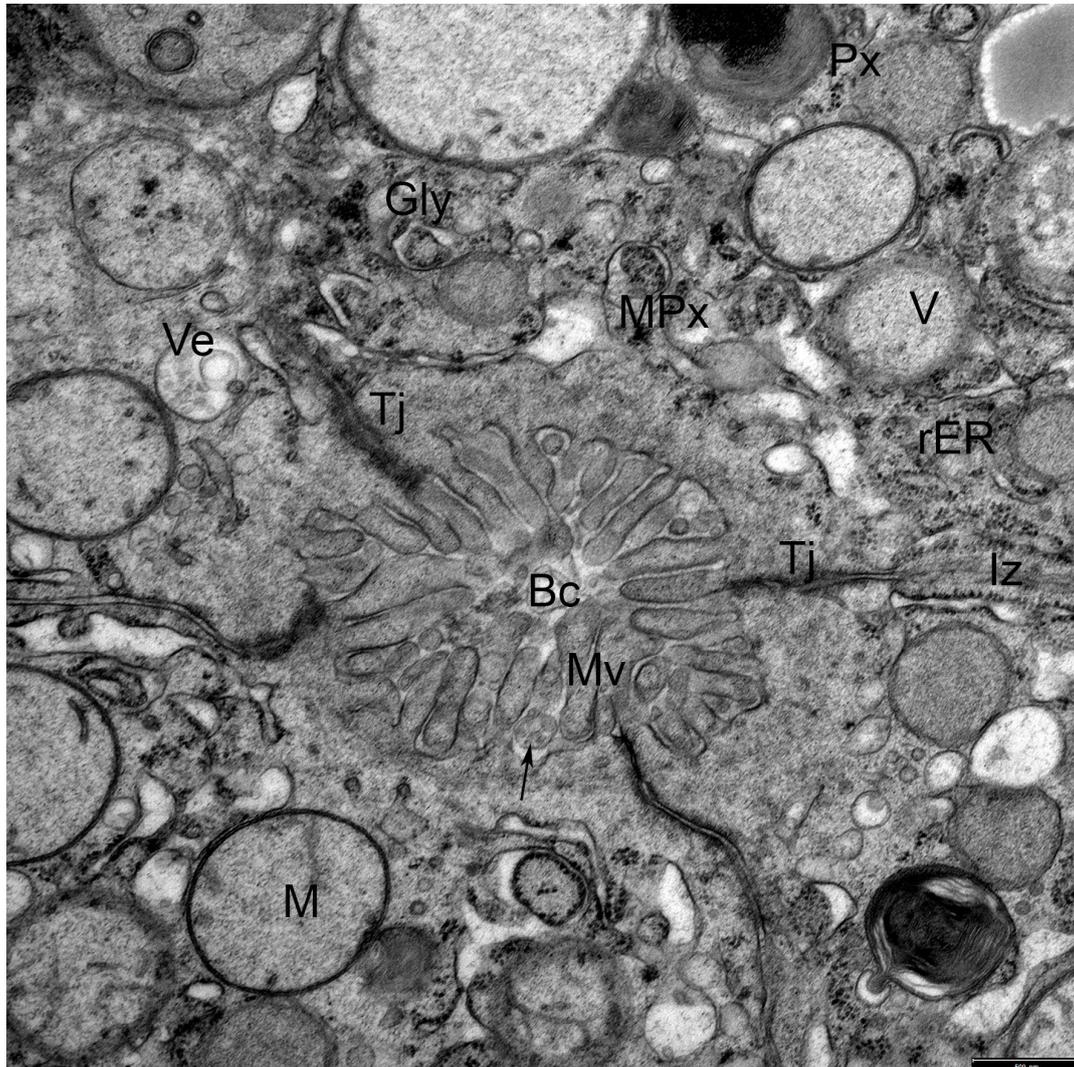


**Abb. 4.44** Leber Strauß, Hepatozyten-Zellmembran interzellulär, TEM  
 raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) in großen Stapeln in der Nähe der Zellmembran (weiße Pfeile). N: Nukleus; Nc: Nukleolus; M: Mitochondrium; G: Golgi-Apparat; sER: glattes Endoplasmatisches Retikulum; Gly: Glykogengranula; L: Lysosom; Px: Peroxosom; Ve: Vesikel; Bc: Canaliculus biliferus; SB = 1000 nm

### 4.5.2 Gallenkanälchen

Aus mehreren, meistens vier, Hepatozyten wird an ihren biliären Polen ein Canaliculus biliferus, Gallekanälchen gebildet (Abb. 4.42). Dieses hat keine eigene Zellmembran sondern wird nur von den Membranen der angrenzenden Leberzellen umschlossen. Zu

den Gallekanälchen hin verengt sich der meist sehr breite interzelluläre Spalt und wird hier durch „tight junctions“ abgedichtet. In das Lumen des Canaliculus biliferus ragen zahlreiche Mikrovilli hinein, die von der sich ausstülpenden Leberzellmembran gebildet werden. Das Zytoplasma in den Bereichen um die Canaliculi biliferi stellt sich homogen granulär und ohne Zellorganellen dar. Im Inneren der quer angeschnittenen Mikrovilli lassen sich strangartige Strukturen erkennen (Abb. 4.45).



**Abb. 4.45** Leber Strauß, Canaliculus biliferus, TEM

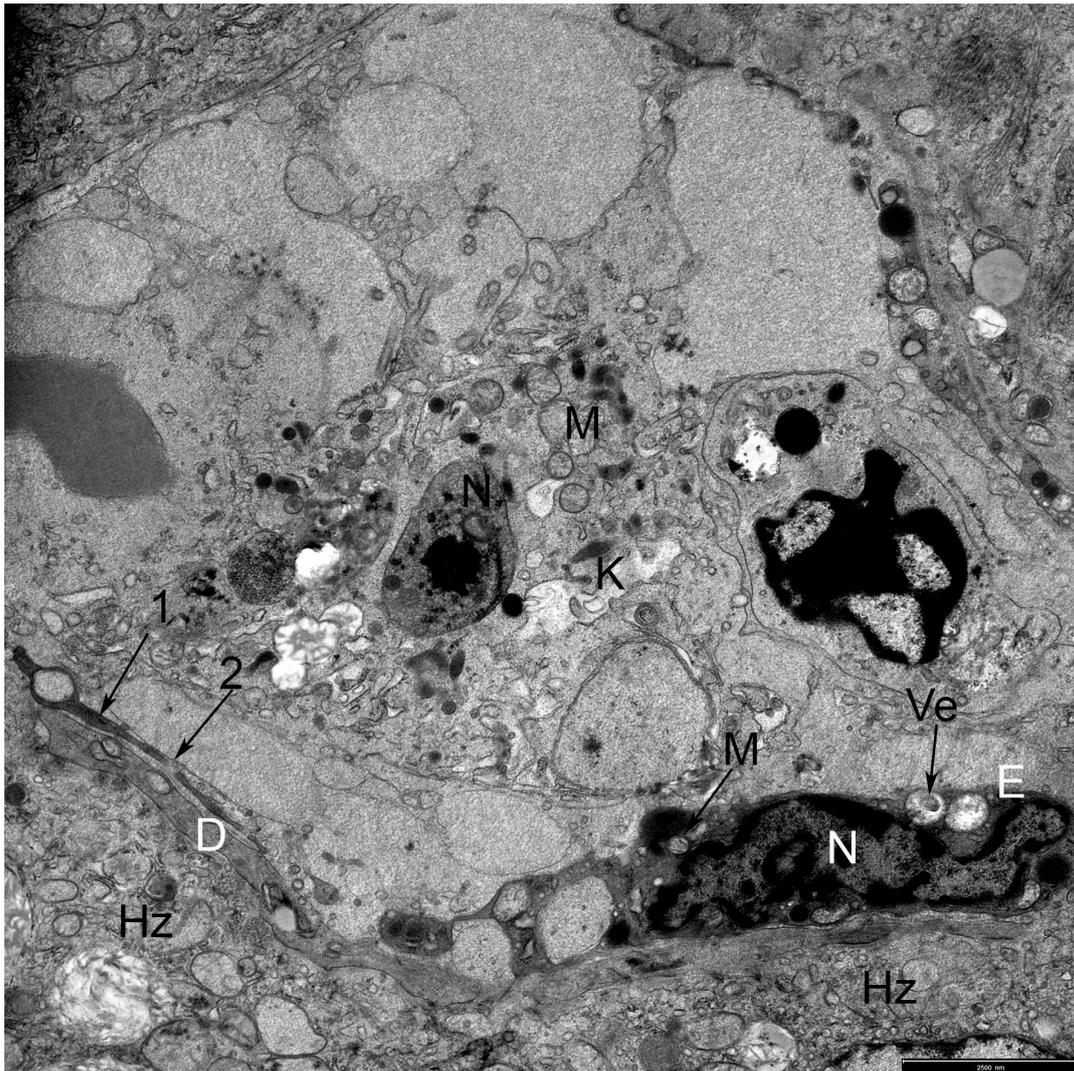
Canaliculus biliferus (Bc) mit zahlreichen Mikrovilli (Mv). M: Mitochondrium; V: Vakuole; Gly: Glykogengranula; Pfeil: quer angeschnittene Mikrovilli mit strangartigem Inhalt; Tj: Tight junction; Iz: Interzellulärer Spalt; Px: Peroxisom; MPx: Miktoperoxisom; Ve: Vesikel mit Inhalt; G: Golgi-Apparat; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; SB = 500 nm

### 4.5.3 Sinusoidale Endothelzellen

Die Wände der Sinusoide bestehen zum größten Teil aus Endothelzellen und deren Zytoplasmaausläufern. Die Gestalt der Zelle stellt sich langgestreckt dar mit einer Ausbuchtung im Bereich des Zellkerns. Dieser ist unregelmäßig geformt und meistens in die Länge gestreckt. Die Matrix des Nukleus besteht etwa zur Hälfte aus stark elektronendichtem Heterochromatin, welches sich in schmalen Bahnen der gesamten Kernmembran anlagert. Stellenweise verbreitern sich diese Bahnen zu größeren Flecken. Die Membran des Zellkerns stellt sich als eine Doppelmembran mit einem schmalen Zwischenraum dar. (Abb. 4.46 und 4.47)

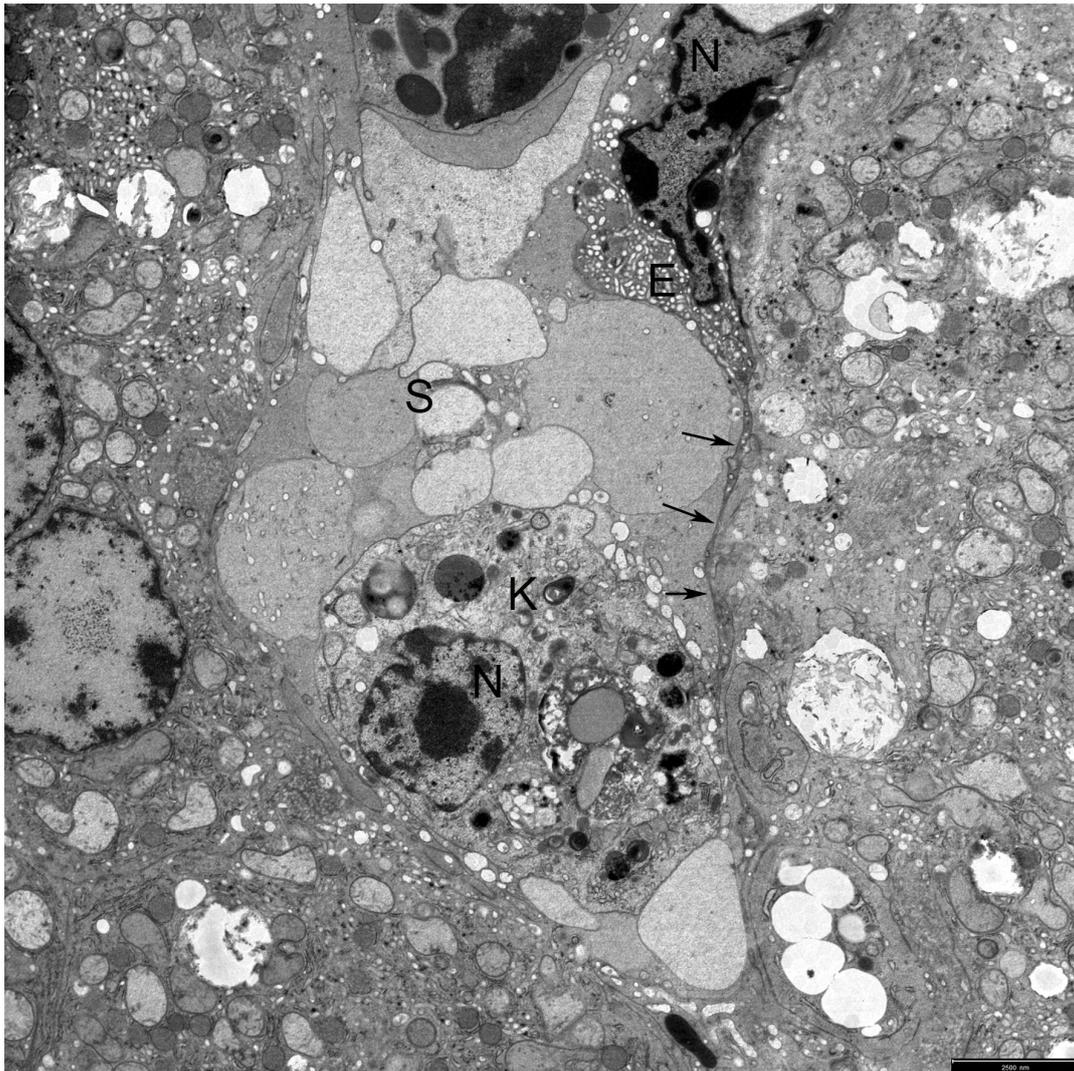
Zellorganellen sind in den Endothelzellen nur wenige zu finden, von denen die meisten im näheren Umfeld des Nukleus gelagert sind. Die Mitochondrien sind mit 280 nm deutlich kleiner als die der Hepatozyten und der von-Kupffer-Zellen. Auch hier sind sie vom Cristae-Typ. Vor allem an der Zellmembran zu Sinusoidlumen hin können „bristle-coated“ Vesikel beobachtet werden. Daneben können noch größere Vesikel mit elektronendichtem Inhalt beobachtet werden.

Das Zytoplasma der Endothelzellen der Sinusoide bildet lange dünne Ausläufer, die die Begrenzung des sinusoidalen Raumes zum Dissé Raum darstellen. Stellenweise verjüngen sich diese Ausläufer auf unter 150 nm, in der Regel haben sie eine Weite von 300 nm. Oft wird diese Auskleidung von intrazellulären Poren mit einem Durchmesser von 250 nm unterbrochen (Abb. 4.46).



**Abb. 4.46** Leber Strauß, Sinusoid, TEM

Sinusoid mit Endothelzelle (E) und von-Kupffer-Zelle (K). N: Nukleus; M: Mitochondrium; G: Golgi-Apparat; Ve: Vesikel; Hz: Hepatozyt; 1: Ausläufer des Endothelzellenzytoplasmas; 2: Pore in der Endothelzellauskleidung des Sinusoids; Ps: Pseudopodium; L: Lysosom; D: Dissé Raum; SB = 2500 nm



**Abb. 4.47** Leber Strauß, Endothelzelle des Sinusoids, TEM  
Sinusoid (S) mit Endothelzelle (E) mit Zytoplasmaausläufern (Pfeile) und  
von-Kupfer-Zelle (K); N: Nukleus; SB = 2500 nm

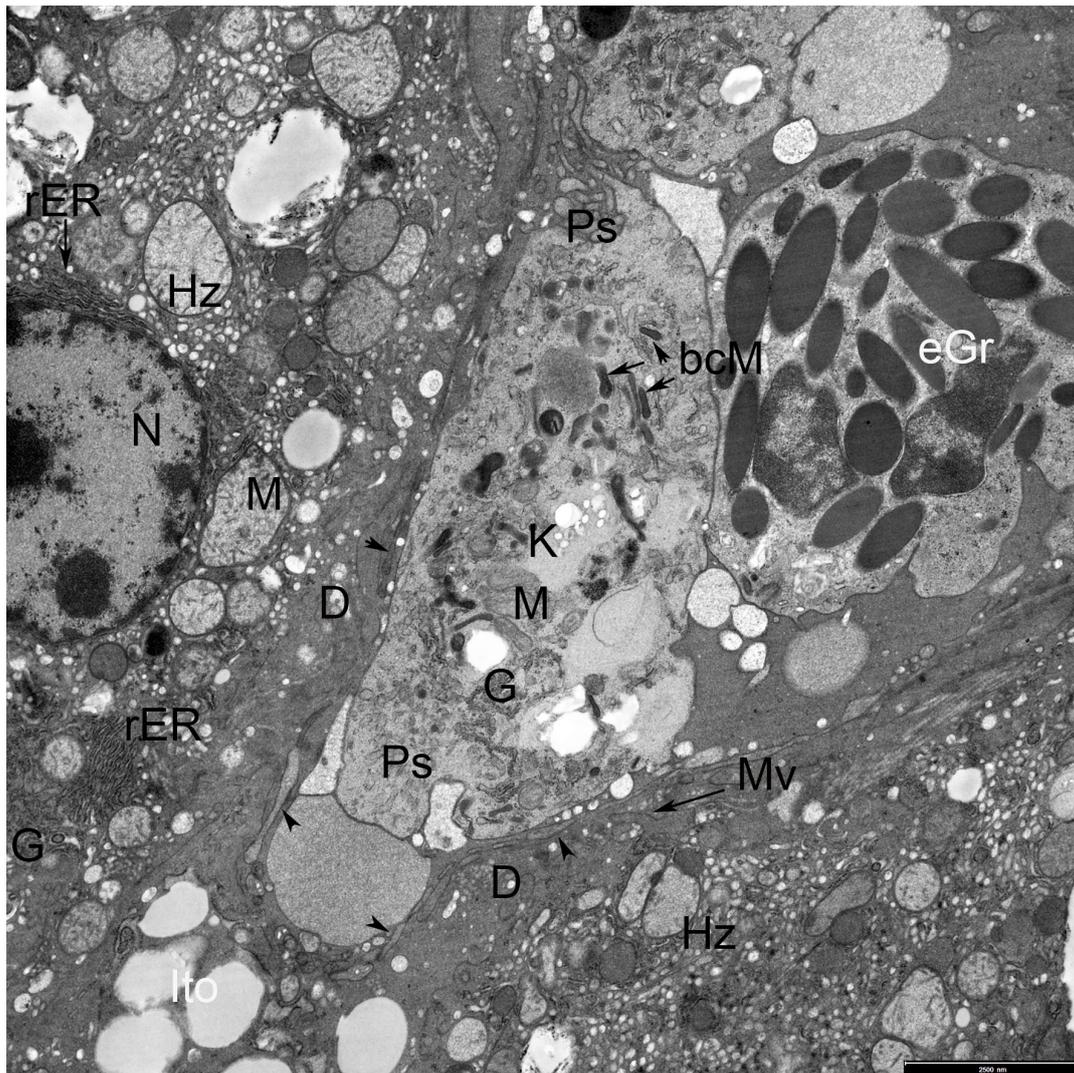
#### 4.5.4 von-Kupfer-Zellen

Eine weitere Zelle die im sinusoidalen Raum und mit engem Kontakt zu dessen Wand zu finden ist, ist die von-Kupfer-Zelle (Abb. 4.46). Diese sind von unregelmäßiger Gestalt mit zahlreichen Pseudopodien. Mit diesen durchdringen sie teilweise die endotheliale Auskleidung, überwinden den Dissé Raum und verankern sich an der Membran der

Hepatozyten. Des Weiteren nehmen sie Kontakt zu der gegenüberliegenden Sinusoidalwand auf (Abb. 4.48). Mit den Pseudopodien umschließen sie auch Bestandteile des sinusoidalen Raumes und nehmen diese in sich auf.

Der Nukleus der von-Kupffer-Zelle ist oval oder birnenförmig und kann teilweise Ausbuchtungen zeigen. Er enthält in seinem Zentrum einen stark elektronendichten Nukleolus (Abb. 4.46 und 4.47). Der Zellkern wird von einer Doppelmembran mit zahlreichen Poren begrenzt. Auf seiner Außenseite finden sich Stapel des rauen Endoplasmatischen Retikulums. Die von-Kupffer-Zelle besitzt im Verhältnis zu ihrem Nukleus deutlich mehr Zytoplasma mit Zellorganellen, als dies bei den Endothelzellen der Fall ist.

Die von-Kupffer-Zelle enthält einen verhältnismäßig großen Golgi-Apparat aus flachen Zisternen und zahlreiche von diesem abgeschnürte Vesikel. Ebenso sind viele Lysosomen zu beobachten. Als weitere Organellen des lysosomalen Endozytosesystems sind die „bristle coated“ Mikropinozytosevesikel zu beobachten. Diese zeigen sich als spindelförmige Vesikel mit granulärem, elektronendichtem Inhalt. Die meist ovalen Mitochondrien sind etwa 410 nm groß (Abb. 4.48).



**Abb. 4.48** Leber Strauß, Sinusoid mit Dissé Raum, TEM

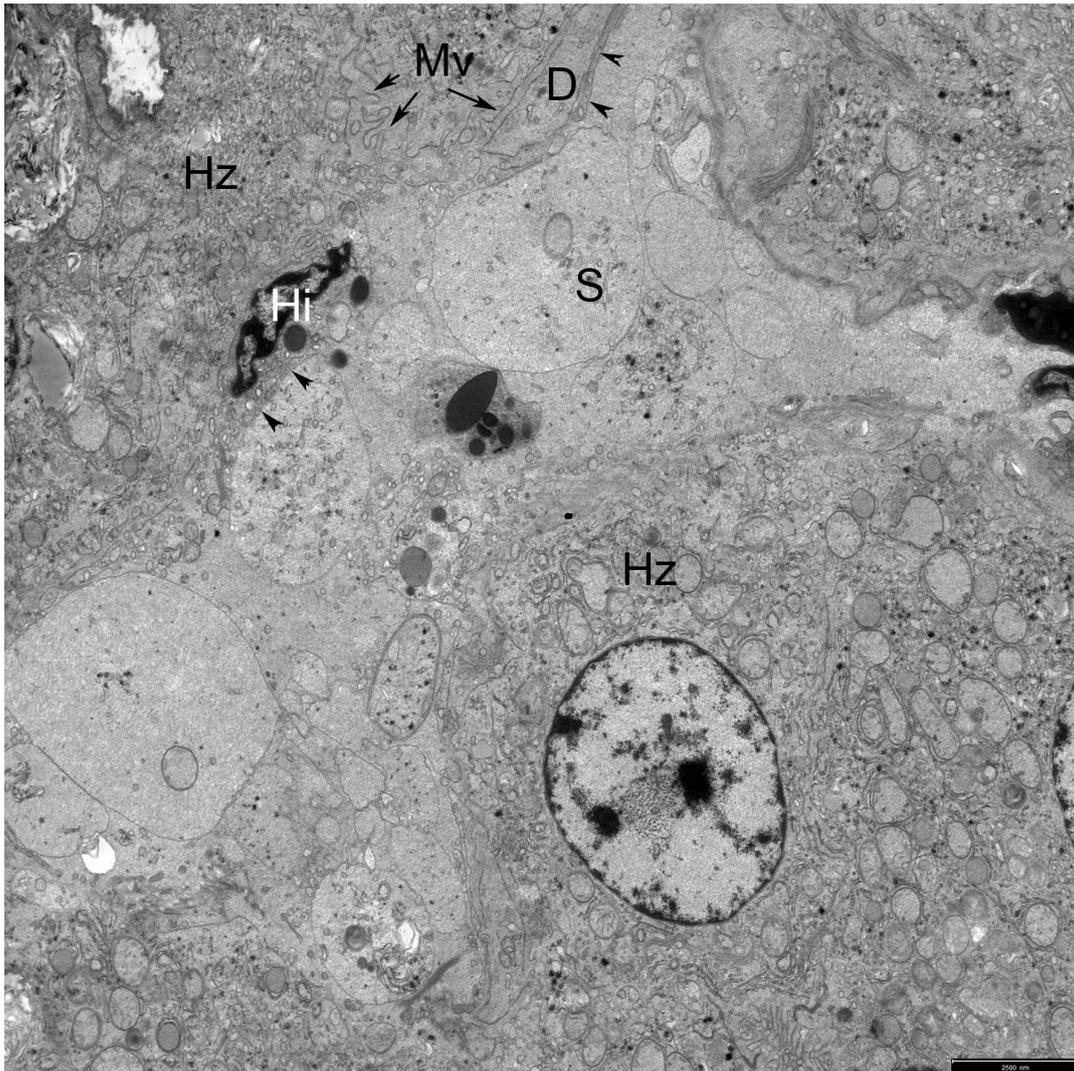
Dissé Raum (D) zwischen Sinusoid (S) und Hepatozyten (Hz). Ito: Ito-Zelle; eGr: pseudo-eosinophiler Granulozyt; K: von-Kupffer-Zelle; Ps: Pseudopodien; Pfeilspitzen: Endothelzellausläufer; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; bcM: bristle-coated Mikropinozytosevesikel; G: Golgi-Apparat; Hz: Hepatozyten; N: Nukleus; M: Mitochondrium; Mv: Mikrovilli (hier der Hepatozytenmembran); SB = 2500 nm

#### 4.5.5 Dissé Raum

Der Dissé Raum befindet sich zwischen dem sinusoidalen Raum und den Hepatozyten. Zum Sinusoid hin wird er hauptsächlich von den Ausläufern der Endothelzellen

abgegrenzt. Die Begrenzung zu den Hepatozyten hin besteht aus der Zellmembran derselben. Ebenso finden sich auf letzterer stellenweise sehr zahlreiche Mikrovilli, die in den Dissé Raum hineinragen (Abb. 4.46, 4.48 und 4.50). Die Mikrovilli werden von der Leberzellmembran ausgestülpt und verzweigen sich in ihrem weiteren Verlauf (Abb. 4.49). In den meisten Bereichen stellt sich der Dissé Raum als sehr schmaler, kaum erkennbarer Spalt dar. Er kann sich aber auch weiten, insbesondere an den Stellen, an denen er die Ito-Zellen beinhaltet. Ein weiterer Zelltyp der im Dissé Raum zu beobachten ist, der Histiozyt, besitzt einen unregelmäßig geformten, länglichen Nukleus und schließt in seinem Zytoplasma Lysosomen ein. (Abb. 4.49)

Häufig enthält der Dissé Raum retikuläre Fasern, die von der Zellmembran der Hepatozyten zu den Endothelzellen ziehen (Abb. 4.51).



**Abb. 4.49** Leber, Strauß, Dissé Raum, TEM

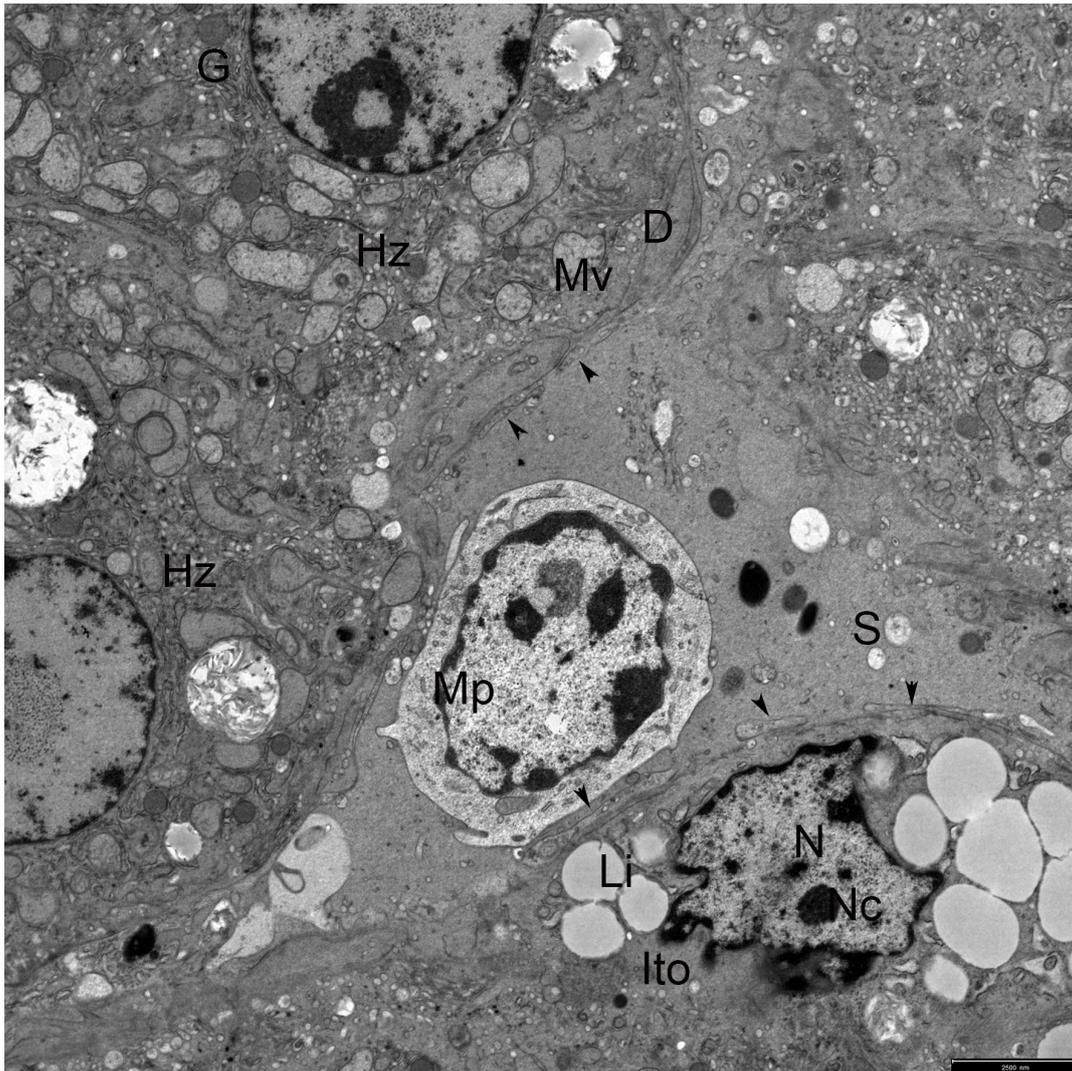
Dissé Raum (D) zwischen Sinusoid (S) und Hepatozyten (Hz). Ito: Ito-Zelle; Pfeilspitzen: Endothelzellausläufer; Hi: Histiozyt; Hz: Hepatozyten; N: Nukleus; M: Mitochondrium; Mv: Mikrovilli (hier der Hepatozytenmembran); SB = 2500 nm

#### 4.5.6 Ito-Zellen oder Fat-Storing-Cells

An manchen Stellen dehnt sich der Dissé Raum aus um eine weitere Zellform aufzunehmen, die Ito-Zellen, auch Sternzellen oder Fettspeicherzellen genannt. Diese sind

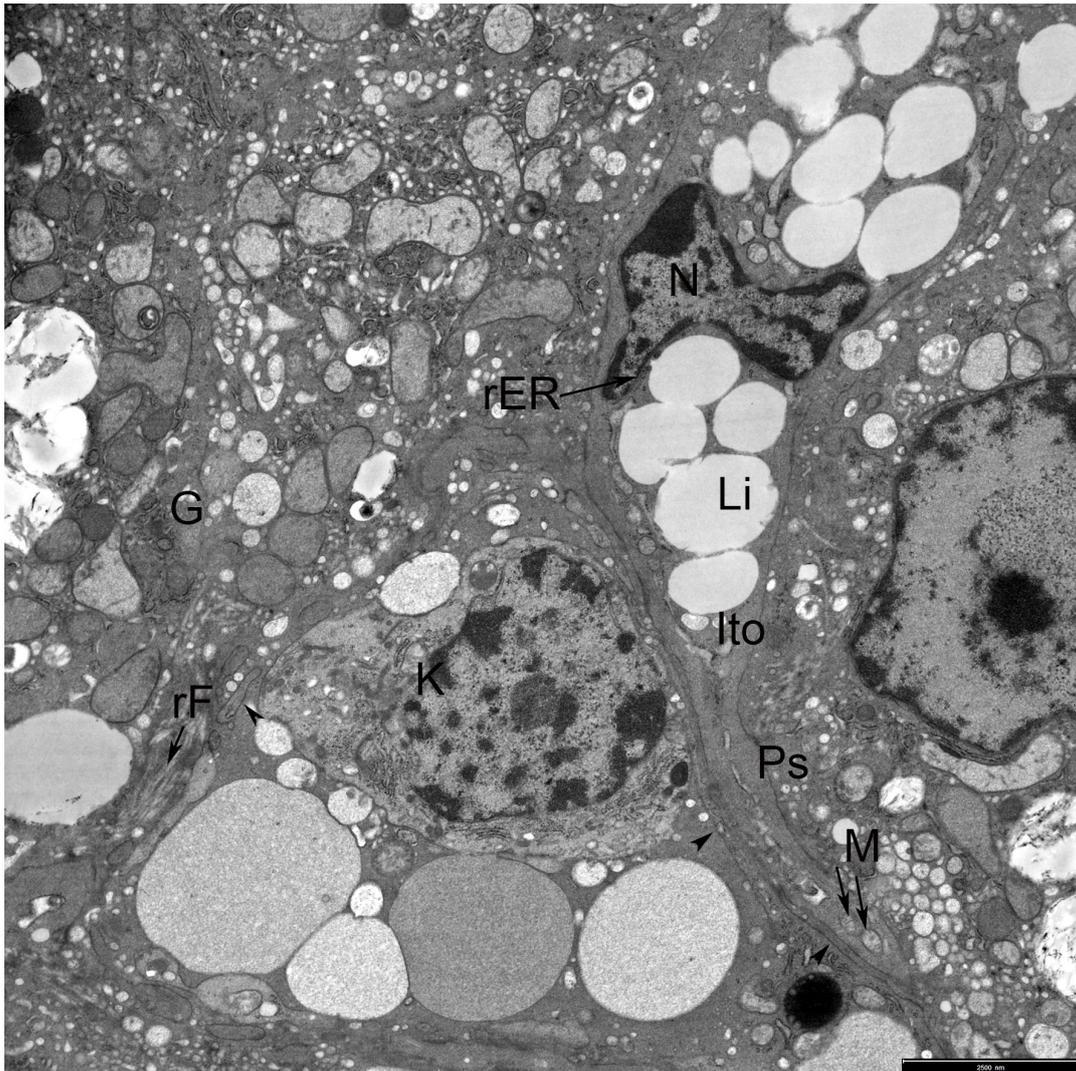
unregelmäßig, oft langgestreckt, geformte Zellen mit einem verhältnismäßig großen Zellkern. Dieser ist in seiner Form sehr variabel und enthält mindestens einen elektronendichten Nukleolus. Die Matrix des Nukleus besteht zum größten Teil aus sehr wenig elektronendichtem Chromatin und enthält nur in den Randbereichen, angelagert an die Zellmembran, etwas dichteres Chromatin. Der Zellkern wird von einer Doppelmembran mit zahlreichen Poren begrenzt. (Abb. 4.50)

Im Zytoplasma der Ito-Zellen finden sich vor allem die namensgebenden Lipidtropfen in großer Zahl. Ihr Durchmesser beträgt zwischen 0,5 und 2  $\mu\text{m}$ . Diese verdrängen durch ihr großes Volumen das Zytoplasma und die Zellorganellen der Ito-Zellen. Auch der Zellkern wird in seiner Ausdehnung eingeschränkt und vielfach eingedrückt (Abb. 4.51 und 4.50). Des Weiteren finden sich noch wenige Mitochondrien im Zytoplasma, die im Vergleich zu denen der Hepatozyten deutlich kleiner sind (Abb. 4.51). In der Nähe des Zellkerns befinden sich Stapel aus wenigen Tubuli des rauen Endoplasmatischen Retikulums. Die Ito-Zellen bilden Pseudopodien, die sich teilweise sehr weit in den Dissé Raum hinein erstrecken.



**Abb. 4.50** Leber, Strauß, Ito-Zelle, TEM

Sinusoid (S) mit Makrophage (Mp) und angrenzendem Dissé-Raum (D) mit Ito-Zelle (Ito). Li: Lipidtropfen; Pfeilspitzen: Endothelzellausläufer; Hz: Hepatozyten; N: Nukleus; Nc: Nukleolus; M: Mitochondrium; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; Mv: Mikrovilli; SB = 2500 nm



**Abb. 4.51** Leber, Strauß, Zellen des sinusoidalen und perisinusoidalen Raumes, TEM

Sinusoid (S) mit von-Kupffer-Zelle (K) und angrenzendem Dissé-Raum (D) mit Ito-Zelle (Ito). Li: Lipidtropfen; rF: retikuläre Fasern im Dissé Raum; Pfeilspitzen: Endothelzellausläufer; Hz: Hepatozyten; N: Nukleus; Nc: Nukleolus; M: Mitochondrium; Ps: Pseudopodium; SB = 2500 nm

## 5 Diskussion

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an der Leber des Afrikanischen Straußes (*Struthio camelus*) wurden Proben von 13 Tieren im Alter von etwa 16 Monaten genommen und bearbeitet. Die Tiere stammten aus kommerzieller Nutztierhaltung von der Straußenfarm Donaumoos (Familie Engelhardt, Herdweg 2, 89340 Leipheim). Für die Untersuchungen wurden konventionelle Färbemethoden, Glyko- und Immunhistochemie sowie Transmissionselektronenmikroskopie angewandt.

Die anatomische Lage der Leber des Straußes wurde von Bezuidenhout (1986); Bezuidenhout (1999) beschrieben. Sie befindet sich im kaudoventralen Teil des Thorax, eingebettet in eine hepato-peritoneale Höhlung. Kranial wird sie vom Herz mit einer dazugehörigen Impressio cordiae und kaudal von Magen begrenzt. Durch eine dorsale und eine tiefe, ventrale Einziehung kann die Leber in zwei große Lappen unterteilt werden, einen rechten und einen linken Leberlappen, Lobus hepatis dexter und Lobus hepatis sinister (Nickel et al., 1992). Der linke Lappen ist wiederum durch eine kleine Einkerbung in einen kranialen und einen kaudalen Teil gegliedert, Pars caudodorsalis und Pars caudoventralis. Des Weiteren findet sich auf der Magen zugewandten Seite des Lobus hepatis sinister ein kleiner zungenförmiger Lappen, Processus intermedius. Die Straußenleber besitzt, anders als die des Nandus (Feder, 1972), keine Gallenblase und der Gallengang tritt links von der Vena porta und der Arteria hepatica an der Leberpforte aus, was auch bei Macalister (1864); Bezuidenhout (1986) und Bezuidenhout (1999) beschrieben ist.

Wie der Tabelle 4.1, welche anhand der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten erstellt wurde, zu entnehmen ist und übereinstimmend mit Arbeiten von Fowler (1991) sowie Cooper und Mahroze (2004), hat die Leber des Straußes im Durchschnitt ein Gewicht von zwei Kilogramm und eine Größe von 30 cm x 27 cm x 7,5 cm. Die Leber hat somit einen prozentualen Anteil von 1,8 % an der Gesamtkörpermasse des Straußes.

Damit liegt die verhältnismäßige Größe der Leber des Straußes im Vergleich mit anderen Vogelarten in der unteren Hälfte. Bei der Trappe macht die Leber etwa 1,4-2,1% aus (Bailey et al., 1997) wohingegen sie beim Huhn bis zu 2,7% (Souba, 1923) und bei der Ente bis zu 4% (Simić und Janković, 1960) ausmachen kann. Entsprechend Beobachtungen, die Wagner (2002) für den Strauß gemacht hat, stellt sich der Lobus hepatis dexter mit einer Größe von 24,8 cm x 15,6 cm etwas größer als der 23,5 cm x 12,8 cm große Lobus hepatis sinister dar. Beim Nandu ist dagegen der linke Leberlappen deutlich größer als der rechte Lappen (Feder, 1972).

## 5.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

Bei der Betrachtung der konventionell gefärbten Präparate der Leber des Straußes lassen sich histologisch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Leberlappen feststellen. Deshalb wird im Folgenden nicht weiter auf einzelne Lappen und deren Struktur eingegangen, sondern diese als ein Ganzes beschrieben. Der Grundaufbau der Straußenleber entspricht dem für Vögel typischen.

An der Oberfläche wird die Leber von einer dünnen Kapsel überzogen. Diese besteht aus straffen Bindegewebe und entlässt sehr dünne, kaum sichtbare, Septen in das Parenchym. Ähnliches haben auch Attia und Soliman (2005) bei ihren Untersuchungen an der Straußenleber gefunden. Die Kapsel der Leber besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern (Attia und Soliman, 2005).

Bei der genaueren Betrachtung des Bindegewebes zwischen den Leberzellplatten zeigt sich, insbesondere in der Goldner Färbung, dass dieses nur schwach ausgebildet ist. Gehäuft tritt es um zuleitende Gefäße (Vena und Arteria interlobularis) und den Ductus interlobularis herum auf. Diese Verteilung der bindegewebigen Strukturen macht es unmöglich eine Läppchenzeichnung im klassischen Sinn zu erkennen. Ähnliche Beobachtungen machte Purton (1969) als er die Struktur der Leber beim Bangivahuhn (*Gallus gallus*) untersuchte. Auch Abdelwahab (1987) berichtete davon, dass bei Enten durch das nur mäßig auftretende Bindegewebe keine Läppchenzeichnung erkennbar ist.

In der PAS-Färbung mit dem Perjodsäure-Schiff-Reagenz reagieren die Gefäßwände deutlich positiv, während das umgebende Bindegewebe, insbesondere das der Area interlobularis und der Glisson-Kapsel, stark positiv reagiert. Da diese Reaktion auch bei

Amylasevorbehandlung in dieser Form bestehen bleibt, bekommt man einen Hinweis auf in der Kapsel und dem übrigen Bindegewebe enthaltene Glykoproteine, wahrscheinlich Kollagen Typ III Fasern (Mulisch et al., 2010). Die gleiche Reaktion konnten auch Attia und Soliman (2005) beobachten. In den meisten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Präparate ist zusätzlich eine stark positive Reaktion der Sinusoidwände zu beobachten. Vermutlich handelt es sich hier, ähnlich wie beim Huhn (Purton, 1969; Ghodducci und Kelly, 2004), um kollagene Fasern im Dissè Raum.

Das homogen erscheinende Leberparenchym besteht zum größten Teil aus Hepatozyten. Die Hepatozyten besitzen eine polygonale, konische Form mit einem relativ großen Kern von 3-5  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Er befindet sich in der Regel auf der sinusoidalen Seite der Zelle und enthält ein bis drei Nukleoli. Mehrere Autoren beschrieben beim Huhn (*Gallus domesticus*) die polygonale Struktur (Purton, 1969) der Hepatozyten mit einem großen Kern von ca 5,5  $\mu\text{m}$  Durchmesser (Hodges, 1972) der einen bis mehrere Nukleoli enthielt (Hodges, 1972; Wong und Cavey, 1992) und sich meistens auf der perisinusoidalen Seite der Hepatozyten befand (Purton, 1969; Wong und Cavey, 1992; Ghodducci und Kelly, 2004). Übereinstimmend mit meinen Befunden berichteten Ghodducci und Kelly (2004) davon, dass der Kern teilweise auch nahe den Gallekanälchen zu sehen ist.

Wie auch für andere Vogellebern dokumentiert, sind die Hepatozyten kreisförmig angeordnet. Sie bilden beim Strauß aus vier bis acht von ihnen zentral in ihrer Mitte die Gallekanälchen. Davon differierend besteht beim Bangivahuhn die Begrenzung der Kanälchen aus drei bis fünf Leberzellen (Purton, 1969). Karrer (1961) berichtete nach Untersuchungen am Hühnerküken, dass vier bis sieben Hepatozyten um einen zentralen Kanal zu sehen sind. Bei Ohata, Tanuma et al. (1982) war zu finden, dass bei Huhn, Taube, Wachtel und Finken vier bis sechs konische Hepatozyten um ein zentrales Gallekanälchen herum angeordnet sind. Diesen Befund bestätigten Ghodducci und Kelly (2004) für das Huhn und beschrieben zusätzlich, dass die Leberzellplatten als tubuläre Stränge um ein zentrales Gallekanälchen herum verlaufen.

Gut erkennbar ist in den vorliegenden Untersuchungen, dass die Leberzellen, um die Kanälchen herumgelagert, Zellbalken unterschiedlicher Länge bilden, die miteinander anastomosieren. Wong und Cavey (1992) bezeichneten die Vogelleber als eine Masse aus verzweigten Parenchymsträngen mit Bahnen in zylindrischer Form. Zwischen diesen Zellbalken liegen miteinander anastomosierende Sinusoide, die nie mehr als zwei Hepatozyten zwischen sich liegen haben, so dass jede Leberzelle mit einem großen Teil ihrer Oberfläche Kontakt zum Lumen der Sinusoide hat. Hickey und Elias (1954) erforschten sehr ausführlich die Struktur der Leberzellbalken bei Vögeln. Aufgrund von früheren

Erkenntnissen, dass die einzelnen Gruppen sich in der Struktur ihrer Leber unterscheiden (Elias und Bengelsdorf, 1952), verwendeten sie bei diesen Untersuchungen 20 Vogelspezies aus möglichst verschiedenen Gruppen. Ihre Arbeit diente als Grundlage um die Theorie zu festigen, dass Leberzellbalken, welche die Breite einer Zelle aufweisen, eine stabilere Konstruktion darstellen und dass die Entwicklung dieser Struktur der Leber ein wichtiger Faktor im Aufstieg der Säugetiere war. Sie verwendeten domestizierte und wildlebende Vögel aus den Ordnungen *Anseriformes*, *Columbiformes*, *Galliformes*, *Gruiformes* und *Passeriformes*. Gefunden wurden sowohl zweischichtige Leberzellbalken bei den weniger entwickelten Arten, wie den Fasanartigen (*Phasianidae*) und den Krallenvögeln *Rallidae*, als auch einschichtige bei den höherentwickelten, wie den Sperlingsvögeln (*Passeriformes*). Teilweise wurden auch beide Typen bei einer Art gefunden, wie bei den Entenvögeln (*Anatidae*). Für das Huhn beschrieb Purton (1969) die Sinusoide als miteinander verbundenes, dreidimensionales Netz, bei dem Purton (1969); Ghodduzi und Kelly (2004) nie mehr als zwei Hepatozyten zwischen zwei benachbarten Sinusoiden gefunden haben. Abdelwahab (1987) korrigierte später die Annahme es seien ein- oder zweischichtige Leberzellbalken und dokumentierte die Struktur des Leberparenchyms als Stränge oder Röhren aus 4-6 Hepatozyten, die um einen zentrales Gallekanälchen angeordnet sind.

Bei der Straußenleber kann keine eindeutige zirkuläre Anordnung der Zellbalken und Sinusoide gefunden werden. Letztere weiten sich in ihrem Lumen zu den Zentralvenen hin und entleeren sich in diese. Anders als bei Abdelwahab (1987), bei dem für Enten ein Sinusoiddurchmesser von bis zu 30  $\mu\text{m}$  angegeben wurde, haben die Sinusoide in meiner Arbeit einen Lumendurchmesser von bis zu 12  $\mu\text{m}$ . Aber auch sehr enge Sinusoide sind zu sehen, durch die gerade noch ein einzelner Erythrozyt hindurch passt. Letzteres ist auch für das Huhn beschrieben (Hodges, 1972).

Die von den ringförmig angeordneten Hepatozyten gebildeten Gallekanälchen gehen in Ductus interlobulares über, die ein einschichtig, isoprismatisches Epithel besitzen. Im weiteren Verlauf erhalten sie ein einschichtig, hochprismatisches Epithel.

Nach Mulisch et al. (2010) können mit Hilfe der Alcianblau 8GX Färbung saure Mucine, Heparin und Glykosaminoglykane nachgewiesen werden. Je nachdem unter welchem pH-Wert die Färbung stattfindet, kann gezeigt werden, dass diese Bausteine Carboxyl- und Sulfatgruppen (pH 2,5) oder nur Sulfatgruppen (pH 1,0) enthalten. Demnach enthält das sich bei beiden pH-Werten schwach bis deutlich positiv verhaltende Bindegewebe der Leber des Straußes in seinen Proteoglykanen und Glykoproteinen sowohl Carboxyl-

als auch Sulfatgruppen.

Die stark Alcianblau-positive Reaktion der apikalen Anteile der Gallengangsepithelzellen bei einem pH-Wert von 2,5 ist beim pH-Wert 1,0 nicht mehr zu sehen. Daraus lässt sich vermuten, dass diese Epithelzellen vorwiegend Carboxylgruppen und kaum bis keine Sulfatgruppen enthalten. In etwas schwächerer Form ist eine Alcianblau-positive Reaktion auch im Lumen der Gallengänge zu beobachten. Diese stark positive Reaktion der Gallengangsepithelzellen und des von ihnen gebildeten Lumens lässt vermuten, dass die Epithelzellen saure Mucine (Mucopolysaccharide) aktiv produzieren, sezernieren und diese als Beimengungen zur Galle in das Lumen abgeben.

Die stark positive Reaktion der Hepatozyten auf das Perjodsäure-Schiff-(PAS)-Reagenz und ihre negative Reaktion auf dieses nach Amylasevorbehandlung gilt als Hinweis, dass im Zytoplasma der Hepatozyten Glykogen vorhanden ist. Vergleiche dazu Mulisch et al. (2010).

In einzelnen Präparaten ist in den Bereichen um die Vena intralobularis eine geringgradig intensivere PAS-Reaktion der Hepatozyten zu beobachten. Aber in Betrachtung der gesamten untersuchten Präparate war keine bevorzugte Lokalisation bei der PAS-positiven Reaktion in einer bestimmten Region zu sehen. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass es in der Straußenleber eine gleichmäßige Verteilung des Glkogens auf alle Hepatozyten gibt. Eine ähnliche Verteilung des Glykogens konnten auch Karrer (1961) beim adulten Huhn und Dalton (1937) beim Hühnerküken feststellen. Hier zeigten die Schnitte eine gleichmäßige PAS-Reaktion des Zytoplasmas über die gesamte Leber verteilt, ohne die Bildung von bestimmten Glykogen-reichen Regionen.

Eine weitere Beobachtung, die in den Präparaten der Straußenleber gemacht werden kann, ist die unterschiedliche Ausprägung der Glykogen-Speicher in den Hepatozyten verschiedener Präparate und somit bei den verschiedenen untersuchten Tieren. Diese Befunde hängen vermutlich mit der unterschiedlichen Stoffwechsellage der einzelnen Tiere zusammen. Auch Dalton (1937) konnte beim Hühnerküken eine große Variation im Verteilungsmuster des gespeicherten Glykogens erkennen. Bei diesen wurde eine Abhängigkeit des Auftretens von Glykogen vom physiologischen Alter der Tiere und der Stärke der metabolischen Rate in der Leber zu diesem Zeitpunkt vermutet.

## 5.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Mittels immunhistochemischer Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Intermediärfilamente des Zytoskeletts der unterschiedlichen Leberzellen nachgewiesen. Es besteht kein Unterschied in der Morphologie des Zytoskeletts aus Intermediärfilamenten bei gefrorenen Proben oder ungefrorenem Material. Auch der Ablauf der Probengewinnung scheint keinen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben (Katsuma et al., 1988).

Vimentin als ein Intermediärfilament, das in Zellen mesenchymalen Ursprungs vorkommt (Kim und Coulombe, 2007; Wendl, 2012), ist in deutlich mehr Zelltypen der Leber des Straußes zu finden als Desmin. Insgesamt kann für die Leber des Straußes ein ähnliches Verteilungsmuster von Vimentin wie für die Ratte (Ballardini et al., 1988) festgestellt werden. Bei der Leber der Ratte findet sich Vimentin in allen Mesenchymzellen der Leber, inklusive den Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Zellen der Blutgefäße, Makrophagen, sinusoidale und perisinusoidale Zellen.

In der Auskleidung der Sinusoide der Leber des Straußes kann Vimentin in deutlich größerer Menge als Desmin nachgewiesen werden. Desmin zeigt sich nur in einzelnen sinusoidalen oder perisinusoidalen ovalen Zellen. Diese besitzen in ihrem stark positiven Zytoplasma hellere bis durchsichtige Vakuolen.

Yokoi et al. (1984) machten Untersuchungen zum Zytoskelett der Sternzellen und beschrieben die Desmin-positiven Zellen als spindelförmig mit Fettvakuolen im Zytoplasma. Später bestätigten Tsutsumi et al. (1987) sowie Rockey et al. (1992) das Vorhandensein von Desmin in den Sternzellen der Leber bei Ratten. Außerdem zeigten De Leeuw et al. (1984), dass die Ito-Zellen in der Rattenleber Vimentin unter allen Umständen exprimieren.

Beim Huhn wurde von Fujimoto und Singer (1987) sowie Handharyani et al. (2001) nachgewiesen, dass die Sternzellen neben Desmin auch Vimentin enthalten. Nach den Untersuchungen von Fujimoto (1986) enthalten die von-Kupffer-Zellen nur Vimentin und kein Desmin. Bei den Endothelzellen der Sinusoide verhält es sich genau andersherum. Diese Untersuchungen führen zu dem Schluss, dass es sich bei den Vimentin-positiven Strukturen der Sinusoide in der Leber des Straußes um von-Kupffer-Zellen und einzelne Sternzellen handelt. Vergleiche mit Untersuchungen an der Leber von Hühnern (Fujimoto, 1986; Fujimoto und Singer, 1987) und die Tatsache, dass die Desmin-positiven Zellen nur vereinzelt vorkommen, lassen vermuten, dass es sich bei diesen um Ito- oder Sternzellen handelt. Auch durch ihre spezifische Position am Rand der Sinusoide liegt

die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Sternzellen handelt.

Für eine genauere Differenzierung, ob es sich bei diesen hier gefundenen Zellen tatsächlich um Ito-Zellen handelt, sind weitere Untersuchungen nötig. Zum einen könnte man eine Gold-Imprägnation mit Gold-Chlorid durchführen, um diese Zellen eindeutig als die beschriebenen Sternzellen zu identifizieren (Kupffer, 1876; Wake, 1971). Zum anderen wäre eine Injektion von kolloidalen Kohlenstoff möglich, welcher nicht von den Sternzellen, aber von den von-Kupffer-Zellen aufgenommen wird (Yokoi et al., 1984). Des Weiteren könnte man eine Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durchführen, um zu zeigen, ob in den Vakuolen Vitamin A gespeichert wird (Wake, 1971). Diese Untersuchung machten auch Yokoi et al. (1984) mit zusätzlich vorab erfolgter, hochdosierter Vitamin A Injektion, um die Anreicherung in den Fettvakuolen und somit die Autofluoreszenz zu erhöhen.

Fujimoto (1986) hat beim Huhn das Vorkommen von Desmin und Vimentin in den Sinusoidalen Zellen der Leber untersucht und herausgefunden, dass die Endothelzellen nur Desmin-positiv sind, während die von-Kupffer-Zellen sich nur für Vimentin positiv sind. Entlang der sinusoidalen Wände wurden häufig beide Intermediärfilamente nachgewiesen. Fujimoto (Fujimoto, 1986) ging davon aus, dass die so reagierenden Abschnitte in den Pseudopodien der Sternzellen liegen und somit die Vimentin-positiv gefärbten Strukturen nur im Dissé Raum vorkommen. Bestätigt wurde diese Annahme durch Immuno-Elektronenmikroskopie. Vor allem das gefundene Vimentin in den Sternzellen führt zu der Vermutung, dass diese Zellen mesenchymalen Ursprungs sind und sich wie Fibroblasten verhalten (De Leeuw et al., 1984), ein Verdacht der sich durch den Nachweis von Desmin bestätigen lässt.

Die Endothelzellen der Intima der Venen des Straußes färben sich deutlich Vimentin-positiv an, mit einer nur schwachen Reaktion der Bindegewebsfasern. In der Tunica intima der Arterien hingegen färben sich die Endothelzellen, Fibroblasten und Bindegewebsfasern sehr stark positiv an. Eine ähnliche Beobachtung machte Fujimoto (1986) bei Untersuchungen an Hühnern, bei denen das Vorhandensein von Vimentin allein, Vimentin mit Desmin und Desmin allein in Endothelzellen im Vergleich betrachtet wurde. Auch Wislperger (2013) berichtete von der Tunica intima der Arterien als der am Vimentin-reichsten Struktur in der Leber des Rindes.

Die dünnen Bindegewebsfasern, die zwischen den Muskelzellen der Tunica media der Arterien verlaufen, zeigen eine schwach positive Reaktion, bei den Venen reagieren sie deutlich Vimentin-positiv. Die arterielle und die venöse Adventitia zeigt eine schwach

bis deutlich positive Reaktion. Desmin ist nur in den Muskelzellen der Tunica media der Vena interlobularis festzustellen und nicht in denen der Arteria interlobularis. Diese Beobachtungen führen zu der Erkenntnis, dass sich die Zytoskelette der untersuchten Gefäßtypen deutlich voneinander unterscheiden.

Beim den von Fujimoto (1986) untersuchten Hühnern sind die Endothelzellen der Venae interlobulares Desmin-positiv und Vimentin-negativ und die der Arteriae interlobulares Vimentin-positiv und Desmin-negativ. Handharyani et al. (2001) konnten weder Desmin noch Vimentin in den Gefäßstrukturen der Leber des Huhnes nachweisen. Bei Yokoi et al. (1984) zeigte sich in der Rattenleber eine Desmin-positive Anfärbung der Muskelzellen der Blutgefäße in der Glisson-Trias, wohingegen Ballardini et al. (1988) eine positive Reaktion in allen Blutgefäßen beschrieb.

Ein stark positiver Nachweis von Desmin im Zytoplasma der Epithelzellen der Ductus interlobulares sowie der Ductuli biliferi ist in der Leber des Straußes zu beobachten. Der immunhistochemische Nachweis von Vimentin ist, anders als für die Gallengänge des Rindes berichtet (Wislsperger, 2013), für alle Abschnitte der Gallengänge negativ. Entgegen der Befunde für den Strauß sind die Gallengangsepithelien beim Huhn für den Nachweis von Vimentin und Desmin negativ (Handharyani et al., 2001). Auch für die Epithelzellen der Gallengänge bei der Ratte ist kein Vorkommen von Desmin beschrieben (Ballardini et al., 1988; Yokoi et al., 1984).

Die Muskelzellen in den Wänden der interlobulären Blutgefäße der Straußenleber reagieren mit dem „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ ( $\alpha$ -SMA) Antikörper. Insbesondere in der Tunica media ist dieser in großer Menge nachzuweisen. Ebenso ist diese Reaktion für die intralobulären Venen zu beobachten, welche im Gegensatz zu ersteren kein Desmin enthalten. Die Intima aller dieser Gefäße zeigt keine Reaktion mit dem Antikörper. Auch bei der Ratte kann eine stark Actin-positive Reaktion festgestellt werden (Ballardini et al., 1988). Tanaka et al. (1991) konnten das gleichzeitige Vorkommen von Desmin in den stark SMA exprimierenden Zellen nachweisen.

Ein großer Teil der sinusoidalen Wandauskleidung reagiert positiv auf den  $\alpha$ -SMA-Antikörper. Eine Beobachtung, die auch in der Leber der Ratte gemacht wird (Ballardini et al., 1988). Dazwischen finden sich sehr vereinzelt runde, sich dunkelbraun anfärbende Zellen. Diese ähneln in Aussehen und Positionierung den schon beschriebenen Desmin-positiven Strukturen, bei denen es sich vermutlich um Sternzellen handelt. Bei der gesunden Ratte beschrieben Tanaka et al. (1991) ein zahlreiches Vorkommen Desmin-positiver sternförmiger Zellen, die bei einer Doppel-Immunofluoreszenz Untersuchung

fast immer negativ für  $\alpha$ -SMA waren. Im weiteren Verlauf der Studie von Tanaka et al. (1991) zur Leberfibrose konnten mit dem Fortschreiten der Fibrose immer mehr Desmin- und  $\alpha$ -SMA-positive Zellen insbesondere im Umfeld der fibrotischen Abschnitte nachgewiesen werden. Auch bei Handharyani et al. (2001) nahm die Expression von Actin in den Sternzellen der Hühnerleber mit dem Fortschreiten der Proliferation derselben zu. Diese Studien lassen den Schluss zu, dass die in der Leber des Straußes gefundenen  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen proliferierte Ito-Zellen sind. Eine genaue Differenzierung wäre nur mittels weiterer histochemischer Untersuchungen möglich.

In den luminalen Anteilen der Gallengänge, den Gallekanälchen und in der Peripherie der Hepatozyten der Ratte konnten Ballardini et al. (1988) Actin nachweisen. Diese Befunde bestätigen sich nicht für die Leber des Straußes.

Zytokeratine, die zu den Intermediärfilamentproteinen gehören, werden vor allem von Epithelzellen exprimiert (M. Osborn und Weber, 1982). Bei der Diskussion der immunhistochemischen Nachweise der Zytokeratine ist festzustellen, dass Zytokeratin 8 und 14 beim Strauß nur in den Strukturen des Gallengangssystems und in den biliären Abschnitten der Hepatozyten vorkommen. Beim Rind sind zusätzlich zu Zytokeratin 8 und 14 auch 18 und 19 nur in den Gallengängen zu finden (Wislsperger, 2013). Bei der Ratte und der Maus sind dagegen auch die Hepatozyten und die Glissonsche Kapsel Zytokeratin 8- und 18-positiv (Blouin et al., 1992; Kiassov et al., 1995; Fickert et al., 2009). Im Bereich der biliären Pole der Hepatozyten zeigt sich die Zytokeratin 8-positive Reaktion in Form kleiner Granula. Auch bei der Taube und dem Huhn stellt sich das Zytoplasma der Hepatozyten im Bereich der Canaliculi biliferi granulär (David, 1961) und grobkörnig fibrillär dar und ist eindeutig elektronendichter als in angrenzenden Gebieten (Hodges, 1972). Im gesamten Zytoplasma der Hepatozyten lässt sich außerdem in kleiner Menge Zytokeratin 18 nachweisen.

Die Canaliculi biliferi fließen in den Heringschen Kanälchen zusammen (Nickel et al., 1992). Diese werden zum Teil aus einschichtig, kubischen Gallengangsepithelzellen und zum anderen Teil aus Hepatozyten gebildet (Purton, 1969; Feder, 1969; Nickel et al., 1992; Ghoddusi und Kelly, 2004). Die Heringschen Kanälchen gehen in die Ductus interlobulares über, die von einem einfachen kubischen oder iso- bis hochprismatischen Epithel mit in das Lumen ragenden Mikrovilli begrenzt werden (Purton, 1969; Heidbrink, 2003). Diese vereinen sich zu den Ductuli biliferi, die von hochprismatischen Epithelzellen umgeben sind. Die Differenzierung der einzelnen Abschnitte der Gallengänge lässt sich

auch anhand der Zytokeratine erkennen. Nur im Bereich der Canaliculi biliferi ist Zytokeratin 8 zu finden. Die Heringschen Kanälchen sind deutlich positiv für Zytokeratin 14 und sehr schwach positiv für Zytokeratin 19. In den kubischen Epithelzellen der Ductus interlobulares zeigt sich Zytokeratin 14 stark positiv, Zytokeratin 19 schwach positiv und Zytokeratin 18 ist deutlich positiv. Im letzten Abschnitt, den Ductuli biliferi, stellen sich in den hochprismatischen Epithelzellen Zytokeratin 14 und 18 stark positiv und Zytokeratin 19 deutlich positiv dar. Wislsperger (2013) machte bei der Leber des Rindes die Beobachtung, dass Zytokeratin 8 eher in zentralen Abschnitten der Gallengänge und Zytokeratin 14 in etwas peripherer gelegenen vorkommt. Auch Blouin et al. (1992) haben bei Untersuchungen an der Rattenleber festgestellt, dass Zytokeratin 14 in den Gallengangszellen vor allem im Portalbereich der Leber vorkommt. Beim Strauß kann eine Gliederung in zentral und peripher nicht vorgenommen werden, da die Leber, wie auch bei anderen Vogelarten (Feder, 1969), keine Läppchenzeichnung aufweist. Aber eine Lebertrias (Heidbrink, 2003) mit Arteria und Vena interlobularis und Ductus interlobularis ist zu erkennen. Die Canaliculi biliferi und die Heringschen Kanälchen verlaufen außerhalb dieser Trias zwischen den Hepatozyten. Nachdem nur die Ductuli biliferi stark Zytokeratin 18 und deutlich Zytokeratin 19 positiv sind, ist davon auszugehen, dass sich deren Zytoskelett von dem der Heringschen Kanälchen und auch teilweise von dem der Ductus interlobulares unterscheidet.

Ferner ist festzustellen, dass die Tunica media der interlobulären Venen Intermediärfilamente vom Typ Zytokeratin 19 enthält.

Der Antikörper Panzytokeratin bindet in den Epithelzellen aller Abschnitte des Gallengangsystems. Die hochprismatischen Epithelzellen der Ductuli biliferi zeigen eine ebenso stark positive Reaktion wie die kubischen Epithelzellen der Ductus interlobulares und der Heringschen Kanälchen. Eine etwas schwächer positive Reaktion ist in den Canaliculi biliferi und dem angrenzenden Zytoplasma der Hepatozyten zu beobachten.

Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit erstellten Ergebnissen konnten Handharyani et al. (2001) in den Cholangiozyten der Hühnerleber keine Zytokeratine nachweisen. Dagegen enthalten die Ito-Zellen, für die in der Straußenleber kein positiver Nachweis auf Zytokeratine erfolgte, in der Leber des Huhnes Zytokeratine.

Die in dieser Untersuchung gemachten Beobachtungen lassen vermuten, dass die Verteilung der Intermediärfilamente speziesabhängig ist. Eine Beobachtung, die auch Madekurozwa (2007) nach Untersuchungen am Ovar des Emus äußerte.

Omary und Ku (1997) fassten in einer Übersichtsarbeit über die Intermediärfilamentproteine der Leber beim Säugetier zusammen, dass in den Hepatozyten Zytokeratin 8 und 18, in den Gallengangsepithelzellen Zytokeratin 7, 8, 18, und 19, in der Glissonschen Kapsel Vimentin und Zytokeratin 8, 14 sowie in den perisinusoidalen Zellen Desmin und Vimentin exprimiert werden. Diese Erkenntnisse lassen sich in dieser Form für den Strauß nicht bestätigen (siehe oben).

### 5.3 Lektin histochemische Untersuchungen

Mittels der glykohistochemischen Untersuchungen wurden spezifische Zuckerbindungsstellen in den Strukturen der Leber des Straußes nachgewiesen. Es wurden sowohl FITC-konjugierte als auch biotinylierte Lektine verwendet. Aus ersterer Gruppe wurden *Canavalia ensiformis* Agglutinin (ConA), *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA), *Griffonia simplicifolia* Lektin I (GSL-I), *Lens culinaris* Agglutinin (LCA), *Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin (PHA-E) und *Phaseolus vulgaris* Leukoagglutinin (PHA-L), Peanut Agglutinin (PNA), *Pisum sativum* Agglutinin (PSA), *Ricinus communis* Agglutinin (RCA), Soybean Agglutinin (SBA), *Ulex europaeus* Agglutinin I (UEA-I), Wheat germ Agglutinin (WGA) und succinyliertes Wheat germ Agglutinin (WGAs) untersucht. Zur zweiten Gruppe gehören die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lektine *Sophora japonica* Agglutinin (SJA), *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA) und *Maackia amurensis* I Agglutinin (MAA-I).

Bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnten Bindungsstellen für ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-1, SBA, PHA-E und PHA-L nachgewiesen werden. Keine Reaktion zeigten hingegen DBA, SJA, SNA, UEA-1 und MAA-I.

Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen hängen von verschiedenen Faktoren ab. Unter anderem von der Art der Fixation und einer eventuellen Vorbehandlung mit Proteasen (Witt und Klessen, 1989). Witt und Klessen (1989) erzielten gute Ergebnisse der Lektinbindung nach der Fixierung der Proben in einer Bouin-Lösung und Murnane et al. (1989) berichteten für die Lektine RCA-I, DBA und SBA von einem unterschiedlichen Reaktionsmuster bei Gefrier- oder Paraffinschnitten. Ein weiterer Faktor, der die Bindung eines Lektins beeinflusst, ist die Höhe der Konzentration des

verwendeten Lektins (Chandramouli et al., 1977). Auch Hixson et al. (1979) demonstrieren anhand der Ergebnisse ihrer Untersuchungen, dass das Bindungsmuster der Lektine von der Konzentration derselben abhängt. Die verwendete Konzentration eines Lektins kann die Bindung des Lektins insofern beeinflussen, als dass dieses stark, schwach oder garnicht bindet. Diese Abhängigkeit führt unter anderem zu den sehr differierenden Ergebnissen, von denen McMillan et al. (1988) berichteten. Bernard et al. (1982) konnten, anders als Chandramouli et al. (1977), bei Untersuchungen an Hühnerembryonen keine Veränderungen der Bindungsreaktionen abhängig von der Versuchstemperatur feststellen.

Mit dem FITC-markierten ConA, welches seine höchste Affinität zu Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid besitzt und eine deutlich geringere zu Glucopyranosyl-Resten (Hardman und Ainsworth, 1976; Soares et al., 2011), reagiert vor allem das Zytoplasma der Hepatozyten sehr stark. Ebenso erhält man eine starke Reaktion des Zytoplasmas der kernhaltigen Straußenerythrozyten. Sumner und Howell (1936) haben nachgewiesen, dass ConA in einer Lösung mit Glykogen agglutiniert und ausfällt. Unter Berücksichtigung der Befunde vorhergehender Untersuchungen, insbesondere denen der PAS-Reaktion, ist davon auszugehen, dass es sich bei den hier positiv reagierenden Bestandteilen der Hepatozyten um Glykogengranula handelt. Auch in den Hepatozyten der Ratte kann eine Bindung von Glykogen mit FITC-markiertem ConA nachgewiesen werden (Kiernan, 1975).

Im Gegensatz zu der Reaktion auf ConA zeigt sich bei LCA, dass eine stärkere Bindungsneigung zu Mannose-tragenden Strukturen hat, die einen Fucoserest in  $\alpha$ -1,6-glykosidischer Bindung an ihrem N-Acetylglucosaminkern präsentieren (Roth, 2011), eine schwächere positive Reaktion des Zytoplasmas der Hepatozyten, die sich zu den Gallekanälchen hin verstärkt. Dieses Bindungsschema lässt vermuten, dass im Zytoplasma der Hepatozyten weniger Oligosaccharidketten vorhanden sind, die an ihrem N-Acetylglucosaminkern über einen Fucoserest mit einem mannosehaltigen Glykan verbunden sind. Die Zellkerne der Hepatozyten zeigen keine Bindung an ConA. PSA als drittes untersuchtes Lektin aus der Gruppe der Glucose/Mannose bindenden Lektine bindet nicht im Zytoplasma der Hepatozyten.

RCA zeigt eine stark positive Reaktion im Zytoplasma der Hepatozyten, mit einer granulären Verteilung und einer Anhäufung in der Nähe der Zellmembran. Im Gegensatz zu dieser Reaktion zeigt PNA, das auch zur Gruppe der Galaktose bindenden Lektine

gehört, keine Bindung an die Hepatozyten. Dieses Reaktionsbild lässt sich dadurch erklären, dass RCA neben einer Bindung an Galaktose auch eine starke Bindung an N-Acetyl-D-Galaktosamin aufweist (Nicolson und Blaustein, 1972). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die positive Reaktion des Lektins RCA von der Bindung an N-Acetyl-D-Galaktosamin stammt.

Eine weitere positive Reaktion ist für GSL-1 zu beobachten. WGA, WGAs, DBA, SJA, SBA, SNA, UEA-1, PHA-E, PHA-L und MAL-1 reagieren neben PSA und PNA auch nicht mit den Hepatozyten der Straußenleber. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen und ihrer Ergebnisse kann man den Schluss ziehen, dass im Zytoplasma der Hepatozyten des Straußes Kohlenhydratketten mit Glucose, Mannose, N-Acetyl-D-Galaktosamin und Galaktose vorhanden sind.

Die Gallengänge der Leber des Straußes gehen eine Bindung mit den Lektinen RCA, WGA, WGAs, PHA-E und PHA-L ein. In den Gallekanälchen reagiert PHA-E stark positiv. Genauso stark reagiert es mit den apikalen Anteilen der Epithelzellen der Ductus interlobularis. In den apikalen Anteilen der Epithelzellen der Ductuli biliferi ist dagegen nur noch eine sehr schwache Fluoreszenz zu beobachten. PHA-L bindet nur schwach im Lumen der Ductus interlobulares. Alle anderen Abschnitte des Gallengangsystems verhalten sich negativ. Eine ähnliche Reaktion wie in den Gallekanälchen der Ratte (Witt und Klessen, 1989) zeigt RCA auch beim Strauß, bei dem dieses Lektin mit einer deutlichen Fluoreszenz bindet. Unter der Berücksichtigung, dass PNA in den von mir durchgeführten Untersuchungen negativ ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Gallengänge des Straußes N-Acetyl-D-Galaktosamin- aber keine Galaktose-Reste exprimieren.

Für die Lektine WGA und WGAs aus der Gruppe der N-Acetyl-D-Glukosamin (Burger und Goldberg, 1967; A. K. Allen et al., 1973) und N-Acetyl-D-Neuraminsäure bindenden Lektine kann eine starke Bindung an die apikalen Bereiche der Epithelzellen der Gallengänge des Straußes beobachtet werden. Auch in der Leber der Ratte sind WGA und WGAs positiv (Witt und Klessen, 1989; Sanzen et al., 1995). Bei diesen reagieren die beiden Lektine, anders als beim Strauß, hauptsächlich im Zytoplasma der Epithelzellen der Gallengänge. Nur WGAs bindet auch am apikalen Ende der Zellen (Sanzen et al., 1995). Die Gallengänge weisen keine Affinität zu den Lektinen ConA, LCA, PSA, PNA, SJA, DBA, GSL-1, SNA und UEA-1 auf.

An den apikalen Anteilen der Epithelzellen der Gallengänge und an den Mikrovilli in deren Lumen sind beim Strauß somit N-Acetyl-D-Glukosamin, N-Acetyl-D-Neuraminsäure und Oligosaccharide zu finden.

Eine stark positive Reaktion der Sinusoide und ihrer Zellen zeigt sich mit den Lektinen LCA, PSA, PNA, WGAs, SBA, PHA-E. PNA bindet sehr stark an einzelne längliche Zellen, die in der Nähe der Area interlobularis gehäuft auftreten. Vereinzelt sind auch lange schmale Ausläufer dieser Zellen zu beobachten, die entlang der Wände der Sinusoide verlaufen. Nicht zu erkennen ist, ob diese Zellen im Sinusoidal- oder Perisinusoidalraum auftreten. Aufgrund ihrer Form, Lokalisation und ihrem Verteilungsmuster ist aber davon auszugehen, dass es sich um von-Kupffer-Zellen oder Ito-Zellen handelt. Die von-Kupffer-Zellen binden bei der Ratte nach Neuraminidase-Vorbehandlung an SBA, WGAs, RCA-I und PNA sowie schwach an PSA (Witt und Klessen, 1989). Takahashi und Howes (1986) sahen die Interpretation der Bindung von Lektinen in Neuraminidase-vorbehandelten Präparaten als schwierig an. Beim Schaf kann nur eine schwache Reaktion mit RCA und WGA erreicht werden (Murnane et al., 1989).

Dagegen sind die Zellen, die mit PSA interagieren, im gesamten Sinusoidalraum zu beobachten. Die leicht fluoreszierenden Ausläufer laufen fast an der gesamten Sinusoidwand entlang. Durch das sehr verbreitete Vorkommen dieser PSA-bindenden Zellen und ihrer Ausläufer in den Sinusoiden kann davon ausgegangen werden, dass es sich um sinusoidale Endothelzellen handelt. Ein sehr ähnliches Verteilungsmuster zeigt sich bei der Reaktion mit PHA-E. Dieses reagiert aber deutlich stärker in den Sinusoidalwänden als PSA. Auch LCA zeigt eine starke Bindungsaffinität zu Zellen im Sinusoidalraum. Diese zeigen sich im Gegensatz zu den zwei zuvor genannten von ovaler Gestalt und ohne Ausläufer. Ein ähnliches Reaktionsbild wie LCA zeigt SBA in den sinusoidalen Zellen. Bei der Reaktion mit WGAs reagieren die Zellen im Sinusoidalraum stark positiv, die Wände der Sinusoide nur stellenweise schwach positiv. Bei den von verschiedenen Forschern (Kawakami und Hirano, 1984; McMillan et al., 1988; Witt und Klessen, 1989) untersuchten Ratten waren die Endothelzellen der Sinusoide positiv für RCA-I, WGA, PSA, WGAs, ConA, LCA und SBA. Beim Schaf waren sie dagegen nur schwach positiv für RCA-I und WGA (Murnane et al., 1989). Keinerlei Bindungsaffinität zeigen die Zellen der Sinusoide zu den Lektinen ConA, WGA, SJA, DBA, GSL-1, SNA, UEA-1 und PHA-L.

Bei den Gefäßstrukturen in der Leber des Straußes zeigen sich teilweise deutliche glykohistochemische Unterschiede zwischen den zu- und ableitenden Gefäßen. Bei Untersuchungen an Gefäßen von Hühnern konnten keine Unterschiede zwischen dem Bindungsverhalten von Arterien und Venen festgestellt werden. Dort binden SNA, WGA, MAA und RCA gleichermaßen an die Endothelzellen (Naňka et al., 2001; Nico et al., 1998). Bei der Maus binden ConA, RCA und PNA ohne Unterschied an die Arterien und Venen (Barberá-Guillem et al., 1991). LCA bindet nur an die zu- und ableitenden Venen der Leber und PHA-E, PSA und WGA zeigen ein auf bestimmte funktionelle Abschnitte des Acinus beschränktes Bindungsverhalten (Barberá-Guillem et al., 1991).

In der Intima größerer Venae interlobulares des Straußes lassen sich einzelne Zellen mit dem Lektin WGA anfärben. Sie bilden lange Ausläufer an der Venenwand entlang. Ihr Zellkern zeigt dabei keine Reaktion. Vermutlich handelt es sich hierbei um die Endothelzellen der Tunica intima der Venen. Eine etwas schwächere Reaktion erhält man für die Endothelzellen der Arteriae interlobulares. Eine sehr viel stärkere Fluoreszenz ist mit dem Lektin WGA zu beobachten. Die Endothelzellen der Venae intralobulares und Venae interlobulares verhalten sich stark positiv. Bei den Arteriae interlobulares fällt die Reaktion deutlich schwächer aus als bei den Venen. Da sowohl WGA als auch WGA zu der Gruppe der N-Acetyl-D-Glukosamin und N-Acetyl-D-Neuraminsäure bindenden Lektine gehören, ist zu vermuten dass in der Zellmembran und dem Zytoplasma der Endothelzellen der Arterien weniger N-Acetyl-D-Glukosamin- und N-Acetyl-D-Neuraminsäure-Glykokonjugate vorkommen.

Des Weiteren kann eine schwache Bindung von SBA an die Intima der Venenwände beobachtet werden. Eine starke Bindung zeigt PHA-E an die Endothelwände der zuleitenden Gefäße. Dagegen ist keinerlei Reaktion dieses Lektins mit den Venae intralobulares zu beobachten. Ein etwas anderes Reaktionsbild liefert das Lektin PHA-L aus der gleichen Gruppe der Oligosaccharid-bindenden Lektine. Dieses bindet nur an die Fibrozyten der venösen Gefäßwände.

Keine Reaktion zeigen die Gefäße der Leber des Straußes mit den Lektinen ConA, SJA, DBA, GSL-1, SNA, RCA und UEA-1. Bei den Arterien der Leber sind außerdem die Untersuchungen mit den Lektinen LCA, PHA-L und SBA negativ.

## 5.4 Ultrastrukturelle Untersuchungen

Für zahlreiche Geflügelarten, wie zum Beispiel dem Huhn, bestehen bereits ausführliche Arbeiten und Studien bezüglich des strukturellen und ultrastrukturellen Aufbaus der Leber (Purton, 1969; Hodges, 1972; Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Für den Afrikanischen Strauß lässt sich nur wenig finden (Attia und Soliman, 2005), trotz seiner kommerziellen Haltung und Nutzung. Die in dieser Arbeit mit dem Transmissionselektronenmikroskop gemachten Aufnahmen der Strukturen der Straußenleber sollen einen weiteren Einblick in deren ultrastrukturellen Aufbau bringen.

Es besteht grundsätzlich eine große Ähnlichkeit der in der vorliegenden Arbeit gefundenen und beschriebenen Strukturen der Leber des Straußes mit den bereits untersuchten und beschriebenen Strukturen bei zahlreichen anderen Vogelarten, wie für Huhn (Purton, 1969; Hodges, 1972; Ghoddusi und Kelly, 2004), Ente (Abdelwahab, 1987), Pute (Bhatnagar und Singh, 1982), Wachtel und Haustaube (Ohata, Tanuma et al., 1982). Aber anders als für manche Vogelarten wie die *Passeriformes*, bei denen die Leberzellen einschichtige Leberzellbalken bilden (Hickey und Elias, 1954), zeigen sich die Hepatozyten beim Strauß als zweischichtiger Balken zwischen zwei benachbarten Sinusoiden. Purton (1969); Hodges (1972); Ghoddusi und Kelly (2004) beschrieben diesen Aufbau auch für das Huhn.

Entsprechend vorhandener Befunde für das Huhn (Hodges, 1972; Ghoddusi und Kelly, 2004), die Ente (Abdelwahab, 1987) und den Truthahn (Bhatnagar und Singh, 1982), zeigen die verhältnismäßig großen Hepatozyten in der vorliegenden Arbeit eine polygonale Form mit ungleichlangen Seitenkanten. Wong und Cavey (1992) beschrieben die Hepatozyten bei den Hühnerküken als zylinderförmig, was sehr gut mit der Form der hier beschriebenen Leberzellen des Straußes übereinstimmt. Die Oberfläche der Hepatozyten lässt sich in drei Bereiche einteilen (David, 1961). Den interzellulären Abschnitt an der Kontaktfläche zwischen zwei Leberzellen, den biliären Bereich mit dem die Canaliculi biliferi begrenzt werden und ein sinusoidaler Abschnitt. Mit letzterem grenzen die Hepatozyten über den Dissé Raum an die Sinusoide. Der den Sinusoiden zugewandte Abschnitt zeigt sich als deutlich breiterer Anteil als der ihm ungefähr parallel gegenüberliegende biliäre Pol. Die Zellmembran dieser beiden Abschnitte stülpt sich aus und formt Mikrovilli. Auf der Seite der Sinusoide ragen diese in den Dissé Raum hinein und verzweigen sich. In den Mikrovilli des biliären Pols zeigen sich strangartige Strukturen,

die in ähnlicher Weise schon von David (1961) für das Kaninchen beschrieben wurden. In diesem Bereich der Hepatozyten stellt sich das Zytoplasma ohne Zellorganellen und homogen granulär dar. Als dritter Abschnitt sind die lateralen Membranwände zu nennen, die den Kontakt zwischen zwei Parenchymzellen darstellen. Ausgehend von Berichten über eine Breite des Interzellularspalts beim Huhn von 17-26 nm (Hodges, 1972) und bei der Taube von 70-200 nm (David, 1961), liegt der Durchmesser beim Strauß mit 41-51 nm genau zwischen diesen beiden Vogelarten.

Die Leberzellen des Straußes besitzen, genauso wie die des Truthahns (Bhatnagar und Singh, 1982), einen einzelnen, großen, runden Nukleus, der meistens exzentrisch auf der sinusoidalen Seite des Hepatozyten liegt, aber auch dem biliären Pol zugewandt sein kann. Wie auch von Attia und Soliman (2005) für den Strauß beschrieben, enthielt der Nukleus in der vorliegenden Arbeit häufig einen oder zwei Nukleoli. In gleicher Weise beschrieben es Purton (1969); Hodges (1972) und Wong und Cavey (1992) für das Huhn. Die Nukleoli bestehen aus einer elektronendichten Matrix mit elektronenoptisch leeren oder dem Kernplasma gleichenden Hohlräumen. Begrenzt wird der 5  $\mu\text{m}$  große Nukleus von einer meistens glatten, teilweise mit Ribosomen besetzten, Doppelmembran, die sich stellenweise einbuchtet und gleichmäßig verteilt mit einem Diaphragma verschlossene Poren aufweist. In deren Bereich verengt sich der ansonsten gleichmäßig weite Spalt zwischen den zwei Membranschichten. An die Kernmembran angelagert ist stark elektronendichtes Heterochromatin zu sehen. Im übrigen Kernplasma tritt zu dreivierteln feingranuläres Euchromatin auf. Im Vergleich mit anderen Arbeiten (Hodges, 1972; Abdelwahab, 1987) besitzt der Strauß einen verhältnismäßig großen Zellkern.

Übereinstimmend mit Berichten über die Leber beim Huhn (Abdelwahab, 1987; Wong und Cavey, 1992), sind im Zytoplasma der Hepatozyten des Straußes die größeren Stapel des rauen Endoplasmatischen Retikulums vor allem entlang der lateralen Zellmembran zwischen den Leberzellen zu finden. Ein bis zwei Zisternen befinden sich auch um die meisten Mitochondrien herum. Entgegen dieser Erkenntnisse befanden sich in einer Arbeit von Ohata, Tanuma et al. (1982) über Hühner, Wachteln und Tauben sowie einer Studie über Truthähne von Bhatnagar und Singh (1982) die Tubuli vor allem um die Mitochondrien herum, zu denen sie engen Kontakt hielten. Es können Stapel aus bis zu neun Tubuli gefunden werden. Die Tubuli bestehen aus langgestreckten, dünnen, mit mäßig elektronendichtem Material gefüllten, rohrartigen Strukturen, die von einer dünnen, mit runden, stark elektronendichten Ribosomen besetzten Membran begrenzt werden.

Die Mitochondrien vom Cristae-Typ sind die am häufigsten im Zytoplasma der Hepatozyten gefundene Zellorganelle und sind meist rund oder oval. Als weitere Form zeigen diese sich auch birnenförmig oder länglich. Letztere Form und ovale Mitochondrien beschrieben auch Bhatnagar und Singh (1982) für den Truthahn. In der von mir erstellten Arbeit sind sie am häufigsten rund um den Nukleus und insbesondere im Bereich der Canaliculi biliferi zu finden. Der Durchmesser dieser Organellen beträgt etwa 850 nm. Die Mitochondrien bestehen aus einer mäßig elektronendichten, granulären Matrix. Begrenzt werden diese von einer Zelldoppelmembran, die sich stellenweise einstülpt und die typischen Cristae formt. Vereinzelt finden sich in den Mitochondrien elektronendichtere Granula, die sich aus kleineren Granula zusammensetzen. Insgesamt ähnelt die Struktur der Mitochondrien des Straußes denen von Huhn, Wachtel und Taube (Ohata, Tanuma et al., 1982).

Etwas kleiner, mit einem Durchmesser von 500-800 nm, und nicht ganz so zahlreich sind die Peroxisomen mit einer elektronendichteren Matrix als die Mitochondrien und einem stark elektronendichten Kern. Des Weiteren sind noch runde Lysosomen mit einem Durchmesser von 300-500 nm zu beobachten, die sich deutlich elektronendichter als das umliegende Zytoplasma darstellen und von einer Membran begrenzt werden. Der Golgi-Apparat ist eher schlecht entwickelt und besteht aus mehreren Dictyosomen und in Abschnürung befindlichen Vesikeln.

Bei der Betrachtung der Verteilung der Glykogengranula im Zytoplasma der einzelnen Hepatozyten fällt auf, dass diese keinem eindeutigen Muster folgt. Die Glykogengranula erscheinen deutlich dunkler als die beobachteten Ribosomen und auch wesentlich größer als diese. Zu finden sind sie über das gesamte Zytoplasma der Leberzelle verteilt. Wie auch schon bei der PAS-Färbung der Präparate zu beobachten, liegen glykogenreiche und -arme Zellen oft nahe beieinander. Dieses heterogene Verteilungsmuster beschrieben auch Karrer (1961); Bhatnagar und Singh (1982); Ohata, Tanuma et al. (1982) und Ghodduji und Kelly (2004) für Huhn und Pute. Bei embryonalen Hühnern und frisch geschlüpften Küken haben Stephens und Bils (1967) sowie Pal et al. (1991) nachgewiesen, dass die Menge an gespeichertem Glykogen bis kurz vor dem Schlupf stark zunimmt, kurz danach deutlich absinkt und dann wieder zunimmt. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Glykogendepots in ihrer Ausprägung stark vom Stoffwechselstatus der verschiedenen Tiere abhängig sind. Innerhalb eines Tieres ist die ungleichmäßige Verteilung des Glykogens auf die Hepatozyten ein Hinweis auf die unterschiedliche Mobilisierung des gespeicherten Glykogens aus den Depots.

Es ist für die Ente, die Taube und den Truthahn beschrieben, dass die Hepatozyten keine flachen Balken bilden, wie von Purton (1969) und Hodges (1972) für das Huhn beschrieben, sondern sich zu 4 oder mehr zirkulär um ein Gallenkanälchen anordnen (David, 1961; Bhatnagar und Singh, 1982; Abdelwahab, 1987; Ghoddusi und Kelly, 2004). Dabei bilden diese tubuli-artige Strukturen um die Gallenkanälchen herum und verzweigen sich in einem dreidimensionalen Netzwerk aus anastomosierenden Strängen (Abdelwahab, 1987), die um sich herum die Sinusoide liegen haben. Zwischen diesen finden sich nie mehr als zwei Hepatozyten. Diese Befunde können auch in der vorliegenden Arbeit für den Strauß bestätigt werden. Bei diesem findet sich am biliären Pol von in der Regel vier Hepatozyten ein Canaliculus biliferus ohne eigene Zellmembran. In das Lumen der Gallekanälchen ragen von der Hepatozytenzellmembran gebildete Mikrovilli. Der Verschluss der Kanälchen zu den verhältnismäßig weiten Interzellularräumen zwischen den Hepatozyten erfolgt, wie für das Huhn (Ghoddusi und Kelly, 2004) und den Truthahn (Bhatnagar und Singh, 1982) beschrieben, durch Tight junctions.

Die Endothelzellen der Sinusoide bilden mit ihrem Zytoplasma lange, dünne Ausläufer mit denen sie den Großteil des Sinusoidlumens vom Dissé Raum abgrenzen. In der Regel haben sie eine Weite von 300 nm, stellenweise verjüngen sich diese Ausläufer jedoch auf unter 150 nm. Durchsetzt ist diese Auskleidung von intrazellulären Poren ohne Diaphragma, die den Austausch von Stoffen mit dem Dissé Raum ermöglichen. Der unregelmäßige langgestreckte Zellkern befindet sich in einer Ausbuchtung der Endothelzelle, in der auch die meisten der vorhandenen Zellorganellen zu finden sind. Im Nukleus der Endothelzellen ist deutlich mehr Heterochromatin als im Hepatozytenzellkern zu finden und im Gegensatz zu diesem enthält er keine Nukleoli. Die Mitochondrien der Endothelzellen sind mit einem Durchmesser von 280 nm deutlich kleiner als die der Hepatozyten (850 nm) und auch vom Cristae-Typ. Im Gesamten ist zu sagen, dass die Endothelzellen der Straußenleber im Aufbau denen des Huhnes (Ghoddusi und Kelly, 2004), der Wachtel und der Taube (Ohata, Tanuma et al., 1982) entsprechen.

Eine weitere Zellart, die im sinusoidalen Raum zu finden ist und teilweise am Aufbau der Sinusoidwand beteiligt ist, ist die von-Kupffer-Zelle. In der vorliegenden Arbeit zeigen sich diese von unregelmäßiger Gestalt mit zahlreichen Pseudopodien, die durch den Dissé Raum bis zu den Hepatozyten vordringen und Kontakt zu diesen aufnehmen. Des Weiteren nehmen sie Kontakt mit der Endothelauskleidung auf der anderen Seite des Sinusoids auf. Diesen Kontakt konnte Purton (1969) beim Huhn nur selten beobachten. Attia und Soliman (2005) beschrieben dagegen auch beim Strauß ein starkes Vordringen

der von-Kupffer-Zellen in den Sinusoidalraum.

Der Nukleus der von-Kupffer-Zellen ist in seiner Form und seinem Aufbau wie in zahlreichen Arbeiten über Huhn, Wachtel und Taube bereits beschrieben (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghoddusi und Kelly, 2004). Um den Kern finden sich Stapel des rauen Endoplasmatischen Retikulums.

Anders als bei Ohata, Tanuma et al. (1982) beschrieben, zeigen sich im Zytoplasma der von-Kupffer-Zelle der Straußenleber deutlich mehr Zellorganellen, als dies bei den Endothelzellen der Fall ist. Das Zytoplasma/Zellkern-Verhältnis hingegen ist, wie bei diesem beschrieben, größer als es für die Endothel- und die Ito-Zelle der Fall ist. Bei der Leber des Straußes kann, ebenso wie bei Ohata, Tanuma et al. (1982) für die Wachtel und die Taube, aber anders als bei Ghoddusi und Kelly (2004) für das Huhn beschrieben, in den von-Kupffer-Zellen ein relativ großer Golgi-Apparat mit einigen Zisternen beobachtet werden, der zahlreiche Vesikel abschnürt.

Die in großer Zahl vorkommenden Lysosomen sind als starker Hinweis auf die Funktion der von-Kupffer-Zellen als Makrophagen zu betrachten. Als weitere Organellen des lysosomalen Endozytosesystems sind die „brizzle coated“ Mikropinozytosevesikel zu beobachten. Diese zeigen sich als spindelförmige Vesikel mit granulärem, elektronendichtem Inhalt. Diese Beobachtungen sind auch für Huhn, Wachtel und Taube beschrieben (Ohata, Tanuma et al., 1982). Eine „worm-like“ Struktur, wie sie Ohata, Tanuma et al. (1982), anders als Ghoddusi und Kelly (2004), für das Huhn beschrieben, kann in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die meist ovalen Mitochondrien sind mit 410 nm ungefähr halb so groß wie die der Hepatozyten und deutlich größer als die der Endothelzellen.

Auf der gegenüberliegenden Seite der Canaliculi biliferi befindet sich zwischen den Hepatozyten und den Endothelzellen der Sinusoide ein schmaler Spaltraum, der perisinusoidale oder Dissé Raum. Nicht in allen Bereichen der Leber kann dieser immer beobachtet werden. Ein Phänomen, das Wassermann (1958) für die Ratte schon beschrieben hat. Unter Umständen liegt es an der hier angewendeten Form der Perfusionsfixation, bei der nicht alle perisinusoidalen Spalträume und auch die hier zu findenden Mikrovilli erhalten bleiben.

Die Begrenzung des Dissé Raumes zu den Hepatozyten hin bildet die Leberzellmembran. Von dieser ausgehend bilden sich an manchen Stellen verzweigte Mikrovilli, die in den Spaltraum hineinragen und damit die Oberfläche der Zellmembran erhöhen. In den

meisten Bereichen stellt sich der Dissé Raum als sehr schmaler, kaum erkennbarer Spalt dar. Stellenweise weitet er sich um in ihm enthaltene Zellen herum. Sehr ausführlich und weitestgehend mit den hier erstellten Befunden übereinstimmend beschrieb David (1961) den Dissé Raum bei der Taube. Beim Huhn hat Purton (1976) Mikrovilli gefunden, die den Dissé Raum durchqueren und direkten Kontakt mit den Endothelzellen oder sogar mit dem Lumen der Sinusoide aufnehmen.

Mehrere Autoren (Purton, 1976; Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghodducci und Kelly, 2004) haben mittlerweile zwei verschiedene Zelltypen beschrieben, die sich im perisinusoidalen Spaltraum aufhalten. Zum einen die in den Ausdehnungen des Dissé Raums befindlichen Ito-Zellen, die an ihren zahlreichen Fettvakuolen zu erkennen sind. Wegen dieser werden sie auch Fettspeicherzellen genannt. Dazu war in einer Studie von Wake (1971) zu lesen, dass die Fettvakuolen oder Lipidtropfen bei Vitamin A-Injektion stark an Größe und vor allem Anzahl zunehmen. Das lässt den Schluss zu, dass sie Vitamin A in großer Menge speichern und später wieder abgeben können. In der vorliegenden Arbeit haben die Lipidtropfen eine Größe von bis zu  $2\ \mu\text{m}$ , dies entspricht dem, was Wake (1971) für Ratten und Kaninchen gemessen hat.

Der große Zellkern ist sehr unterschiedlich in seiner Form und an vielen Stellen eingedellt durch die großen Fettvakuolen. Dies beschrieben auch Ghodducci und Kelly (2004) für das Huhn. Der Zellkern enthält mindestens einen Nukleolus und in den Randbereichen an der Kernmembran elektronendichtes Heterochromatin.

Von Kupffer (1876) beschrieb schon einen speziellen Zelltyp in der Leber, den er mittels einer Goldimprägnation als tief schwarze sternartige Struktur darstellen konnte. Wake (1971) zeigte dann, dass es sich hierbei um Sternzellen der Leber handelt, die sich im Perisinusoidalen Raum aufhalten, eine unregelmäßige, langgestreckte Gestalt aufweisen und Zytoplasmaausläufer bilden. Diese Beobachtungen werden auch für die Ito-Zellen der Straußenleber gemacht. Die Zytoplasmaausläufer oder Pseudopodien erstrecken sich weit in den Dissé Raum hinein. Dagegen kann hier nicht dargestellt werden, dass sie auch durch die Endothelzellwand in den sinusoidalen Raum eindringen.

Die nur in geringer Zahl vorhandenen Zellorganellen werden von den Fettvakuolen stark verdrängt. Beim Strauß sind nur wenige kleine Stapel des rauen Endoplasmatischen Retikulums zu sehen, wohingegen dieses beim Huhn sehr gut zu erkennen ist und aus vielen Zisternen besteht (Ohata, Tanuma et al., 1982; Ghodducci und Kelly, 2004).

Ein weiterer Zelltyp, der im Dissé Raum liegt, wurde in verschiedenen Arbeiten unterschiedlich bezeichnet. Zum einen von Purton (1976) als freie „Mesenchymal Cell“ oder

Histiozyt. Später beschrieben sowohl Ohata, Tanuma et al. (1982) als auch Ghoddusi und Kelly (2004) diese als hauptsächlich interzellulär zwischen den Hepatozyten gelegen. Bei letzteren wurde dieser Zelltyp deshalb als „intercalated cells“ bezeichnet. Dieser Zelltyp kann in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden.

## 6 Zusammenfassung

Zur morphologischen und ultrastrukturellen Untersuchung der Leber des Straußes wurden in der vorliegenden Doktorarbeit lichtmikroskopische Färbungen sowie die Elektronenmikroskopie verwendet. Zur genaueren Charakterisierung des Zytoskeletts der einzelnen Leberzellen wurden immunhistochemische Methoden herangezogen. Die Glykohistochemie half bei der Untersuchung der Kohlenhydratstrukturen der verschiedenen Zellen der Leber. Die untersuchten Organe stammten von dreizehn Afrikanischen Straußen (*Struthio camelus*) im Alter von 15 - 17 Monaten aus kommerzieller Haltung von der Straußenfarm Donaumoos. In meinen Untersuchungen konnte ich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Leber des Straußes feststellen. Überwiegend stimmen meine Befunde über die Straußenleber mit bisher bekannten Berichten über die Lebern bei anderen Vogelarten überein.

Die rotbraune Leber liegt im kaudoventralen Teil des Thorax und wird kranial vom Herz sowie kaudal vom Magen begrenzt. Zwei tiefe Einziehungen teilen die Leber in zwei große Lappen. Der rechte, ungeteilte Leberlappen ist mit durchschnittlich 24,8 x 15,6 cm etwas größer als der 23,5 x 12,8 cm große linke Leberlappen. Letzterer wird durch eine kleine Einziehung in einen kranialen und einen kaudalen Abschnitt unterteilt. Auf seiner viszeralen Seite befindet sich ein kleiner zungenförmiger Lappen. Die Leber des Straußes ist mit einem Anteil von 1,8% an der Gesamtkörpermasse im Vergleich zu vielen anderen Vogelarten verhältnismäßig klein.

Ich konnte in meinen Untersuchungen keine Unterschiede in der Struktur der einzelnen Leberlappen erkennen.

An ihrer Oberfläche ist die Leber von einer bindegewebigen Kapsel bedeckt. Histomorphologisch ist bei der Leber des Straußes weder eine Unterteilung des Parenchyms in Läppchen, noch eine zirkuläre Anordnung der zweischichtigen Leberzellbalken zu erkennen. Die *Areae interlobulares* mit *Venae interlobulares*, *Arteriae interlobulares* sowie *Ductus interlobulares* zeigen sich unregelmäßig verteilt im Parenchym liegend. Das Grundgerüst desselben besteht aus parallel zueinander verlaufenden Leberzellbalken

und Sinusoiden. Die polygonalen Hepatozyten ordnen sich zu einem Kreis aus vier bis acht von ihnen um einen Canaliculus biliferus herum, der keine eigene Zellmembran besitzt. Dadurch lässt sich ihre Oberfläche in drei Abschnitte unterteilen. Einen schmalen biliären, den gegenüberliegenden, breiteren sinusoidalen Abschnitt und die Kontaktfläche zwischen zwei Hepatozyten. Die Hepatozyten des Straußes besitzen einen  $5\ \mu\text{m}$  großen Zellkern. Außerdem beinhalten sie diffus verteilt Glykogendepots, die sowohl mittels der PAS-Färbung nachgewiesen, als auch in den elektronenmikroskopischen Bildern als Glykogengranula gefunden werden konnten. Die Verteilung und Ausprägung dieser Depots unterschied sich deutlich zwischen den einzelnen Tieren.

Die Wandauskleidung der Sinusoide wurde von Zellfortsätzen der Endothelzellen und den Pseudopodien der von-Kupffer-Zellen gebildet. Im schmalen Dissé Raum fanden sich Ito-Zellen mit bis zu  $2\ \mu\text{m}$  großen Lipidtropfen.

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden verschiedene Komponenten des Zytoskeletts der Leberzellen untersucht. Dabei konnten in meiner Arbeit Intermediärfilamente (Zytokeratine, Vimentin und Desmin) sowie das Protein  $\alpha$ -SMA nachgewiesen werden. Die Zytokeratine waren vor allem in den Gallengangszellen zu finden. Durch die unterschiedliche Verteilung der untersuchten Zytokeratine auf die einzelnen Abschnitte des Gallengangesystems lassen sich diese voneinander abgrenzen. Zytokeratin 8 konnte nur in den biliären Abschnitten der Hepatozyten gefunden werden. Vimentin und Desmin konnten in den Sinusoiden und den Gefäßwänden der Leber nachgewiesen werden. Außerdem zeigten die Epithelzellen der Gallengänge eine positive Reaktion mit dem Desmin-Antikörper.

Bei den Untersuchungen in meiner Arbeit mit Methoden der Glykohistochemie konnten Bindungsstellen für ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-1, SBA, PHA-E und PHA-L nachgewiesen werden. Anhand dieser Befunde konnten in den Hepatozyten Zuckerketten mit Glucose-, Mannose-, N-Acetyl-D-Galaktosamin- und Galaktose-Resten differenziert werden. Bei den galleführenden Strukturen konnten Zuckerketten mit N-Acetyl-D-Glukosamin-, N-Acetyl-D-Neuraminsäure- und Oligosaccharid-Resten nachgewiesen werden. Die Zellmembran und das Zytoplasma der Endothelzellen der Arterien zeigen eine geringere Reaktion auf den Nachweis von N-Acetyl-D-Glukosamin- und N-Acetyl-D-Neuraminsäure-Glykokonjugaten als die der Venen.

## 7 Summary

### **Histological, histochemical and ultrastructural studies of the liver of common ostrich (*Struthio camelus*)**

In the present thesis I used light microscopy and transmission electron microscopy for the morphological characterization of the liver of the ostrich. Immunohistochemical methods were used to characterize the cytoskeleton of the liver cells. Using glycohistochemistry the sugar structures of the various cell types of the liver were studied. The studied organs came from thirteen African ostriches (*Struthio camelus*) from commercial farming with an age between 15 and 17 months. No morphological differences were found between male and female ostriches. My results for the ostrich liver are mostly in accordance with studies of other bird species.

The liver has a reddish brown colour and is situated in the caudo-ventral part of the thorax. It is bordered by the heart on the cranial side and the ventriculus on the caudal side. Two deep incisures divide the liver in two lobes. The right, undivided lobe of the liver with an average size of 24,8 x 15,6 cm is somewhat bigger than the left one with an average size of 23,5 x 12,8 cm. The left lobe is subdivided into a cranial and a caudal part. On the visceral side of the left lobe a little tongue-shaped lobule can be observed. With an average percentage of 1,8% of the body mass, the liver of an ostrich is small compared to other bird species.

The histological structure of the liver appears similar to that of other bird species. During my study I did not observe differences in the histological structure between the individual lobes. The liver surface is covered with an capsule of connective tissue. There is neither a subdivision of the parenchym into lobules nor a circular arrangement of the two-layered hepatic cell plates. The *areae interlobulares* with *venae interlobulares*, *arteriae interlobulares* and *Ductus interlobulares* are irregularly distributed within the parenchym. The parenchym is formed by hepatic cell plates, which run parallel to each other and to the sinusoids. 4–8 polygonal hepatocytes are usually arranged circularly

around a bile canaliculus. This has no own wall. Thus their surface can be divided in three parts. The intercellular space between between two adjacent liver cells is between 41 and 51 nm. The cell nucleus has a diameter of 5  $\mu\text{m}$ .

Additionally the hepatocytes contain diffusely distributed glycogen deposits. These could be detected with the PAS-staining as well as in ultrastructural fotos as glycogen granules. The distribution and occurrence varied significantly between the individual animals. The lining of the sinusoids is formed by cytoplasmic extensions of the endothelial cells and the pseudopodia of the von-Kupffer cells. Ito-cells with lipid droplets are found in the narrow Dissé space. The diameter of the lipid droplets is about 2  $\mu\text{m}$ .

By means of immunohistology I examined the components of the cytoskeleton of the liver cells. Thereby I could identify several classes of intermediate filaments (cytokeratins, vimentin, desmin) and  $\alpha$ -SMA. The cytokeratins were mainly localized in the bile duct cells. Due to characteristic distribution patterns of the studied cytokeratins the different parts of the biliary system could be distinguished easily. Cytokeratin 8 could be found only in the biliary part of the hepatocytes. Vimentin and desmin could be detected in the sinusoids and the vascular walls of the liver. Additionally, the epithelial cells of the bile ducts showed a positive reaction with the desmin antibody.

With glyco histochemically methods I could proof binding sites for ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-1, SBA, PHA-E and PHA-L. With these findings I showed Glucosyl-, Mannosyl-, N-Acetyl-D-Galactosamin- and Galactosyl-residuals in the hepatocytes. N-Acetyl-D-Glucosamin-, N-Acetyl-D-Neuraminicacid- and Oligosaccarid-residuals could be detected in the biliary structures. The endothelialcells of the arteriae have less N-Acetyl-D-Glucosamin- and N-Acetyl-D-Neuraminicacid-Glycoconjugates in their cytoplasm and cellwall than the venae.

## 8 Literatur

- Abdelwahab, E. M. (1987). Ultrastructure and arrangement of hepatocyte cords in the duckling's liver. In: *Journal of anatomy* (150), S. 181–189.
- Abidu-Figueiredo, M., Xavier-Silva, B., Bath, F. C., Babinski, M. A. und Chagas, M. A. (2006). Morphological and topographical aspects of the ostrich (*Struthio camelus*) liver. In: *Revista portuguesa de ciências veterinárias* 557(101), S. 41–43.
- Adamiker, D. (1969). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Virushepatitis der Entenküken. In: *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 16, S. 620–636.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2011). *Molekularbiologie der Zelle*. 5., vollst. überarb. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Alcântara, D., Rodrigues, M. N., Francioli, A. L. R., Da Fonseca, E. T., Silva, F. M. O., Carvalho, R. C., Fratini, P., Sarmiento, C. A. P., Ferreira, A. J. P. und Miglino, M. A. (2013). Embryonic development of endoderm in chicken (*Gallus gallus domesticus*). In: *Microscopy research and technique* 76(8), S. 803–810.
- Allen, A. K., Neuberger, A. und Sharon, N. (1973). The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. In: *Biochemical Journal* 131(1), S. 155–162.
- Allen, H. J., Johnson, Edward A. Z. und Matta, K. L. (1977). A comparison of the binding specificities of lectins from *ulex europaeus* and *lotus tetragonolobus*. In: *Immunological Investigations* 6(6), S. 585–602.
- Andrews, L., Gillespie, J., Schupp, A. und Taylor, G. (2000). Ratite meat sensory scores compared with beef. In: *Journal of Food Quality* 23(3), S. 351–359.
- Ankney, C. D. (1977). Feeding and digestive organ size in breeding lesser snow geese. In: *The Auk* 94(2), S. 275–282.
- Ankney, C. D. und Scott, D. M. (1980). Changes in nutrient reserves and diet of breeding brown-headed cowbirds. In: *The Auk* 97(4), S. 684–696.
- Ankney, C. D. und Scott, D. M. (1988). Size of digestive organs in breeding brown-headed cowbirds, *Molothrus ater*, relative to diet. In: *Canadian Journal of Zoology* 66, S. 1254–1257.

- Attia, H. F. und Soliman, S. M. (2005). Histological and histochemical studies on the ostrich's liver. In: *Benha Veterinary Medicine Journal* Vol. 16(2).
- Augustin-Voss, H. G. und Pauli, B. U. (1992). Migrating endothelial cells are distinctly hyperglycosylated and express specific migration-associated cell surface glycoproteins. In: *The Journal of cell biology* 119(2), S. 483–491.
- Bailey, T. A., Mensah-Brown, E. P., Samour, J. H., Naldo, J., Lawrence, P. und Garner, A. (1997). Comparative morphology of the alimentary tract and its glandular derivatives of captive bustards. In: *Journal of anatomy* 191(3), S. 387–398.
- Ballardini, G., Fallani, M., Biagini, G., Bianchi, F. B. und Pisi, E. (1988). Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. In: *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology* 56(1), S. 45–49.
- Barberá-Guillem, E., Rocha, M., Alvarez, A. und Vidal-Vanaclocha, F. (1991). Differences in the lectin-binding patterns of the periportal and perivenous endothelial domains in the liver sinusoids. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 14(1), S. 131–139.
- Berlich, H. D. (1979). *Topographie und Anatomie des Verdauungstraktes der Waldschnepfe (Scolopax rusticola L. 1758)*. Bd. 5. Schriften des Arbeitskreises für Wildbiologie und Jagdwissenschaft an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Stuttgart: Enke.
- Bernard, B., Font, J., Aubery, M. und Bourrillon, R. (1982). Influence of temperature on the interaction of Concanavalin A with chick fibroblasts during embryo development. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 106(2), S. 256–264.
- Bezuidenhout, A. J. (1999). „Anatomy, Chapter 2“. In: *The ostrich: Biology, production, and health*. Hrsg. von D. C. Deeming. Wallingford u. a.: CABI Publ., S. 13–49.
- Bezuidenhout, A. J. (1986). The topography of the thoraco-abdominal viscera in the ostrich (*Struthio camelus*). In: *The Onderstepoort journal of veterinary research* 53(2), S. 111–117.
- Bhatnagar, M. K. und Singh, A. (1982). Ultrastructure of turkey hepatocytes. In: *The Anatomical Record* 202(4), S. 473–482.
- Bittner, H. (1925). Beitrag zur topographischen Anatomie der Eingeweide des Huhnes. In: *Zeitschrift für Morphologie und Oekologie der Tiere* 3(5), S. 785–793.
- Blomhoff, R. und Wake, K. (1991). Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5(3), S. 271–277.

- Blouin, R., Blouin, M.-J., Royal, I., Grenier, A., Roop, D. R., Loranger, A. und Marceau, N. (1992). Cytokeratin 14 expression in rat liver cells in culture and localization in vivo. In: *Differentiation; research in biological diversity* 52(1), S. 45–54.
- Boyd, W. C. und Shapleigh, E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). In: *Science* 119(3091), S. 419.
- Burger, M. M. und Goldberg, A. R. (1967). Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57(2), S. 359–366.
- Burt, A. D., Robertson, J. L., Heir, J. und Macsween, Roderick N. M. (1986). Desmin-containing stellate cells in rat liver; distribution in normal animals and response to experimental acute liver injury. In: *The Journal of Pathology* 150(1), S. 29–35.
- Chandramouli, V., Williams, S., Marshall, J. S. und Carter, J. R. (1977). Cell surface changes in diabetic rats. Studies of lectin binding to liver cell plasma membranes. In: *Biochimica et biophysica acta* 465(1), S. 19–33.
- Cooper, R. G., Mahrose, K. M. A., Horbańczuk, J. O., Villegas-Vizcaíno, R., Kennou Sebei, S. und Faki Mohammed, A. E. (2009). The wild ostrich (*Struthio camelus*): a review. In: *Tropical animal health and production* 41(8), S. 1669–1678.
- Cooper, R. G. und Mahroze, K. M. (2004). Anatomy and physiology of the gastrointestinal tract and growth curves of the ostrich (*Struthio camelus*). In: *Animal Science Journal* 75(6), S. 491–498.
- Crompton, D. W. und Nesheim, M. C. (1972). A note on the biliary system of the domestic duck and a method for collecting bile. In: *The Journal of experimental biology* 56(2), S. 545–550.
- Cummings, R. D. und Kornfeld, S. (1982). Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. In: *The Journal of biological chemistry* 257(19), S. 11230–11234.
- Al-Dabagh, M. A. und Abdulla, M. (1963). Correlation of sizes and weights of livers and spleens to the age and bodyweights of normal chicks with a note on the histology of these organs in chicks. In: *Veterinary Record* 75(15), S. 397–400.
- Dalton, A. J. (1937). The functional differentiation of the hepatic cells of the chick embryo. In: *The Anatomical Record* 68(4), S. 393–409.
- Dalton, A. J. (1934). The ontogenetic history of the mitochondria and golgi network of the hepatic cell of the chick. In: *The Anatomical Record* 58(4), S. 321–347.

- David, H. (1961). Zur Morphologie der Leberzellmembran. In: *Zeitschrift für Zellforschung* 55, S. 220–234.
- De Leeuw, M. A., McCarthy, S. P., Geerts, A. und Knook, D. L. (1984). Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 4(3), S. 392–403.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G. und Montreuil, J. (1981). Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. In: *European Journal of Biochemistry* 117(1), S. 41–51.
- Dieterlen-Lièvre, F. und Martin, C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. In: *Developmental Biology* 88(1), S. 180–191.
- Directorate Marketing (2014). *A profile of the south african ostrich market value chain, 2014*. Hrsg. von Directorate Marketing.
- Drobney, R. D. (1984). *Effect of diet on visceral morphology of breeding wood ducks*.
- Elias, H. und Bengelsdorf, H. (1952). The structure of the liver of vertebrates. In: *Cells, Tissues, Organs* 14(4), S. 297–337.
- Engelhardt, W. v. und Ahrens, F. (2005). *Physiologie der Haustiere: 99 Tabellen. 2., völlig neu bearb. Aufl.* Stuttgart: Enke.
- Farner, D. S. und King, J. R. (Hrsg.) (1972). *Avian biology: Volume II*. New York: Academic Press.
- Feder, F. H. (1969). Beitrag zur makroskopischen und mikroskopischen Anatomie des Verdauungsapparates beim Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*). In: *Anatomischer Anzeiger* 125(3), S. 233–255.
- Feder, F. H. (1972). Zur mikroskopischen Anatomie des Verdauungsapparates beim Nandu (*Rhea americana*). In: *Anatomischer Anzeiger* 132(3), S. 250–265.
- Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Silbert, D., Zatloukal, K., Denk, H. und Trauner, M. (2009). The role of the hepatocyte cytokeratin network in bile formation and resistance to bile acid challenge and cholestasis in mice. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50(3), S. 893–899.
- Fowler, M. E. (1991). Comparative clinical anatomy of Ratites. In: *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians* 22(2), S. 204–227.
- Franz, H. (1990). 100 Jahre Lektinforschung — eine Bilanz. In: *Die Naturwissenschaften* 77(3), S. 103–109.
- Fuchs, E. und Coulombe, P. A. (1992). Of mice and men: genetic skin diseases of keratin. In: *Cell* 69(6), S. 899–902.

- Fuchs, E. und Weber, K. (1994). Intermediate filaments: Structure, dynamics, function and disease. In: *Annual Review of Biochemistry* 63(1), S. 345–382.
- Fujimoto, T. (1986). Immunocytochemical studies of endothelial cells in vivo. I. The presence of desmin only, or of desmin plus vimentin, or vimentin only, in the endothelial cells of different capillaries of the adult chicken. In: *The Journal of cell biology* 103(6), S. 2775–2786.
- Fujimoto, T. und Singer, S. J. (1987). Immunocytochemical studies of desmin and vimentin in pericapillary cells of chicken. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 35(10), S. 1105–1115.
- Gabius, H. J. (2009). *The sugar code: Fundamentals of glycosciences*. Weinheim und Chichester: Wiley-VCH und John Wiley [distributor].
- Gabius, H.-J., Siebert, H.-C., André, S., Jiménez-Barbero, J. und Rüdiger, H. (2004). Chemical biology of the sugar code. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 5(6), S. 740–764.
- Gadow, H. (1879). Versuch einer vergleichenden Anatomie des Verdauungssystemes der Vögel. In: *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft* (13 = N.F. Bd. 6.), S. 92–171.
- Ghoddusi, M. und Kelly, W. R. (2004). Ultrastructure of in situ perfusion-fixed avian liver, with special reference to structure of the sinusoids. In: *Microscopy research and technique* 65(1-2), S. 101–111.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. und Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? In: *Nature* 285(5760), S. 66.
- Goudie, R. I. und Ryan, P. C. (1991). Diets and morphology of digestive organs of five species of sea ducks wintering in Newfoundland. In: *Journal of the Yamashina Institute for Ornithology* 22(1), S. 1–8.
- Greenaway, P. J. und Levine, D. (1973). Binding of N-acetyl-neuraminic acid by wheat-germ agglutinin. In: *Nature New Biology* 241(110), S. 191–192.
- Gupta, S. C., Gupta, C. D. und Gupta, S. B. (1982). Intrahepatic patterns of the biliary ducts in the chick liver (*Gallus gallus domesticus*). In: *Anatomischer Anzeiger* 151(1), S. 64–69.
- Habermann, F. A., André, S., Kaltner, H., Kübler, D., Sinowatz, F. und Gabius, H.-J. (2011). Galectins as tools for glycan mapping in histology: comparison of their binding profiles to the bovine zona pellucida by confocal laser scanning microscopy. In: *Histochemistry and Cell Biology* 135(6), S. 539–552.
- Hammarstrom, S., Murphy, L. A., Goldstein, I. J. und Etzler, M. E. (1977). Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine-"specific" lectins: *Helix pomatia*

- A hemagglutinin, soy bean agglutinin, lima bean lectin, and Dolichos biflorus lectin. In: *Biochemistry* 16(12), S. 2750–2755.
- Handharyani, E., Ochiai, K., Iwata, N. und Umemura, T. (2001). Immunohistochemical and ultrastructural study of ito cells (fat-storing cells) in response to extrahepatic bile duct ligation in broiler chickens. In: *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 63(5), S. 547–552.
- Hardman, K. D. und Ainsworth, C. F. (1976). Structure of the concanavalin A-methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside complex at 6-Å resolution. In: *Biochemistry* 15(5), S. 1120–1128.
- Hazelwood, R. L. (1973). The avian endocrine pancreas. In: *American Zoologist* 13(3), S. 699–709.
- Hees, H. und Sinowatz, F. (2000). *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. 3., überarb. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl.
- Heidbrink, S. (2003). „Morphologische Untersuchungen des Verdauungsapparates verschiedener Greifvögel unter Berücksichtigung ihrer Ernährungsstrategie“. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Heinrich, P. C., Müller, M. und Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Lehrbuch. Berlin und Heidelberg: Springer.
- Henry, C. (1995). Differential lectin binding to microvascular endothelial glycoconjugates during normal angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. In: *Microvascular research* 49(2), S. 201–211.
- Hickey, J. J. und Elias, H. (1954). The structure of the liver of birds. In: *The Auk* 71(4), S. 458–462.
- Hixson, D. C., Miller, M. F., Maruyama, K., Walborg, E. F., Wagner, S., Starling, J. J. und Bowen, J. M. (1979). A statistical evaluation of the binding of ferritin-conjugated lectins to the surface of rat cells. Topographical variations as a function of lectin concentration and cell type. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 27(12), S. 1618–1629.
- Hodges, R. D. (1974). *The histology of the fowl*. London und New York: Academic Press.
- Hodges, R. D. (1972). The ultrastructure of the liver parenchyma of the immature fowl (*Gallus domesticus*). In: *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 133(1), S. 35–46.
- Hopkins, J. W. und Biely, J. (1935). Variation in weight of some internal organs of the domestic fowl (*Gallus gallus*). In: *Canadian journal of Research* 12(5), S. 651–656.

- Hsu, S. M., Raine, L. und Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 29(4), S. 577–580.
- Hummel, G. (2000). *Anatomie und Physiologie der Vögel: Kompendium für Studium und Praxis*. Bd. 2144. UTB für Wissenschaft : Agrarwissenschaften Veterinärmedizin. Stuttgart: Ulmer.
- Hurwitz, S., Bar, A., Katz, M., Sklan, D. und Budowski, P. (1973). Absorption and secretion of fatty acids and bile acids in the intestine of the laying fowl. In: *The Journal of nutrition* 103(4), S. 543–547.
- Ibrahim, I. A., Abdalla, K., Mansour, A. A. und Taha, M. (1992). Topography and morphology of the liver and biliary duct system in fowl, pigeon, quail, heron and kestrel. In: *Assiut Veterinary Medical Journal* 27(53), S. 12–32.
- Iji, P. (2005). *Anatomy and digestive physiology of the neonatal ostrich (*Struthio camelus*) in relation to nutritional requirements*. New England und Australia.
- Karrer, H. E. (1961). Electron microscope observations on chick embryo liver. In: *Journal of ultrastructure research* 5(2), S. 116–141.
- Karrer, H. E. (1960). Electron-microscopic observations on developing chick embryo liver. In: *Journal of ultrastructure research* 4(2), S. 149–165.
- Katsuma, Y., Marceau, N., Ohta, M. und French, S. W. (1988). Cytokeratin intermediate filaments of rat hepatocytes: different cytoskeletal domains and their three-dimensional structure. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 8(3), S. 559–568.
- Kawakami, H. und Hirano, H. (1984). Lectin-binding patterns on the plasma membranes of dissociated rat liver cells. In: *Histochemistry* 80(5), S. 415–420.
- Kern, D. (1963). „Die Topographie der Eingeweide der Körperhöhle des Haushuhnes (*Gallus domesticus*) unter besonderer Berücksichtigung der Serosa- und Gekröseverhältnisse“. Dissertation. Gießen: Justus Liebig Universität.
- Kiassov, A. P., Eyken, P., Pelt, J. F., Depla, E., Fevery, J., Desmet, V. J. und Yap, P. S. H. (1995). Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: An immunohistochemical and morphometric study. In: *Differentiation; research in biological diversity* 59(4), S. 253–258.
- Kiernan, J. A. (1975). Localization of alpha-d-glucosyl and alpha-d-mannosyl groups of mucosubstances with concanavalin A and horseradish peroxidase. In: *Histochemistry* 44(1), S. 39–45.

- Kim, S. und Coulombe, P. A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. In: *Genes & Development* 21(13), S. 1581–1597.
- King, A. S. und McLelland, J. (Hrsg.) (1979). *Form and function in birds*. Bd. 1. London: Acad. Press.
- Kingsbury, J. W., Alexanderson, M. und Kornstein, E. S. (1956). The development of the liver in the chick. In: *The Anatomical Record* 124(2), S. 165–187.
- Koch, T. (1978). *Anatomy of the chicken and domestic birds*. Ann Arbor: Reprinted for the Iowa State University Press by University Microfilms International.
- Kupffer, C. v. (1876). „Ueber Sternzellen in der Leber“. In: *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. Hrsg. von W. Waldeyer und V. St. George. Bd. 12. Bonn: Cohen, S. 353–358.
- Latimer, H. B. und Pedersen, L. T. (1923). The variability in the gross body weight and the weights of the liver, feathers and blood of 131 chickens. In: *Poultry Science* 3(1), S. 11–14.
- Latimer, H. B. und Osborn, J. L. (1923). The topography of the viscera of the chicken. In: *The Anatomical Record* 26(4), S. 275–289.
- Latimer, H. B. und Rosenbaum, J. A. (1926). A quantitative study of the anatomy of the turkey hen. In: *The Anatomical Record* 34(1), S. 15–23.
- Liebich (2010). *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. 5. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Schattauer.
- Lin, G. L., Himes, J. A. und Cornelius, C. E. (1974). Bilirubin and biliverdin excretion by the chicken. In: *The American journal of physiology* 226(4), S. 881–885.
- Lis, H. und Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. In: *Annual Review of Biochemistry* 55, S. 35–67.
- Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D. und Sharon, N. (1975). The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). In: *The Journal of biological chemistry* 250(21), S. 8518–8523.
- Lucas, A. M. und Denington, E. M. (1956). Morphology of the chicken liver. In: *Poultry Science* 35(4), S. 793–806.
- Macalister, A. (1864). On the anatomy of the ostrich (*Struthio camelus*). In: *Proceedings of the Royal Irish Academy (1836-1869)* 9, S. 1–24. URL: <http://www.jstor.org/stable/20488878>.

- Madekurozwa, M.-C. (2007). An immunohistochemical study of the distribution of intermediate filaments in the ovary of the emu (*Dromaius novaehollandiae*). In: *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* 36(5), S. 336–342.
- Malewitz, T. D. und Calhoun, M. L. (1958). The gross and microscopic anatomy of the digestive tract, spleen, kidney, lungs and heart of the turkey. In: *Poultry Science* 37(2), S. 388–398.
- Maloiy, G. M. O., Warui, C. N. und Clemens, E. T. (1987). Comparative gastrointestinal morphology of the Kori bustard and secretary bird. In: *Zoo Biology* 6(3), S. 243–251.
- Masson, M. T., Villanove, F. und Greaves, P. (1986). Histological demonstration of wheat germ lectin binding sites in the liver of normal and ANIT treated rats. In: *Archives of Toxicology* 59(2), S. 121–123.
- McMillan, P. N., Hixson, D. C., Hevey, K. A., Naik, S. und Jauregui, H. O. (1988). Hepatocyte cell surface polarity as demonstrated by lectin binding. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 36(12), S. 1561–1571.
- Mehner, A. und Hartfiel, W. (Hrsg.) (1983). *Handbuch der Geflügelphysiologie*. Basel: Karger.
- Metz, K. (1988). „Die hepatopankreatischen Ausführungsgangsysteme der japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*), ein Injektionstechnischer Beitrag“. Dissertation. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Miyaki, T. (1973). The hepatic lobule and its relation to the distribution of blood vessels and bile ducts in the fowl: Hepatic lobule and its relation to the distribution of blood vessels and bile ducts in the fowl. In: *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science* 35(5), S. 403–410.
- Miyaki, T. (1978). The afferent venous vessels to the liver and the intrahepatic portal distribution in the fowl. In: *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* 7(2), S. 129–139.
- Miyazaki, A., Yokoi, Y., Matsuzaki, K. und Kuroda, H. (1986). Immunological cross-species reactivity of desmin in fat-storing cells (Ito cells) of vertebrates. In: *Acta Histochemica et Cytochemica* 19(2), S. 219–229.
- Monsigny, M., Roche, A.-C., Sene, C., Maget-Dana, R. und Delmotte, F. (1980). Sugar-lectin interactions: How does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? In: *European Journal of Biochemistry* 104(1), S. 147–153.

- Monsigny, M., Sene, C., Obrenovitch, A., Roche, A.-C., Delmotte, F. und Boschetti, E. (1979). Properties of succinylated wheat-germ agglutinin. In: *European Journal of Biochemistry* 98(1), S. 39–45.
- Moore, S. J. und Battley, P. F. (2006). Differences in the digestive organ morphology of captive and wild Brown Teal *Anas chlorotis* and implications for releases. In: *Bird Conservation International* 16(03), S. 253.
- Mulisch, M., Welsch, U., Aescht, E. und Romeis, B. (Hrsg.) (2010). *Romeis mikroskopische Technik*. 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Murnane, R. D., Ahern-Rindell, A. J. und Prieur, D. J. (1989). Lectin histochemistry of an ovine lysosomal storage disease with deficiencies of beta-galactosidase and alpha-neuraminidase. In: *The American journal of pathology* 135(4), S. 623–630.
- Naňka, O., Peumans, W. J., Damme, E. v., Pfüller, U., Valášek, P., Halata, Z., Schumacher, U. und Grim, M. (2001). Lectin histochemistry of microvascular endothelium in chick and quail musculature. In: *Anatomy and Embryology* 204(5), S. 407–411.
- Nickel, R., Schummer, A. und Seiferle, E. (Hrsg.) (1992). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band V*, 2. Aufl. Berlin und Hamburg: Paul Parey.
- Nico, B., Quondamatteo, F., Ribatti, D., Bertossi, M., Russo, G., Herken, R. und Roncali, L. (1998). Ultrastructural localization of lectin binding sites in the developing brain microvasculature. In: *Anatomy and Embryology* 197(4), S. 305–315.
- Nicolson, G. L. und Blaustein, J. (1972). The interaction of *Ricinus communis* agglutinin with normal and tumor cell surfaces. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 266(2), S. 543–547.
- Nicolson, G. L., Blaustein, J. und Etzler, M. E. (1974). Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. In: *Biochemistry* 13(1), S. 196–204.
- Nishimura, S., Sagara, A., Oshima, I., Ono, Y., Iwamoto, H., Okano, K., Miyachi, H. und Tabata, S. (2009). Immunohistochemical and scanning electron microscopic comparison of the collagen network constructions between pig, goat and chicken livers. In: *Animal Science Journal* 80(4), S. 451–459.
- Ochiai, K., Handharyani, E. und Umemura, T. (2002). Idiopathic hepatic fibrosis with cholestasis in broiler chickens: Immunohistochemistry of hepatic stellate cells. In: *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* 31(5), S. 425–428.
- Ohata, M. und Ito, T. (1986). Experimental study on the fine structure of chicken liver parenchyme with special references to extra-sinusoidal macrophages and sinusoidal

- blood cells. Part 1. Sinusoidal Cells and Macrophages in the Normal and India Ink-Perfused Livers. In: *Archives of Histology and Cytology* 49(1), S. 83–103.
- Ohata, M., Tanuma, Y. und Ito, T. (1982). Electron microscopic study on avian livers with special remarks on the fine structure of sinusoidal cells. In: *Okajimas folia anatomica Japonica* 58(4-6), S. 325–367.
- Omary, M. B. und Ku, N. O. (1997). Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 25(5), S. 1043–1048.
- Osborn, M. und Weber, K. (1982). Intermediate filaments: Cell-type-specific markers in differentiation and pathology. In: *Cell* 31(2), S. 303–306.
- Pal, A. K., Parmar M. L. und Datta I. C. (1991). Histomorphological studies on prehatch broiler chick liver. In: *Indian Journal of Animal Science* 61(5), S. 513–515.
- Paleari, M. A., Camisasca, S., Beretta, G., Renon, P., Corsico, P., Bertolo, G. und Crivelli, G. (1998). Ostrich meat: Physico-chemical characteristics and comparison with turkey and bovine meat. In: *Meat Science* 48(3-4), S. 205–210.
- Polysciences, I. (o.D.). *Poly/Bed Poly/Bed®812 - BDMA Embedding Kit: Technical Data Sheet 471*.
- Pschyrembel, W. (Hrsg.) (2004). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 260., neu bearb. Aufl. Berlin: de Gruyter.
- Purton, M. D. (1976). Extravascular cells within the perisinusoidal space of the avian liver. In: *Experientia* 32(6), S. 737–740.
- Purton, M. D. (1969). Structure and ultrastructure of the liver in the domestic fowl, *Gallus gallus*. In: *Journal of zoology (London, England : 1987)* 159(3), S. 273–282.
- Rockey, D. C., Boyles, J. K., Gabbiani, G. und Friedman, S. L. (1992). Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. In: *Journal of submicroscopic cytology and pathology* 24(2), S. 193–203.
- Roots, C. (2006). *Flightless birds*. Greenwood guides to the animal world. Westport und Conn: Greenwood Press.
- Roth, J. (2011). Lectins for histochemical demonstration of glycans. In: *Histochemistry and Cell Biology* 136(2), S. 117–130.
- Rüdiger, H. (1978). Lectine, pflanzliche zuckerbindende proteine. In: *Die Naturwissenschaften* 65(5), S. 239–244.
- Rüdiger, H. und Gabius, H. J. (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. In: *Glycoconjugate journal* 18(8), S. 589–613.
- Rüdiger, H. (1981). Lectine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. In: *Chemie in unserer Zeit* 15(5), S. 155–162.

- Rüsse, I. und Sinowatz, F. (1998). *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. 2., unveränd. Aufl. Berlin: Parey.
- Sandström, B. und Westman, J. (1971). Ultrastructure of the developing chicken liver before hatching. In: *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 117(4), S. 516–525.
- Sanzen, T., Yoshida, K., Sasaki, M., Terada, T. und Nakanuma, Y. (1995). Expression of glycoconjugates during intrahepatic bile duct development in the rat: An immunohistochemical and lectin-histochemical study. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 22(3), S. 944–951.
- Schildmacher, H., Wohlrab, F. und Cossel, L. (1968). Biochemische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Leber eines Zugvogels (*Fringilla montifringilla* L.) unter dem Einfluß zunehmender Tageslänge. In: *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 91(4), S. 604–616.
- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A. D., Rogers, M. A. und Wright, M. W. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. In: *The Journal of cell biology* 174(2), S. 169–174.
- Selman, H. A. (2013). Morphological and histologica study for liver in local coot birds *Fulica Atra*. In: *Basrah Journal of Veterinary Research* 12(1), S. 152–158.
- Silverman, H. und Hikida, R. S. (1977). Membrane systems of avian hepatocytes during chronic exposure to dantrolene sodium: A morphometric, ultrastructural and histochemical study. In: *Tissue and Cell* 9(3), S. 507–520.
- Simić, V. und Janković, N. (1960). Ein Beitrag zur Morphologie und Topographie der Leber beim Hausgeflügel und der Taube. In: *Wiener tierärztliche Monatsschrift* (47), S. 154–175.
- Sinowatz, F. und Hees, H. (2012). *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. 5. Aufl. München: Selbstverl.
- Skalli, O. (1986). A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. In: *The Journal of cell biology* 103(6), S. 2787–2796.
- Skalli, O., Pelte, M. F., Pelet, M. C., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., Ravazzola, M. und Orci, L. (1989). Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 37(3), S. 315–321.

- Soares, P. A., Nascimento, C. O., Porto, T. S., Correia, M. T., Porto, A. L. und Carneiro-da-Cunha, M. G. (2011). Purification of a lectin from *Canavalia ensiformis* using PEG–citrate aqueous two-phase system. In: *Journal of Chromatography B* 879(5-6), S. 457–460.
- Souba, A. J. (1923). Variation and correlations of the organs of single comb white leghorn cockerels. In: *The Anatomical Record* 26(4), S. 291–297.
- Spicer, S. S. und Schulte, B. A. (1992). Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 40(1), S. 1–38.
- Stephens, R. J. und Bills, R. F. (1967). Ultrastructural changes in the developing chick liver. In: *Journal of ultrastructure research* 18(3-4), S. 456–474.
- Sumner, J. B. und Howell, S. F. (1936). Identification of hemagglutinin of jack bean with Concanavalin A. In: *Journal of bacteriology* 32(2), S. 227–237.
- Takahashi, H. und Howes, R. I. (1986). Binding pattern of ferritin-labeled lectins (RCAI and WGA) during neural tube closure in the bantam embryo. In: *Anatomy and Embryology* 174(3), S. 283–288.
- Tanaka, Y., Nouchi, T., Yamane, M., Irie, T., Miyakawa, H., Sato, C. und Marumo, F. (1991). Phenotypic modulation in lipocytes in experimental liver fibrosis. In: *The Journal of Pathology* 164(3), S. 273–278.
- Tatsumi, H. und Fujita, H. (1983). Fine structural aspects of the development of Ito cells (vitamin A uptake cells) in chick embryo livers. In: *Archivum histologicum Japonicum = Nihon shohikigaku kiroku* 46(5), S. 691–700.
- Tsukada, S., Parsons, C. J. und Rippe, R. A. (2006). Mechanisms of liver fibrosis. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 364(1-2), S. 33–60.
- Tsutsumi, M., Takada, A. und Takase, S. (1987). Characterization of desmin-positive rat liver sinusoidal cells. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 7(2), S. 277–284.
- Turk, D. E. (1982). The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization. In: *Poultry Science* 61(7), S. 1225–1244.
- Vandekerckhove, J. und Weber, K. (1981). Actin typing on total cellular extracts. A highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins. In: *European Journal of Biochemistry* 113(3), S. 595–603.
- Wagner, W. M. und Kirberger, R. M. (2001). Radiography of the thoraco-abdominal cavity of the ostrich (*Struthio camelus*). In: *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 42(2), S. 134–140.

- Wagner, W. M. (2002). „Bildgebende Verfahren beim Strauss (*Struthio camelus*)“. Dissertation. Berlin.
- Wake, K. (1980). Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. In: *International review of cytology* 66, S. 303–353.
- Wake, K. (1971). "Sternzellen" in the liver: Perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. In: *The American journal of anatomy* 132(4), S. 429–461.
- Wang, W. C. und Cummings, R. D. (1988). The immobilized leukoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues. In: *The Journal of biological chemistry* 263(10), S. 4576–4585.
- Wassermann, F. (1958). The structure of the wall of the hepatic sinusoids in the electron microscope. In: *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 49(1), S. 13–32.
- Welsch, U. und Sobotta, J. (2006). *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen*. 2. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Wendl, J. R. W. E. (2012). „Follikulogenese und Intermediärfilamente: Eine immunhistochemische Studie am Ovar des Rindes mit Verweisen auf Laser-Mikrodissektion und anschließender quantitativer Reverse-Transkriptase PCR“. Dissertation. München: lmu.
- Weyrauch, K. D. und Schnorr, B. (1978). Die Feinstruktur des Epithels der Hauptausführungsgänge der Leber und des Pankreas vom Haushuhn: The fine structure of the epithelium of the main outlets from the liver and pancreas of the domestic chicken. In: *Anatomischer Anzeiger* 143(1), S. 37–49.
- Whittow, G. C. (2000). *Sturkie's avian physiology*. 5th ed. San Diego: Academic Press.
- Whyte, R. J. und Bolen, E. G. (1985). Variation in mallard digestive organs during winter. In: *The Journal of wildlife management* 49(4), S. 1037.
- Wislsperger, E. S. (2013). „Histochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen an der Leber des Rindes“. Dissertation. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Wisse, E., Braet, F., Dianzhong, L., Zanger, R. d., Jans, D., Crabbe, E. und Vermoesen, A. (1996). Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. In: *Toxicologic pathology* 24(1), S. 100–111.
- Witt, M. und Klessen, C. (1989). Lectin binding sites in normal and phenobarbitale/halothane treated rat liver. In: *Histochemistry* 90(5), S. 391–397.

- Wong, G. K. und Cavey, M. J. (1992). Development of the liver in the chicken embryo. I. Hepatic cords and sinusoids. In: *The Anatomical Record* 234(4), S. 555–567.
- Wong, G. K. und Cavey, M. J. (1993). Development of the liver in the chicken embryo. II. Erythropoietic and granulopoietic cells. In: *The Anatomical Record* 235(1), S. 131–143.
- Yasuda, M. (1962). Histological, histochemical and electron microscopic studies on the development of the liver of the domestic fowl. In: *Archivum histologicum Japonicum = Nihon soshikigaku kiroku* 23(1), S. 79–112.
- Yokoi, Y., Namihisa, T., Kuroda, H., Komatsu, I., Miyazaki, A., Watanabe, S. und Usui, K. (1984). Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 4(4), S. 709–714.
- Yoshida, K., Yasuda, M., Nasu, T. und Murakami, T. (2010). Scanning electron microscopic study of vascular and biliary casts in chicken and duck liver. In: *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 72(7), S. 925–928.
- Zon, L. I. (1995). Developmental biology of hematopoiesis. In: *Blood* 86(8), S. 2876–2891.

## 9 Tabellenverzeichnis

2.1	Lektine . . . . .	46
3.1	Übersicht über die, für die Untersuchungen verwendeten, Strauße . . . . .	51
3.2	Verweildauer in der aufsteigenden Alkoholreihe, Bouin . . . . .	54
3.3	Verweildauer in der aufsteigenden Alkoholreihe, Formalin . . . . .	54
3.4	Vorbereitung der Proben in einer absteigenden Alkoholreihe . . . . .	56
3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	57
3.6	Trichromfärbung nach Masson und Goldner . . . . .	58
3.7	Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 . . . . .	59
3.8	Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 . . . . .	59
3.9	Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McManus . . . . .	60
3.10	Labortechnische Daten der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper	62
3.11	Protokoll für den Antikörpernachweis . . . . .	63
3.12	Verwendete FITC-markierte Lektine . . . . .	66
3.13	Protokoll für die Färbungen mit FITC-markierten Lektinen . . . . .	67
3.14	Verwendete biotinylierte Lektine . . . . .	68
3.15	Protokoll für die Färbungen mit biotinylierten Lektinen . . . . .	68
3.16	Verwendete Hemmzucker . . . . .	70
4.1	Erhobene Daten über das Gewicht und die Gesamtgröße der Leber des Straußes. . . . .	76
4.2	Erhobene Messdaten der Abmessungen an den Leberlappen des Straußes	76
4.3	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin . . . . .	87
4.4	Immunhistochemischer Nachweis von Desmin . . . . .	89
4.5	Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha$ -SMA . . . . .	92
4.6	Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin . . . . .	94
4.7	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 8 . . . . .	96
4.8	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 14 . . . . .	98

---

4.9	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 18 . . . . .	100
4.10	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19 . . . . .	102
4.11	Bindungsstellen der verwendeten Lektine in der Straußenleber . . . . .	123
11.1	verwendete Konzentrationen FITC-markierter Lektine . . . . .	193
11.2	Verwendete Konzentrationen biotinylierter Lektine . . . . .	193
11.3	Epon . . . . .	196

# 10 **Abbildungsverzeichnis**

1.1	Afrikanischer Strauß, Zuchtfarm, Abu Dhabi . . . . .	2
3.1	Probenentnahmestellen, Leber, Strauß, skizziert . . . . .	52
4.1	Leber, Strauß, In situ . . . . .	77
4.2	Leber, Strauß, makroskopische Betrachtung . . . . .	77
4.3	Leber, Strauß, Bindegewebskapsel, HE- und Masson-Goldner-Färbung . .	79
4.4	Leber, Strauß, Aufbau und Bestandteile des Parenchyms, HE-Färbung . .	80
4.5	Leber, Strauß, Aufbau und Bestandteile des Parenchyms, Masson-Goldner- Färbung . . . . .	81
4.6	Leber, Strauß, Alcianblau-Färbung, pH 2,5 und 1,0 . . . . .	83
4.7	Leber, Strauß, PAS-Färbung mit und ohne Amylase . . . . .	85
4.8	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin . . . . .	88
4.9	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Desmin . . . . .	90
4.10	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von $\alpha$ -SMA . . . . .	93
4.11	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin . . .	95
4.12	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 8 . . . .	97
4.13	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 14 . . .	99
4.14	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 18 . . .	101
4.15	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19 . . .	103
4.16	Leber, Strauß, Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin 19 . . .	103
4.17	Leber, Strauß, Vena intralobularis, Bindung von ConA-FITC . . . . .	104
4.18	Leber, Strauß, Vena intralobularis, Bindung von LCA-FITC . . . . .	105
4.19	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von LCA-FITC . . . . .	106
4.20	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI . . . . .	106
4.21	Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von PSA-FITC . . . . .	107
4.22	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von PSA-FITC . . . . .	108

---

4.23	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von PNA-FITC . . . . .	109
4.24	Leber, Strauß, Hepatozyten, Bindung von RCA-FITC . . . . .	110
4.25	Leber, Strauß, Ductus interlobularis, Bindung von RCA-FITC . . . . .	110
4.26	Leber, Strauß, Ductus interlobularis, Bindung von WGA-FITC . . . . .	111
4.27	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von WGAs-FITC . . . . .	113
4.28	Leber, Strauß, Glisson-Kapsel, Bindung von WGAs-FITC . . . . .	113
4.29	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von WGAs-FITC . . . . .	114
4.30	Leber, Strauß, Vena intralobularis, Bindung von WGAs-FITC . . . . .	114
4.31	Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von GSL-I-FITC . . . . .	116
4.32	Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von SBA-FITC . . . . .	117
4.33	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von SBA-FITC . . . . .	118
4.34	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von PHA-E-FITC . . . . .	120
4.35	Leber, Strauß, Parenchym, Bindung von PHA-E-FITC . . . . .	120
4.36	Leber, Strauß, Vena intralobularis, Bindung von PHA-E-FITC . . . . .	121
4.37	Leber, Strauß, Venenwand, Bindung von PHA-L-FITC . . . . .	122
4.38	Leber, Strauß, Area interlobularis, Bindung von PHA-L-FITC . . . . .	122
4.39	Leber, Strauß, Parenchym, PHA-E-FITC, mit und ohne Hemmzucker- Vorbehandlung . . . . .	124
4.40	Leber, Strauß, Area interlobularis, LCA-FITC mit und ohne Hemmzucker- Vorbehandlung . . . . .	125
4.41	Leber, Strauß, Parenchym, TEM . . . . .	128
4.42	Leber, Strauß, Parenchym, TEM . . . . .	129
4.43	Leber Strauß, Hepatozytennukleus, TEM . . . . .	130
4.44	Leber Strauß, Hepatozyten-Zellmembran interzellulär, TEM . . . . .	131
4.45	Leber Strauß, Canaliculus biliferus, TEM . . . . .	132
4.46	Leber Strauß, Sinusoid, TEM . . . . .	134
4.47	Leber Strauß, Endothelzelle des Sinusoids, TEM . . . . .	135
4.48	Leber Strauß, Sinusoid mit Dissé Raum, TEM . . . . .	137
4.49	Leber, Strauß, Dissé Raum, TEM . . . . .	139
4.50	Leber, Strauß, Ito-Zelle, TEM . . . . .	141
4.51	Leber, Strauß, Zellen des sinusoidalen und perisinusoidalen Raumes, TEM	142

# 11 Anhang

## 11.1 Lösungen für die Lichtmikroskopie

### 11.1.1 Fixierungslösungen

#### Bouinlösung

750 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäure<sup>1</sup> in einen großen Glaszylinder filtern und mit 250 ml 37%igem Formaldehyd<sup>1</sup> mischen. Diese Mischung in eine braune Flasche füllen und 50 ml Eisessig<sup>1</sup> (100%ige Essigsäure) dazugeben.

#### Formalin 3,7 %ig

Für einen Liter 3,7%iges Formalin werden 100 ml 37%ige Formaldehydlösung<sup>1</sup> mit 90 ml konzentriertem PBS und 810 ml DEPC-Wasser gemischt.

### 11.1.2 Puffer

#### PBS-Puffer

Der PBS-Puffer besteht aus 11,652 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat<sup>1</sup> ( $Na_2HPO_4$ ), 2,174 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat<sup>1</sup> ( $NaH_2PO_4$ ) und 90 g Natriumchlorid<sup>1</sup> (Sodiumchloride for analysis, NaCl) in 1 l DEPC-Wasser gelöst.

#### DEPC-Wasser

1 l demineralisiertes Wasser wird mit 1000  $\mu$ l DEPC<sup>2</sup> (Diethylpyrocarbonat  $C_6H_{10}O_5$ ) vermischt, über Nacht stehengelassen und dann autoklaviert.

### 11.1.3 Färbelösungen

#### A. Allgemeines

Methanol  $\geq 99,9\%$ <sup>2</sup>

Eukitt<sup>®3</sup> (Quick hardening mounting medium)

#### B. HE-Färbung

##### Saures Hämalaun nach Meyer

2 g Hämatoxylin<sup>1</sup> werden zusammen mit 0,4 g Natriumjodat<sup>1</sup> ( $NaJO_3$ ), 100 g Kalialaun p.A.<sup>1</sup> (Aluminiumkaliumsulfat  $AlK(SO_4)x12H_2O$ ), 100 g Chloralhydrat<sup>1</sup> ( $C_2H_3Cl_3O_2$ ) und 2 g Zitronensäure krist.<sup>2</sup> in 2000 ml Aqua dest. auf dem Magnetrührer gelöst und anschließend filtriert (Mulisch et al., 2010: S.214). Die so entstandene Lösung ist rot-violett und in einer dunklen Flasche lange Zeit haltbar. Vor jedem Gebrauch sollte sie filtriert werden.

##### Eosin

Zuerst wird eine 1 %ige Stammlösung aus 2 g Eosin<sup>1</sup> (gelblich) und 198 ml Aqua dest. hergestellt. Zur längeren Haltbarkeit werden ihr einige Tropfen Formol zugesetzt. Für die Färbung wird eine Verdünnung aus einem Teil 1 %ige Stammlösung, zehn Teilen Aqua dest. und 1-5 Tropfen Eisessig<sup>1</sup> pro 100 ml fertiger Färbelösung hergestellt.

#### C. Trichromfärbung nach Masson und Goldner

##### Eisenhämatoxylin nach Weigert

Lösung A: 1 g Hämatoxylin<sup>1</sup> wird in 100 ml 96 %igem Alkohol gelöst und muss dann eine Woche reifen.

Lösung B: 2,48 g Eisen(III)chlorid<sup>1</sup> ( $FeCl_3x6H_2O$ ) in 100 ml Aqua dest. lösen und anschließend 1 ml konzentrierte Salzsäure<sup>1</sup> (37 %ige HCL) zugeben.

Die zwei Lösungen in dunklen Flaschen gut verschlossen aufbewahren. Erst vor dem Gebrauch wird eine Mischung im Verhältnis 1:1 hergestellt. Dabei Lösung A zu Lösung B geben. Diese fertige Mischung ist eine Woche haltbar und kann in dieser Zeit mehrmals verwendet werden.

**Azophloxin**

Man löst 0,5 g Azophloxin<sup>4</sup> in 100 ml Aqua dest. und gibt dann 0,2 ml Eisessig<sup>1</sup> dazu. Lösung ist in einer dunklen, gut verschlossenen Flasche haltbar und muss vor Gebrauch immer filtriert werden.

**Phosphormolybdänsäure-Orange**

4 g Phosphormolybdänsäure<sup>1</sup> in 100 ml Aqua dest. lösen und 2 g Orange G<sup>1</sup> hinzufügen. Die Lösung immer frisch ansetzen und nach Gebrauch verwerfen!

**Lichtgrün**

0,1-0,2 g Lichtgrün<sup>1</sup> in 100 ml Aqua dest. lösen. Anschließend kommen 0,2 ml Eisessig<sup>1</sup> dazu und die Lösung wird gefiltert. Die Lösung ist in einer dunklen, gut verschlossenen Flasche lange haltbar. Nach Gebrauch Lösung filtern und zurück in die Flasche füllen.

**1 %ige Essigsäure**

10 ml Eisessig<sup>1</sup> auf 1000 ml Aqua dest..

**D. Alcianblau 8GX****Alcianblau pH 2,5**

Es wird 1 g Alcianblau 8GX<sup>3</sup> in 100 ml 3%iger Essigsäure<sup>1</sup> gelöst, der pH-Wert auf 2,5 eingestellt, die Lösung filtriert und eine Messerspitze Thymolkristall<sup>1</sup> zur Haltbarkeit zugesetzt.

**Alcianblau pH 1,0**

Für die Färbung unter dem pH-Wert 1,0 wird 1 g Alcianblau 8GX<sup>3</sup> in 100 ml 0,1 N Salzsäure<sup>2</sup> gelöst, der pH-Wert eingestellt, die Lösung filtriert und eine Messerspitze Thymolkristall<sup>1</sup> zur Haltbarkeit zugesetzt.

Beide Lösungen sind in einer dunklen Flasche gut haltbar.

**3 %ige Essigsäure**

Es werden 30 ml Eisessig<sup>1</sup> (100 %ige Essigsäure) mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

**Kernechtrot<sup>1</sup>****E. PAS-Reaktion nach McManus**

**0,5 % wässrige Perjodsäure**

Zur Herstellung der 0,5 %igen wässrigen Perjodsäure wird 1 g Perjodsäure<sup>2</sup> in 200 ml Aqua dest. gelöst.

**Schiff'sches Reagenz<sup>2</sup>****Sulfit-(SO<sub>2</sub>)-Wasser**

Es werden 200 ml Leitungswasser mit 10 ml n-Salzsäure<sup>2</sup> (im Verhältnis 1:10 gemischt, 9 ml Aqua dest. mit 1 ml konzentrierter Salzsäure) und 10 ml 10 %ige Natriumdisulfitlösung<sup>1</sup> gemischt.

Zur Herstellung der 10 %igen Natriumdisulfitlösung<sup>1</sup> werden 3,003 g Natriumdisulfit in 30 ml Aqua dest. gelöst. SO<sub>2</sub>-Wasser immer frisch herstellen.

**Hämalaun**

siehe HE-Färbung

**0,5 %ige Amylase**

Man mischt 10 g  $\alpha$ -Amylase-Pulver<sup>3</sup> mit 2 ml Aqua dest. (auf pH 5,5-6,0 mit 10 %iger Essigsäure<sup>1</sup> einstellen) und lässt diese Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.

## 11.2 Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen

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

Für den PBS-Puffer werden 42,5 g Natriumchlorid<sup>1</sup> (NaCl), 6,35 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat<sup>1</sup> ( $Na_2HPO_4$ ) und 1,95 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat<sup>1</sup> ( $NaH_2PO_4$ ) in 5 l Aqua dest. gelöst und am pH-Meter auf den pH-Wert 7,4-7,6 eingestellt. Der Puffer ist circa eine Woche haltbar.

**Protein Block Serum-Free<sup>5</sup>****7,5%ige Hydrogenperoxidlösung**

Dazu werden 50 ml Hydrogenperoxid<sup>1</sup> mit 150 ml Aqua dest. vermischt.

## Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase Complex<sup>3</sup>

### DAB-Hydrogenperoxidlösung

Zunächst stellt man eine Stammlösung aus verdünnten Hydrogenperoxid<sup>1</sup> her. Dazu werden 5 ml PBS-Puffer (pH 7,4) mit 15  $\mu$ l 30 %iger Hydrogenperoxidlösung vermischt. Von dieser Stammlösung werden nun 0,4 ml zu einer Mischung aus 60 ml Aqua dest. und 6 DAB(=3-3'-Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid)-Tabletten<sup>3</sup> (10 mg) gegeben. Abgedunkelt auf dem Magnetrührer gut vermischen.

## 11.3 Lösungen für die glykohistochemischen Untersuchungen

### PBS-Puffer

Herstellung des PBS-Puffer (pH 7,4) siehe oben, Immunhistochemie.

### Verdünnung der Lektine

Die Konzentration der unverdünnten Lektine beträgt hier immer 2  $\mu$ g/ $\mu$ l. Es werden Verdünnungsreihen angelegt und dabei mit einer hohen Verdünnung begonnen. Verdünnt wird mit PBS-Puffer. Für 2  $\mu$ g/ml werden 1  $\mu$ l Lektin auf 1 ml PBS-Puffer gemischt. Bei 5  $\mu$ g/ml sind es 2,5  $\mu$ l Lektin auf 1 ml PBS-Puffer.

**Tabelle 11.1** verwendete Konzentrationen FITC-markierter Lektine

Lektin	Konzentration
WGA	2 $\mu\text{g/ml}$
WGAs	5 $\mu\text{g/ml}$
PNA	5 $\mu\text{g/ml}$
PSA	5 $\mu\text{g/ml}$
PHA-E	5 $\mu\text{g/ml}$
PHA-L	5 $\mu\text{g/ml}$
CON A	2 $\mu\text{g/ml}$
LCA	5 $\mu\text{g/ml}$
SBA	5 $\mu\text{g/ml}$
UEA	5 $\mu\text{g/ml}$
DBA	5 $\mu\text{g/ml}$
GSL-1	5 $\mu\text{g/ml}$
RCA	5 $\mu\text{g/ml}$

**Tabelle 11.2** Verwendete Konzentrationen biotinylierter Lektine

Lektin	Konzentration
SJA	20 $\mu\text{g/ml}$
MAL-1	5 $\mu\text{g/ml}$
SNA	5 $\mu\text{g/ml}$

Roti<sup>®</sup>-Mount FluorCare DAPI<sup>2</sup> (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)

Protein-Block-Serum-Free<sup>5</sup>

Streptavidin-FITC<sup>5</sup>

## 11.4 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

### 11.4.1 Fixierungslösungen

#### Fixierungslösung nach Karnovsky

Die Fixierungslösung nach Karnovsky wird aus 1,097 ml 25 %igem Glutaraldehyd<sup>6</sup> und 8 ml Karnovsky-Stock-Solution direkt vor Gebrauch angemischt.

### **Karnovsky-Stock-Solution**

Für die Karnovsky-Stock-Solution werden 20 ml 10%iges Paraformaldehyd<sup>3</sup> mit 50 ml 0,2 molarem Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) und 0,05 g Calciumchlorid<sup>7</sup> gemischt.

### **10%iges Paraformaldehyd**

Hierfür werden 10 g Paraformaldehyd in 100 ml Aqua dest. gegeben und bei maximal 60–70 °C auf dem Magnetrührer gelöst. Dann 1-2 Tropfen Natriumhydroxid<sup>1</sup> zugeben, um eine klare Lösung zu erhalten.

## **11.4.2 Puffer**

### **0,2 M Natriumcacodylat-Puffer, Stammlösung**

4,28 g Natriumcacodylat<sup>6</sup> ( $NaC_2H_6AsO_2 \cdot 3H_2O$ ) in 50 ml Aqua dest. lösen. Achtung! Sehr giftig, da arsenhaltig!

### **0,2 M Natriumcacodylat-Puffer, pH 7,2**

Für die Gebrauchslösung 50 ml der Stammlösung mit 0,2 M Salzsäure<sup>1</sup> (HCl) auf den pH 7,2 einstellen. Mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen.

### **0,1 M Natriumcacodylat-Puffer, pH 7,2**

Zu 50 ml der Stammlösung tropfenweise 0,2 M Salzsäure<sup>1</sup> (HCl) zugeben bis ein pH-Wert von 7,2 erreicht ist. Dann mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen.

## **11.4.3 Kontrastierungslösungen**

### **A. Vorkontrastierungslösungen**

Als Kontrastierungslösung zum Vorkontrastieren der Proben werden gleiche Volumina der beiden Stammlösungen gemischt. Dies ergibt ein Verdünnungsverhältnis von 3:2 bzw. 1,5:1 ( $K_4(Fe(CN)_6) : OsO_4$ ).

**Kaliumferrocyanid-Stammlösung**

Zur Herstellung einer 3%igen Kaliumferrocyanid-Stammlösung werden 0,3 g Kaliumferrocyanid<sup>3</sup> in 10 ml 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer gelöst und 24 Stunden ruhen gelassen.

**Osmiumtetroxid-Stammlösung** Zur Herstellung einer 2%igen Osmiumtetroxid-Stammlösung aus 4%igem Osmiumtetroxid<sup>6</sup> werden 2 ml von zweiterem mit 2 ml 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer in Glasröhrchen mit einer Pasteurpipette pipettiert.

**B. Nachkontrastierungslösungen****Uranylacetat<sup>8</sup>****Bleiacetat**

Um Bleicitrat nach Reynolds anzusetzen werden für ein Endvolumen von 10 ml 0,266 g Bleinitrat<sup>3</sup> ( $Pb(NO_3)_2$ ) mit 0,352 g Natriumcitrat<sup>3</sup> ( $Na_3(C_6H_5O_7) \cdot 2H_2O$ ) und 6 ml Aqua dest. durch mindestens eine Minute dauerndes starkes Schütteln und dann in 30 Minuten nur ab und zu erfolgreiches Schütteln vermischt. Danach werden circa 1,6 ml 1 N Natriumhydroxid<sup>1</sup> tropfenweise dazupipettiert bis zum Erreichen einer durchsichtigen Lösung mit dem pH 12. Bleicitrat ist in Plastikröhrchen und bei 4 °C gelagert circa drei Monate haltbar und muss vor Gebrauch mit 11400 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert und dann filtriert werden.

**11.4.4 Einbettmedien****Propylenoxid<sup>9</sup>****Epon**

Zur Herstellung von Epon bzw Poly/Bed<sup>®</sup> 812<sup>10</sup> mit BDMA<sup>9</sup> (N-Benzyl-dimethylamin) werden die Volumina mit einer Einmalspritze abgemessen oder laut Tabelle abgewogen. Generell gilt für die Mischung, dass durch mehr NMA<sup>9</sup> (Nadic-Methyl-Anhydride) die Blöcke härter werden und durch mehr DDSA<sup>9</sup> (Dodecenylnbernsteinsäure-anhydrid) weicher.

**Tabelle 11.3** Epon

	Substanz	ml	g	ml	g	ml	g
1.	Poly/Bed <sup>®</sup> 812	5	6,3	10	12,6	20	25,2
2.	DDSA	4	4,1	8	8,2	16	16,4
3.	NMA	2,5	3,25	5	6,5	10	12,9
4.	BDMA	0,35		0,7		1,4	

Während des Mischvorgangs werden die Substanzen auf dem Magnetrührer homogenisiert. Zuerst wird Poly/Bed<sup>®</sup> 812 mit DDSA verrührt. Dann erfolgt die Zugabe von NMA. Bei der Zugabe von BDMA wird zuerst mit einem Glasstab vorgerührt, da BDMA sehr flüssig ist. Wenn alle vier Substanzen zugegeben sind wird die ganze Lösung noch einmal für 30 Minuten auf dem Magnetrührer homogenisiert, aber nicht zu intensiv gerührt, da sich sonst Blasen bilden (Polysciences, o.D.).

### 11.4.5 Färbelösungen

#### Methylenblau nach Richardson

Für die Färbelösung nach Richardson werden 1%iges Methylenblau<sup>1</sup> (1 g auf 100 ml Aqua dest.) mit 1%igem Borax<sup>3</sup> (Natriumtetraboratdecahydrat p.A.,  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) im Verhältnis 1:1 gemischt. Danach werden im Verhältnis 1:1 1%iges Azur II<sup>1</sup> mit dem Methylenblau-Borax-Gemisch vermischt.

## Fußnoten

<sup>1</sup>Merck, Darmstadt

<sup>2</sup>Carl Roth GmbH, Karlsruhe

<sup>3</sup>Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

<sup>4</sup>Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH und Co, Münster

<sup>5</sup>Dako, Hamburg

<sup>6</sup>Polysciences Inc., Warrington, USA

<sup>7</sup>Serva, Heidelberg

<sup>8</sup>Agar Scientific LTD, Essex, England

<sup>9</sup>Grübler, Stuttgart-Untertürkheim

<sup>10</sup>Vektor Laboratories Inc., Burlingham

## 12 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien bedanken. Des Weiteren danke ich ihm vor allem für die wissenschaftliche Betreuung als Doktorvater bei der Erstellung dieser Arbeit sowie für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Frau W. Scholz möchte ich für ihren engagierten Einsatz bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen und ihr unermüdliches Engagement für die Doktoranden danken. Herrn Y. Gök danke ich für die gründliche Einarbeitung in die lichtmikroskopischen und glykohistochemischen Arbeiten und die freundliche Unterstützung bei allen Fragen. Frau Rußmeier und Frau Settles danke ich für ihre Hilfe bei den immunhistochemischen Arbeiten im Labor.

Herrn Habermann danke ich für die Einweisung in die Fluoreszenzmikroskopie und die Hilfe bei der Formatierung der Bilddateien sowie für die Unterstützung beim Mikroskopieren.

Der Familie Engelhardt von der Straußenfarm Donaumoos in Leipheim möchte ich sehr herzlich für die Bereitstellung der Straußenlebern und ihre freundliche Unterstützung danken.

Frau Dr. E. Steyer und Frau Dr. J. Bicker danke ich für ihre freundliche Hilfe bei den Korrekturen und Aufmunterung in schwierigen Phasen. Frau Dr. A. Wuck möchte ich auch ganz herzlich für so manches anfeuerndes Wort danken.

Danken möchte ich meiner Freundin und Kollegin Annette Reistle, mit der die Zeit der Doktorarbeit zu einer ganz besonderen Zeit geworden ist und ohne die ich vermutlich so manches Mal aufgegeben hätte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Horst für seine unendliche Geduld, emotionale Unterstützung und freundlichen Schubser in die richtige Richtung.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei meinen Eltern, meinen Schwestern und Großeltern für ihre tatkräftige Unterstützung und ihr grenzenloses Verständnis. Danke, dass ihr alle immer an mich geglaubt habt.