

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

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

---

**Ultrastrukturelle und histochemische  
Untersuchungen der Blutzellen des Straußes**  
*(Struthio camelus)*

---

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

von  
Julia Katharina Scholz  
aus  
Landshut

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

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

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

*Meinen lieben Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung .....	1
II.	Literaturübersicht	
2.1.	Allgemeines zum Blut des Vogels .....	3
2.1.1	Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes .....	3
2.1.2	Hämatopoese .....	4
2.1.3	Spezielle Hämatologie des Straußes .....	8
2.2	Charakterisierung der einzelnen Blutzellen	
2.2.1	Erythrozyten	
2.2.1.1	Allgemeines .....	8
2.2.1.2	Bildung .....	9
2.2.1.3	Morphologie .....	11
2.2.1.4	Zytochemische Eigenschaften .....	14
2.2.1.5	Zytoskelett .....	15
2.2.1.6	Aufgaben .....	17
2.2.2	Thrombozyten	
2.2.2.1	Allgemeines .....	17
2.2.2.2	Bildung .....	18
2.2.2.3	Morphologie .....	19
2.2.2.4	Zytochemische Eigenschaften .....	21
2.2.2.5	Zytoskelett .....	22
2.2.2.6	Aufgaben .....	23
2.2.3	Heterophile Granulozyten	
2.2.3.1	Allgemeines .....	25
2.2.3.2	Bildung .....	25
2.2.3.3	Morphologie .....	27
2.2.3.4	Zytochemische Eigenschaften .....	29
2.2.3.5	Zytoskelett .....	30
2.2.3.6	Aufgaben .....	32
2.2.4	Eosinophile Granulozyten	
2.2.4.1	Allgemeines .....	33
2.2.4.2	Bildung .....	33
2.2.4.3	Morphologie .....	34

2.2.4.4 Zytochemische Eigenschaften .....	36
2.2.4.5 Zytoskelett .....	36
2.2.4.6 Aufgaben .....	37
<b>2.2.5 Basophile Granulozyten</b>	
2.2.5.1 Allgemeines .....	38
2.2.5.2 Bildung .....	38
2.2.5.3 Morphologie .....	39
2.2.5.4 Zytochemische Eigenschaften .....	40
2.2.5.5 Zytoskelett .....	41
2.2.5.6 Aufgaben .....	41
<b>2.2.6 Lymphozyten</b>	
2.2.6.1 Allgemeines .....	42
2.2.6.1.2 Das Lymphatische System der Vögel .....	42
2.2.6.2 Bildung .....	44
2.2.6.3 Morphologie .....	44
2.2.6.4 Zytochemische Eigenschaften .....	47
2.2.6.5 Zytoskelett .....	47
2.2.6.6 Aufgaben .....	48
2.2.6.6.1 Allgemeines .....	48
2.2.6.6.2 B-Lymphozyten .....	49
2.2.6.6.3 T-Lymphozyten .....	50
2.2.6.6.4 Natürliche Killerzellen .....	51
<b>2.2.7 Monozyten</b>	
2.2.7.1 Allgemeines .....	51
2.2.7.2 Bildung .....	52
2.2.7.3 Morphologie .....	52
2.2.7.4 Zytochemische Eigenschaften .....	54
2.2.7.5 Zytoskelett .....	54
2.2.7.6 Aufgaben .....	55
<b>2.3 Enzymhistochemie</b>	
2.3.1 Definition und Anwendung .....	56
2.3.2 Technik .....	56
2.3.3 Einteilung der Enzyme .....	57
2.3.3.1 Peroxidase .....	57
2.3.3.2 Phosphatasen .....	57

2.3.3.2.1 Alkalische Phosphatase .....	57
2.3.3.2.2 Saure Phosphatase .....	58
2.3.3.3 $\beta$ -Glukuronidase .....	58
2.3.3.4 Esterasen .....	59
2.3.3.4.1 Unspezifische Esterasen .....	59
2.3.3.4.1.1 Naphthol-AS-D-Acetat-Esterase .....	59
2.3.3.4.1.2 $\alpha$ -Naphthyl-Acetaat-Esterase .....	59
2.3.3.4.2 Spezifische Esterasen .....	59
2.3.3.4.2.1 Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase .....	60
<b>2.4 Glykohistochemie</b>	
2.4.1 Lektine	
2.4.1.1 Entstehung und Definition des Begriffes "Lektin" .....	60
2.4.1.2 Struktur und Einteilung der Lektine .....	63
2.4.1.3 Funktion und Anwendung von Lektinen .....	66
2.4.1.4 Technik .....	69
2.4.1.5 Zuckerstrukturen auf aviären Blutzellen .....	69
2.4.1.6 Lektinbindungsstellen auf aviären Blutzellen .....	70
<b>2.5 Immunzytochemie</b>	
2.5.1 Definition und Anwendung .....	71
2.5.2 Technik .....	71
<b>2.6 Zytoskelett</b>	
2.6.1 Allgemeines .....	73
2.6.2 Aktinfilamente .....	73
2.6.3 Mikrotubuli .....	74
2.6.4 Intermediärfilamente .....	75
<b>2.7 Blutgruppen beim Vogel</b>	
2.7.1 Die Blutgruppensysteme und deren Bestimmung .....	76
2.7.2 Beschreibung der Blutgruppensysteme der Vögel.....	77
2.7.3 Bedeutung der Blutgruppenbestimmung .....	77
<b>III. Material und Methoden</b>	
3.1 Untersuchungsmaterial .....	80
<b>3.2 Lichtmikroskopie</b>	
3.2.1 Übersichtsfärbungen .....	82
3.2.1.1 Diff-Quick-Färbung .....	82
3.2.1.2 Giemsa-Färbung .....	82

3.2.1.3	May-Grünwald-Färbung .....	83
3.2.1.4	Pappenheim-Färbung .....	83
3.2.2	Substrathistochemische Färbungen	
3.2.2.1	Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung .....	84
3.2.2.2	Sirius-Red-Färbung .....	85
3.2.2.3	Toluidinblau-Färbung .....	85
3.2.2.4	Alcianblau-Färbung .....	86
3.3	Enzymhistochemie	
3.3.1	Peroxidase .....	87
3.3.2	Alkalische Phosphatase .....	87
3.3.3	Saure Phosphatase .....	88
3.3.4	$\beta$ -Glukuronidase .....	89
3.3.5	Naphthol-AS-Acetat-Esterase .....	90
3.3.6	$\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase .....	91
3.3.7	Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase .....	92
3.4	Elektronenmikroskopie .....	93
3.5	Glykohistochemie .....	94
3.5.1	FITC-markierte Lektine .....	94
3.5.2	Biotinylierte Lektine .....	97
3.5.3	Vorbehandlung mit Hemmzucker .....	100
3.5.4	Vorbehandlung mit Neuraminidase .....	100
3.6	Zytoskelett .....	102
3.6.1	Aktin .....	102
3.6.2	Tubulin .....	102
3.6.3	Vimentin .....	103
3.7	Auswertung .....	104
IV.	Ergebnisse	
4.1	Blutbilder der verwendeten Strauße .....	104
4.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen .....	105
4.2.1	Erythrozyten .....	105
4.2.2	Thrombozyten .....	107
4.2.3	Heterophile Granulozyten .....	110
4.2.4	Eosinophile Granulozyten .....	112
4.2.5	Basophile Granulozyten .....	115
4.2.6	Lymphozyten .....	120

4.2.7	Monozyten .....	122
4.3	<b>Enzymhistochemische Untersuchungen</b>	
4.3.1	Erythrozyten .....	125
4.3.2	Thrombozyten .....	126
4.3.3	Heterophile Granulozyten .....	127
4.3.4	Eosinophile Granulozyten .....	130
4.3.5	Basophile Granulozyten .....	131
4.3.6	Lymphozyten .....	132
4.3.7	Monozyten .....	134
4.4	<b>Elektronenmikroskopische Untersuchungen</b>	
4.4.1	Erythrozyten .....	137
4.4.2	Thrombozyten .....	138
4.4.3	Heterophile Granulozyten .....	139
4.4.4	Eosinophile Granulozyten .....	140
4.4.5	Basophile Granulozyten .....	141
4.4.6	Lymphozyten .....	142
4.4.7	Monozyten .....	143
4.5	<b>Glykohistochemische Untersuchungen</b> .....	144
4.5.1	<b>Für Glukose/Mannose spezifische Lektine</b>	
4.5.1.1	Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA-FITC) .....	145
4.5.1.2	Bindung von Lens Culinaris Agglutinin (LCA-FITC) .....	149
4.5.1.3	Bindung von Pisum sativum Agglutinin (PSA-FITC) .....	153
4.5.2	<b>Für Galaktose spezifische Lektine</b>	
4.5.2.1	Bindung von Peanut Agglutinin (PNA-FITC) .....	157
4.5.2.2	Bindung von Ricinus communis Agglutinin (RCA-FITC) .....	161
4.5.2.3	Bindung von Viscum album Agglutinin (VAA-Biotin) .....	164
4.5.3	<b>Für N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure spezifische Lektine</b>	
4.5.3.1	Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA-FITC) .....	165
4.5.3.2	Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs-FITC) .....	169
4.5.4	<b>Für N-Acetyl-Galaktosamin spezifische Lektine</b>	
4.5.4.1	Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA-FITC) .....	173
4.5.4.2	Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL-1-FITC) .....	175
4.5.4.3	Bindung von Sophora japonica Agglutinin (SJA-FITC) .....	175
4.5.5	<b>Für N-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose spezifische Lektine</b>	
4.5.5.1	Bindung von Sambucus niger Agglutinin (SNA-Biotin) .....	176



4.5.5.2 Bindung von Soybean Agglutinin (SBA-FITC) .....	179
4.5.6 Für Fukose spezifische Lektine	
4.5.6.1 Bindung von Ulex europaeus Agglutinin1 (UEA-1-FITC) .....	180
4.5.6 Für komplexe Kohlenhydratstrukturen spezifische Lektine	
4.5.6.1 Bindung von Phaseolus vulgaris E Agglutinin (PHA-E-FITC) .....	183
4.5.6.2 Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin (PHA-L-FITC) .....	186
4.5.6.3 Bindung von Maackia amurensis Agglutinin (MAA-Biotin) .....	189
4.5.8 Ergebnisse der Vorbehandlung mit Hemmzuckern .....	192
4.5.9 Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase .....	193
4.6 Untersuchung des Zytoskelettes .....	194
4.6.1 Aktin .....	194
4.6.2 Tubulin .....	198
4.6.3 Vimentin .....	202
V. Diskussion .....	205
VI. Zusammenfassung .....	231
VII. Summary .....	233
VIII. Anhang	
1. Abkürzungsverzeichnis .....	235
2. Verzeichnis der Gebrauchslösungen .....	237
3. Abbildungsverzeichnis .....	242
4. Tabellenverzeichnis .....	247
IX. Literaturverzeichnis .....	249
X. Danksagung .....	268

## I Einleitung

Früheste Kontakte zwischen Mensch und Strauß belegen Funde von verzierten Straußeneiern aus dem 9. Jahrtausend vor Christus. Im alten Ägypten waren Straußenvögel wichtige Zucht- und Jagdtiere, die als Eier- und Fleischlieferanten große Bedeutung hatten. Die großen weißen Schmuckfedern galten aufgrund ihrer Gleichmäßigkeit und eleganten Gestalt als Symbol des Lichts und der Gerechtigkeit. Im antiken Griechenland wurden Strauße zusätzlich auch als Zug- und Reittiere gehalten. Als im 18. Jahrhundert in Europa Straußenfedern als Hutschmuck in Mode kamen, nahm die Jagd auf die Laufvögel so drastische Ausmaße an, dass sie in Westasien, Nord- und Südafrika ausgerottet wurden. Im 19. Jahrhundert begann erstmals in Südafrika die Zucht und Haltung der Strauße in Farmen und ab der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde der ursprünglich in Afrika beheimatete Strauß in Farmen über die ganze Welt verbreitet. Heute wird der Strauß weniger wegen seiner Federn und Eiern, sondern vielmehr aufgrund seines hochwertigen Fleisches und Leders gehalten.

Das Wort "Strauß" stammt vom altgriechischen "struthion", was "großer Spatz" bedeutet. Die Griechen nennen den Strauß auch "Kamelspatz", was den wissenschaftlichen Namen der Art "struthio camelus" erklärt.

Mit der zunehmenden wirtschaftlichen Bedeutung des Straußes, wächst auch das Interesse an seiner Gesundheit und Prophylaxe vor Infektionen. Viele Krankheiten des Straußes gehen mit charakteristischen Veränderungen im Blutbild einher. Aus diesem Grund ist es wichtig, physiologische Parameter, wie Anzahl und Aussehen gesunder Blutzellen genau zu kennen, um eine Abweichung einordnen zu können.

In vorliegender Arbeit wurden die Blutzellen des Straußes mit verschiedenen Übersichtsfärbungen untersucht und anhand ihres charakteristischen morphologischen Erscheinungsbildes identifiziert. Des Weiteren wurden mit Hilfe substrathistochemischen Nachweisfärbungen bestimmte Zellkomponenten wie Glykogen, neutrale und saure Mukopolysaccharide spezifisch angefärbt und innerhalb der Zelle lokalisiert. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde die Ultrastruktur der Zellen dargestellt. Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel und geben Aufschluß über die spezifische Aufgabe der Zelle. Verschiedene Enzyme, die für die Charakterisierung von Blutzellen von Bedeutung sind, wurden enzymhistochemisch nachgewiesen. Blutzellen tragen unter anderem Kohlenhydratstrukturen auf ihrer Oberfläche, die für die Interaktionen mit anderen Zellen und dem Endothel von Bedeutung sind. Lektine binden spezifisch an diese Kohlenhydrate und können, über einen farbigen Marker, Aufschluß über die Zuckerstrukturen der verschiedenen Zellen geben. Das Zytoskelett ist ein wichtiger struktureller Bestandteil vieler Zellen welches unterschiedlichste Aufgaben, wie beispielsweise Migration, Zellveränderungen und Zellteilung bewerkstelligt. Es besteht unter anderem aus den Proteinen Aktin, Tubulin und Vimentin welche in dieser Arbeit über

immunzytochemische und andere histochemische Methoden markiert und sichtbar gemacht wurden.

Das Ziel dieser Arbeit ist die ultrastrukturelle, glykohistochemische, enzymhistochemische und immunzytochemische Charakterisierung der einzelnen Blutzellen des Straußes. Es wurde dazu zunächst die Morphologie der Zellen nach Übersichtsfärbungen unter dem Lichtmikroskop und nach ultrastrukturellen Untersuchungen im Elektronenmikroskop beschrieben. Bei der glykohistochemischen Untersuchung wurden mit einer Reihe von Lektinen die Kohlenhydratstrukturen der einzelnen Blutzellen charakterisiert. Verschiedene diagnostisch wichtige Enzyme der Blutzellen wurden histochemisch nachgewiesen und ebenfalls unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Letztendlich wurden Elemente des Zytoskeletts der Zellen mittels immunzytochemischer und anderer histochemischer Methoden dargestellt und bewertet.

Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde erstmals eine umfangreiche Charakterisierung der Blutzellen des Straußes durchgeführt, welche eine solide Grundlage für aviärmedizinische Aspekte sowie weiterführende hämatologische Forschungen liefert.

## II Literaturübersicht

### 2.1 Allgemeines zum Blut des Vogels

Das Blut der Vögel weist einige charakteristische Besonderheiten auf. Alle seine Zellen, auch die reifen Erythrozyten und Thrombozyten besitzen Zellkerne. Die Funktion der neutrophilen Granulozyten wird von den heterophilen Granulozyten übernommen. Das Plasma enthält weniger Albumin und weniger Natrium, aber mehr Kalium als das Säugerblut (Gylstorff und Grimm, 1998). Der Blutglukosespiegel ist typischerweise beim Vogel doppelt so hoch wie beim Säuger (Smith et al., 2000). Im Gerinnungssystem fehlen einige Faktoren (V und VII) oder sind nur in geringen Konzentrationen vorhanden (IX und XII). Der Extrinsic-Faktor, das Gewebethromboplastin, ist für die Gerinnung wichtiger als der Intrinsic-Faktor (Gylstorff und Grimm, 1998).

### 2.2 Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes

Das im Gefäßsystem zirkulierende Blut macht beim Vogel etwa 3 bis 13 % der Körpermasse aus. Die physiologische Blutmenge beträgt etwa 7,8 bis 9,2 ml pro 100 g Körpermasse und liegt damit im gleichen Bereich wie beim Säugetier (Bezzel und Prinzinger, 1977).

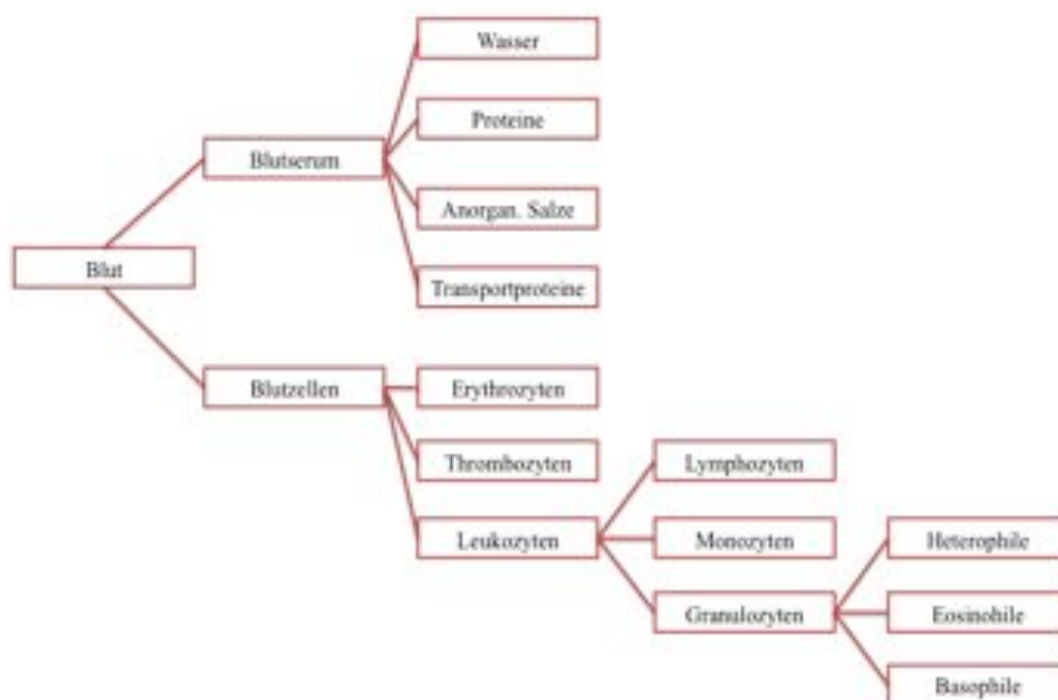
Das Blut setzt sich aus einem flüssigen Bestandteil, dem Blutplasma und einem zellulären Anteil, den Blutkörperchen zusammen. Das Blutplasma besteht aus circa 90 % Wasser (Sinowatz und Hees, 2000). Darin sind vor allem Proteine (Albumine und Globuline) Lipide, Vitamine, Kohlenhydrate sowie Spurenelemente und Mineralstoffe gelöst. Neben diesen Nährstoffen transportiert das Blutplasma auch Gase, Hormone und Abbauprodukte. Wird dem Plasma das Protein Fibrinogen entzogen welches für die Blutgerinnung verantwortlich ist, so erhält man Blutserum (Loeffler, 1978).

Der zelluläre Anteil, die Blutzellen, können als prozentualer Volumenanteil, dem Hämatokrit gemessen werden. Dieser kann stark schwanken beispielsweise zwischen 25 % beim jungen Haushuhn und 60 % bei der adulten Taube (Bezzel und Prinzinger, 1977). Im Mittel liegt er mit etwa 40-58 % im gleichen Bereich wie beim Säuger (Kummerfeld, 2007). Die Blutzellen können weiter unterteilt werden in rote und weiße Blutkörperchen, letztere weiterhin in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten. Als weiterer zellulärer Bestandteil sind noch die Blutplättchen bzw. Spindelzellen zu nennen (Sinowatz und Hees, 2000).

Die wohl wichtigste Funktion des Blutes besteht im Transport und Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen Lunge und Gewebe. Das Blut hat als Transport- und Regulierungsorgan jedoch noch weitere verantwortungsvolle Aufgaben: Es führt Nährstoffe, Metaboliten, Abwehrzellen,

Stoffwechselendprodukte und Hormone zu den jeweiligen Zielorganen. Des Weiteren versorgt das Blut als Wärmeleiter den Körper und hält durch regulierte Homöostase den Blutdruck aufrecht. Auch zur Koagulation und somit zum Schutz vor Blutverlust hält das Blut beständig Faktoren bereit (Gassmann und Lutz, 2004). In folgender Abbildung ist die Zusammensetzung des Blutes noch einmal grafisch dargestellt.

Abbildung 1: Zusammensetzung des Blutes:



### 2.1.2 Hämatopoese

Der Dottersack ist der Ort der ersten primitiven Hämatopoese. Sie beginnt um die 29. Entwicklungsstunde (Geerts et al., 1993). Blut- und Blutgefäßbildung beginnen extraembryonal. In der Wand des Dottersackes entsteht ein ausgedehntes anastomosierendes Kapillarsystem, das in Richtung Embryo die Venae omphalomesentericae (Dottersackvenen) bildet (Rüsse und Sinowatz, 1998). Durch Aggregation entstehen im lockeren embryonalen Mesenchym dicht gepackte Zellansammlungen. Die außen liegenden Zellen flachen ab und werden zu Angiothelzellen, die inneren Zellen runden sich ab und werden zu ersten primitiven freischwimmenden Blutzellen, den Hämocytoblasten, auch pluripotente Stammzellen genannt. Während der weiteren Embryonalentwicklung verlagert sich die

Blutbildung in Leber und Milz und schließlich ins Knochenmark, welches beim frisch geschlüpften Vogel den dominierenden Ort der Blutbildung darstellt (Bienzle und Smith, 2000). Zwei separate Orte der Blutbildung können innerhalb des Knochenmarks histologisch unterschieden werden. Im intravasalen Kompartiment findet die Erythro- und Thrombopoese statt, während die Granulo-, Mono- und Lymphopoese extravasal im Knochenmark lokalisiert ist (Olah und Vervelde, 2008).

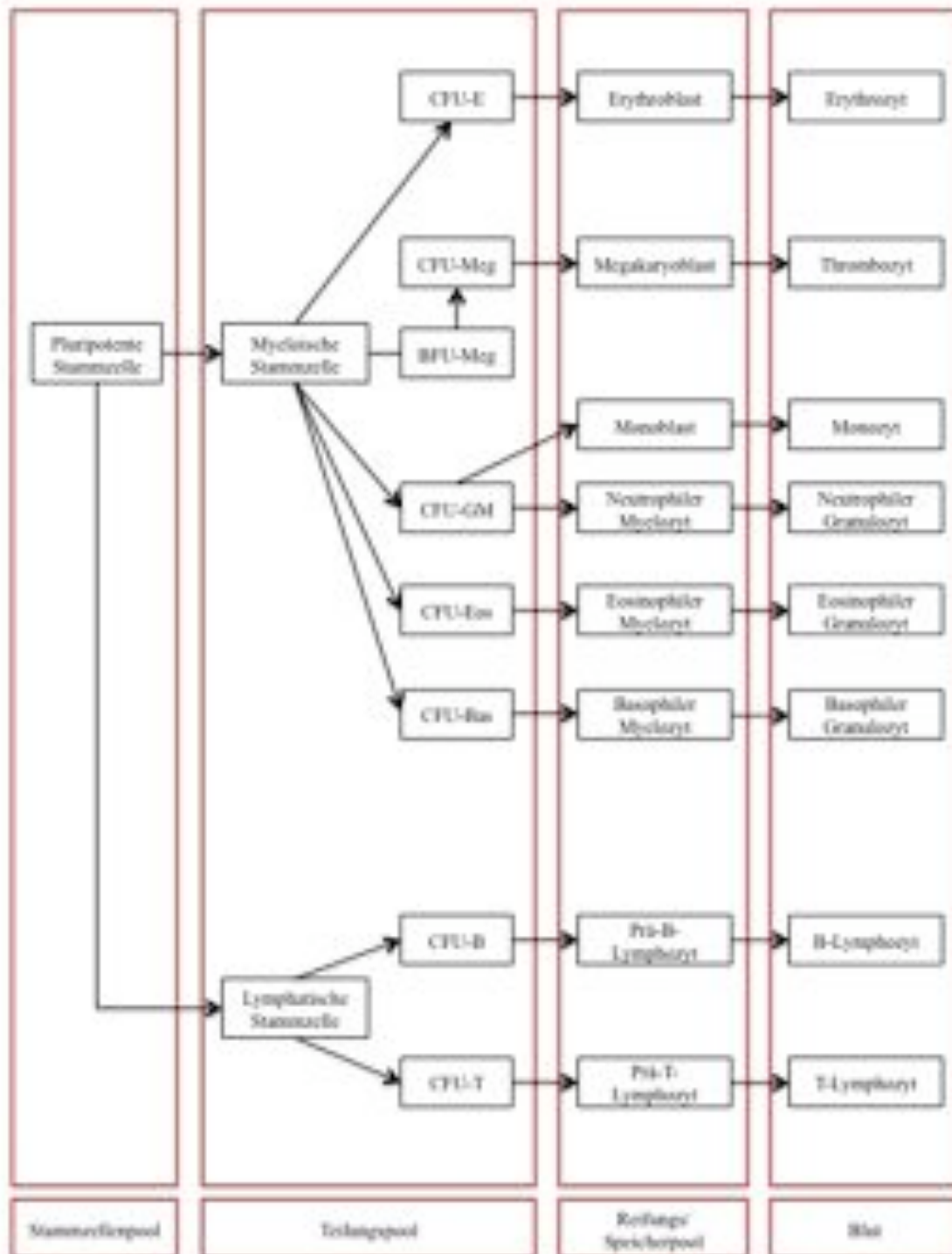
Ausgangszelle für sämtliche differenzierte Blutzellen ist eine nichtdeterminierte, pluripotente hämatopoetische Stammzelle (Hämozytoblast). Im Englischen wird sie auch HSC (engl.: hematopoetic stem cell) oder, da sie fähig ist in der Milz hämatopoetische Zellkolonien zu bilden, CFU-S (engl.: colony forming units in the spleen) genannt (Welsch, 2003). Sie ist Bestandteil des sogenannten Stammzellpools, der nur etwa 0,01 % sämtlicher Knochenmarkszellen darstellt. Der Großteil dieser Zellen befindet sich in der Ruhephase des Zellteilungszyklus (G<sub>0</sub>). Nur ein kleiner Teil der Stammzellen teilt sich aufgrund von Mediatoren mitotisch (Liebich, 2004). Zu diesen stimulierenden Faktoren gehören vor allem Interleukine und koloniestimulierenden Faktoren, die von Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und T-Zellen gebildet werden (Welsch, 2003). Diese vermitteln ihre Wirkungen über Oberflächenrezeptoren der Zielzellen. Sie regulieren die Teilung, Vermehrung, Differenzierung, Mobilität und Aktivität der hämatopoetischen Zellen (Liebich, 2004).

Teilt sich nun eine pluripotente Stammzelle, so verbleibt eine Tochterzelle im Stammzellpool, während die andere sich innerhalb der Hämatopoese weiterentwickelt. Das nächste Stadium in dem sich die Zelle befindet wird Teilungspool genannt. In diesem Pool befinden sich die determinierten hämatopoetischen Vorläuferzellen, auch als Progenitorzellen bezeichnet (Liebich, 2004). Zunächst differenziert sich die pluripotente Stammzelle entweder zu einer myeloischen oder einer lymphatischen Progenitorzelle. Da diese Zellen sich entweder zu Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten (myeloische Zellreihe) oder zu B- und T-Lymphozyten (lymphatische Zellreihe) differenzieren und somit in ihren Entwicklungsmöglichkeiten etwas eingeschränkt sind, werden sie als multipotent bezeichnet (Wurzinger und Peschl, 2005). In ihrem weiteren Verlauf differenzieren sich die multipotenten Stammzellen zu einer einzigen Zellart. Die Tochterzellen werden auch CFU (engl.: colony forming units) genannt und tragen je nach Zielzelle einen Zusatz, z.B. CFU-E, wenn die ausgereifte Zelle ein Erythrozyt ist. Mit Ausnahme von Granulozyten und Monozyten, die eine gemeinsame Progenitorzelle haben (bipotente CFU-GM), bezeichnet man die CFU als unipotent (Wurzinger und Peschl, 2005). Mikroskopisch lassen sich die verschiedenen Arten von Stammzellen/Progenitorzellen nicht unterscheiden. Sie ähneln allesamt großen Lymphozyten. Charakteristisch ist jedoch ein Zelladhäsionsmolekül CD34, welches temporär bei ihnen zu finden ist und während der weiteren Ausreifung wieder verschwindet. Etwa 1-3 % aller im Knochenmark vorkommenden Zellen sind CD34 positiv (Wurzinger und Peschl, 2005). Die nächste Stufe zur reifen Blutzelle ist der Reifungs- und Speicherpool. Die Blasten werden auch Vorläuferzellen bzw.

Precursorzellen genannt (Gassmann und Lutz, 2004). Sie sind deutlich von einander unterscheidbar und stellen das erste Glied der verschiedenen Zellreihen dar (Wurzinger und Peschl, 2005). Durch weitere Differenzierung entstehen schließlich reife Erythrozyten (Erythropoese), Monozyten (Monopoese), Granulozyten (Granulopoese), Thrombozyten (Thrombopoese) und Lymphozyten (Lymphopoese) (Liebich, 2004).

Auf die verschiedenen Entwicklungsreihen wird in den entsprechenden Kapiteln näher eingegangen.

Abbildung 2: Schema der Hämatopoese:



BFU-Meg=Burst forming unit-Megakaryozyt, CFU-Meg=Colony forming unit Megakaryozyt. Weitere Abkürzungen s. Text.

Quelle: (Gassmann und Lutz, 2004)



### **2.1.3 Spezielle Hämatologie des Straußes**

Der Strauß gehört phylogenetisch zu einer der ältesten und größten Vogelarten. In diesem Zusammenhang könnten einige Besonderheiten stehen, die das Blut des Straußes von anderen Vogelarten unterscheidet. Verglichen mit anderen Vogelspezies hat der Strauß eine geringere Gesamterthrozytenanzahl welche durch einen erhöhten MCV ausgeglichen wird. Die höhere Sauerstoffbindungsaffinität des Blutes steht in engem Zusammenhang mit Inositoltetrakisphosphat (IP4) welches bisher nur in Erythrozyten des adulten Straußes nachgewiesen wurde (Isaacks et al., 1977).

## **2.2 Charakterisierung der einzelnen Blutzellen**

### **2.2.1 Erythrozyten**

#### **2.2.1.1 Allgemeines**

Reife aviäre Erythrozyten sind für gewöhnlich größer als Erythrozyten der Säugetiere, jedoch kleiner als die der Reptilien und Amphibien. Die Größe der roten Blutkörperchen variiert, abhängig von der jeweiligen Vogelspezies zwischen 10,7-15,8 x 6,1-10,2  $\mu\text{m}$  (Sturkie und Griminger, 1986). Ebenso hängt die Lebensspanne der Erythrozyten von der jeweiligen Spezies ab. Zum Beispiel beträgt die Überlebenszeit von Hühnererythrozyten 28-35 Tage, die der Tauben 35-45 Tage und die der Wachtel 33-35 Tage (Campbell, 2004). Somit haben die Erythrozyten der Vögel eine im Durchschnitt kürzere Überlebensdauer, verglichen mit der der Säugetiere, die speziesabhängig zwischen 28 und 100 Tage betragen kann (Fitzgerald, 1969). Sie können aber aufgrund dessen bei regenerativer Anämie, den Blutverlust besser kompensieren als die meisten Säugetiere (Campbell, 2004). Bei chronischen Krankheiten, die eine nicht-regenerative Anämie verursachen, zB. Aspergillose, Aviäre Tuberkulose oder Clamydiose entwickeln Vögel jedoch schneller als Säugetiere eine Anämie aufgrund der kürzeren Lebensspanne der Erythrozyten (Easley, 1985). Alter, Geschlecht, Hormone, Hypoxie, Umwelteinflüsse und Krankheiten nehmen Einfluß auf die totale Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und den Hämatokrit (Hebert et al., 1989). Im Normalfall steigt die Erythrozytenzahl sowie der Hämatokrit mit dem Alter an und ist grundsätzlich bei geschlechtsreifen männlichen Tieren höher. Dies ist auf den positiv blutbildenden Effekt von Androgen und Thyroxin zurückzuführen sowie auf den Erythropoese hemmenden Effekt von Östrogenen (Hebert et al., 1989).

### 2.2.1.2 Bildung

Die Blutzellbildung beginnt extraembryonal in der Wand des Dottersacks (megaloblastische Phase), geht dann über auf Leber und Milz (hepato-lienale Phase) und wird in den späteren Abschnitten der intrauterinen Entwicklung vom roten Knochenmark übernommen (medulläre Phase). Das hämatopoetische Gewebe in Leber und Milz reduziert sich allmählich, kann aber bei Bedarf wieder aktiviert werden (Liebich, 2004).

Beim erwachsenen Tier findet die Blutbildung im Inneren der Sinusoide des Knochenmarks statt (Hodges, 1977). Die Ultrastruktur vom embryonalen sowie adulten Knochenmark der Vögel unterscheidet sich von dem der Säugetiere (Campbell, 1967; Sorrell und Weiss, 1982). Die Äste der Knochenmarkskapillaren münden in Kapillaren von einem Durchmesser über 10 µm, sogenannte Sinusoide, die ein diskontinuierliches Endothel aufweisen (Wurzinger und Peschl, 2005) und die im Unterschied zu anderen Blutgefäßen keine deutlich ausgebildete Basallamina aufweisen. Durch die relativ weiten Lücken zwischen den Endothelzellen, den sogenannte Migrationsporen (Liebich, 2004), treten die ausgereiften Erythrozyten über Diapedese in die Zirkulation ein (Bounous und Stedman, 2000; Wurzinger und Peschl, 2005). Die Erythropoese bis zur Stufe des Retikulozyten findet im engen Kontakt zu Makrophagen des Knochenmarkstromas statt. Diese sogenannten Ammenzellen übernehmen einen Teil der Versorgung der Zellen der Erythropoese mit Eisen und anderen Substraten. Daraus resultiert das typische Bild der ‚Erythroblasteninseln‘ im Knochenmark, mit einem zentralen Makrophagen, um den herum Erythroblasten gruppiert sind (Wurzinger und Peschl, 2005).

Es werden mehrere Blutbildungsstadien voneinander unterschieden (Hawkey und Dennett, 1989). Die Erythropoese nimmt ihren Ausgang bei der pluripotenten Stammzelle. Aus dieser geht die myeloische Vorläuferzelle hervor, aus welcher sich schließlich der Proerythroblast entwickelt (Kraft et al., 1997). Bei den Proerythroblasten handelt es sich um große runde stark basophile Zellen, die einen ebenfalls großen runden zentral liegenden Kern enthalten. Das nukleare Chromatin ist typischerweise grob granuliert (Campbell und Ellis, 2007). Aus einem Proerythroblasten können durch bis zu fünf aufeinanderfolgenden Teilungen maximal 32 reife Erythrozyten entstehen. Die Zahl der Zellteilungen wird durch Erythropoetin und anderen Wachstumsfaktoren kontrolliert und bei Bedarf angepasst (Wurzinger und Peschl, 2005).

Die basophilen Erythroblasten bilden die nächste Stufe der Blutzellentwicklung. Sie gleichen den Proerythroblasten durch den großen zentral liegenden Kern, der typischerweise von einem schmalen Saum aus basophilem Zytoplasma umgeben ist (Campbell und Ellis, 2007). Basophile Erythroblasten inkorporieren durch Mikropinozytose vermehrt Ferritin von anliegenden Makrophagen und Retikulumzellen, das sie zur Hämoglobinsynthese benötigen (Liebich, 2004). Rötliche Areale im

Zytoplasma der basophilen Erythroblasten weisen auf diese beginnende Hämoglobinsynthese hin. Die Zellen der nächsten Entwicklungsstufe sind etwas kleiner als die vorangegangenen Zellstadien, jedoch ähneln sie sich in ihrer runden Form. Sie werden anhand des Erscheinungsbildes ihres Zytoplasmas in drei Gruppen eingeteilt. Der frühe polychromatische Erythroblast enthält homogenes basophiles Zytoplasma und einen runden Nukleus mit kondensiertem Chromatin. Die nächste Entwicklungsstufe, der späte polychromatische Erythroblast ist kleiner als sein Vorgänger. Hier ist erstmals eine Formveränderung vom runden zu einem leicht ellipsoiden Nukleus zu erkennen. Die dritte und letzte Stufe besetzt der orthochrome Erythroblast (azidophile Erythroblast). Dieser hat eine ellipsoide Form und ein eosinophiles Zytoplasma (Campbell und Ellis, 2007). Die zunehmende Eosinophilie bzw. Azidophilie ist auf die vermehrte Menge an azidophilem Hämoglobin im Zytoplasma zurückzuführen (Welsch, 2003).

Der Retikulozyt bildet die vorletzte Stufe zum reifen Erythrozyt. Diese Zellen zirkulieren bereits im peripheren Blut des Vogels. Sie haben eine abgeflachte ellipsoide Form. Retikulozyten sind etwas größer und runder im Vergleich zu reifen Erythrozyten und enthalten feine zytoplasmatische Granula (Hodges, 1977). Sie behalten ihren Zellkern und das Chromatin ist kondensiert (Campbell und Ellis, 2007). Retikulozyten sind metabolisch stärker aktiv als ihre reifen Nachfolger. Um mehr Energie zu produzieren, haben sie einen höheren Anteil an Mitochondrien und eine höhere Aktivität glykolytischer Enzyme. Sie reifen in der Blutbahn innerhalb von 24 bis 48 Stunden zu Erythrozyten heran und verlieren dabei an Größe, Transferrin, Fibronektinrezeptoren. Gleichzeitig reduziert sich die Anzahl der Zellorganellen. Die enzymatische Aktivität vermindert sich und die Hämoglobinkonzentration steigt an (Jain, 1993). Die aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien der roten Blutkörperchen ähneln sich im Wesentlichen bei Vogel und Säugetier. In der Literatur kann es jedoch zu Variationen der Terminologie kommen (Lucas und Jamroz, 1961; Hawkey und Dennett, 1989; Bounous und Stedman, 2000; Campbell, 2004; Campbell und Ellis, 2007).

Zusammenfassend kann die Entwicklung vom Proerythroblasten zum reifen Erythrozyt im Folgenden beschrieben werden: Die Kerngröße verringert sich und ändert die Form von rund zu ellipsoid, das Chromatin kondensiert zunehmens, die Menge des Zytoplasmas nimmt zu und die Hämoglobinkonzentration erhöht sich (erkennbar durch vermehrte Eosinophilie). Die Zellform ändert sich von rund zu oval (Campbell, 2004). Beim Säugetier einschließlich Mensch tritt gegen Ende der Erythropoese durch zunehmende Verdichtung und Schrumpfung des Nukleus eine Kernpyknose ein, der sich eine Kernausschleusung (E nukleation) anschließt. Bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen (Ausnahme: Zyklostomen) tritt der Vorgang der E nukleation nicht ein. Die Erythrozyten dieser Tierarten sind deshalb kernhaltig und größer (Liebich, 2004).

Sinkt der arterielle Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) so reagiert der Organismus mit Ausschüttung eines Hypoxie-induzierten-Faktor-1 (HIF1). Dieser Faktor veranlasst die Transkription von Erythropoetin (Wenger und Gassmann, 1997). Beim Vogel wird die Erythropoese durch einen humoralen Faktor stimuliert, der sich jedoch von Erythropoetin insofern unterscheidet, als dass er nicht in Säugetieren zur Erythropoese führt und weder von Sialidase, noch von Erythropoetin-Antikörpern inaktiviert wird. Da dieser Faktor jedoch durch Trypsin abgebaut wird, kann davon ausgegangen werden, dass er wie auch Erythropoetin eine Proteinstruktur besitzt (Rosse und Waldmann, 1966). Dieses Glykoprotein wird bei abnehmender Sauerstoffspannung im Gewebe von der Niere gebildet, in die Blutbahn ausgeschüttet und wirkt direkt am Ort der Blutbildung im Knochenmark als ein „Überlebensfaktor“. Er verhindert die Apoptose der Prorubrizyten und somit können diese zu Erythrozyten reifen (Jain, 1993; Semenza, 1994; Lösch et al., 2000; Campbell, 2004). Die Lebensspanne der Erythrozyten beläuft sich beim Huhn auf 28-35, bei der Ente auf 39-42 und bei der Wachtel auf 33-35 Tage. Mit zunehmenden Alter der roten Blutzellen kondensiert der Zellkern zunehmend und wird schließlich pyknotisch. Die enzymatische Tätigkeit lässt nach und die Zelle wird fragil (Hodges, 1977). Der Abbau der Erythrozyten geschieht vorrangig in der Milz. Die roten Blutkörperchen treten durch die Endkapillaren in erweiterte Sinusräume (rote Milzpulpa) über, in deren Wänden Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) alternde Erythrozyten aufgrund veränderter Oberflächenmembranen erkennen. Diese werden dann von den Makrophagen des MPS enzymatisch zerstört, das eisenfreie Porphyringerüst des Häm in die Leber transportiert und zu den Gallenfarbstoffen Biliverdin und Bilirubin transformiert. Das aus dem Hämoglobin frei werdende Ferritin wird als Hämosiderin in Makrophagen gespeichert und dient im Knochenmark den Ammenzellen zur Neubildung von Hämoglobin (Liebich, 2004).

### 2.2.1.3 Morphologie

Die Anzahl der Erythrozyten variiert unter den Vogelarten und ist abhängig von extrinsischen und intrinsischen Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Jahreszeit, Temperatur und Legezyklus (Hodges, 1977). Bei der Zählung der Erythrozyten der Wachtel weisen die weiblichen Tiere mit  $4,2 \times 10^{12}$  pro Liter Blut eine niedrigere Anzahl und die männlichen Tiere mit  $5 \times 10^{12}/L$  eine höhere Anzahl an roten Blutkörperchen auf (Atwal et al., 1964). Beim adulten Huhn erreicht die Erythrozytenzahl beim weiblichen Tier Werte um  $2,7-3 \times 10^{12}/L$ , beim männlichen Tier  $3,2-3,8 \times 10^{12}/L$  (Hodges, 1977). Dieser Unterschied ist zurückzuführen auf den Einfluss von Androgenen, Thyroxin und Östrogenen auf die Blutbildung (Atwal et al., 1964). Beim adulten Strauß wurden mittlere Werte von 1,75 bzw. 2,1 und  $2,4 \times 10^{12}$  pro Liter Blut gezählt (Palomeque et al., 1991; Mushi et al., 1999; Bonadiman et al., 2009).

Die Größe der roten Blutkörperchen variiert, abhängig von der jeweiligen Vogelspezies, zwischen 10,7-15,8  $\mu\text{m}$  Länge und 6,1-10,2  $\mu\text{m}$  Breite (Sturkie und Griminger, 1986) bzw. 9,2-14,2  $\mu\text{m}$  Länge und 4,6-8,3  $\mu\text{m}$  Breite (Lucas und Jamroz, 1961). Der Mittelwert der Länge des Kerns, gemessen bei fünf verschiedenen Vogelarten, beträgt 4,8  $\mu\text{m}$ , der Mittelwert der Breite 3,1  $\mu\text{m}$  (Hodges, 1977). Beim adulten Strauß haben die Erythrozyten eine Länge von 15,7-18  $\mu\text{m}$  und die Breite variiert zwischen 9-12,4  $\mu\text{m}$ . Die Länge des Nukleus hat einen Wert zwischen 5,1-7,9  $\mu\text{m}$  und eine Breite von 2,8-4,5  $\mu\text{m}$  (Mushi et al., 1999). Das mittlere Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) gibt die mittlere Zellgröße der peripheren Erythrozyten an und wird in Femtoliter gemessen. Dieser Wert variiert bei den verschiedenen Vogelspezies zwischen 135 und 302 fL/Zelle (Clark et al., 2009). Beim adulten Strauß wurden von verschiedenen Autoren Mittelwerte zwischen 201,5 und 251,5 fL/Zelle gemessen (Palomeque et al., 1991; Mushi et al., 1999; Bonadiman et al., 2009).

Der physiologische Hämatokrit liegt bei einem Vergleich von 16 verschiedenen Vogelspezies zwischen 33 und 63 %, mit einem Mittelwert von 48 % (Clark et al., 2009) Der adulte Strauß besitzt einen mittleren Hämatokrit von 43 % (Mushi et al., 1999; Bonadiman et al., 2009) bzw. 48 % (Palomeque et al., 1991).

Die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) beschreibt das Volumen, welches das Hämoglobin in den Erythrozyten einnimmt und wird in g/dl gemessen (Hodges, 1977). Untersuchungen von Legehennen haben gezeigt, dass am Ende einer Legeperiode die MCHC am niedrigsten ist (30-31 g/dl), während der Legepause ansteigt und einen Höhepunkt erreicht (40-41 g/dl) kurz bevor die neue Legeperiode beginnt. Die MCHC der männlichen Tiere liegt in etwa in dem Bereich der Hennen während der Legepause (Bell et al. 1964). Der Durchschnittswert des MCHC beim adulten Strauß liegt bei 38,6 g/dl (Mushi et al., 1999).

Juvenile Vögel weisen laut zahlreichen Studien niedrigere Werte bei Erythrozytenzahlen, Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit auf (Hodges, 1977; Palomeque et al., 1991; Campbell und Ellis, 2007).

Der reife Erythrozyt der Vögel besitzt eine ellipsoide und bikonkave Form sowie einen ovalen zentral gelegenen Zellkern (Weyrauch und Smollich, 1998; Campbell und Ellis, 2007). Im Gegensatz zu den kernlosen Erythrozyten der Säugetiere sind sie weniger deformierbar und haben eine höhere Konzentration an freiem zytoplasmatischen Hämoglobin (Smith et al., 2000). Das Chromatin ist einheitlich geklumpt und verdichtet sich mit zunehmenden Zellalter. Unter dem Elektronenmikroskop betrachtet stellt sich der Erythrozyt im Längsschnitt irregulär linsenförmig dar mit einem zentral liegenden ovalen Kern, der sowohl peripher als auch zentral stark kondensiertes Chromatin enthält. Neben dem Hauptbestandteil Hämoglobin, welches so gut wie alle weiteren Strukturdetails im

Zytoplasma verdeckt, konnten, nach dessen Extraktion, eine äußere fragile Kernmembran und wenige Zellorganellen, darunter Mitochondrien, bei jungen Erythrozyten noch vereinzelt Ribosomen und Komponenten des Zytoskeletts festgestellt werden (Harris und Brown, 1971; Barrett und Dawson, 1974; Hodges, 1977). Bei aviären Erythrozyten konnten Intermediärfilamente, Mikrotubuli und Aktinfilamente nachgewiesen werden (Barrett und Dawson, 1974; Hodges, 1977). Die Fibrillen der Intermediärfilamente verlaufen von der Plasmamembran um die Organellen und verankern sich in der äußeren Hülle des Zellkerns und fixieren somit Organellen und Nukleus in deren Position. Ein weiterer bemerkenswerter Bestandteil im Zytoplasma der aviären Erythrozyten ist das marginale Band aus Mikrotubuli. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Formveränderung der Erythrozyten während der verschiedenen Entwicklungsstufen (Barrett und Dawson, 1974).

Mit einem Anteil an 1-5 % der Erythrozytenpopulation sind die Retikulozyten im Blutbild vertreten. Sie stellen die unreife Vorstufe der Erythrozyten dar. Der Retikulozyt ist etwas größer und das Kernchromatin ist lockerer strukturiert als bei ausgereiften Erythrozyten (Clark et al., 2009). Er enthält Reste von ribosomaler RNA, welche sich bei Färbungen mit Methylenblau oder Brilliantkresylblau dunkel hervorhebt und deren netzförmiges Erscheinungsbild dem Retikulozyt seinen Namen gibt (Fernandez und Grindem, 2000; Sinowatz und Hees, 2000; Kummerfeld, 2007). Dieses Netzwerk existiert vorher nicht, sondern ist ein Artefakt, welches bei der Färbung durch die Präzipitation von ribosomalen Ribonukleinsäuren und Proteinen gebildet wird (Bain und Huhn, 1997; Fernandez und Grindem, 2000). Es werden aggregierte und getüpfelte Retikulozyten voneinander unterschieden (Fernandez und Grindem, 2000). Wenn diese Zellen reifen, verringert sich das dichte retikuläre Material im Zytoplasma, verteilt sich und führt schließlich zu dem punktierten Erscheinungsbild des reifen Retikulozyten (Campbell, 2004). Die aggregierten Retikulozyten stellen die frühe Form dar und werden auch polychromatische Zellen, Polychromatophile oder Polychromatozyten genannt (Alsaker et al., 1977; Hawkey und Dennett, 1989; Jain, 1993). Diese verstärkte Anfärbbarkeit (Polychromasie) entsteht aufgrund einer Aufnahme sowohl von Eosin durch Färbung des Hämoglobins als auch basischer Farbstoffe durch Färbung der ribosomalen RNA. Es kann deshalb eine Beziehung zwischen den beiden Zelltypen hergestellt werden. Da jedoch nur die unreife Form der Retikulozyten polychromatisch ist, ist die Anzahl der Gesamtkretikulozyten in einem normalen Blutbild stets höher als die Anzahl der polychromatischen Zellen (Bain und Huhn, 1997). Polychromatische Zellen sind ein Indikator für Erythrozytenregeneration und ihre Zahl steigt beispielsweise bei regenerativer Anämie (Kummerfeld, 2007). Ihr Auftreten ist ein sicherer Indikator für Erythropoese und erlaubt Rückschlüsse auf die Knochenmarkaktivität. Somit ist die Einteilung einer Anämie in regenerativ und nicht-regenerativ möglich. Dadurch, dass Retikulozyten typischerweise größer sind als ihre reifen Nachfolger, wird ihr Auftreten auch als Makrozytose oder Anisozytose beschrieben (Fernandez und Grindem, 2000).

### Variationen in der Morphologie:

Abweichungen in der Größe der Erythrozyten werden als Anisozytose bezeichnet und werden anhand des mittleren korpuskulären Volumen (MCV) bestimmt (Campbell, 2004). Dieser Wert variiert bei den verschiedenen Vogelarten zwischen 135 und 302 fL/Zelle (Clark et al., 2009). Zu den makrozytischen Zellen, die einen MCV überhalb des Normalbereich aufweisen, werden unter anderem die neu in die Zirkulation entlassenen Blutzellen gezählt, die älteren Erythrozyten weisen oftmals mikrozytische Werte auf (Campbell und Ellis, 2007). Da Erythrozyten sich teilen, sind zum Teil Mitosefiguren im Blutaussstrich sichtbar (Clark et al., 2009). Des Weiteren können hypochromatische Erythrozyten gefunden werden. Sie sind abnormal blass und zeigen häufig zytoplasmatische Vakuolen um einen runden pyknotischen Zellkern. Diese Abweichung zeigt sich beispielsweise bei einem Eisendefizit und der daraus resultierenden niedrigen Hämoglobinkonzentration (Campbell, 2004). Abweichungen von der ovalen Zellform der Erythrozyten wird als Poikilozytose beschrieben und diese tritt vermehrt bei Dysgenese der Blutzellen bzw. Krankheit auf. Weniger als 1 % der reifen Erythrozyten besitzen keinen Nukleus. Diese Zellvariante wird als Erythroplastid beschrieben (Campbell, 2004; Clark et al., 2009). Neben diesen Varianten können auch abweichende Strukturen innerhalb der Erythrozyten festgestellt werden. Zu diesen gehören die sogenannten ‚Heinz bodies‘, die bei oxidativer Denaturierung von Hämoglobin entstehen und sich als kleine helle, meist exzentrisch im Zytoplasma gelegene Areale darstellen. Die basophile Tüpfelung ist ebenfalls eine, nicht zum regulären Erscheinungsbild gehörende Variante der Erythrozyten. Diese kommt zustande wenn sich Ribosomen zu kleinen Granula zusammenlagern (Campbell, 2004).

#### **2.2.1.4 Zytochemische Eigenschaften**

Durch den Verlust vieler Zellorganellen fehlen dem Erythrozyt Enzyme, die für Stoffwechselfvorgänge dieser Organellen nötig sind (Horn et al., 2003). Da der aviäre Erythrozyt jedoch Mitochondrien enthält (Hodges, 1977), behält er mit diesen auch die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation, des Zitratzyklus und der Atmungskette (Horn et al., 2003). Ein weiteres sehr wichtiges Enzym ist die Methämoglobin-Reduktase. Die Hauptaufgabe der Erythrozyten besteht darin Sauerstoff zu transportieren. Beim Sauerstofftransport wird das Hämoglobin oxygeniert, die Wertigkeit des Eisenatoms ändert sich dabei nicht. Des Öftern kann es vorkommen, dass Hämoglobin spontan und ungewollt oxidiert und  $\text{Fe}^{2+}$  wird durch Elektronenabgabe zu  $\text{Fe}^{3+}$ . Das so entstandene Methämoglobin kann keinen Sauerstoff transportieren. Die Methämoglobin-Reduktase sorgt für die Reduktion zu normalem Hämoglobin (Horn et al., 2003). Des Weiteren besitzen aviäre Erythrozyten Glukosephosphatisomerasen, Pyruvat- und Phosphofruktokinase, Aldolasen, Enolasen, Glyceraldehydphosphat- und Laktatdehydrogenasen,

Monophosphatglyceromutasen, Acetylcholinesterase und Gluthationreduktasen (Melrose und Nicol, 1992). Bei der Auswertung von enzymhistochemischen Nachweisen ist zu beachten, dass das Enzymlevel vom Alter der Zelle abhängig ist (Nicol et al., 1988).

### 2.2.1.5 Zytoskelett der Erythrozyten

Ihre abgeflachte Form verdanken die Erythrozyten einem sogenannten Membranskelett. Dabei handelt es sich um ein flächiges Netz aus Spektrinfilamenten, die durch kurze Aktinelemente zusammengehalten werden (Bennett, 1990). Durch Adaptorproteine wie Protein 4.1 und Ankyrin, welches beim Vogel durch das Phosphoprotein Goblin ersetzt wird (Moon und Lazarides, 1984), wird das Netz an integralen Proteinen der Plasmamembran verankert (Bennett, 1990). Dieses erythrozytäre Membranskelett kontrolliert die Verformbarkeit der Zelle, reguliert exozytische Prozesse und bewahrt die Zellpolarität (Mangeat, 1988). Die Erythrozyten enthalten ebenfalls Mikrotubuli (Meves, 1911; Behnke, 1970; Beltramo et al., 1987). Anders als bei anderen Tierklassen, sind bei aviären Erythrozyten alle Mikrotubuli peripher, direkt unterhalb der Plasmamembran als marginales Band angeordnet (Swan und Solomon, 1984; Winckler und Solomon, 1991). Die Mikrotubuli besitzen eine vergleichsweise hohe Stabilität um ihrer Aufgabe als Stütze während der Zirkulation gerecht werden zu können (Linhartova et al., 2002). Das marginale Band besteht bei Hühnererythrozyten aus circa 10 bis 16 Mikrotubuli pro Zelle (Behnke, 1970; Swan und Solomon, 1984; Beltramo et al., 1987). Barrett und Dawson wiesen beim weißen Leghorn Huhn nach, dass die Mikrotubulizahl bei jungen Erythrozyten ein Maximum von 40 aufweist und diese mit Älterwerden der Zelle auf 10 abfällt (Barrett und Dawson, 1974). Die Mikrotubuli sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zusammengesetzt (Swan und Solomon, 1984; Rudiger und Weber, 1993). Mehrere Autoren beobachteten dieses marginale Band (zu Beginn des 19. Jahrhunderts von Meves auch als „Randreifen“ beschrieben) bei kernhaltigen Erythrozyten der Fische, Amphibien, Reptilien, Vögel (Meves, 1911; Fawcett und Witebsky, 1964; Maser und Philpott, 1964) sowie bei Säugetieren nach (Haydon und Taylor, 1965; Malawista und Bensch, 1967). Da die Erythrozyten, ob kernhaltig oder nicht, keine kugelige Form aufweisen, stimmten viele Autoren Meves These zu, dass das marginale Band aus Mikrotubuli für die Aufrechterhaltung der Scheibenform mitverantwortlich sei (Meves, 1911; Behnke, 1970). Bei einem Versuch von Behnke, bei dem das marginale Band aus Thrombozyten und Erythrozyten von Hühnern experimentell entfernt wurde, verloren die Thrombozyten, nicht jedoch die Erythrozyten, ihre typische Form. Somit konnte bewiesen werden, dass Mikrotubuli nicht hauptsächlich bzw. nicht bei allen Zelltypen für die Aufrechterhaltung der Zellform verantwortlich sind (Behnke, 1970). In Bezug auf diese Fragestellung haben sich Barrett und Dawson (1974) mit der Reifung und Entwicklung der aviären Erythrozyten und die somit verbundene Transformation von runder zu ellipsoider Form



befasst. Die Abflachung der Vorläuferzelle erfolgt kurz nach der letzten mitotischen Teilung im Reifeprozess zeitgleich mit dem Zusammenschluß loser Mikrotubuli zum marginalen Band. Werden durch Chemikalien wie Alkaloiden oder durch Kältebehandlung die Mikrotubuli in ihrer Bildung arretiert, so behält die Vorläuferzelle ihre runde Form bei. Hat sie jedoch einmal ihre ellipsoide Form angenommen, so ändert sich diese auch nach späterem Entfernen der Mikrotubuli nicht (Barrett und Dawson, 1974). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Mikrotubuli in der Aufrechterhaltung der Form der reifen aviären Erythrozyten keine große Rolle spielen, jedoch ausschlaggebend für die Formveränderung in den frühen Entwicklungsstadien sind (Behnke, 1970; Barrett und Dawson, 1974). Die aviären Erythrozyten besitzen des Weiteren Intermediärfilamente, hauptsächlich bestehend aus Vimentin und Synemin (Granger et al., 1982). Dabei bildet das 52,000 Da schwere Polypeptid Vimentin die Hauptkomponente. Synemin, mit einer Molekularmasse von 250,000 Da, bindet in periodischen Abständen von 180 nm an das Vimentinfilament und wirkt somit als Verbindungsstruktur (Moon und Lazarides, 1983). Vimentin und Synemin bilden so ein schlaufenförmig in sich verflochtenes Netzwerk (Granger et al., 1982). Das Verhältnis von Vimentin zu Synemin beträgt dabei 50:1 (Granger et al., 1982). Elektronenmikroskopisch betrachtet geht das Vimentin eine enge Bindung mit dem Polypeptid Ankyrin (Georgatos und Blobel, 1987) des Membranskeletts ein, hat jedoch auch starke Assoziation mit dem Kern, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das dreidimensionale Netzwerk Nukleus und Membran verbindet, die Form der Zelle aufrecht erhält und gleichzeitig die zentrale Position des Kerns sichert. (Behnke, 1970; Harris und Brown, 1971; Lazarides, 1980; Granger et al., 1982; Moon und Lazarides, 1983; Georgatos und Blobel, 1987). Dabei unterscheiden sich die Bindungsstellen an Kern und Membran deutlich voneinander. Entlang der Kernhülle sind Rezeptoren lokalisiert, die Polypeptide beinhalten, welche selektiv an die Carboxylgruppe des Vimentin binden. Die Plasmamembran dagegen beinhaltet Rezeptoren, an denen die Aminogruppe des Vimentin bindet. Auf diese Weise erhalten die eigentlich apolaren, 10 nm langen Vimentinfilamente durch die funktionale Gegensätzlichkeit der Rezeptortypen polaren Charakter (Georgatos und Blobel, 1987).

Genauerer zu Struktur und Aufbau der verschiedenen Elemente des Zytoskelett s. Kapitel 2.6.

### 2.2.1.6 Aufgaben

Die Hauptaufgabe der roten Blutkörperchen liegt in der Versorgung des Körpers mit Sauerstoff. Dieser wird von den Erythrozyten beim Passieren der Lunge aufgenommen und während der Zirkulation in den Kapillargebieten des Körpers an das Gewebe abgegeben. Der Sauerstoff ist im Zytoplasma der Erythrozyten an den Blutfarbstoff Hämoglobin gebunden (Lösch et al., 2000). Das aviäre Hämoglobin gleicht dem der Säugetiere durch seine vier eisenhaltigen Untergruppen, jedoch unterscheiden sie sich in ihrem Sauerstoffbindungsvermögen (Hebert et al., 1989). Dies ist auf die unterschiedlichen Phosphatgruppen zurückzuführen. Das Hämoglobin der Vögel enthält Myoinositol-Pentophosphat (IP<sub>5</sub>), welches eine niedrigere Affinität zum Sauerstoff hat und ihn somit schneller und leichter an das umliegende Gewebe abgibt. Das Hämoglobin von Säugetieren enthält dagegen 2,3-Diphosphoglycerate (DPG), die den Sauerstoff stärker an sich binden (Coates, 1975). Untersuchungen haben ergeben, dass der Strauß eine Phosphatverbindung aufweist, die bisher nicht in Erythrozyten anderer Tierarten nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich hierbei um Inositol-tetrakisphosphat (IP<sub>4</sub>), welches den Hauptanteil an organischem Phosphat in den Erythrozyten des adulten Straußes ausmacht. IP<sub>5</sub> ist ebenfalls vertreten, aber nur etwa halb soviel wie IP<sub>4</sub>. Diese einzigartige Phosphatkombination erklärt die vergleichsweise hohe Sauerstoffaffinität (P<sub>50</sub>=24,5) der Erythrozyten des Straußes (Isaacs et al., 1977). Diese Sauerstoffbindungsaffinität ist beim Vogel, anders als beim Säugetier (CO<sub>2</sub>-Partialdruck), durch den pH-Wert des Blutes reguliert. Fällt der pH-Wert, so sinkt die Sauerstoffaffinität (Bohr Effekt), vermutlich verknüpft mit dessen Bindung zu IP<sub>5</sub> (Isaacs et al., 1980). Der CO<sub>2</sub>-Gehalt des Blutes hat nur einen minimalen Effekt auf die Sauerstoffbindungsaffinität, da aufgrund des effizienten Respirationssystems der Vögel davon ausgegangen wird, dass das CO<sub>2</sub>-Level konstant bleibt. Da jedoch ein eventueller Anstieg von CO<sub>2</sub> im Blut durch das Kohlensäure-Hydrogenkarbonat-System abgepuffert wird, und dies durch Ansammlung von sauren HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zur pH-Senkung führt, so spielt der CO<sub>2</sub>-Gehalt des Blutes zumindest eine indirekte Rolle (Bounous und Stedman, 2000). Auf das Vorkommen von Blutgruppenantigenen und anderen Kohlenhydrat- und Proteinkomplexen auf der Oberfläche der Erythrozyten wird noch in Kapitel 2.7 eingegangen.

## 2.2.2 Thrombozyten

### 2.2.2.1 Allgemeines

Die Thrombozyten der Vögel sind komplexe multifunktionale Zellen (Stinson et al., 1979). Sie stellen nicht nur das Äquivalent zu den Blutplättchen der Säugetiere dar (Lucas und Jamroz, 1961; Maxwell, 1974; Daimon und Uchida, 1985) und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Blutgerinnung,

sondern sie sind auch fähig, Viren, Bakterien und Fremdpartikel zu phagozytieren (Hodges, 1977; Stinson et al., 1979; Gylstorff und Grimm, 1998; Bounous und Stedman, 2000; Kummerfeld, 2007). Aviäre Thrombozyten, aufgrund ihrer Form auch Spindelzellen genannt, sind im Vergleich zu den Thrombozyten der Säuger deutlich größer und kernhaltig (Kummerfeld, 2007). Die Tendenz der aviären Thrombozyten spontan zusammenzuklumpen, erschwert ihre Zählung. Physiologischerweise liegt die Thrombozytenzahl der Vögel zwischen 20.000 und 30.000 pro  $\mu\text{L}$  Blut (Kummerfeld, 2007). Sie sind somit nach den Erythrozyten die häufigste Blutzellart (Campbell und Ellis, 2007).

### 2.2.2.2 Bildung

Die Thrombozyten der Vögel entwickeln sich im Knochenmark im Zuge der Thrombopoese. Diese stellt neben der Lympho- und Myelopoese eine eigene Zelllinie dar (Hodges, 1977). Die Entwicklung der Thrombozyten beginnt mit dem Thrombozytoblast, verläuft über den frühen, mittleren und späten unreifen Thrombozyt und endet schließlich mit der Differenzierung zum reifen zirkulierenden Thrombozyt. Der Thrombozytoblast ähnelt in seinem Aussehen dem Proerythroblast, jedoch ist er etwas kleiner und sein runder Nukleus weist fein gepunktetes Chromatin auf (Hodges, 1977; Campbell und Ellis, 2007). Die Form des Thrombozytoblasten bewegt sich zwischen rund und oval. Das wenige Zytoplasma färbt sich stark basophil und enthält teilweise klare Areale. Die nächste Stufe der unreifen Thrombozyten ist in drei Phasen eingeteilt. Der frühe unreife Thrombozyt ist etwas größer als sein Vorgänger ähnelt ihm aber in der runden bis ovalen Form. Er besitzt mehr Zytoplasma, welches sich ebenfalls tief basophil anfärbt und Vakuolen enthalten kann. Das Chromatin ist unregelmäßig geklumpt. Der mittlere unreife Thrombozyt ist ein wenig länglicher als seine Vorläuferzelle und besitzt ein blass-blaues Zytoplasma. Bei dieser Entwicklungsstufe sind zum ersten Mal Granula im Zytoplasma zu erkennen. Späte unreife Thrombozyten haben eine ovale Form und sind etwas kleiner als der mittlere unreife Thrombozyt. Ihr Zytoplasma ist blass-bläulich und weist teilweise klare Bereiche auf. An den Polen der Zelle befinden sich zum Teil Granula. Die nächste und letzte Stufe der Thrombopoese ist der reife Thrombozyt, der im nächsten Kapitel (2.2.2.3) genauer beschrieben wird (Campbell, 2004; Campbell und Ellis, 2007).

Somit unterscheidet sich die Thrombopoese der Vögel sehr stark von jener der Säugetiere. Die Entwicklung beginnt beim Säuger zwar ebenfalls mit der pluripotenten Stammzelle, verläuft aber dann über die myeloische Stammzellreihe mit den Zwischenstufen BFU-Meg (engl.: burst forming unit Megakaryozyt) und CFU-Meg (engl.: colony forming unit Megakaryozyt) aus denen sich die Precursorzelle, der Megakaryoblast entwickelt (Gassmann und Lutz, 2004). Der Megakaryoblast differenziert sich weiter zum Megakaryozyt. Diese auffällig großen Zellen mit einem Durchmesser

von 50-70, gelegentlich bis 150  $\mu\text{m}$ , befinden sich meist in Sinusnähe im Knochenmark. Das Zytoplasma des Megakaryozyten ist durch sogenannte Demarkationskanäle in kleinere Bereiche unterteilt, in deren Zentren Granula und wenige Organellen liegen. Die Demarkationskanäle entstehen vermutlich durch Verschmelzung intrazytoplasmatischer Vesikel. Einer anderen Auffassung zufolge entstehen die Demarkationskanäle durch tiefe spaltenförmige Einsenkungen der Zellmembran. Die Fortsätze des Megakaryozyten reichen bis in den Knochenmarksinus hinein. Hier zerfallen die Fortsätze und setzen bis zu 1200 Blutplättchen frei. Ein Megakaryozyt kann bis zu sechs solcher Fortsätze bilden (Welsch, 2003).

### 2.2.2.3 Morphologie

Thrombozyten des Vogels sind kernhaltige, ovale, spindelförmige bis runde Zellen, mit einer glatten Zelloberfläche im nicht aktivierten Zustand, die im peripheren Blut zirkulieren (Hawkey und Dennett, 1989; Campbell und Ellis, 2007; du Plessis und van Wilpe, 2009). Sie liegen einzeln oder in Gruppen aggregiert im Blutausschlag (du Plessis und van Wilpe, 2009). Unter dem Lichtmikroskop können sie leicht mit kleinen Lymphozyten verwechselt werden (Traill et al., 1983). Physiologischerweise befindet sich die Thrombozytenanzahl bei den meisten Vogelarten um die  $20\text{-}30 \times 10^9/\text{L}$  (Bounous und Stedman, 2000; Campbell und Ellis, 2007; du Plessis und van Wilpe, 2009). Bezzel und Prinzing geben eine Spannweite von  $10\text{-}130 \times 10^9/\text{L}$  an (Bezzel und Prinzing, 1977). Bei der japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) zählten Nirmalan und Robinson (1971) ebenfalls hohe Werte. Die männlichen Tiere besaßen im Mittel  $117 \times 10^9$ , die weiblichen, legenden Tiere  $132 \times 10^9$  Thrombozyten pro L Blut (Nirmalan und Robinson, 1971). Andere Autoren konnten ebenfalls beim weiblichen Tier eine höhere Thrombozytenanzahl als beim männlichen Tier nachweisen (Lucas und Jamroz, 1961; Hodges, 1977; Janzarik, 1981; Bonadiman et al., 2009). Beim Strauß wurden auch beim weiblichen Tier mit  $54,2 \times 10^9$  Thrombozyten pro L höhere Werte als beim männlichen Tier mit  $50,2 \times 10^9/\text{L}$  gemessen (Bonadiman et al., 2009). Lucas und Jamroz beschrieben für Thrombozyten verschiedener Geflügelarten eine Länge die zwischen  $6,1\text{-}11,5 \mu\text{m}$  und eine Breite, die zwischen  $3\text{-}6,1 \mu\text{m}$  variiert (Lucas und Jamroz, 1961). Andere Autoren geben andere Zahlen für die Thrombozytengröße beim Geflügel an (Bezzel und Prinzing, 1977; Lee et al., 2004; du Plessis und van Wilpe, 2009).

Aktiviert bilden Thrombozyten zytoplasmatische Ausläufer an ihrer Zelloberfläche, welche einzeln aber auch als pseudopodiale Netzwerke auftreten können und den Zellen eine eher unregelmäßige Form geben (Maxwell, 1974; du Plessis und van Wilpe, 2009). Auf der Oberflächenmembran sind in der Glykokalix Fibrinogen und Thromboplastin vorhanden, die entscheidend zur Agglutination und

somit zur Thrombusbildung beitragen (Liebich, 2004).

Unter dem Lichtmikroskop ist der zentral liegende Zellkern für die aviären Thrombozyten charakteristisch (du Plessis und van Wilpe, 2009). Er ist oval, jedoch etwas runder als bei den Erythrozyten und nimmt circa ein Drittel des Zellvolumens ein (Hodges, 1977). Das Chromatin ist stark geklumpt (Fitzgerald, 1969). Der Gehalt an Heterochromatin überwiegt (Nirmalan et al., 1972). Zum Teil befinden sich im Heterochromatin helle Areale (Maxwell, 1974). Die charakteristischsten Zellbestandteile der Thrombozyten sind die, auch unter dem Lichtmikroskop erkennbaren, meist an den Polen der Zelle gelegenen, kleinen eosinophilen Granula (Fitzgerald, 1969; Campbell und Ellis, 2007). Sie werden auch spezifische Granula genannt (Hodges, 1974; Daimon und Uchida, 1982; Campbell und Ellis, 2007). Je nach Spezies können sie vereinzelt oder in Gruppen vorkommen. Sie können aber auch vollkommen fehlen (Meseguer et al., 2002). Die sie umschließende Membran gleicht der Plasmamembran in ihrem Aufbau (Daimon und Uchida, 1982). Diese Granula, die einen Durchmesser von 0,2-3  $\mu\text{m}$  aufweisen (Maxwell, 1974; Nickel et al., 2004) sind das Äquivalent zu den ‚dense bodies‘ der Säugetiere und enthalten größtenteils das biogene Amin 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) (Hodges, 1977; Daimon und Uchida, 1982; Nickel et al., 2004), sowie ADP, ATP, Pyrophosphate und Magnesium (White, 2007). Ebenso konnten Kalzium und Glykosaminoglykane an der Innenfläche der Granulamembran nachgewiesen werden (Daimon et al., 1977). Unter dem Elektronenmikroskop weisen die Granula einen elektronendichten Inhalt auf, der in den meisten Fällen exzentrisch an der Membran angelagert ist (Daimon und Uchida, 1982; White, 2007). Verantwortlich für die große Elektronendichte ist ein Komplex aus Kalzium, Serotonin und Pyrophosphaten (White, 2007). Bei Aktivierung der Thrombozyten werden die spezifischen Granula abgegeben und hinterlassen zunächst vakuolisierte Areale und schließlich klare, leere Vakuolen (Hodges, 1977; White, 2007). Somit weisen im Zytoplasma enthaltene Vakuolen auf einen aktivierten oder phagozytierenden Zustand der Thrombozyten hin (Hawkey und Dennett, 1989; Campbell und Ellis, 2007). Bei einer ultrastrukturellen Untersuchung der Thrombozyten des Aasgeiers konnten teilweise Myelin und elektronendichter Inhalt in den Vakuolen festgestellt werden (du Plessis und van Wilpe, 2009).

Neben diesen Granula konnten bis zu 1  $\mu\text{m}$  große zytoplasmatische Einschlüsse festgestellt werden, die eine, von einer Membran umgebene, elektronendichte Matrix aufwiesen (Daimon und Uchida, 1982). Es handelt sich hierbei um sekundäre Lysosomen, die, wie die „dense bodies“, zu den sekretorischen Organellen gehören. Sie enthalten saure Phosphatase, Kathepsine und andere hydrolytische Enzyme (Reed, 2007). Diese scheinen mit den spezifischen Granula in Kontakt zu treten (Daimon und Uchida, 1982). Sekundäre Lysosomen entstehen, wenn durch Endozytose entstandene Endosomen mit primären Lysosomen verschmelzen (Alberts et al., 2004). Des Weiteren stellen sich

unter dem Elektronenmikroskop nahe der Plasmamembran Vesikel und Kanäle dar (Daimon und Uchida, 1982). Daimon und Uchida (1985) untersuchten anhand der Ruthenium-Rot Methode diese Strukturen bei den Thrombozyten der Haie (*Triakis scyllia*). Ruthenium-Rot färbt die Glykokalix der Plasmamembran, durchdringt diese aber nicht. Da die Innenflächen der Vesikel und Kanäle angefärbt wurden und zusätzlich die umgebene Membran in ihrem Aufbau identisch mit der Plasmamembran ist, konnte auf diese Weise nachgewiesen werden, dass Thrombozyten ein verzweigtes System besitzen, welches in Kontakt mit dem extrazellulären Raum steht. Ebenso zeigten Daimon und Uchida (1985) durch ein Ultradünnschnittverfahren, dass die Vesikel lediglich die Querschnitte dieses komplexen Kanalsystem darstellen. Die nach außen kommunizierende Fläche vervierfacht sich auf diese Weise. Diese thrombozytenspezifische Struktur besitzen nicht nur Vögel, ebenso wurde sie bei verschiedenen Fischen, Amphibien, Reptilien und Säugetieren nachgewiesen (Daimon und Uchida, 1985). Außerdem finden sich im Zytoplasma Mitochondrien, Elemente des Zytoskeletts in Form eines marginalen Bands aus Mikrotubuli, Golgi-Komplex, Endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, Lipidtröpfchen und Glykogenablagerungen (Hodges, 1974,1977; Belleville et al., 1982; Daimon und Uchida, 1982; Nickel et al., 2004; du Plessis und van Wilpe, 2009). Die Thrombozyten der Ente unterscheiden sich in ihrer Morphologie von den meisten Vogelarten. Die Organellen sind nahe um den Zellkern angeordnet und teilen so das Zytoplasma in eine organellenreiche und hinter einem ektoplasmatischen Ring eine organellenarme Zone, in der sich nur einige Ribosomen und Glykogengranula befinden (Maxwell, 1974).

#### **2.2.2.4 Zytochemische Eigenschaften**

Die aviären Thrombozyten zeigen eine deutliche Aktivität der sauren Phosphatase in den sekundären Lysosomen sowie auch in den kleineren primären Lysosomen, nicht jedoch in den Vakuolen (Daimon und Uchida, 1982). Des Weiteren besitzen sie unspezifische Esterasen (Fey, 1966). Eine Aktivität der  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase konnte allerdings in den Thrombozyten des Straußes nicht nachgewiesen werden (Ergun et al., 2004). Daneben enthalten sie noch Laktatdehydrogenasen und  $\beta$ -Glukuronidasen (Stiller et al., 1975).

#### **2.2.2.5 Zytoskelett**

Aviäre Thrombozyten besitzen Aktin, Tubulin und Vimentin. Aktin macht dabei den Hauptanteil der Zytoskelettproteine aus (Spangenberg, 1990). Kernhaltige Thrombozyten besitzen wie Erythrozyten ein ringsum peripher verlaufendes marginales Band, bestehend aus Mikrotubuli (Daimon und Uchida,

1982; Lee et al., 2004). Dieses ist aus circa 20-35 Mikrotubuli aufgebaut und befindet sich direkt unter der Plasmamembran. Behnke (1970) hat nachgewiesen, dass aviäre Thrombozyten nach Verlust der Mikrotubuli ihre ovale Form verlieren. Das läßt darauf schließen, dass das marginale Band, anders als bei aviären Erythrozyten für die Aufrechterhaltung der Zellform verantwortlich ist (Behnke, 1970; Meseguer et al., 2002). Vimentin bildet aus 10 nm langen Intermediärfilamenten ein Netzwerk, welches das Zellinnere durchquert und nahe der Plasmamembran als ringförmige Struktur organisiert ist. Zellbiologische Untersuchungen haben ergeben, dass das Aminoende des Vimentin eine Affinität zu negativ geladenen Phospholipiden der Membran besitzt (Podor et al., 2002; Ahmed et al., 2008). Ebenfalls interagiert Vimentin mit dem C-Terminus von Serotonintransportern (SERT), welche sich sowohl im Zytoplasma als auch an der Membran befinden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Vimentin bei der Translokation von Serotonin vom Zytoplasma zur Zellmembran beteiligt ist (Ahmed et al., 2008). Die Thrombozyten besitzen ebenso ein kortikales Netz aus Aktinfilamenten (DaMatta et al., 1998; Lee et al., 2004), welches dazu beiträgt, die Zellmembran zu kontrahieren (Liebich, 2004). Neben diesem Netzwerk verlaufen dichte F-Aktin Bündel mit einer Breite von ca. 0,5 µm in unmittelbarer Nähe zum breiteren marginalen Band mit einer Dicke von bis zu 1,4 µm (Lee et al., 2004). In einer Studie von K.-G. Lee und Mitarbeitern (2004) wurde das Zytoskelett von kernhaltigen Thrombozyten eines Fisches (Katzenhai) während der verschiedenen aktivierten Stadien untersucht. In den nicht aktivierten ovalen Thrombozyten trug die Interaktion von F-Aktin und Mikrotubuli zur Aufrechterhaltung der Zellform bei. Es konnte festgestellt werden, dass bei Einwirken von Aktivierungsfaktoren auf die Zelle die Interaktion verloren geht. Je stärker sich die Zelle verformt, desto unorganisierter erscheinen die Mikrotubuli des marginalen Bandes. Sie passen sich der veränderten Zellform an, indem sie selbst eine verkrümmte und wellige Form annehmen. Sie ziehen zentral in direkte Umgebung des Zellkerns. Dort sind sie zackenförmig mit seiner lappenförmigen Veränderung assoziiert oder erscheinen als Konglomerate zwischen den nuklearen Fragmenten nach Zerfall des Zellkerns. Die Aktinfilamente dagegen breiten sich über die gesamte Zelle aus, orientieren sich mehr nach außen und bilden dichte Faserbündel, die bis in die Pseudopodien hinein ziehen (Lee et al., 2004). Die Aktinfilamente spielen eine prominente Rolle in der Veränderung der Zellform, da nachgewiesen werden konnte, dass die Formveränderung der Zelle ausbleibt, wenn die Polymerisation zu filamentärem Aktin gehemmt wird. Bis auf Unterschiede in Zellgröße und Form, wurden gleiche Vorgänge der Veränderung während der Aktivierung in den Blutplättchen nachgewiesen (Debus et al., 1981; Escolar et al., 1986; Lee et al., 2004).

### 2.2.2.6 Aufgaben

Die Thrombozyten dienen der Blutgerinnung (Gylstorff und Grimm, 1998; Sinowatz und Hees, 2000). Sie spielen beim Vogel außerdem eine wichtige Rolle beim Entzündungsgeschehen und in der Phagozytose (Hodges, 1977; Stinson et al., 1979; Awadhiya et al., 1980; Grecchi et al., 1980; Lam, 1997; Gylstorff und Grimm, 1998; Thomas und Blue-McLendon, 1998; Bounous und Stedman, 2000; du Plessis und van Wilpe, 2009).

Bei der Blutgerinnung (Hämostase) handelt es sich um eine Kaskade, die mit zwei unterschiedlichen Wegen beginnt und schließlich in einem gemeinsamen Weg endet. Ziel dieser Kaskade ist die Umwandlung des im Plasma vorhandenen löslichen Fibrinogen zu unlöslichem Fibrin (Espada, 2000). Wird das Gefäßendothel verletzt, treten an dieser Stelle die Basallamina und das subendotheliale Gewebe hervor. Thrombozyten besitzen an ihrer Oberfläche Integrine, die an das nun freigelegte Fibronektin und Kollagen der Basallamina binden (Wurzinger und Zanner, 2005). Die Aggregation bei kernhaltigen Thrombozyten wird vermutlich durch Thrombin, Kollagen, Arachidonsäure, Kontakt zu Glas, PAF, Calciumionophore und Serotonin induziert (Thomas und Blue-McLendon, 1998; Espada, 2000; Lee et al., 2004). Bemerkenswert ist, dass ADP, welches beim Säugetier in den Granula der Thrombozyten enthalten ist und stark aktivierend wirkt, beim Vogel nicht diesen Effekt besitzt (Belleville et al., 1982; Thomas und Blue-McLendon, 1998).

Die aktivierten Thrombozyten verändern innerhalb von Sekunden ihre Form („shape change“, visköse Metamorphose) (Wurzinger und Zanner, 2005). Neben Formveränderung der Zelle von ellipsoid zu rund sowie des Nukleus von einem mononuklearen zu einem lobierten bis hin zum fragmentierten Stadium, verändert sich auch die Zelloberfläche (Lee et al., 2004). Hierbei dient das offene kanalikuläre System als Membranreserve, das nun ausgestülpt wird und mehrere Mikrometer lange Fortsätze bildet. Pseudopodien aktivierter Thrombozyten können sich so ineinander verhaken und bilden gemeinsam mit dem reichlich im Plasma vorkommenden löslichen Fibrinogen die Vorstufe eines hämostatischen Pfropfs. Fibrinogen bindet an das Integrin GPIIb/IIIa der Zellmembran der aktivierten Thrombozyten und bildet somit Molekülbrücken zwischen benachbarten aktivierten Thrombozyten (Wurzinger und Zanner, 2005). Dieser primäre Thrombus (sog. weißer Thrombus) ist instabil und hat nur eine Lebensdauer von einigen Sekunden. Er dient als Gerüst, in dem die sekundäre Blutgerinnung stattfindet (Gerinnungskaskade). Die Aktivierung dieser Koagulationskaskade läuft nahezu simultan zur Thrombozytenadhäsion und -aggregation ab. Unterschieden werden der intrinsische und der extrinsische Weg, die jeweils über andere Faktoren aktiviert werden. Der intrinsische Weg beginnt mit der Umwandlung von Faktor XII zu XIIa. Dies wird durch den Kontakt mit subendothelialen Kollagen und durch den primären Thrombus katalysiert. Die Gewebeshormone Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen sind hierbei wichtige Kofaktoren. Faktor XIIa aktiviert



wiederum Faktor XI zu XIa, dieser katalysiert die Umwandlung von Faktor IX zu IXa und dieser wiederum bildet aus Faktor VIII Faktor VIIIa. Der aktivierte Faktor VIIIa ist nun fähig, den ersten Faktor des gemeinsamen Gerinnungsweges, Faktor X, zu aktivieren (Couto, 2006).

Da beim Vogel Faktor XII und XI kaum oder gar nicht im Plasma nachzuweisen sind (Doerr und Hamilton, 1981; Dodds, 1997), und Präkallikrein sowie hochmolekulares Kininogen ebenfalls nicht vorhanden sein dürfte, ist anzunehmen, dass der extrinsische Weg der Gerinnungskaskade als Start der Koagulation beim Vogel eine grössere Bedeutung hat. Auch besitzen aviäre Thrombozyten weit weniger Thromboplastin als Blutplättchen der Säugetiere (Espada, 2000; Nickel et al., 2004). Der extrinsische Weg wird durch sogenannte Gewebefaktoren, die bei Gewebetraumata freigesetzt werden, ausgelöst (Couto, 2006). Das Gewebethromboplastin aktiviert Faktor VII zu Faktor VIIa. Faktor VIIa aktiviert Faktor X und somit den gemeinsamen Weg der Koagulationskaskade (Espada, 2000). Dieser verläuft von Faktor X über Faktor V, II, I und XIII. Faktor XIIIa katalysiert schließlich über Thrombin die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Erst am Ende dieser Kaskade bildet sich durch unlösliches Fibrin, aktivierte Thrombozyten und Erythrozyten der sekundäre und endgültige Thrombus (Couto, 2006).

Nach einer Studie zur Hämostase bei der Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) lagern sich bereits zehn Sekunden nach einer venösen Endothelverletzung freie Thrombozyten an die Schnittländer an. Nach zwanzig Sekunden sammeln sich kleine Thrombozytenaggregate an den Wundrändern. Ab der dreißigsten Sekunde bildet sich ein Fibrinnetz im Gefäßlumen, welches nach weiteren dreißig Sekunden vollständig das proximale und distale Endothel bedeckt. Sechzig Sekunden nach der Läsion bedeckt ein dichter Thrombus, bestehend aus Thrombozyten, Erythrozyten und dichten Fibrinfäden die Wundfläche. Nach fünf Minuten erscheint der Thrombus etwas fenestriert, was hinweisend auf die einleitende Fibrinolyse ist (Belleville et al., 1982).

Es existieren mehrere Hinweise, dass die aviären Thrombozyten zur Phagozytose fähig sind: Sie treten mit partikulärem Material (Abiotische Partikel, AgAk-Komplexe) in Interaktion. Im Zytoplasma sind lysosomale Stoffe vorhanden, die auf Stimulation freigesetzt werden und es existieren metabolische Faktoren, die als Entzündungsmediatoren agieren könnten (Weksler und Nachman, 1971). Wigley und Mitarbeiter (1999) untersuchten die Phagozytoseaktivität und oxidativen Burst, indem sie Thrombozyten des Huhns verschiedenen Bakterienstämmen aussetzten. Die Thrombozyten nahmen nicht-selektiv alle Bakterien auf, auch nicht-invasive wie *Escheria coli* und *Staphylococcus aureus*. Gleichzeitig konnte ein respiratorischer Burst, also ein Anstieg der reaktiven Sauerstoffradikale, verzeichnet werden. Im Vergleich zu heterophilen Granulozyten, die selektiver vorgehen und keine Partikel sowie Farbstoffe aufnehmen, in ihrer phagozytotischen Aktivität jedoch effizienter sind, phagozytieren Thrombozyten auch abiotische Fremdpartikel (Wigley et al., 1999).

Einige Autoren sind der Meinung, dass eine echte Phagozytoseaktivität noch nicht endgültig nachgewiesen wurde, da es fragwürdig sei, ob es sich um Phago- bzw. Endozytose im engeren Sinn handelt, wenn aufgenommene Partikel im offenen kanalikulären System verbleiben und somit in Kontakt mit dem extrazellulären Raum stehen (Meseguer et al., 2002).

### **2.2.3 Heterophile Granulozyten**

#### **2.2.3.1 Allgemeines**

Granulozyten der Vögel werden aufgrund der Anfärbarkeit ihrer zytoplasmatischen Granula in eosinophile, basophile und heterophile (pseudoeosinophile) Granulozyten eingeteilt (Kummerfeld, 2007). Die Granulozyten bilden gemeinsam mit den Agranulozyten (Lymphozyten und Monozyten) die Leukozytenpopulation im Blut der Vögel (Clark et al., 2009). Heterophile Granulozyten stellen beim Vogel den Hauptanteil der Granulozyten dar und entsprechen funktionell den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere (Santos et al., 2003; Campbell, 2004; Kummerfeld, 2007). Die Benennung bezieht sich dabei nur auf Unterschiede in der Anfärbarkeit der Granula (Hawkey und Dennett, 1989; Jain, 1993). Während sich die Granula der neutrophilen Granulozyten der meisten Säugetiere nur geringgradig mit sauren sowie mit basischen Farbstoffen anfärben lassen und sich so gegenüber diesen Farbstoffen neutral verhalten (Tschudi und Hees, 1990), besitzen die aviären heterophile Granulozyten viele spezifische eosinophile Granula (Hawkey und Dennett, 1989). Granulozyten bewegen sich amöboid und haben die Fähigkeit via Diapedese aus der Zirkulation ins Gewebe aktiv einzuwandern (Liebich, 2004). Ihre wesentliche Funktion besteht im Abtöten von Erregern durch Chemotaxis, Opsonisierung, Phagozytose und Lysis (Hawkey und Dennett, 1989). Somit übernehmen sie eine wichtige Funktion in der unspezifischen Abwehr (Liebich, 2004).

#### **2.2.3.2 Bildung**

Die Granulopoese der Vögel gleicht der der Säugetiere (Campbell und Ellis, 2007). Sie schließt die Bildung von heterophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten ein. Sie beginnt bei der pluripotenten Stammzelle im Knochenmark. Aus ihr entsteht die bipotente CFU-GM (engl.: colony-forming unit-granulocyte-monocyte), aus der unter bestimmtem Reiz hin die unipotente CFU-G (engl.: colony-forming unit-granulocyte) hervorgeht. Daneben besitzen eosinophile und basophile Granulozyten eigene Progenitorzellen (CFU-Eos und CFU-Bas). Die unipotenten Progenitorzellen differenzieren sich weiter zu Myeloblasten. Gefärbt nach Wright-Giemsa und lichtmikroskopisch

betrachtet, lassen sich die Myeloblasten der drei verschiedenen Zellreihen nicht unterscheiden (Jain, 1993). Myeloblasten haben einen Durchmesser von ca. 15  $\mu\text{m}$  (Liebich, 2004) und besitzen einen runden Zellkern mit feinem Chromatin und ein bis zwei Nukleoli. Das mäßig bis reichliche Zytoplasma lässt sich moderat blau anfärben und ist für gewöhnlich frei von Granula. Der Promyelozyt ist etwas größer als seine Vorläuferzelle (Jain, 1993). Mit einer Größe von 18-25  $\mu\text{m}$  ist er der größte Vertreter der Granulopoese (Liebich, 2004). Er besitzt ebenfalls einen runden Kern mit fein getüpfeltem Chromatin, jedoch keine Nukleoli (Jain, 1993). Durch einen Anstieg der Zytoplasmamenge besitzt der Promyelozyt ein niedrigeres Nukleus:Zytoplasma Verhältnis im Vergleich zu seinem Vorgänger (Campbell, 2004). Das reichliche Zytoplasma färbt sich heller an als bei den Myeloblasten und enthält bereits zahlreiche kleine rötlich-lila azurophile Granula (Jain, 1993). Diese haben einen Durchmesser von 0,25-0,5  $\mu\text{m}$  (Liebich, 2004). Selten können die eosinophilen Promyelozyten vergleichsweise größere azurophile Granula in ihrem Zytoplasma enthalten (Jain, 1993). Diese azurophilen Granula differenzieren sich innerhalb einer Woche zu den zellspezifischen Granula (Liebich, 2004; Campbell und Ellis, 2007). Aus den Promyelozyten entwickeln sich die jeweiligen Myelozyten. Ab diesem Stadium können die Precursorzellen aufgrund spezifischer Anfärbbarkeit der zytoplasmatischen Granula ihrer Zelllinie zugeordnet werden. Die Myelozyten enthalten einen runden bis leicht eingekerbten Zellkern mit grobem oder geklumpten Chromatin, ohne erkennbare Nukleoli. Das Zytoplasma lässt sich nur schwach blau anfärben und enthält die jeweils zellspezifischen Granula. Der heterophile Myelozyt besitzt viele kaum sichtbare blasse Granula. Bei der nächsten Reifestufe, dem Metamyelozyt, gleicht das Zytoplasma der Vorgängierzelle, der Zellkern hingegen erscheint eingekerbt bis nierenförmig. Aus dem Metamyelozyt geht die stabförmige Zelle hervor. Diese hat bereits die gleiche Größe wie der reife Granulozyt. In dem klaren bis blassblauen Zytoplasma befindet sich ein schlanker, hufeisenförmiger Kern mit fein geklumpten Chromatin (Jain, 1993). Mit weiterer Reifung formiert sich der Zellkern von einem gelappten zu einem segmentierten Stadium. Ein gelappter Kern ist definiert, wenn die Tiefe der Einschnürung weniger als zwei Drittel des Kerndurchmessers ausmacht. Sobald die Einschnürung tiefer geht, wird von Segmentierung gesprochen (Tschudi und Hees, 1990). Durch diese Segmentierung können die einzelnen Zellsegmente besser hintereinander angeordnet werden, was eine schnellere Diapedese und Migration zwischen den Endothelspalten ermöglicht (Paape et al., 2003).

Der reife heterophile Granulozyt besitzt einen segmentierten Zellkern, geklumptes Chromatin und spezifische Granula (Jain, 1993). Circa zwölf Stunden nach Eintritt in die Blutbahn wandert der heterophile Granulozyt ins Gewebe ein. Dort geht er während einer relativ kurzen Lebensdauer von einigen Tagen seinen spezifischen Aufgaben nach (Tizard, 1992). Die Granulopoese wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten sezernieren Interleukine und zahlreiche Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF, engl.:

colony-stimulating factor). Deren Produktion und Ausschüttung steigt unter anderem nach Antigenkontakt, bakterieller Infektion, Chemotherapie und Bestrahlung. IL3 und GM-CSF bzw. G-CSF sind in der heterophilen Granulopoese von großer Bedeutung. Unter ihrem Einfluß wird die Differenzierung der Progenitorzellen stimuliert (Jain, 1993). Reguliert wird die Abgabe ins zirkulierende Blut durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der von der Anzahl differenzierter Granulozyten abhängt (Liebich, 2004).

### 2.2.3.3 Morphologie

Heterophile Granulozyten gehören bei den meisten Vogelarten zu den am häufigsten vertretenen Granulozyten im peripheren Blut. Bei manchen Arten gehören sie sogar zu den zahlreichsten Leukozyten (Clark et al., 2009). Beim Strauß machen die heterophilen Granulozyten 60 % der Gesamtleukozytenanzahl von  $5 \times 10^9/L$  aus (Mushi et al., 1999). Die absolute Anzahl der heterophilen Granulozyten variiert zwischen den Vogelarten. So besitzt die Ente  $2,7-5,6 \times 10^9$ , die Möwe  $0,5-14 \times 10^9$ , der Falke  $2,3-6,71 \times 10^9$  und der Pinguin  $2,2-6,1 \times 10^9$  heterophile Granulozyten pro L Blut (Clark et al., 2009). Die aviären Granulozyten sind deutlich größer als die Erythrozyten (Bezzel und Prinzing, 1977). Der mittlere Durchmesser beträgt  $8,8 \mu m$  (Campbell und Ellis, 2007). Sein Durchmesser kann große Variationen aufweisen (Loeffler, 1978; Bounous und Stedman, 2000).

Unter dem Lichtmikroskop zeigt sich der aviäre heterophile Granulozyt nach Romanowsky-Färbung typischerweise als runde bis unregelmäßig geformte Zelle (Clark et al., 2009). Das Zytoplasma erscheint farblos bis blass basophil und enthält zahlreiche eosinophile (ziegelsteinfarben bis dunkelorange) Granula, die im Längsschnitt eine spindelförmig-längliche und im Querschnitt eine runde Form aufweisen (Campbell und Ellis, 2007; Clark et al., 2009). Die Länge und Breite der einzelnen Granula variieren bei den verschiedenen Vogelarten (Lucas und Jamroz, 1961). In einigen heterophilen Granula ist ein ‚central granular body‘ erkennbar (Robertson und Maxwell, 1991). Hierbei handelt es sich um eine runde bis ovale, blasse Struktur, die zentral in den Granula eingelagert ist. Die Granula sind gleichmäßig verteilt und bedecken größtenteils das Zytoplasma und zum Teil den Zellkern (Clark et al., 2009). In der Regel hat der Zellkern stark kondensiertes Chromatin und zwei bis drei Segmente (Campbell und Ellis, 2007; Clark et al., 2009).

Unter dem Elektronenmikroskop weisen die heterophilen Granulozyten eine überwiegend runde Form mit wenigen kurzen zytoplasmatischen Ausläufern auf (Santos et al., 2003). Im Zytoplasma ist ein gelappter Zellkern mit peripheren Heterochromatin und zentralen Euchromatin lokalisiert (Santos et al., 2003; Bonadiman et al., 2009). Des Weiteren weisen die meisten aviären heterophilen

Granulozyten der Vögel drei voneinander unterscheidbare Granula auf (Dieterien-Lievre, 1988). So besitzen beispielsweise die heterophilen Granulozyten des Huhns drei Typen von Granula. Am häufigsten kommt mit 48,3 % Typ 1 vor. Es handelt sich hierbei um große, 1,5 µm lange und 0,6 µm breite, stäbchenförmige Granula, die einen homogenen, elektronendichten Inhalt aufweisen (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Manche Autoren beschreiben bei dieser Granulasorte einen ‚circular central body‘. Dieser ist ebenfalls elektronendicht und beinhaltet eine etwas weniger elektronendichte Matrix, die vermutlich aus Proteinen aufgebaut ist (Campbell und Ellis, 2007). Typ 2 Granula erreichen einen Durchmesser von 0,5 µm und treten mit 24,7 % weniger zahlreich auf (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Sie sind weniger elektronendicht und beinhalten exzentrisch gelagerte Einschlüsse, bestehend aus gelösten, filamentösen Material. Diese Granula können in den meisten Vogelspezies nachgewiesen werden (Maxwell und Robertson, 1998). Typ 3 Granula sind mit einem Durchmesser von 0,1 µm die kleinsten Vertreter und machen einen prozentualen Anteil von 27 % an der Granulapopulation aus. Bei ihnen wird ein elektronendichter Kern von einer elektronendurchlässigen Membran unterschieden (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Campbell und Ellis, 2007). Beim Strauß wurden bei einer ultrastrukturellen Studie nur zwei Arten von Granula nachgewiesen. Typ 1 weist eine Spindelform unterschiedlicher Größe auf und Typ 2 ist kleiner und homogener in Größe und Elektronendichte. Es wurden keine ‚circular central bodies‘ nachgewiesen (Bonadiman et al., 2009). Beim Truthahn sowie beim Wegebussard wurde nur eine Granulaform entdeckt (Topp und Carlson, 1972; Santos et al., 2003). Manche Autoren vertreten die Meinung, dass die verschiedenen Granulaformen den unterschiedlichen Reifegraden der Granula zugeordnet werden können (Maxwell und Robertson, 1998; Santos et al., 2003). Ultrastrukturell sind im Zytoplasma neben Zellkern und Granula noch verschiedene Zellorganellen, wie Golgi-Apparat, raues endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, kleine Vesikel (Clark et al., 2009), sowie Mikrotubuli und Mikrofilamente zu finden (Bounous und Stedman, 2000). Die Granula enthalten lysosomale und nicht-lysosomale Enzyme, die im Zuge einer bakteriziden Abwehr eingesetzt werden (Campbell und Ellis, 2007). Im Zuge einer Immunantwort zeigen aviäre heterophile Granulozyten ähnlich wie die der Säugetiere bestimmte morphologische Veränderungen. Diese sind lichtmikroskopisch zu erkennen und können in vier verschiedene Stadien eingeteilt werden: Eine erhöhte Basophilie des Zytoplasmas, resultierend durch den Anstieg der Ribosomenzahl, zeigt sich bei Heterophilen des 1+ Stadiums. Das 2+ Stadium der Toxizität ist erreicht, wenn die Zellen eine starke Basophilie und eine teilweise Degranulation aufweisen. Stadium 3+ kennzeichnet eine tiefe Basophilie des Zytoplasmas, moderate Degranulation, abnorme Granula und zytoplasmatische Vakuolen. Bei Stadium 4+ zeigen die aviären heterophilen Granula tiefe zytoplasmatische Basophilie, moderat bis starke Degranulation und abnorme Granula, Vakuolen und Karyorrhesis bis Karyolysis. Je nach Anzahl der toxischen Zellen wird zwischen wenig (5-10%), moderat (11-30%) und ausgeprägt (>30%) unterschieden (Campbell, 2004; Campbell und Ellis, 2007).

Neben diesen aktivierten Stadien können auch unreife Vorstufen der heterophilen Granulozyten im Blutausschlag gefunden werden. Diese sind meist Myelozyten und Metamyelozyten und können anhand der vermehrten Basophilie des Zytoplasmas, des unsegmentierten Zellkerns, sowie der noch unreifen Granula identifiziert werden. Daneben sind auch stabkernige Granulozyten auszumachen, die bis auf den nichtgelappten und hufeisenförmigen Zellkern den reifen heterophilen Granulozyten gleichen (Campbell und Ellis, 2007). Teilweise kann es beim Blutausschlag der Vögel Schwierigkeiten bereiten, die eosinophilen Granula der Heterophilen von den echten eosinophilen Granulozyten zu unterscheiden (Hawkey und Dennett, 1989). Eine exakte Einteilung erlaubt hier der zytochemische Nachweis (Andreasen und Latimer, 1990).

#### **2.2.3.4 Zytochemische Eigenschaften**

Im Unterschied zu früheren lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden über zytochemische Techniken und Elektronenmikroskopie nachgewiesen, dass die spindelförmigen spezifischen Granula der aviären heterophilen Granulozyten Lysosomen sind und somit funktionell den neutrophilen Granulozyten der Mammalier entsprechen (Montali, 1988). Als Lysosomen werden intrazelluläre, von einer Membran umgebene Organellen bezeichnet, die positiv auf den Nachweis von saurer Phosphatase,  $\beta$ -Glukuronidase und anderen hydrolytischen Enzymen reagieren (Topp und Carlson, 1972). Die heterophilen Granula der Vögel enthalten außerdem Trimetaphosphatase (Maxwell, 1984). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Heterophilen der Vögel und der Säugetiere ist das Fehlen der Peroxidase (Myeloperoxidase, MPO) und alkalischer Phosphatase (Brune et al., 1972; Daimon und Caxton-Martins, 1977; Bonadiman et al., 2009). Die Granula der Heterophilen enthalten ebenfalls  $\beta$ -Glukuronidase und saure Phosphatase (Topp und Carlson, 1972; Daimon und Caxton-Martins, 1977; Campbell und Ellis, 2007). Die saure Phosphatase wurde beim Huhn nur in den Granula vom Typ 2 nachgewiesen (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Diese Beobachtung deckt sich mit der Aussage von Santos und Mitarbeitern (2003), die beim Wegebussard ebenfalls nicht in allen Granula ein positives Ergebnis beim Nachweis der sauren Phosphatase erzielte. Weiterhin wurde beim Wegebussard mithilfe der PAS-Reaktion Glykogen in den heterophilen Granulozyten nachgewiesen. Dieses wird bei einer niedrigen Sauerstoffkonzentration über anaerobe Glykolyse zu ATP metabolisiert. (Santos et al., 2003). Beim Huhn dagegen zeigen die heterophilen Granulozyten kein positives Reaktionsprodukt beim PAS-Nachweis sowie ein negatives Ergebnis für unspezifische Esterasen (Andreasen und Latimer, 1990). Die heterophilen Granulozyten von Hühnern, Steinhühnern und Truthähnen zeigen im Gegensatz zum Strauß positive Reaktion auf den Nachweis von  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase (Ergun et al., 2004; Dönmez und Sur, 2008; Sari et al., 2009). Die spezifische Esterase Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase ist bei humanen neutrophilen Granulozyten

in den Lysosomen lokalisiert und wird häufig als Marker für Zellen granulozytären Ursprungs genutzt (Kass, 1979; Lojda et al., 1979; Lang, 2006). Die heterophilen Granulozyten der Vögel setzen zum Abtöten der Mikroorganismen sauerstoffunabhängige Reaktionswege wie den Einsatz von Lysozym und kationischen Proteinen beispielsweise saure Hydrolasen und Kathepsine. Des Weiteren produzieren sie durch ihre Sauerstoffverwertung freie Radikale und Wasserstoffperoxide, die sie ebenfalls gegen Erreger einsetzen (Dri et al., 1978). Laut einer Studie nach Brune und Mitarbeitern (1972) sind die polymorphkernigen Granulozyten (PMN) des Huhns fähig, gram-negative und gram-positive Bakterien sowie Hefen zu aufzunehmen und von diesen 80 % in den ersten dreißig Minuten zu eliminieren. Somit ist die Phagozytosekapazität im Vergleich zu humanen neutrophilen Granulozyten (95 %) erniedrigt, die Abtötung der Erreger erfolgt jedoch gleich effektiv (Brune et al., 1972). Dri und Mitarbeiter (1978) verglichen die biochemischen Vorgänge der PMN des Huhns und die des Meerschweinchens. Gemeinsam ist den Zellen, dass nach Phagozytoseaktivität der Sauerstoffverbrauch ansteigt, der Hexosemonophosphatweg sowie die NADPH-Oxidase aktiviert wird und die Produktion von Superoxidanion ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) ansteigt. Durch diese metabolischen Veränderungen lassen sich die Vorgänge in den PMN des Huhns nachvollziehen: Die heterophilen Granulozyten bilden durch den ansteigenden Sauerstoffverbrauch vermehrt  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ . Wasserstoffperoxid wird in Zellen mit den Enzymen Peroxidase und Katalase zu  $H_2O$  und  $O_2$  abgebaut. Da die meisten aviären heterophilen Granulozyten diese Enzyme nicht aufweisen, bauen die PMN der Vögel Wasserstoffperoxid über den Glutathionzyklus ab. Der Reaktionsweg soll in folgender Skizze verdeutlicht werden:

1.  $H_2O_2 + 2 \text{ Glutathion} \Rightarrow 2 H_2O + \text{Glutathion-Disulfid}$
2.  $\text{Glutathion-Disulfid} + NADPH/H^+ \Rightarrow 2 \text{ Glutathion} + NADP^+$

Der erste Reaktionsschritt wird über das Enzym Glutathionperoxidase katalysiert. Die Reduktion des Glutathion-Disulfids erfolgt durch die Glutathionreduktase. Das bei diesem Weg entstehende  $NADP^+$  wird von den ersten beiden Enzymen des Hexosemonophosphatzyklus, auch Pentosephosphat- oder 6-Phosphoglukonatweg genannt, wieder reduziert. Dies erklärt die vermehrte Aktivierung des Pentosephosphatweg in aviären PMN im Zuge einer Phagozytoseaktivität (Dri et al., 1978).

### 2.2.3.5 Zytoskelett

Das Zytoskelett ist eine dynamische Struktur, welches aus verschiedenen Proteinen gebildet wird. Für die umfangreichen Funktionen der neutrophilen bzw. heterophilen Granulozyten, wie Chemotaxis, Phagozytose, Degranulation und Apoptose, ist ein flexibles Arrangement des Zytoskeletts erforderlich

(Moisan und Girard, 2006). Aktin gehört beim Säugetier zu den Hauptkomponenten des Zytoskeletts der neutrophilen Granulozyten (Bengtsson et al., 2006). In den frühen Stadien der Phagozytose formiert sich aufgrund chemotaktischer Botenstoffe das monomere, globuläre G-Aktin in einem strukturierten Ablauf zu polymerisierten, filamentösen F-Aktin. Dabei gibt es Bereiche innerhalb der Zelle in denen vermehrt Aktinfasern auftreten. Diese Anordnung ist ausschlaggebend für die Motilität der Zelle (Carulli et al., 2006). Die Summe an Aktin ist in ruhenden sowie in aktivierten Zellen konstant. Bei neutrophilen Granulozyten der Säugetiere und vermutlich auch bei anderen Vertebraten führt die Polymerisation von G- zu F-Aktin zu strukturellen Veränderungen, unter anderem zur Bildung von Pseudopodien. Die immunologischen Prozesse wie Phagozytose und die damit verbundenen intrazellulären Prozesse sind sehr alte, evolutionär bewährte Mechanismen, die nicht nur in Mammaliern, sondern auch bei anderen Wirbeltieren bis hin zu Wirbellosen wie Einzellern beobachtet werden konnten (Gupta und Campenot, 1996). Das Aktinskelett spielt auch eine wichtige Rolle in der Regulation und Stabilisation der NADPH-Oxidase, dem Enzym, welches Superoxide für die Keimabtötung generiert. So wurde in humanen neutrophilen Granulozyten Aktin als ein dynamisches Filamentsystem beschrieben, welches einerseits ein mit Rezeptoren versehenes Gerüst in der Plasmamembran darstellt, andererseits in Kontakt mit intrazellulären Signalwegen und der NADPH-Oxidase steht. Somit nimmt das Aktinskelett eine zentrale Rolle bei der Bewegung der Zelle auf das Zielobjekt sowie indirekt bei dessen Zerstörung ein (Bengtsson et al., 2006). Mikrotubuli tragen ebenfalls zur Immunantwort der PMN bei. Sie stabilisieren die Pseudopodien und sind essentiell für den Vorgang der Motilität. Bei einem Versuch von Nath und Mitarbeiter (1982) wurde festgestellt, dass aktivierte PMN des Kaninchens vermehrt Tyrosin aufnehmen, wodurch  $\alpha$ -Ketten in Tubulin aufgebaut werden. Tubulin macht nur etwa 1 % vom Gesamtprotein der PMN aus (Nath et al., 1982). Olins und Herrmann (2000) untersuchten bei humanen neutrophilen Granulozyten das Zytoskelett und fanden heraus, dass in nicht aktiviertem Zustand Vimentin eher perinukleär angeordnet ist und für eine strukturelle Stabilität des Zytoplasmas sorgt. In chemotaktisch aktivierten Zellen ändert sich diese Anordnung und die Vimentinfilamente akkumulieren vermehrt im Uropod (Olins et al., 2000). Moisan und Girard (2006) entdeckten bei einem Versuch von humanen Neutrophilen, dass diese Vimentin auf ihrer Zelloberfläche bilden, sobald diese in Apoptose übergehen. Die apoptotischen Zellen exprimierten jedoch nur das Carboxylende, die sogenannte ‚tail domain‘ des Vimentin. Die Autoren vermuten, dass Vimentin in diesem Fall ein Signal zur Phagozytose der Apoptosezelle darstellt (Moisan und Girard, 2006).



### 2.2.3.6 Aufgaben

Die heterophilen Granulozyten sind maßgeblich an der unspezifischen Abwehr von Krankheitserregern beteiligt (Loeffler, 1978). Die wichtigste Funktion der heterophilen Granulozyten ist die Phagozytose, das heißt, die Aufnahme und Zerstörung von Bakterien, Zelltrümmern und Fremdpartikeln. Diese Aufgabe nehmen sie nicht nur im Blut, sondern auch im Gewebe wahr (Lösch et al., 2000). Neben der Phagozytose gehört auch die Sekretion toxischer Produkte zu ihren Funktionen (Schratl und Heinemann, 2009). Die Granula der heterophilen Granulozyten können über den Vorgang der Exozytose mit der Zellmembran verschmelzen und so ihren Inhalt (abgetötete Erreger, Bakterienprodukte oder Granulainhalt) in das umliegende Gewebe abgeben (Jain, 1993). Granulozyten schütten in aktivierten Zustand verschiedene Zytokine (TNF, CSF-G, CSF-M) aus und stimulieren so andere Entzündungszellen (Djeu et al., 1990).

Die Aktivierung der Granulozyten wird über körperfremde Stoffe wie Bestandteile von Bakterien oder körpereigene Botenstoffe wie Leukotriene, Prostaglandine, Komplementfaktoren (C5a) und Zytokine initiiert (Schratl und Heinemann, 2009). Bei Entzündungsprozessen werden nicht nur die Granulozyten, sondern auch die involvierten Endothelzellen aktiviert (Lösch et al., 2000). In diesem Zustand kommt es zu einer Anheftung (Adhäsion) zwischen membranständigen Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen und den Granulozyten (Lösch et al., 2000). Es folgt die Auswanderung ins Gewebe (Diapedese), bei der die angehefteten Granulozyten durch intrazelluläre Poren (engl.: intracellular junctions) die Zirkulation verlassen, nachfolgend die Basalmembran passieren und ins Gewebe einwandern (Jain, 1993). Nachdem die Granulozyten die Blutbahn verlassen haben, können sie, entlang eines chemischen Gradienten (Chemotaxis), aktiv an den Ort der Entzündung vordringen. Dieser Prozess wird durch lösliche Faktoren wie der Komplementkomponente C5a und Interleukin-8 vermittelt. Die zu phagozytierenden Partikel müssen zunächst an Immunglobuline oder Komplementfaktoren (C3a) gekoppelt werden. Dieser Vorgang wird Opsonisierung genannt. Über Immunglobulin- und Komplementrezeptoren wird das zu phagozytierende Material an die Granulozytenmembran gebunden und von dieser umflossen. Nach Aufnahme ins Zytoplasma verbindet sich das so entstandene Phagosom mit dem Lysosom zum Phagolysosom (Lösch et al., 2000). Die Zelle hat zwei verschiedene Möglichkeiten phagozytiertes Material abzutöten. Diese werden als sauerstoffabhängiger und sauerstoffunabhängiger Weg kategorisiert (Jain, 1993). Beim sauerstoffunabhängigen Weg wird das phagozytierte Material mit dem Inhalt der Lysosomen (unter anderem Lysozym, saure Hydrolasen, hydrolytische Enzyme) in Kontakt gebracht und zerstört. Eine andere Möglichkeit der Abtötung von Mikroorganismen ist die Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen (Jain, 1993; Lösch et al., 2000). Im Zuge der Phagozytose erhöht sich die aerobe und anaerobe Glykolyse und somit der Sauerstoffverbrauch. Dieser Prozess wird ‚metabolic burst‘

genannt. Während dieses Vorganges bilden sich in der Zelle unter Einbezug des Pentosephosphatwegs und der membranständigen NADPH-Oxidase toxische Sauerstoffmetaboliten (Wasserstoffperoxid, Superoxidanion, Hydroxylradikal und einfacher Sauerstoff), die für die Abtötung der Erreger wichtig sind (Jain, 1993). Verglichen mit humanen und kaninen neutrophilen Granulozyten zeigen die heterophilen Granulozyten des Huhns eine gleich starke Toxizität gegenüber Bakterien, ihre Phagozytosekapazität ist jedoch vergleichsweise geringer (Andreasen und Latimer, 1990).

## **2.2.4 Eosinophile Granulozyten**

### **2.2.4.1 Allgemeines**

Die eosinophilen Granulozyten kommen meist nur in geringer Zahl vor. Sie treten häufig im Zusammenhang mit allergischen oder parasitären Erkrankungen sowie in chronisch entzündlichem Gewebe auf (Loeffler, 1978; Jain, 1993). Beim Huhn und der Schleiereule wurde ein Anstieg der eosinophilen Granulozyten von 1,7 % auf 6,8 % während der Mauser festgestellt. Solch ein Anstieg tritt auch unter Einfluß von Kälte auf während bei Hitze die eosinophilen Granulozyten beim Huhn sinken. Im Allgemeinen ist eine aviäre Eosinophilie jedoch ein seltenes Ereignis und scheint anderen Voraussetzungen zu folgen als beim Säugetier (Gylstorff und Grimm, 1998). Im Gegensatz zu den heterophilen Granulozyten besitzen die Eosinophilen eher runde und weniger zahlreiche Granula (Loeffler, 1978).

### **2.2.4.2 Bildung**

Die Granulopoese der Vögel ähnelt der der Säugetiere (Campbell und Ellis, 2007). Sie findet hauptsächlich im Knochenmark, zu geringen Teilen aber auch in anderen Geweben, wie Thymus und Milz statt. Die Granulopoese wird durch Mediatoren wie IL3 und 5, sowie CSF-GM (engl.: colony stimulating factor granulocyte-macrophage) von aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen induziert (Jain, 1993). Die drei Granulozytentypen durchlaufen morphologisch sich gleichende Differenzierungsstufen (Welsch, 2003). Die eosinophilen Granulozyten entwickeln sich von der pluripotenten über die myeloische Stammzelle zu der Progenitorzelle CFU-Eos (engl.: colony forming unit eosinophil) (Gassmann und Lutz, 2004). Über weitere Zellteilungen entstehen die Myeloblasten, die Promyelozyten und schließlich die Myelozyten (Campbell und Ellis, 2007). Im Stadium der Promyelozyten sind erstmals primäre Granula, gebildet vom Golgi-Apparat, im Zytoplasma der verschiedenen Granulozytenarten erkennbar (Jain, 1993). Diese primären Granula variieren stark in

Größe und Farbe. Während der nächsten Differenzierungsstufe entwickeln die Myelozyten die sekundären oder spezifischen Granula. In diesem Differenzierungsstadium können eosinophile Granulozyten zum ersten Mal von den zwei anderen Granulozytenklassen morphologisch unterschieden werden. Über Metamyelozyten und Stabkernige entwickeln sich schließlich die reifen eosinophilen Granulozyten (Campbell und Ellis, 2007). Die Produktion der eosinophilen Granulozyten dauert für gewöhnlich zwischen zwei und sechs Tage. Ihr intravaskulärer Aufenthalt beträgt meist nur ein paar Stunden, bevor sie dann ins Gewebe auswandern und für gewöhnlich nicht wieder in die Zirkulation zurückkehren (Jain, 1993).

### 2.2.4.3 Morphologie

Die eosinophilen Granulozyten sind typischerweise weniger zahlreich als die heterophilen Granulozyten (Clark et al., 2009) sind aber in etwa gleich groß (Bonadiman et al., 2009). Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl schwankt zwischen den verschiedenen Vogelarten. Sie machen beim Ara und der Amazone durchschnittlich 0-1 %, beim Wellensittich 0-2 %, (Kummerfeld, 2007), beim Truthahn 3,9 %, beim Huhn 5 %, bei der Ente 5,7 %, bei der Taube 6,1 % und bei der Gans 14,5 % der Leukozytenpopulation aus (Loeffler, 1978). Beim erwachsenen Strauß sind 0,8-1,2 % der Gesamtleukozytenzahl von  $5 \times 10^9$  pro Liter Blut eosinophile Granulozyten (Mushi et al., 1999).

Die eosinophilen Granulozyten der Vögel haben eine runde bis unregelmäßige Form und erreichen bei den meisten Spezies einen mittleren Durchmesser von  $7,9 \mu\text{m}$  (Campbell und Ellis, 2007). Die Größe kann jedoch stark variieren und hat eine Spannweite von 4 bis  $11 \mu\text{m}$  (Lucas und Jamroz, 1961; Hodges, 1977; Bounous und Stedman, 2000). Der segmentierte Zellkern ist meist zwei-, mitunter aber auch dreilappig (Hodges, 1977; Santos et al., 2003; Kummerfeld, 2007) und sein Chromatin färbt sich im Vergleich zu den heterophilen Granulozyten dunkler und gleichmäßiger an (Clark et al., 2009). Der Kern und das Zytoplasma sind meist vollständig durch die, je nach Vogelart, runden bis ovalen, membranumgebenen eosinophilen Granula überlagert (Hodges, 1977; Bounous und Stedman, 2000). Diese sekundären oder auch spezifischen Granula erreichen bei den verschiedenen Vogelspezies eine Größe von bis zu  $1,2 \mu\text{m}$  (Maxwell, 1978). Sie dienen als Träger verschiedener zellspezifischer Enzyme, wie Peroxidase, saure Phosphatase und Arylsulfatase und ähneln somit in Inhalt und Aufgaben den Eosinophilen der Säugetiere (Campbell und Ellis, 2007). Die spezielle Färbung der Granula beruht auf dem Gehalt an stark kationischen (basischer) argininreichen Proteinen. Die beiden wichtigsten sind das MBP (engl.: major basic protein) und das ECP (engl.: eosinophil cationic protein). Beide wirken zytotoxisch und werden vor allem bei der Bekämpfung von

Endoparasiten eingesetzt (Jain, 1993).

Bei einer ultrastrukturellen Studie von 39 verschiedenen Vogelarten, teilte Maxwell (1978) die Granula der eosinophilen Granulozyten in drei morphologisch unterscheidbare Gruppen ein. Die Granula haben entweder ein homogenes Erscheinungsbild ohne weitere Einschlüsse oder sie enthalten einen Inhalt, der entweder kristallin oder nicht-kristallin ist. Die meisten Vertreter gehören zur ersten Gruppe, deren Granula ein homogenes Erscheinungsbild ohne abgrenzbaren Inhalt zeigen. Dazu zählen unter anderem die Hühnervögel und die japanische Wachtel. Zur zweiten Gruppe gehören ausschließlich Vertreter der Ordnung Gänsevögel (*Anseriformes*). Hier wurden in den Granula prominente, kristalline Einschlüsse gefunden, die parallel zur Längsachse angeordnet sind (Maxwell, 1978). Dieses längliche lamellenartige Eiweißkristalloid dient der Stabilität (Liebich, 2004) und ist neben den Anseriformes auch ein Charakteristikum der humanen eosinophilen Granulozyten (Mahmudi-Azer et al., 2010). Zur dritten Gruppe gehören unter anderem der weiße Storch und der Seidenreiher. Bei diesen Vogelarten wurde ein nicht-kristalliner Inhalt in den Granula nachgewiesen, welcher aus Bündeln aus Mikrotubuli und –filamenten besteht, die parallel zur Längsachse der Granula verlaufen. Diese vergleichende Studie zeigt zum einen, dass kein phylogenetischer Zusammenhang hinsichtlich der Morphologie der eosinophilen Granulozyten besteht, zum anderen, dass alle drei Gruppen die gleichen Enzyme in denselben Strukturen lokalisiert haben und dadurch jede Granulaform Lysosomen darstellt (Maxwell, 1978).

Unter dem Elektronenmikroskop zeigen die eosinophilen Granulozyten eine runde bis unregelmäßige Form mit vereinzelt zyttoplasmatischen Ausläufern. In der Zelle befindet sich ein segmentierter Kern mit zentral gelagertem Euchromatin und peripheren Heterochromatin. Das Zytoplasma beinhaltet neben großen kugelförmigen elektronendichten Granula, raues endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, pinozytische Vesikel und Vesikel mit dense bodies (Santos et al., 2003) sowie freie Ribosomen und einen ausgeprägten Golgi-Apparat (Hodges, 1977). Die Elektronendichte der einzelnen Granula kann, abhängig vom Gehalt ungesättigter bzw. gesättigter Fettsäuren, leicht variieren. Die weniger elektronendichten Granula besitzen mehr gesättigte, die elektronendichten dagegen mehr ungesättigte Fettsäuren (Santos et al., 2003). Dieterien-Lievre (1988) unterscheidet in einer ultrastrukturellen Studie zwischen primären unreifen und sekundären ausgereiften Granula. Erstere sind kugelförmig und etwas größer und stellen eine Vorstufe der ausgereiften kleineren Granula dar (Dieterien-Lievre, 1988; Campbell und Ellis, 2007). Andere Autoren beschreiben nur eine Population von runden elektronendichten Granula (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Santos et al., 2003). Bonadiman und Mitarbeiter (2009) untersuchten die eosinophilen Granulozyten des Straußes und unterschieden drei verschiedene Typen von Granula. Alle drei haben eine runde Form, Typ I und II treten am häufigsten auf, wobei Typ II etwas elektronendichter erscheint. Typ III wurde nicht in

allen eosinophilen Zellen entdeckt und enthält einen exzentrisch gelagerten elektronendichten Inhalt (Bonadiman et al., 2009).

#### 2.2.4.4 Zytochemische Eigenschaften

Die Granula der aviären eosinophilen Granulozyten zeigen beim Nachweis von Peroxidase und saurer Phosphatase eine stark positive Reaktion (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Maxwell, 1978; Andreasen und Latimer, 1990). Die Reaktionsprodukte konnten sowohl in den primären als auch in den sekundären Granula nachgewiesen werden (Maxwell, 1978). Die Granula der Eosinophilen der Säugetiere, einschließlich des Menschen, enthalten  $\beta$ -Glukuronidase (Follette et al., 1952; Marshall et al., 1988). Des Weiteren sind die eosinophilen Granulozyten PAS-positiv. Neben Glykogen enthalten sie auch Polyaminosäuren, welche sich mit einer positiven Reaktion bei der Sirius-Red-Färbung nachweisen ließen (Santos et al., 2003). Alkalische Phosphatase konnte nicht in den aviären eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Ebenso ließ sich beim Strauß keine Aktivität der unspezifischen Esterase  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase finden (Ergun et al., 2004). Beim Greyhound konnte keine Aktivität der spezifischen Esterase Naphhtol-AS-D-Chloracetat-Esterase in den eosinophilen Granulozyten festgestellt werden (Iazbik und Couto, 2005). Bei Säugetierarten wurde eine Aktivität von alkalische Phosphatase und unspezifischen Esterasen im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten nachgewiesen (Jain, 1993).

Da lichtmikroskopisch eosinophile und heterophile Granulozyten, vor allem die unreifen Vorstufen der Heterophilen mit runden Granula leicht verwechselt werden können, verschaffen die zytochemischen Techniken hier eine klare Unterscheidung (Andreasen und Latimer, 1990). Die Granula der eosinophilen Granulozyten der Vögel werden aufgrund der hydrolytischen Enzyme wie die der Säugetiere als lysosomale Strukturen eingeordnet (Maxwell, 1978).

#### 2.2.4.5 Zytoskelett

Eosinophile Granulozyten enthalten monomeres globuläres G-Aktin, welches unter dem Einfluß von Histamin, einem endogenen Botenstoff aus den Granula der basophilen Granulozyten und Mastzellen zu filamentösen F-Aktin polymerisiert. Dieser rezeptorvermittelte ( $H_4R$ ) Vorgang induziert somit eine Umwandlung des Aktin-Zytoskeletts, welches Voraussetzung für Chemotaxis, Adhäsion und Migration der eosinophilen Granulozyten ist (Buckland et al., 2003; Barnard et al., 2008; Schratl und Heinemann, 2009).

Bei der Untersuchung der Motilitätsfähigkeit der eosinophilen Granulozyten des rauhäutigen Gelbbauchmolchs (*Taricha granulosa*) konnten Koonce und Mitarbeiter (1984) feststellen, dass die Zellen Mikrotubuli enthalten. FITC-gekoppelte Tubulinantikörper banden mit hoher Affinität an Zentrosomen, von denen radiär Mikrotubuli zwischen die Granula in die Peripherie ausstrahlten. Daneben konnten Mikrotubulibündel festgestellt werden, die zwischen Zellkern und Membran verliefen. Die Autoren konnten weiterhin nachweisen, dass Intermediärfilamente im gesamten Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten vorhanden waren (Koonce et al., 1984).

Beim Kranich konnte Maxwell (1979) bei den Granula mit kristallinen Einschlußkörperchen Bündel von Mikrofilamenten mit einem Durchmesser von 5-7 nm nachweisen, die innerhalb der Granula parallel zur Längsachse verliefen (Maxwell, 1979). Bei einer Studie der humanen eosinophilen Granulozyten wurde in den Membranen der Granula eine sogenannte membranotubuläre Struktur entdeckt die vermutlich eine Rolle in der Sekretion der Granula spielt (Mahmudi-Azer et al., 2010).

#### 2.2.4.6 Aufgaben

Die eosinophilen Granulozyten sind wichtige Effektorzellen bei Entzündungen und allergischen Reaktionen (Schratl und Heinemann, 2009). Dabei übernehmen sie verschiedene Aufgaben. Zum einen sind sie in der Lage fremde Partikel und Bakterien zu phagozytieren, zum anderen bekämpfen sie Endoparasiten durch Degranulation und Exozytose zytotoxischer Stoffe in den extrazellulären Raum. Der Abtötungsprozess wird primär durch MBP, Peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Halogene und Sauerstoffmetaboliten vermittelt (Jain, 1993). Die eosinophilen Granulozyten bilden proinflammatorische Mediatoren wie Kationen, Wachstumsfaktoren, Zyto- und Chemokine und speichern sie in ihren spezifischen Granula. Nach Exozytose in den extrazellulären Raum wirken die Mediatoren als Katalysator bei verschiedenen allergisch-entzündlichen Prozessen wie Asthma, allergischer Rhinitis und Dermatitiden. Des Weiteren ist eine Erhöhung der eosinophilen Granulozyten auch bei parasitären Erkrankungen, vor allem Wurminfektionen gegeben (Jain, 1993; Mahmudi-Azer et al., 2010).

Die eosinophilen Granulozyten sind fähig ins Gewebe zu migrieren. Dies geschieht aufgrund eines chemotaktischen Reizes. Dazu gehören unter anderem AgAk-Komplexe in Kombination mit IgE, Leukotriene und aktivierte Komplementfaktoren. Die wichtigsten Mediatoren sind jedoch Histamine und eosinophil-spezifische Lymphokine. Bindet Histamin an den H<sub>4</sub>-Rezeptor an der Zellmembran des eosinophilen Granulozyten, kommt es zu Umbauprozessen des Aktinskelettes der Zelle. Diese Formveränderung macht eine Motilität und anschließende Auswanderung ins Gewebe erst möglich (s.

Kapitel 2.2.4.5.) (Barnard et al., 2008). Weiterhin induziert Histamin eine intrazelluläre Kalziumerhöhung und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zellmembran (Buckland et al., 2003). Andererseits führt Stress, einhergehend mit einem Anstieg von Glukokortikoiden zu einer Eosinopenie, da diese Histamin neutralisieren (Jain, 1993). Die eosinophilen Granulozyten besitzen auch eine immunsuppressive Funktion bei hypersensitiven Reaktionen. Dabei beseitigen sie Immunkomplexe und inaktivieren die von basophilen Granulozyten und Mastzellen freigesetzten Mediatoren, unterdrücken deren Degranulation und unterbinden die Bildung aktiver Metaboliten (Kroegel et al., 1994). Aufgrund des Enzymprofils lassen sich die Granula der Eosinophilen, wie auch die Granula der Eosinophilen der Säugetiere als Lysosomen einstufen (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Maxwell, 1978)

## **2.2.5 Basophile Granulozyten**

### **2.2.5.1 Allgemeines**

Die basophilen Granulozyten stellen im allgemeinen die kleinste Granulozytenfraktion im peripheren Blut dar (Lösch et al., 2000). Im Vergleich zum Blutbild der Säugetiere sind aviäre basophile Granulozyten jedoch etwas häufiger anzutreffen (Gylstorff und Grimm, 1998; Campbell und Ellis, 2007) und sind bei manchen Vogelarten, unter anderem Huhn, Finken, Fasanen und auch beim Strauß zahlreicher als eosinophile Granulozyten (Mushi et al., 1999; Latimer und Bienzle, 2000). Funktionell scheinen die basophilen Granulozyten mit den Mastzellen verwandt zu sein (Lösch et al., 2000). Der wichtigste Inhaltsstoff ihrer Granula ist der endogene Botenstoff Histamin, welcher nach Freisetzung rezeptorvermittelt allergische und entzündliche Prozesse moduliert (Buckland et al., 2003). Auch in ihrem Erscheinungsbild durch ihre Granula und dem unsegmentierten Zellkern ähneln sie den Mastzellen (Campbell und Ellis, 2007).

### **2.2.5.2 Bildung**

Die basophilen Granulozyten finden ihren Ursprung wie alle anderen Blutzellen aus der pluripotenten Stammzelle im Knochenmark (Jain, 1993). Ihr Reifeweg ähnelt dem der Säugetiere (Campbell und Ellis, 2007). Über die myeloische Stammzelle differenzieren sie sich weiter zur Progenitorzelle CFU-Bas (engl.: colony forming unit basophil) (Gassmann und Lutz, 2004). Über die Stadien Myeloblast, Promyelozyt, Myelozyt und Metamyelozyt reifen sie schließlich zu adulten basophilen Granulozyten heran. Auf Stufe der Myelozyten bilden sich die spezifischen Granula, was eine erstmalige

Identifikation und Unterscheidung von den beiden anderen Granulozytenarten ermöglicht (Campbell und Ellis, 2007). Die Produktion der basophilen Granulozyten wird durch sogenannte ‚Basophilopoietins‘ stimuliert, die von aktivierten T-Lymphozyten ausgeschüttet werden. Des Weiteren wird die Bildung und Differenzierung von basophilen Granulozyten sowie auch von Mastzellen von IL-5, IL-3 und CSF-GM reguliert (Jain, 1993).

### 2.2.5.3 Morphologie

Beim adulten Strauß machen die basophilen Granulozyten einen prozentualen Anteil von 6 % an der Gesamtleukozytenzahl von  $5 \times 10^9$  pro L Blut aus (Mushi et al., 1999). Die basophilen Granulozyten der Vögel haben einen mittleren Durchmesser von 8,2  $\mu\text{m}$  und sind somit im Durchschnitt etwas kleiner als die heterophilen Granulozyten (Dieterien-Lievre, 1988).

Nach Romanowsky Färbung zeigen sich die aviären basophilen Granulozyten als unregelmäßig runde Zellen (Clark et al., 2009). Das Zytoplasma enthält dicht gepackte mittelgroße kugelförmige tief basophile Granula (Hodges, 1977; Dieterien-Lievre, 1988). Diese intensive metachromatische Basophilie beruht auf der chemischen Zusammensetzung des in den Granula enthaltenen Heparins, einem stark anionischen, sulfatierten Mukopolysaccharid (Weiss, 1988). Die Granula erreichen einen Durchmesser von bis zu 0,8  $\mu\text{m}$  (Hodges, 1977). Verglichen mit der starken Anfärbbarkeit der Granula, erscheint der Zellkern relativ blass (Clark et al., 2009). Der überwiegend einlappige bzw. runde bis ovale Zellkern liegt bei den meisten Vogelarten exzentrisch an einem Pol der Zelle und enthält schwach kondensiertes Chromatin (Hodges, 1977; Clark et al., 2009). Er färbt sich schwach basophil an und ist häufig von zytoplasmatischen Granula bedeckt (Kummerfeld, 2007; Clark et al., 2009). Zwischen den Vogelarten können Unterschiede in Dichte, Größe und Farbe der Granula auftreten. Teilweise färben sich die Granula nicht an (Clark et al., 2009). In anderen Fällen werden die Granula durch wässrige Lösungen ausgewaschen (Hodges, 1977). Dann erscheinen sie als runde Vakuolen in einem blassen Zytoplasma (Clark et al., 2009).

Elektronenmikroskopisch betrachtet, stellen sich die basophilen Granulozyten der Vögel als relativ gleichmäßig runde Zellen dar, die wenige kurze Pseudopodien ausbilden können (Hodges, 1977). Im Zytoplasma können drei Arten von Granula unterschieden werden. Die am häufigsten anzutreffende Art ist rund und elektronendicht. Die zweite Art besitzt eine getüpfelte innere Struktur und die dritte Art der Granula zeigt eine ‚honigwabenförmige‘ Anordnung. Diese honigwabenartige Struktur besitzen auch humane Mastzellen. Es wird angenommen, dass diese Struktur in Verbindung mit Heparin und Histamin steht. Analog dazu ist diese Honigwabenstruktur ein Marker für aviäre



basophile Granulozyten (Dieterien-Lievre, 1988). Auch bei der Untersuchung der Granula des Wegebussards, kamen Santos und Mitarbeiter (2003) auf drei verschiedene Granulaformen. Die erste Form ist homogen und elektronendicht, die zweite hat ein helleres Erscheinungsbild mit elektronendichten Einschlüssen und die dritte, häufigste Granulaform zeigt einen feingranulären Inhalt (Santos et al., 2003). Eine weitere elektronenmikroskopische Untersuchung am Blut des Huhnes zeigte nur zwei verschiedenen Granulaformen. Die Mehrheit, Typ 1, sind runde, bis zu 0,6 µm große Granula, deren Elektronendichte mit dem Reifegrad der Zelle variiert. Typ 2 sind ebenfalls rund, besitzen einen homogenen, sehr elektronendichten Inhalt und sind mit einem Durchmesser von 0,1 µm viel kleiner (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Die Variationen der Granula der basophilen sowie auch der heterophilen Granulozyten existieren vermutlich aufgrund unterschiedlicher Reifegrade der Granula (Santos et al., 2003). Des Weiteren können im Zytoplasma Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, kleine Lipidtropfen und Glykogengranula gefunden werden (Hodges, 1977).

#### **2.2.5.4 Zytochemische Eigenschaften**

Daimon und Caxton-Martins (1977) untersuchten die zytochemischen Eigenschaften der basophilen Granulozyten von Hühnern. Bei ihren enzymhistochemischen Untersuchungen von saurer und alkalische Phosphatase sowie Peroxidase reagierte nur die saure Phosphatase in den getüpfelten Granula in geringem Umfang positiv (Daimon und Caxton-Martins, 1977). In den Granula sind Histamin, Heparin und zinkhaltige Proteine enthalten (Sinowitz und Hees, 2000). Beim Aalmolch reagierte sowohl das Zytoplasma als auch die Granula PAS-positiv, jedoch in geringerem Ausmaß als bei den heterophilen Granulozyten (Cowden, 1965). Beim Leopard wurde eine stark positive Reaktion auf den Nachweis von  $\beta$ -Glukuronidase nachgewiesen, sowie schwach positive Reaktionen auf PAS und ANAE (Salakij et al., 2010). Die ANAE wurde auch beim Meerschweinchen auf der Oberfläche, sowie in ausgestoßenen Granula gefunden, nicht jedoch in Granula von unstimulierten basophilen Granulozyten (Inoue et al., 1991). Parwaresch und Mitarbeiter (1970) wiesen in den Vorstufen der Basophilen eine Aktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase nach. Sie war im Stadium der basophilen Myelozyten am stärksten, nimmt dann innerhalb der Reifungsreihe gleichmäßig und stufenlos ab und ist in reifen basophilen Granulozyten nicht mehr nachzuweisen (Parwaresch et al., 1970). Um die basophilen Granulozyten darzustellen, bietet sich die Färbung mit Toluidinblau an. Durch die im Heparin veresterte anorganische Schwefelsäure entsteht eine charakteristische Metachromasie, die sich in einem leuchtend rotvioletten Farbniederschlag zeigt (Freund, 2008).

### 2.2.5.5 Zytoskelett

In humanen basophilen Granulozyten, sowie Mastzellen wurden die Zytoskelettproteine Tubulin und Aktin identifiziert. Basophile Granulozyten besitzen unter anderem auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für Interleukin-3 (IL3). Dieses Interleukin wirkt als Überlebensfaktor, hemmt die Apoptose, reguliert die Differenzierung, Wachstum sowie Sekretion und fördert die Histaminproduktion im Inneren der Zelle. Daneben wurde festgestellt, dass nach Inkubation mit IL3, basophile Granulozyten vermehrt Aktin bilden. Die Tubulinproduktion stieg dagegen erst nach kombinierter Stimulation von IL3 und Anti-IgE. Es wurde eine Parallele zwischen der Tubulinexpression und der Histaminfreisetzung entdeckt. Wird die Tubulinpolymerisation durch beispielsweise Colchicin unterdrückt, so hemmt dies auch die Histaminfreisetzung. Somit wird angenommen, dass Tubulin und Aktin eine wichtige Rolle im Prozess der Histaminfreisetzung in basophilen Granulozyten und Mastzellen spielen (Nielsen et al., 2004).

Bei den Mastzellen wurde nachgewiesen, dass die Aktinfilamente netzförmig um die Granula liegen und diese auch während der Exozytose unterstützend wirken (Nielsen et al., 2004).

### 2.2.5.6 Aufgaben

Die Funktion der basophilen Granulozyten der Vögel ist nicht hinreichend geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass ihre Funktion mit der der basophilen Granulozyten der Haussäugetiere und der Mastzellen übereinstimmt, da sich ihr Granulainhalt ähnelt (Campbell und Ellis, 2007). Bei den Haussäugetieren spielen die basophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle bei pathophysiologischen Vorgängen wie beispielsweise allergischen Reaktionen. Basophile Granulozyten können Immunglobuline vom Typ E binden. Durch Bindung von diesen Immunglobulinen und Quervernetzung der IgE Moleküle mit den entsprechenden Allergenen kommt es zur Degranulation. Durch die Freisetzung von Histamin, Heparin und Serotonin aus den basophilen Granula wird die Gefäßpermeabilität und der Gefäßtonus beeinflusst und so die Entzündungsreaktion moduliert. Freigesetztes Histamin führt unter anderem bei eosinophilen Granulozyten über den H<sub>4</sub>-Rezeptor zu Umbauvorgängen des Zytoskeletts. Dadurch ist eine Auswanderung ins Gewebe und eine Beteiligung anderer Entzündungszellen erst möglich (Barnard et al., 2008). Außerdem beteiligen sich die aviären basophilen Granulozyten bei akuten Entzündungsreaktionen und Typ 4 Hypersensitivitätsreaktionen (Lösch et al., 2000). Versuche belegen, dass die basophilen Granulozyten der Vögel bei Befall von internen und externen Parasiten wie Zecken, Schistosomen und Luftsackmilben eine Immunantwort gewährleisten. Massive basophile Infiltrate in experimentell herbeigeführten Sarkomen beweisen eine

basophil-assoziierte Tumortoxizität (Latimer und Bienzle, 2000). Basophile Granulozyten sind eine der ersten Leukozyten, die bei einer Immunantwort ins Gewebe einwandern (Bounous und Stedman, 2000).

## 2.2.6 Lymphozyten

### 2.2.6.1 Allgemeines

Das Immunsystem gliedert sich in das unspezifische und das spezifische Abwehrsystem. Das unspezifische Abwehrsystem wird von Granulozyten, Monozyten und Gewebemakrophagen gebildet. Träger der spezifischen Immunantwort sind die immunologisch kompetenten B- und T- Lymphozyten, die mit Hilfe von akzessorischen Zellen, wie Monozyten und Makrophagen körpereigene und fremde Substanzen unterscheiden können (Sinowatz und Hees, 2000).

Bei den verschiedenen Haussäugetieren bilden die Lymphozyten unterschiedliche Anteile am weißen Blutbild. So sind bei Rind, Schaf und Ziege zwischen 50 und 70 % der Leukozyten Lymphozyten, beim Pferd und bei der Katze zwischen 30 und 35 %, beim Hund dagegen nur 20-25 % (Liebich, 2004). Beim Vogel variiert die Lymphozytenzahl je nach Art, Rasse, Alter und Geschlecht und reagiert äußerst labil auf endogene und exogene Einflüsse. Der gesunde Nymphensittich beispielsweise weist mit  $60 \times 10^9$  Lymphozyten pro L Blut eher hohe Werte, der Turmfalke mit  $16 \times 10^9/L$  und die Rabenkrähe mit  $14 \times 10^9/L$  sehr niedrige Werte auf (Gylstorff und Grimm, 1998). Der Strauß weist einen Anteil von 32 % an der Gesamtleukozyten von  $5 \times 10^9$  pro Liter Blut auf (Mushi et al., 1999). Sie werden in kleine, mittlere und große Lymphozyten eingeteilt, wobei die kleinen und mittleren Vertreter den Hauptbestandteil ausmachen (Hodges, 1977).

#### 2.2.6.1.2 Das Lymphatische System der Vögel

Das Lymphatische System dient der Infektionsabwehr, vor allem bei spezifischen Infektionen. Darüber hinaus können Zelltrümmer und kleinste Fremdkörper entfernt werden. Zum Lymphsystem der Vögel gehören die Lymphgefäße, die Lymphknoten bzw. die Lymphfollikel, die Milz, die Bursa Fabricii und der Thymus.

In den *Lymphgefäßen* wird lymphatische Flüssigkeit, angereichert mit Lymphozyten, parallel zu den Venen zurück zum Herzen transportiert. Die Lymphgefäße sind sehr dünnwandig und haben beim Vogel nur wenige Taschenklappen. Sogenannte Lymphherzen an der Schwanzbasis besitzen jedoch

eine muskulöse Wand und sind zur Pulsation fähig. Lymphknoten als Filtereinrichtung fehlen bei Huhn und Taube. Ente und Gans haben jedoch zwei Lymphknotenpakete ausgebildet. An der Halsbasis befinden sich die Halslymphknoten (Lnn. cervicothoracales) und die, in der Beckenhöhle lokalisierten Lendenlymphknoten (Lnn. lumbales). Diese weisen einen wesentlich einfacheren Bau auf als die Lymphknoten der Säugetiere und besitzen keine Kapsel und keine Trabekel (Loeffler, 1978). Außer in den Lymphknoten sind Lymphozyten in zahlreichen mikroskopisch kleinen und größeren (bis 1 cm Durchmesser) Lymphfollikeln in verschiedenen Organwänden eingelagert (Bezzel und Prinzing, 1977). Solche Lymphknötchen befinden sich in der Wand des Verdauungstrakts und der Abdominalorgane, den serösen Häuten und der subkutanen Haut (Campbell und Ellis, 2007), sowie im Pharynx, den Choanen und um die pharyngealen Öffnungen der Eustachischen Röhre (Bezzel und Prinzing, 1977). Vor allem in den Blinddärmen sind diese Lymphfollikel stark ausgeprägt (Blinddarmmandeln, Zäkaltonsillen) (Loeffler, 1978).

Die *Milz* wird funktionell in die weiße und rote Milzpulpa eingeteilt. Die rote Milzpulpa speichert Erythrozyten und baut überalterte und geschädigte Blutzellen ab. Die weiße Milzpulpa besteht hauptsächlich aus retikulärem Gewebe, in welches zahlreiche Lymphozyten eingelagert sind. Ihre Funktion ist mit der der Lymphknoten gleichzusetzen. Die Retikulumzellen der weißen Milzpulpa und die Endothelzellen der roten Milzpulpa sind außerdem zur Phagozytose befähigt.

Die *Bursa Fabricii* ist ein spezielles Organ, welches nur die Vögel aufweisen. Sie wurde 1611 von Hieronymus Fabricius entdeckt. Es handelt sich hierbei um eine sackartige Ausbuchtung dorsal der Kloake (Loeffler, 1978). Sie öffnet sich zur dorsalen Wand des Proctodeum (Campbell und Ellis, 2007). In ihren Hohlraum münden zahlreiche Drüsenschläuche, die von Lymphfollikeln umgeben sind. Diese bilden spezielle Lymphozyten die dann als B-Lymphozyten Milz, Lymphknoten, Lymphfollikel besiedeln und spezifische humorale Antikörper bilden. Die Bursa Fabricii ist bei jungen Vögeln besonders stark ausgeprägt. Die höchste Aktivität zeigt sie in der 2.-6. Lebenswoche. Dann wird sie bis zur Geschlechtsreife wieder zurückgebildet.

Der *Thymus* besteht bei Säugetier und Vogel aus einer äußeren Rinde, die unzählige Lymphozyten enthält und einem eher lymphozytenärmeren Mark. Beim Vogel ist das Organ jedoch nicht einheitlich sondern in 5-8 Lappen untergliedert, die beidseitig am Hals liegen. Die Aufgabe des Thymus besteht darin, T-Lymphozyten zu bilden. Auch dieses Organ bildet sich mit zunehmenden Alter zurück (Loeffler, 1978). (Auf die genauen Funktionen der B- und T-Lymphozyten wird im Kapitel 2.2.6.6 weiter eingegangen).

### 2.2.6.2 Bildung

Die Entwicklung der Lymphozyten beginnt wie die aller Blutzellen mit der pluripotenten Stammzelle, dem Hämoytoblasten im Knochenmark (Liebich, 2004). Diese differenziert sich weiter zu der lymphatischen Stammzelle. Die aviären lymphoiden Progenitorzellen verlassen nun das Knochenmark und besiedeln die primären lymphatischen Organe, Thymus und Bursa Fabricii (Jain, 1993) und beim Säuger die ‚Bursaäquivalente‘ Knochenmark und Peyerschen Platten (Lösch et al., 2000).

Hier entwickeln sich zwei funktionell und phänotypisch voneinander unterscheidbare lymphoide Precursorzellen. Diese B- und T- Precursorzellen besiedeln nun die sekundären lymphatischen Organe wie das lymphoretikuläre Gewebe der Milz, Peyersche Platten und Lymphfollikelaggregate, um dort ihren spezifischen Aufgaben nachzugehen. (Die Entwicklung von T-Lymphozyten im Thymus wird unter anderem durch die Interleukine IL1, IL2, IL4, IL6 und IL7, die in den sekundär lymphatischen Organen von den Interleukinen IL1, IL2, IL4, IL7 und IL9 beeinflusst. Die Differenzierung der B-Lymphozyten wird in der Bursa Fabricii von IL1 bis IL7 und in den sekundären Organen von IL1 bis IL6 gesteuert. Lymphopoese wird für gewöhnlich durch Antigenkontakt stimuliert und durch Kortikosteroide, Sexualhormone und Unterernährung unterdrückt (Jain, 1993). Bei den Haussäugetieren beträgt die Lebensdauer der T-Lymphozyten mehrere Monate bis Jahre, während B-Lymphozyten deutlich kürzer leben. Relativ langlebig sind in beiden Populationen die Gedächtniszellen, (engl.: memory cells), die besondere Bedeutung bei sekundären spezifischen Abwehrreaktionen nach wiederholtem Antigenkontakt haben (Lösch et al., 2000).

### 2.2.6.3 Morphologie

Die aviären Lymphozyten werden in kleine, mittlere und große Lymphozyten eingeteilt. Den Hauptanteil dieser Zellen bilden mit circa 60-70 % die kleinen Lymphozyten (Kummerfeld, 2007).

Die Anzahl der Lymphozyten im Blutausschlag beträgt beim Strauß 30-34 % der Gesamtleukozytenzahl (Mushi et al., 1999). In folgender Tabelle sind Lymphozytenkonzentrationen verschiedener Vogelspezies aufgelistet:

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl verschiedener Vogelarten

	Wellensittich <sup>1</sup>	Graupapagei <sup>1</sup>	Ara <sup>1</sup>	Kakadu <sup>1</sup>	Taube <sup>1</sup>	Strauß <sup>2</sup>	Wachtel <sup>3</sup>
Leukozyten (x10 <sup>9</sup> /L)	3-8,5	5-11	6-12	5-11	10-30	5	12,5-24,6
Lymphozyten (%)	25-45	25-45	20-45	20-45	25-70	32	50-70

Quellen: <sup>1)</sup> Johnson-Delaney und Harrison 1996, <sup>2)</sup> (Mushi et al., 1999) <sup>3)</sup> (Pollack et al., 2005)

Der kleine Lymphozyt ist der kleinste Vertreter der Leukozyten des Vogels (Clark et al., 2009). Sein Durchmesser bewegt sich zwischen 4-10 µm (Bezzel und Prinzinger, 1977; Loeffler, 1978). Er hat eine runde Form und besitzt einen runden, zentral gelegenen Kern mit geklumpten Chromatin und ein hohes Kern:Zytoplasma Verhältnis (Bounous und Stedman, 2000; Campbell und Ellis, 2007). Im Blutausschlag sehen die Lymphozyten der Vögel durch eine enge Aneinanderlagerung mit benachbarten Erythrozyten häufig deformiert aus (Hawkey und Dennett, 1989). Das Zytoplasma erscheint unter dem Lichtmikroskop oft nur als schmaler, manchmal einseitiger inkompletter basophiler Saum (Kummerfeld, 2007; Clark et al., 2009). Dieses blassblaue Zytoplasma ist ein Unterscheidungsmerkmal zu dem klaren Zytoplasma der Thrombozyten, die mit den kleinen Lymphozyten oft verwechselt werden (Bounous und Stedman, 2000; Campbell, 2004). Laut Maxwell (1974), der in einer ultrastrukturellen Studie sechs verschiedene Vogelspezies verglichen hat, besitzen kleine Lymphozyten eine runde Form mit teilweise auftretenden Pseudo- und Lobopodien. Der für gewöhnlich runde bis ovale Zellkern weist des Öfteren Einkerbungen auf (Nirmalan et al., 1972; Maxwell, 1974; Hodges, 1977). Heterochromatin, welches sich eher peripher an der Nukleusmembran ansammelt und Euchromatin liegen zu etwa gleichen Teilen vor (Nirmalan et al., 1972; Hodges, 1977). Gegenüber der Einkerbung des Kerns kann für gewöhnlich ein Golgi-Apparat und Zentriolen lokalisiert werden. Des Weiteren können im Zytoplasma raues endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, Mitochondrien, Vesikel, Vakuolen mit einem Durchmesser von weniger als 0,1 µm und dichte Granula mit einem Durchmesser von bis zu 0,5 µm festgestellt werden (Maxwell, 1974). Diese azurophilen Granula treten nur gelegentlich auf und ihre Bedeutung ist noch unklar (Bounous und Stedman, 2000; Campbell und Ellis, 2007).

Der mittlere Lymphozyt der Vögel ist etwas größer als der kleine Lymphozyt und reicht in seiner Größe in etwa an den aviären Granulozyt (Clark et al., 2009). Er hat eine runde bis ovale Form mit einem hohen Nucleus:Zytoplasma Verhältnis. Der Zellkern, für gewöhnlich rund, kann ebenfalls Einkerbungen enthalten (Maxwell, 1974). Im Gegensatz zu den kleinen Lymphozyten, liegt hier das peripher gelegene Heterochromatin in geringeren Anteilen vor als das reichlich vertretene zentral liegende Euchromatin (Hodges, 1977). Teilweise erreicht ihre Größe ein Viertel des Kerns. Charakteristisch für den mittelgroßen Lymphozyt ist die, im elektronenmikroskopisch sichtbare perinukleäre Zisterne. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu anderen Leukozyten ist der relativ geringe Gehalt an Zellorganellen. Das Zytoplasma enthält runde, ovale, teilweise nierenförmige durchschnittlich große Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Vesikel unterschiedlicher Größe, Vakuolen und membrangebundene Granula mit einer Größe von 0,1-1,0 µm. Gegenüber der Einkerbung des Zellkerns konnte in manchen Zellen ein Golgi-Apparat, sowie Zentriolen und Mikrotubuli festgestellt werden (Maxwell, 1974).

Gelegentlich können große Lymphozyten im Blutbild der Vögel gefunden werden. Diese haben einen Durchmesser von bis zu 15 µm (Bezzel und Prinzing, 1977). Sie enthalten einen runden bis ovalen Zellkern mit mäßig dichtem, unregelmäßig geklumpten Chromatin (Clark et al., 2009). Zum Teil werden sie mit Monozyten verwechselt. Diese besitzen jedoch mehr Zytoplasma, mit zum Teil darin befindlichen feinen eosinophilen Granula (Bounous und Stedman, 2000). Die großen Vertreter der Lymphozyten können als Vorstufen bzw. Übergangsformen angesehen werden (Loeffler, 1978; Bounous und Stedman, 2000).

Sobald Lymphozyten mit Antigenen in Kontakt kommen, transformieren sie sich in reaktivierte Lymphozyten. Reaktivierte Lymphozyten sind kleine und mittelgroße Lymphozyten mit stark geklumpten Chromatin und tief basophilem Zytoplasma (Campbell und Ellis, 2007). In dem dunkelblauen Zytoplasma kann teilweise ein klares Areal um den Nucleus und prominente azurophile Granula festgestellt werden (Bounous und Stedman, 2000; Campbell, 2004). Aktivierte Lymphozyten können anhand ihres zentral liegenden Kerns von Plasmazellen unterschieden werden (Campbell, 2004). Plasmazellen sind nur in sehr geringer Zahl im peripheren Blut des Vogels vertreten (Bounous und Stedman, 2000). Es handelt sich hierbei um große B-Lymphozyten, deren tief basophiles Zytoplasma einen exzentrisch gelegenen Zellkern enthält (Campbell und Ellis, 2007). Die Basophilie ist auf das komplexe raue endoplasmatische Retikulum zurückzuführen, welches einen Großteil des Zytoplasmas einnimmt. In den eher klaren Arealen im Zytoplasma befindet sich der Golgi-Apparat (Jain, 1993).

Eine Unterscheidung von B- und T-Lymphozyten im Blutausschlag ist nur mit Hilfe spezieller Verfahren möglich (Hawkey und Dennett, 1989).

#### 2.2.6.4 Zytochemische Eigenschaften

Lymphozyten weisen keine Peroxidase-Aktivität auf. Sie besitzen weder Chloracetat-Esterase noch alkalische Phosphatase. T-Lymphozyten besitzen eine unspezifische Esterase, die sich aber im Gegensatz zur unspezifischen Esterase der Monozyten nicht durch Natrium-Fluorid hemmen lässt (Jain, 1993). Diese  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase lässt sich mit einem positiven granulären Reaktionsprodukt nachweisen, mit ein bis zwei, manchmal mehr Granula pro Zelle. B-Lymphozyten sind ANAE-negativ, somit wird die Anwesenheit der Esterase oftmals auch als Differenzierungsmerkmal herangezogen (Ergun et al., 2004). Als B-Zell Marker wird häufig der Nachweis von saurer Phosphatase eingesetzt, da dieses hydrolytische Enzym hauptsächlich in Lymphozyten lokalisiert ist, welche von der Bursa Fabricii stammen (Dönmez und Sur, 2008). Lymphozyten sind PAS-positiv (Raskin und Valenciano, 2000). Plasmazellen weisen weder eine Peroxidase- noch eine unspezifische Esterase-Aktivität auf. Sie reagieren aber stark auf den Nachweis von  $\beta$ -Glukuronidase (Jain, 1993).

#### 2.2.6.5 Zytoskelett

Aktin, Tubulin und Vimentin wurden in den Lymphozyten der Menschen nachgewiesen (Atkins und Anderson, 1982; Brown et al., 2001). Jedes der drei Zytoskelettelemente hat in zirkulierenden Lymphozyten eine charakteristische Histotopik. Aktinfilamente sind durchgehend in der Region unterhalb der Zellmembran vorhanden, Tubulin strahlt von einem Mikrotubulizentrum in die Peripherie und Vimentinfilamente bilden ein, im Zytoplasma gelegenes grobes Netz. Diese typischen Anordnungen verändern und reorganisieren sich nach Stimulation durch bestimmte Chemokine und ermöglichen so den stabilen runden Lymphozyten eine so weitreichende Deformation, dass die aktivierten Zellen zur Diapedese durch Endothelspalten fähig sind. Aktinreiche Pseudopodien werden an der Oberfläche ausgebildet, das Netzwerk aus Vimentin kondensiert zu einem juxtannuklearen Aggregat und auch Tubulin zieht sich zurück und bildet ein Knäuel. Brown und Mitarbeiter (2001) vertraten die These, dass die Lymphozyten, die während der Zirkulation starken hydrodynamischen und mechanischen Kräften ausgesetzt sind, ihre Stabilität dem Gitter aus Vimentinfilamenten zu verdanken haben. In ihrer Studie untersuchen Brown und Mitarbeiter das Zytoskelett humaner Lymphozyten vor und nach Stimulation und den damit einhergehenden Veränderung von stabilen zu flexiblen Zellen. So behalten die zirkulierenden Lymphozyten auch nach Entfernen von Aktin und Tubulin ihre stabile runde Form. Nach Zusammenfall des Vimentingitters deformiert die Zelle und kann aus dem Gefäß auswandern (Brown et al., 2001).



## 2.2.6.6 Aufgaben

### 2.2.6.6.1 Allgemeines

Das Immunsystem der Vögel arbeitet wie das der Säugetiere (Bezzel und Prinzing 1977). Es dient der Abwehr von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten) und Fremdkörpern und hat zum Ziel, den Organismus frei von Infektionen zu halten. Dieses komplexe Abwehrsystem wird in das unspezifische oder angeborene und das spezifische oder erworbene Abwehrsystem gegliedert. Beide Systeme können nochmals in lösliche und zelluläre Komponenten unterteilt werden. Zu den löslichen Faktoren des unspezifischen Abwehrsystems gehören das Komplementsystem, die Akute-Phase-Proteine und das Interferonsystem. Die Zellen des unspezifischen Immunsystems umfassen die Granulozyten, die Monozyten und die Makrophagen. Da diese Komponenten ständig im Organismus vorliegen oder binnen weniger Stunden gebildet werden können, reagiert das unspezifische Abwehrsystem in der Regel sehr schnell. Mit einer zeitlichen Verzögerung von Tagen bis Wochen greift das spezifische Immunsystem, wenn Erreger die Barriere der unspezifischen Abwehr durchbrochen haben. In diesem Falle kommt es zur Aktivierung von Lymphozyten (zelluläre Komponente), die einerseits Erreger und infizierte Zellen des Körpers töten, andererseits spezifische Antikörper zur gezielten Abwehr der Erreger bilden (lösliche Komponente). Funktionell wird zwischen B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK) unterschieden. Das B-Zell-System ist für die humorale Abwehr, das T-Zellsystem für die zellvermittelte Abwehr verantwortlich. Diese funktionelle Einteilung der nach konventionellen Übersichtsfärbungen nicht voneinander unterscheidbaren Lymphozyten, kann z.B. durch immunzytochemische Methoden anhand charakteristischer Marker (Enzyme, Rezeptoren, Antikörpermoleküle) erfolgen. Nach Lösch und Mitarbeiter (2000) sind beim Haussäugetier die Anteile der B- und T-Lymphozyten in etwa gleich. Im Blut befinden sich allerdings nur etwa 1 % der Gesamtlymphozyten (Lösch et al., 2000). Die übrigen sind in den lymphatischen Organen, im Knochenmark oder als freie Zellen im lockeren Bindegewebe lokalisiert. Lymphozyten besitzen eine geringe amöboide Beweglichkeit. Sie phagozytieren nicht und besitzen kaum Lysosomen. Das Besondere ist ihre Fähigkeit zur Weiterentwicklung. Lymphozyten sind keine Endzellen. Sie können nach Stimulation weiter transformiert werden (Sinowatz und Hees, 2000). Da die einzelnen Komponenten der verschiedenen Abwehrsysteme sehr eng miteinander interagieren, existiert keine funktionelle Trennung in vivo (Lösch et al., 2000).

### 2.2.6.6.2 B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten der Haustiere besitzen auf ihrer Oberfläche circa 100.000 identische Antikörpermoleküle, BCR (engl.: B cell receptor) mit deren Hilfe sie spezifisch fremde, immunogene Strukturen binden und somit erkennen können. Jeder B-Lymphozyt besitzt nur einen bestimmten, genau definierten Antikörper auf seiner Zelloberfläche (Lösch et al., 2000). Nach Bindung an den B-Zell-Rezeptor wird der Antigen-Antikörperkomplex durch Mikropinozytose ins Innere des Lymphozyten geschleust (Liebich, 2004). Es folgen mehrere Teilungen (klonale Expansion) und weitere Differenzierungen. Der somit aktivierte B-Lymphozyt wird nach abgeschlossener Aktivierung auch Plasmazelle genannt. Diese Effektorzelle bildet nun konstant spezifische Antikörper, entsprechend der Struktur der Antikörper der Zelloberfläche, die anschließend über die Zellmembran sezerniert werden. Pro Plasmazelle können so in einer Sekunde circa 2000 identische Antikörpermoleküle hergestellt werden. Die Plasmazelle hat eine kurze Lebensdauer von wenigen Tagen. Um auf viele verschiedene Antigene eingehen zu können, besitzen die Hausäugetiere viele verschiedene B-Lymphozyten. Ein Antikörper erkennt nun selektiv bestimmte Molekülstrukturen, die auch Epitope genannt werden. Besitzt ein Molekül entsprechende Epitope, so wird dieses als Antigen bezeichnet. Ein Antigen kann mehrere Epitope aufweisen, was die Chance von Lymphozyten erkannt zu werden, vervielfacht. Die Antikörper der Tiere werden in verschiedene Immunglobulinklassen (IgM, IgG, IgE, IgA, IgD) eingeteilt, wobei in der Tierwelt der Spezifitätsgrad des entwickelten Immunsystems mit der phylogenetischen Entwicklungsstufe zunimmt (Lösch et al., 2000). Beispielsweise können Seeanemonen Proteine bilden, die fremde Strukturen erkennen. Schnecken stellen bereits schützende Proteine her und Insekten besitzen antibakterielle Proteine wie Lysozym oder Cepronin. Fische bilden Antikörper vom IgM-Isotyp und Amphibien sind fähig zusätzlich den IgG-Isotyp zu produzieren. Bei den Vögeln kommt IgA hinzu. Säugetiere verfügen zusätzlich über IgE und IgD (IgD sogar nur bei manchen Arten) (Lösch et al., 2000). Die Aminosäuresequenz der IgYH-Kette der Vögel ähnelt jedoch sehr dem IgE der Säugetiere (Parvari et al., 1988). Die verschiedenen Isotypenformen unterscheiden sich strukturell und funktionell. Die Funktion der Antikörper geht über die Antigenerkennung und deren Neutralisation hinaus. Überwiegend IgG markiert Fremdstoffen (Opsonisierung), welche danach phagozytiert werden können. Des Weiteren können Antikörper zur Aktivierung von Komplementsystem und den natürlichen Killerzellen beitragen oder IgE-vermittelt zur Sensibilisierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten (Lösch et al., 2000). Aus Vorstufen der Plasmazellen entwickeln sich sogenannte Gedächtniszellen (engl.: memory cell). Diese bleiben teilungsfähig und bilden das sogenannte immunologische Gedächtnis. Bei erneutem Antigenkontakt kann der Erreger durch rascheren und massiveren Antikörperausstoß schon früher und besser bekämpft werden. Auf dem Prinzip dieses immunologischen Gedächtnis stützt sich auch die Wirkungsweise von Impfungen (Lösch et al., 2000).

### 2.2.6.6.3 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind in erster Linie Effektorzellen der zellvermittelten Immunität. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Tötung virusinfizierter Zellen durch Zytolyse (zytotoxische T-Zellen) und die Aktivierung von Makrophagen, so daß diese stark bakterizid wirken. Dazu kommt noch die Unterstützung der B-Lymphozyten in ihrer Antikörperproduktion, vermittelt durch die T-Helferzellen. Generell werden sie in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen aufgeteilt. Wie die B-Lymphozyten tragen auch die T-Lymphozyten einen speziellen T-Zell-Rezeptor, TCR (engl.: T cell receptor) auf ihrer Oberfläche, der zur spezifischen Antigenerkennung dient. Der T-Zell-Rezeptor ist kovalent mit einem sogenannten CD3-Komplex verbunden, der die Signalübertragung ins Innere der Zelle katalysiert. Der TCR wird immer gemeinsam mit dem CD3 (TCR/CD3) exprimiert. CD3 ist daher auch ein Marker für alle T-Lymphozyten. Daneben gibt es noch weitere wichtige Oberflächenmoleküle. Auf T-Helferzellen befindet sich das Molekül CD4 und auf zytotoxischen T-Zellen wird das Molekül CD8 exprimiert, wobei CD für ‚cluster of differentiation‘ steht. Beide dienen als Korezeptoren zur Verstärkung der Signalübertragung vom TCR in die Zelle. Die Antigenerkennung ist bei T-Lymphozyten komplizierter als bei den B-Lymphozyten. Nicht das Antigen allein, sondern ein Komplex aus Antigenpeptid und MHC-Molekül wird von den T-Lymphozyten erkannt. Dieser Haupthistokompatibilitätskomplex, MHC (engl.: major histocompatibility complex) ist an der Oberfläche antigenpräsentierenden Zellen lokalisiert (s. Kapitel 2.2.7). CD4-tragende T-Helferzellen erkennen Antigene im Komplex mit MHC-Klasse-II-Moleküle, während CD8-tragende T-Zellen (zytotoxische Zellen) Antigene gemeinsam mit MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen (Lösch et al., 2000). Im weiteren Verlauf der Immunantwort binden sich nun die T-Zellen an die antigenpräsentierenden Zellen, wodurch die T-Lymphozyten zur Klonierung angeregt werden (Liebich, 2004). Die T-Helferzellen lassen sich nochmals in zwei Subpopulationen einteilen: Die TH1- und TH2- Zellen. Sie unterscheiden sich in der Sezernierung ihrer löslichen Faktoren. TH1-Zellen bilden nach Aktivierung Zytokine (Interferon- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL2), die für die zellvermittelte Immunabwehr notwendig sind beispielsweise Makrophagenaktivierung. TH2-Zellen dagegen bilden andere Zytokine (z.B. IL4 und IL5) und helfen damit antikörperproduzierenden B-Lymphozyten und bei allergischen Reaktionen. Da die Zytokine der unterschiedlichen T-Helferzellen sich gegenseitig hemmen, führt dies zu einer reziproken Beziehung zwischen spezifischer Antikörperproduktion und zytotoxischer T-Zellantwort (Lösch et al., 2000). Auch beeinflussen die T-Helferzellen andere T-Zellen (T-Supressorzellen) immunologische Reaktionen abzuschwächen oder abubrechen. Des Weiteren können sich T-Helferzellen zu langlebigen T-Gedächtniszellen differenzieren (Liebich 1990).

#### **2.2.6.6.4 Natürliche Killerzellen**

Neben den B- und T-Lymphozyten befindet sich noch eine dritte Population bei den peripheren Blutlymphozyten. Die Natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) sind etwas größer als die B- und T-Lymphozyten. Es handelt sich hierbei um zytoplasmareiche Lymphozyten mit darin enthaltenen Granula (Tizard, 1992). Die natürlichen Killerzellen tragen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und gehören somit zum angeborenen bzw. unspezifischen Immunsystem. Sie können abnorme Zellen wie Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten. Diese binden sie mit Hilfe spezieller Rezeptoren, die mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen interagieren. Infizierte Zellen und Tumorzellen werden normalerweise von den zytotoxischen T-Lymphozyten aufgrund von Fremd-Antigenen, die sie im Komplex mit den MHC-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentieren, erkannt und eliminiert. Einige Viren sind in der Lage, die Präsentation von MHC-I Molekülen auf der Oberfläche ihrer Wirtszellen zu unterdrücken und entgehen so der Zerstörung durch zytotoxische T-Lymphozyten. Die verminderte Expression der MHC-Moleküle auf Tumorzellen und von Mikroorganismen befallenen Zellen wird nun von den NK-Zellen erkannt und führt zur Apoptose der Zielzelle (Janeway und Medzhitov, 2002).

### **2.2.7 Monozyten**

#### **2.2.7.1 Allgemeines**

Die Monozyten sind die größten Leukozyten im peripheren Blut der Vögel (Bounous und Stedman, 2000; Campbell und Ellis, 2007). Sie gehören, gemeinsam mit den Lymphozyten, zu den mononukleären Leukozyten (Clark et al., 2009). Nach Bildung und Entwicklung im Knochenmark gelangen sie in die Blutbahn, in der sie für etwa 12 bis 24 Stunden zirkulieren, um dann ins umliegende Bindegewebe auszuwandern. Hier differenzieren sie sich zu Makrophagen (Welsch, 2003) und bilden das über den Körper verteilte mononukleäre Phagozytensystem, MPS (Gylstorff und Grimm, 1998). Monozyten sind amöboid beweglich und zur Phagozytose befähigt (Bezzel und Prinzing, 1977). Als Gewebemakrophagen übernehmen sie eine Vielzahl an organspezifischen Aufgaben beispielsweise in lymphatischen Organen als Sinusendothelzellen, in der Leber als von-Kupffer-Sternzellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, in den Körperhöhlen als Peritonealmakrophagen, im Zentralnervensystem als Mikrogliazellen und im lockeren Bindegewebe als Histiocyten oder als Osteoklasten (Sinowatz und Hees, 2000; Liebich, 2004). Zu den vielseitigen Aufgaben des Monozyten-Makrophagen-Systems gehört die Abwehr vor infektiösen Fremdstoffen wie Pilze, Bakterien, Protozoen und Viren sowie Phagozytose und Beseitigung von geschädigten und

alternden Zellen, die Elimination von virusinfizierten oder tumorösen Zellen und die Remodellierung von Gewebe während Wachstums- und Heilungsprozessen (Latimer und Bienzle, 2000).

### 2.2.7.2 Bildung

Monozyten nehmen ihren Ursprung von der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Über die myeloische Stammzelle differenzieren sie sich zu der bipotenten CFU-GM (engl.: colony-forming unit granulocyte-macrophage) (Latimer und Bienzle, 2000). Diese stellt die gemeinsame Progenitorzelle für Granulozyten und Monozyten dar (Jain, 1993). Über weitere Differenzierungsschritte entwickelt sich zunächst der Monoblast, dann der Promonozyt und über zwei mitotische Teilungen schließlich der reife Monozyt (Latimer und Bienzle, 2000; Wurzinger und Peschl, 2005). Die gesamte Monopoese wird über IL3 und CSF-GM reguliert. Die Differenzierung der CFU-GM zu CFU-M und die Entwicklung der Precursorzellen (Monoblast und Premonozyt) zum reifen Monozyt wird durch CSF-M gefördert. Im Unterschied zu anderen Zellen verbleiben Monozyten nicht im Speicherpool des Knochenmarks, sondern werden nach vollendeter Reifung in die Zirkulation entlassen (Jain, 1993). Monozyten verbleiben für gewöhnlich nur eine kurze Zeitspanne in der Blutbahn. Sie können durch interzelläre Spalträume im Endothel ins Gewebe einwandern und sich zu Makrophagen differenzieren. Hier können sie Tage bis Monate ihren spezifischen Aufgaben nachgehen (Andreasen und Latimer, 1990). Gefördert wird dieser Prozess im Zuge einer Immunantwort, verlangsamt oder gehemmt durch Kortikosteroide und andere immunsuppressive Medikamente. Monozyten, die einmal ins Gewebe eingewandert sind, kehren für gewöhnlich nicht in die Blutbahn zurück (Jain, 1993).

### 2.2.7.3 Morphologie

Die Monozyten gehören mit einem Durchmesser von circa 14  $\mu\text{m}$  (Bounous und Stedman, 2000) bzw. 8-17  $\mu\text{m}$  (Bezzel und Prinzing, 1977; Loeffler, 1978) zu den größten Leukozyten der Vögel (Bounous und Stedman, 2000). Ihre Anzahl im peripheren Blut beträgt beim weißen Pelikan  $0-0,2 \times 10^9$ , beim Flamingo  $0-1,42 \times 10^9$  und beim Falken  $0,2-1,49 \times 10^9$  pro Liter Blut (Clark et al., 2009). Beim Strauß machen die Monozyten etwa 1 % der Gesamtleukozytenzahl aus (Mushi et al., 1999). Sie können leicht mit den großen Vertretern der Lymphozyten verwechselt werden (Bounous und Stedman, 2000). Die Monozyten besitzen aber deutlich mehr Zytoplasma (Bezzel und Prinzing, 1977). Teilweise ist es fein granuliert und kann im aktivierten Zustand Vakuolen enthalten (Kummerfeld, 2007). Die feinen Azurgranula tauchen vor allem bei jungen Monozyten auf und nehmen mit zunehmendem Alter ab (Sinowatz und Hees, 2000). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist der pleomorphe (rund, oval, hufeisenförmig bis eingekerbte) Zellkern (Bezzel und Prinzing,

1977; Clark et al., 2009).

Unter dem Elektronenmikroskop beobachtet, weisen die Monozyten oftmals eine runde bis längliche Form auf. Der meist nierenförmige Zellkern der aviären Monozyten enthält zentral gelagertes Euchromatin mit ein bis zwei Nukleoli und peripher gelegenes Heterochromatin. Die Zellmembran kann sowohl Pseudo- als auch Lobopodien besitzen. Das reichliche Zytoplasma beinhaltet zahlreiche Organellen wie einen ausgeprägten Golgi-Apparat, Zentriolen, Mikrotubuli, Vesikel, Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, 0,1-0,5 µm große elektronendichte Granula, Lipidtröpfchen und Vakuolen. Die Organellen sind häufig nahe der Einkerbung des Zellkerns, (engl.: hof-region) lokalisiert (Maxwell, 1974). Nachdem die Monozyten im Bereich der postkapillären Venolen ins Bindegewebe auswandern, differenzieren sie sich zu Makrophagen, die mehrere Monate bis Jahre aktiv bleiben (Sinowatz und Hees, 2000). Diese Transformation wird von mehreren morphologischen und biochemischen Veränderungen begleitet. Makrophagen erscheinen aufgrund erhöhten Zytoplasmavolumens größer als Monozyten. Dieses enthält mehr Vakuolen und lässt sich stärker anfärben. Makrophagen sind metabolisch stark aktiv. Proteinbiosyntheseleistung und Enzymproduktion, sowie Glukoseverbrauch, Laktatproduktion, Pino- und Phagozytose sind im Vergleich zu den Monozyten erhöht (Jain, 1993). Die folgende Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl verschiedener Vogelarten:

Tabelle 2: Prozentualer Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl

	Wellen- sittich <sup>1</sup>	Grau- papagei <sup>1</sup>	Kakadu <sup>1</sup>	Kanari <sup>1</sup>	Taube <sup>1</sup>	Wachtel <sup>2</sup>	Strauß <sup>3</sup>
Leukozyten (10 <sup>9</sup> /l)	3-8,5	5-11	5-11	4-9	10-30	12,5-24,6	5
Monozyten (%)	0-2	0-3	0-1	0-2	1-3	0-4	1

Quellen: <sup>1</sup>) Johnson-Delaney und Harrison 1996, <sup>2</sup>) (Pollack et al., 2005), <sup>3</sup>) (Mushi et al., 1999)

#### 2.2.7.4 Zytochemische Eigenschaften

Beim Peroxidasenachweis können Monozyten sowohl positiv als auch negativ reagieren (Jain, 1993). Die Granula der Monozyten der Haussäugetiere stellen Lysosomen dar und reagieren daher positiv auf den Nachweis von saurer Phosphatase (Weiss, 1988). Die Aktivität zeigt sich in einem granulären (Dönmez und Sur, 2008), teilweise aber auch diffusen Niederschlag und die Aktivität nimmt mit steigendem Reifegrad des Monozyten zum Makrophagen zu. Monozyten zeigen eine schwache, diffuse, zytoplasmatische Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase (Raskin und Valenciano, 2000). Monozyten, sowie deren Vorstufen reagieren positiv auf den Nachweis von der spezifischen Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase (Parwaresch et al., 1970). Monozyten zeigen eine diffuse Aktivität von unspezifischen Esterasen (NSE) im Zytoplasma (Jain, 1993; Bienzle, 2000). Dabei ist vor allem die  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase charakteristisch für Monozyten (Bienzle, 2000; Ergun et al., 2004; Dönmez und Sur, 2008; Sari et al., 2009). Diese kann, im Gegensatz zu der NSE der Lymphozyten, durch Natrium-Fluorid gehemmt werden. Sie ist beim Vogel diffus bis granulär im Zytoplasma der Monozyten (Raskin und Valenciano, 2000; Sari et al., 2009) bzw. auf umhüllten Vesikel aber nicht in Lysosomen oder phagozytierenden Vakuolen enthalten (Inoue et al., 1991).

Makrophagen der Tiere sind größtenteils Peroxidase-negativ. Abhängig von Reifegrad und Umgebung, können sie aber auch positiv auf Peroxidase reagieren. Bei Knochenmarkmakrophagen wurde eine starke, durch Natrium-Fluorid hemmbare Aktivität von NSE festgestellt. Endothelzellen sowie vielkernige Riesenzellen, die beide wie die Makrophagen ebenfalls von den Monozyten abstammen, reagieren Peroxidase-negativ (Jain, 1993).

#### 2.2.7.5 Zytoskelett

Monozyten enthalten Aktin, welches sich als gut ausgebildetes Netzwerk über das gesamte Zytoplasma der Zelle bis in die Pseudopodien erstreckt (Meloni et al., 2011). Bei Hühnermonozyten sind die Aktinfilamente als zahlreiche punktförmige Strukturen mit einem Durchmesser von 0,2-0,4  $\mu\text{m}$  vertreten (Marchisio et al., 1987). Aktin spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion und Migration von Monozyten und Makrophagen (Kim et al., 2010). Nach experimenteller Zerstörung des Aktinnetzes in aktivierten Makrophagen überleben diese zwar, die Abwehrfunktionen in Form der Bereitstellung von Sauerstoffradikalen,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{TNF}\alpha$  ist jedoch vermindert (Kim et al., 2010). Tubulin führt strahlenförmig von der perinukleären Ära über das Zytoplasma in die Zellperipherie. Die Mikrotubulifasern sind unter anderem wichtig für die polaren Eigenschaften der Pseudopodien, die eine zielgerichtete Migration möglich machen (Meloni et al., 2011). Monozyten enthalten das

Intermediärfilament Vimentin. Dieses stellt sich im Zytoplasma als gut entwickeltes filamentöses Netzwerk dar. Vimentin spielt eine bedeutende Rolle in der Monozyten/Makrophagen Differenzierung. Nach experimenteller Verringerung des intrazellulären Vimentinspiegels führte dies zu einer deutlichen Verminderung der Monoblastenproliferation. Vimentin nimmt unter anderem auch indirekt Einfluss auf die Funktion der Monozyten bzw. Makrophagen. Zum einen ist die Umstrukturierung des Zytoskeletts alternder Zellen ausschlaggebend für die Abnahme der Phagozytose, zum anderen reagieren Hormone und Toxine, die ebenfalls die Phagozytose beeinträchtigen mit dem Vimentin-Netzwerk. Des Weiteren tritt Vimentin mit den anderen Komponenten des Zytoskeletts in Kontakt, zum Beispiel über das Vimentin bindende Protein Fimbrin welches Querverbindungen mit Aktin eingeht und somit auf die veränderte Struktur des Aktins während Adhäsion, Migration und Phagozytose eingeht (Benes et al., 2006). Im aktivierten Zustand bildet die Zelle zwei funktionell und morphologisch unterscheidbare Pole aus, der führende Pol, sowie der sogenannte Uropod. Dies geht mit einer Umstrukturierung des gesamten Zytoskeletts einher. Vimentin kollabiert dabei und zieht sich in die Region des Uropods zurück. Die Polarität der Zelle, die durch eine gezielte Umorganisation der einzelnen Elemente des Zytoskeletts gewährleistet wird, ist von hoher Bedeutung für Migration, Aktivierung und Apoptose der Monozyten (Fais und Malorni, 2003).

#### **2.2.7.6 Aufgaben**

Die Makrophagen erfüllen mehrere Aufgaben (Lösch et al., 2000). Die aviären Makrophagen sind, genau wie die Makrophagen der Säugetiere, Antigen-präsentierende Zellen und spielen somit eine wichtige Rolle für die Funktion des Immunsystems (Glick, 2000). Die Zellen des MPS sind an der Regulation des spezifischen Abwehrsystems beteiligt. Ihre Funktion besteht darin, phagozytierte Antigene zu spalten und die dabei entstehenden Peptide in MHC-Klasse-II-Moleküle einzubauen um sie an ihrer Zelloberfläche zu lokalisieren. So können T-Helferzellen die Antigene erkennen und das spezifische Abwehrsystem aktivieren (Lösch et al., 2000). Eine maximale Aktivierung der aviären Makrophagen erfordert vor allem zwei Mediatoren, Lymphokine (IFN) und Lipopolysaccharide (LPS). Aktivierte Makrophagen sezernieren IL1, TNF $\alpha$  und den Kolonie-stimulierenden-Faktor (CSF) (Qureshi und Taylor, 1993). Makrophagen können opsonisierte Partikel phagozytieren und zerstören. Dafür bilden sie Phagolysosomen, die lysosomale Enzyme und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (Stickstoffmonoxid) enthalten. Diese reaktive Verbindung wirkt stark antineoplastisch und antimikrobiell. Für die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) benötigen die Vögel exogenes L-Arginin, da sie nicht wie die Säugetiere Arginin aus dem Harnstoffzyklus synthetisieren können (Glick, 2000).



## 2.3 Enzymhistochemie

### 2.3.1 Definition und Anwendung

Enzyme, auch Fermente genannt, sind katalytisch wirksame Proteine in Zellen und Geweben, die die chemischen Reaktionen aller Stoffwechselfvorgänge ermöglichen. Durch den Nachweis bestimmter Enzyme in den einzelnen Zellkompartimenten wie beispielsweise Mitochondrien, Lysosomen oder Zellmembran, können die Aktivitäten der jeweiligen Organellen bestimmt werden und zu einem besseren Verständnis der Zell- bzw. Gewebephysiologie führen (Weiss, 1988; Romeis, 2010). Routinemäßig werden enzymhistochemische Methoden unter anderem für die Diagnostik von Leukämien und Muskelerkrankungen eingesetzt (Romeis, 2010). Enzymhistochemische Methoden finden auch Einsatz zur Unterscheidung bestimmter Zellen, die in Übersichtsfärbungen nur ungenügend differenziert werden können wie zum Beispiel B- und T-Lymphozyten anhand der  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase (Dönmez und Sur, 2008).

### 2.3.2 Technik

Die Enzyme der verschiedenen Zellkompartimente können über vier verschiedene Wege lokalisiert werden.

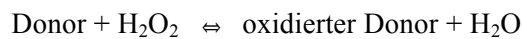
Die erste Methode ist der Nachweis der enzymatischen Aktivität. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen einem wasserlöslichen Substrat ausgesetzt, bei dem durch die Enzymreaktion wasserunlösliche Produkte entstehen, die am Ort der Reaktion ausgefällt und sichtbar werden. Dies nennt man katalytische Enzymhistochemie. Die zweite Form ist der Nachweis der antigenen Eigenschaften des Enzymproteins über einen spezifischen Antikörper (Immunhistochemie). Des Weiteren können Enzyme über ihre mRNA nachgewiesen werden (in-situ-Hybridisierung) oder, als vierter Weg, durch einen Nachweis der spezifischen Bindung von Hemmsubstanzen oder Substraten, die markiert sind oder sichtbar gemacht werden (Romeis, 2010). (Weiteres zu Enzymnachweisen in Kapitel 2.5.3 und im Methodenteil).

In dieser Arbeit wurden die jeweiligen Enzyme über deren enzymatische Aktivität detektiert, da hierbei weder inaktive Enzyme nachgewiesen werden sowie neben dem qualitativen auch ein semiquantitativer Nachweis der Aktivität möglich ist (Romeis, 2010).

### 2.3.3 Einteilung der Enzyme

#### 2.3.3.1 Peroxidase

Die Peroxidase gehört zur Gruppe der Oxidoreduktasen (Lojda et al., 1979). Sie katalysiert die Oxidation eines Substrates in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, der dabei zu Wasser reduziert wird. Folgende Skizze verdeutlicht schematisch die Reaktion:



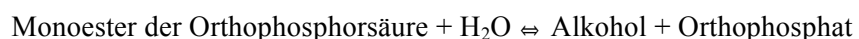
Eine hohe Peroxidaseaktivität weisen neutro- und eosinophile Granulozyten, Kupfferzellen, Mastzellen, Mamma-, Speichel- und Schilddrüse auf (Lojda et al., 1979; Romeis, 2010). Unter den pflanzlichen Peroxidasen ist die aus Meerrettich gewonnene am besten untersucht. Die verschiedenen lokalisierten Peroxidasen wie beispielsweise Laktoperoxidase, Speichelperoxidase oder die Myeloperoxidase der Leukozyten unterscheiden sich in ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber Fixationsmitteln (Romeis, 2010). Die Darstellung mit Peroxidasen hat neuerdings erheblich an Bedeutung gewonnen. Vor allem Meerrettich-Peroxidase wird häufig als chemischer oder immunochemischer (Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex) Marker für Antigen-Nachweise genutzt. Der Farbumschlag ist im Vergleich zu klassischen Verfahren der Antikörpermarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen von längerer Haltbarkeit (Lojda et al., 1979).

#### 2.3.3.2 Phosphatasen

Phosphatasen gehören zur Gruppe der Hydrolasen (Lojda et al., 1979). Sie spalten Phosphatgruppen von Molekülen ab und sind somit Gegenspieler von Phospho-Transferasen (Horn et al., 2003; Romeis, 2010).

##### 2.3.3.2.1 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist an der Zellmembran lokalisiert und katalysiert bei stark alkalischem pH-Optimum (pH 9,2 bis 9,8) die hydrolytische Spaltung von Estern der Orthophosphorsäure mit verschiedenen Alkoholen und Phenolen (Lojda et al., 1979; Horn et al., 2003; Romeis, 2010). Folgende Skizze soll dies schematisch verdeutlichen:

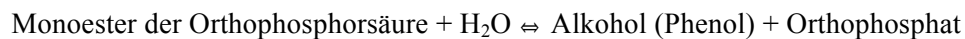


Das Enzym ist häufig dort in Zellmembranen vertreten, wo aktive Transportvorgänge ablaufen. Es wurde beispielsweise im Bürstensaum von Enterozyten lokalisiert sowie in proximalen Tubuluszellen

der Niere, im Kapillar- und Arteriolendothel und in den Granula der neutrophilen Granulozyten (Lojda et al., 1979).

#### 2.3.3.2 Saure Phosphatase

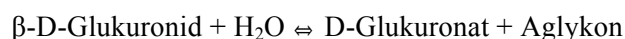
Das Enzym katalysiert im sauren Milieu die hydrolytische Spaltung von Estern der Orthophosphorsäure mit verschiedenen Alkoholen und Phenolen. Folgendes Reaktionsschema soll dies verdeutlichen:



Das pH-Optimum liegt dabei bei 4-5. Die saure Phosphatase kommt intrazellulär hauptsächlich in den Lysosomen vor. Dadurch ist die Färbung ein guter Marker für Lysosomen (Romeis, 2010). Außerhalb der Lysosomen ist sie noch im endoplasmatischen Retikulum oder teilweise im Grundplasma zu finden. (Lojda et al., 1979).

#### 2.3.3.3 $\beta$ -Glukuronidase

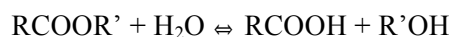
Die  $\beta$ -Glukuronidase gehört zur Gruppe der Glykosidasen, diese wiederum gehören ebenfalls zu den Hydrolasen. Die Glykosidasen kommen in zahlreichen tierischen und pflanzlichen Geweben vor und katalysieren die Hydrolyse von Glykosidbindungen. Anhand des glykosidisch gebundenen Zuckers werden innerhalb der Glykosidasen unter anderem Galaktosidasen, Glukuronidasen und Glukosaminidasen unterschieden. Des Weiteren werden sie nach der Form der glykosidischen Bindung, an der sie angreifen, als  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Glykosidasen bezeichnet. Die Größe des gespaltenen Moleküls bestimmt die Einteilung der Glykosidasen in Poly-, Oligo- und Disaccharidasen. Die  $\beta$ -Glukuronidase gehört zu den Oligosaccharidasen. Sie ist ein Enzym mit dualer Lokalisation. Die Aktivität ist zum einen an Lysosomen zum anderen an das endoplasmatische Retikulum gebunden und katalysiert folgende Reaktion:



Hohe Enzymaktivität zeigt sich in Nebenhoden, Leber, Milz, Niere und Nebennierenrinde vor. Der optimale pH-Wert ist spezies- und organabhängig und liegt zwischen 4 und 5,5 (Lojda et al., 1979).

### 2.3.3.4 Esterasen

Die Esterasen gehören zur Gruppe der Carboxylesterhydrolasen, welche wiederum eine Untergruppe der Hydrolasen darstellt. Die Carboxylesterhydrolasen katalysieren folgende Reaktion:



Die Esterasen sind ein wichtiges Diagnosemittel in der Identifizierung lymphoblastischer Zellen im Zusammenhang mit leukämischen Erkrankungen. Anhand ihrer Substratumsetzung werden die Esterasen in spezifische und unspezifische Esterasen eingeteilt. Das Ausgangssubstrat trägt auch zur Benennung der einzelnen Esterasen bei. Zum Beispiel setzt die  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat mithilfe von Wasser zu einer Säure und  $\alpha$ -Naphthol um. (Kass, 1979).

#### 2.3.3.4.1 Unspezifische Esterasen

Zu dieser Gruppe gehören Carboxylesterasen, Arylesterasen und Acetylesterasen (Lojda et al., 1979). Sie zeichnen sich durch eine relativ geringe Substratspezifität aus. Diese Gruppe wird anhand ihrer Reaktionen auf bestimmte Substrate und ihrer Empfindlichkeit gegenüber spezifischer Inhibitoren unterteilt (Lang, 2006). Unspezifische Esterasen kommen ubiquitär in pflanzlichen und tierischen Geweben vor. Intrazellulär sind sie vor allem im endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen und in den Mitochondrien lokalisiert. Organe mit hoher Aktivität sind Leber, Niere und Darm. Das pH-Optimum der Mehrzahl der Esterasen liegt zwischen 5 und 9 (Lojda et al., 1979; Lang, 2006).

##### 2.3.3.4.1.1 Naphthol-AS-Acetat-Esterase

Die Naphthol-AS-Acetat-Esterase kommt in geringer Konzentration bei Monozyten sowie neutrophilen Granulozyten und deren Vorstufen vor (Bain und Huhn, 1997).

##### 2.3.3.4.1.2 $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase

Die  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase (ANAE) ist ein lysosomales Enzym, welches in Monozyten und reifen, immunkompetenten T-Lymphozyten vorkommt. Ihr Nachweis wird auch dazu genutzt, B- und T-Lymphozyten in verschiedenen Vogel- und Säugetierarten voneinander zu unterscheiden (Donmez und Sur, 2008; Sari et al., 2009). Sie ist an der Membran sowie im Inneren der Lysosomen lokalisiert (Sari et al., 2009). Die ANAE ist verantwortlich für den zytotoxischen Effekt der T-Lymphozyten und der phagozytischen Aktivität der Monozyten (Mueller et al., 1975).

#### 2.3.3.4.2 Spezifische Esterasen

Anhand des Substrates Naphthol-AS-D-Chloracetat kann die Aktivität der spezifischen Esterase

geprüft werden. Spezifische Esterasen sind in Lysosomen lokalisiert. Sie sind Marker für Zellen granulozytären Ursprungs (Kass, 1979).

#### 2.3.3.4.2.1 Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase wird unter anderem zur Darstellung von neutrophilen Granulozyten und deren Vorstufen genutzt (Lang, 2006). Ab dem Reifegrad der Promyelozyten reagieren sie positiv auf den Enzymnachweis. Am stärksten ist die Anfärbbarkeit im Pro- und Myelozytenstadium (Hagemann, 2009). Anhand dieser Tatsache können bestimmte Krankheiten diagnostiziert werden, beispielsweise Leukämien oder das granulozytäre Sarkom (Kass, 1979; Lang, 2006). Auch Erkrankungen des blutbildenden Systems und Differenzierungen der Vorstufenreihen ist durch diesen enzymhistochemischen Nachweis möglich (Lang, 2006). Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase kommt neben den neutrophilen noch in basophilen Granulozyten vor, jedoch nicht in eosinophilen Granulozyten. Sie kommt in Myeloblasten, jedoch nicht in Lymphoblasten vor (Kass, 1979). Des Weiteren gelten Gewebemastzellen, Monozyten und die Vorstufen der eosinophilen und basophilen Granulozyten als positiv (Parwaresch et al., 1970). Das Verhalten der Esterasen zeigt einen charakteristischen Verlauf während der Monopoese. So lässt während des Reifungsprozesses die Aktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase nach, die Aktivität der beiden anderen Esterasen steigt an. (Wieczorek, 2003).

## 2.4 Glykohistochemie

### 2.4.1 Lektine

#### 2.4.1.1 Entstehung und Definition des Begriffes „Lektin“

Der Name „Lektin“ ist aus dem lateinischen „legere“ abgeleitet, welches übersetzt „auswählen“ bedeutet. Boyd und Shapleigh (1954) beschrieben erstmals Samen und andere Teile bestimmter Pflanzen als Lektine, die die Fähigkeit besitzen Erythrozyten zu agglutinieren. Sie beschrieben ebenfalls, dass Lektine darüber hinaus blutgruppenspezifische Präzipitine sind (Boyd und Shapleigh, 1954). Folglich waren Lektine definiert als kohlenhydratbindende Proteine aus Pflanzensamen (Goldstein et al., 1980). Das Interesse an den beschriebenen Substanzen (auch beschrieben als Agglutinine, Phytohämagglutinine, Phytoagglutinine und Protectine (Goldstein et al., 1980) stieg stetig an. Durch die Entdeckung alternativer Quellen für Lektine (unter anderem Bakterien, Pilze und Fische) sahen Goldstein und Mitarbeiter (1980) die Notwendigkeit, die Definition des Begriffes Lektin neu anzupassen. Substanzen, die als Lektine beschrieben werden, sollten somit folgende Eigenschaften

besitzen: „Lektine sind zuckerbindene Proteine oder Glykoproteine nicht immunogenen Ursprungs, welche Zellen agglutinieren und/oder Glykoproteine präzipitieren“ (Goldstein et al., 1980). Weiterhin führt er auf, dass Lektine mindestens zwei Bindungsstellen besitzen und sowohl pflanzliche als auch tierische Zellen agglutinieren. Der Name des jeweiligen Lektins leitet sich aus dessen Zuckerspezifität ab, welche wiederum durch die Zuckerstruktur definiert ist, die die Agglutination oder Präzipitation hemmt. Lektine stammen aus Pflanzen, Bakterien und Tieren. Anhand dieser Definition sollen Lektine von anderen Arten kohlenhydratbindender Proteine wie zum Beispiel Enzyme, Hormone, Toxine ect. abgegrenzt werden können (Goldstein et al., 1980). Dieser Definition folgte ein Jahr später ein von Kocourek und Horejsi (1981) verfasster Einspruch. Sie waren der Meinung, die Lektine sollten, da ihre Aufgabe im lebendigen Organismus noch völlig ungeklärt ist weder nach ihren in vitro Eigenschaften, noch, da es eher ein zufälliges Ereignis sei, nach ihrer Agglutinationsfähigkeit definiert werden. Nach Goldsteins Definition würden auch Lektine ausgeschlossen werden, die nur eine Bindungsstelle und/oder toxische oder hormonähnliche Eigenschaften besitzen. Kocourek und Horejsi (1981) schlugen vor, die Definition folgendermaßen zu ändern: „Lektine sind zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nicht immunogenen Ursprungs, die keine enzymatische Aktivität bezüglich der Zucker, welche sie binden, aufweisen und welche für ihre Bindung keine freien glykosidischen Hydroxylgruppen an diesen Zuckern benötigen“ (Kocourek und Horejsi, 1981). Diese beiden Definitionen wurden 1981 vom Nomenklatur Komitee der internationalen Gemeinschaft für Biochemie gegenübergestellt und geprüft. Gemein ist beiden Ausführungen, dass es sich bei einem Lektin um ein zuckerbindendes Protein nicht immunogenen Ursprung handelt. Da jedoch das Fehlen einer enzymatischen Aktivität schwieriger zu überprüfen ist als die Fähigkeit zur Agglutination von Zellen, beschloss das Komitee, solange keine gesicherten Erkenntnisse über die Rolle der Lektine im lebenden Organismus vorliegen, die von Goldstein verfasste Definition zu übernehmen (Dixon, 1981).

Charakteristisch für ein Lektin ist seine Bindungsfähigkeit für spezifische Zuckerstrukturen. Da jedoch nicht nur Lektine diese Eigenschaft besitzen, weist Gabius und Mitarbeiter (2004) auf die strikte Abgrenzung von Lektinen und anderen zuckerbindenden Substanzen hin. Diese sind im Folgenden kohlenhydratspezifische Immunglobuline, Enzyme deren Substrate aus Kohlenhydraten bestehen (beispielsweise Glykosyltransferase, Glykosidase) und Sensor/Transportproteine für freie Mono- oder Oligosaccharide (Gabius et al., 2004; Sharon und Lis, 2004). Auf die wichtige Abgrenzung von Lektinen zu Antikörpern weist auch Franz (1990) hin. Laut Franz führte die gemeinsame Entwicklungsphase von Immunologie und Lektinologie zu obsoleten Bezeichnungen für Lektine wie zum Beispiel ‚natürliche Antikörper‘, ‚antikörperähnliche Substanzen‘ und ‚pflanzliche Antikörper‘ (Franz, 1990). Klarheit verschaffte die 1983 formulierte Definition von Uhlenbruck: „Nach unserer Auffassung spricht vieles dafür, dass sich der, durch Lektine vermittelte Kohlenhydrat-Erkennungsmechanismus, völlig unabhängig von allen anderen immunbiologischen

Erkennungsmechanismen entwickelt hat“ (Uhlenbruck, 1983).

Tabelle 3 verdeutlicht die wichtigsten Unterschiede zwischen Lektinen und Antikörpern:

Tabelle 3: Vergleich von Lektinen und Antikörpern:

	Lektin	Antikörper
Antigener Stimulus	Nicht erforderlich	Für Produktion erforderlich
Vorkommen	ubiquitär	Vertebraten
Bindung	Zuckerstrukturen	Antigene und Haptene unterschiedlicher chemischer Struktur
Struktur	variabel	Gemeinsame Grundstruktur, leichte und schwere Ketten
Bindungskonstante	Relativ niedrig	Relativ hoch
Struktur der Bindungsstelle	gebildet von einer Proteinkette	gebildet von leichter und schwerer Kette
Funktionen	große Vielfalt, teilweise unbekannt	Erkennen und Eliminieren von körperfremden Stoffen

Quelle: (Franz, 1990)

Gabius und Mitarbeiter (2011) beschrieben die Lektine als kohlenhydratbindende Proteine, welche die Struktur ihres Liganden nach Bindung nicht verändern. Die Lektine müssen von Antikörpern, Enzymen sowie von Sensor- und Transportproteinen für Mono- und Oligosaccharide unterschieden werden (Gabius et al., 2011).

„Die Diskussionen um eine allgemein akzeptierte Lektin-Definition sind sicherlich Ausdruck der Schwierigkeiten, die das Verständnis der Lektine bereitet(e)“ (Franz, 1990).

#### 2.4.1.2. Struktur und Einteilung der Lektine

Bei den Lektinen handelt es sich um Proteine, meist Glykoproteine mit einem Kohlenhydratanteil von 2-50 %. Davon ausgenommen sind die Lektine ConA und WGA, die keine Zuckeranteile enthalten. In weiteren Eigenschaften wie Molekulargröße und -architektur sowie Aminosäuresequenz

unterscheiden sich die einzelnen Lektine erheblich voneinander (Rüdiger, 1982). Bei den aus Pflanzen abstammenden Lektinen, befinden sich diese im ganzen Pflanzenorganismus, jedoch ist die größte Menge in den Speicherorganen wie Rinde, Knolle oder Wurzelsystem enthalten. Die meisten Lektine, die kommerziell genutzt werden, entstammen den Pflanzensamen. Die messbare Menge weist zwischen den Lektinen enorme Unterschiede auf und reicht beispielsweise von mehr als 1g (ConA, PHA) zu wenigen Milligramm (LCA, UEA) pro 100 g Pflanzenmaterial. Die meisten der Lektine sind intrazellulär in speziellen, den Vakuolen entstammenden Zellorganellen, den sogenannten 'protein bodies' lokalisiert. Hier liegen die Lektine gemeinsam mit Speicherproteinen und Phytinsäure vor, die der Pflanze als Speicher für Phosphat und Kationen, die der Keimling zum Wachsen benötigt, dient (Gabijs und Rüdiger, 2009).

Lektine können strukturell in Einketten- und Zweikettenlektine eingeteilt werden. Die Einkettenlektine sind aus vier nahezu gleichartigen Untereinheiten zusammengesetzt. Zu dieser Gruppe gehört das Lektin ConA aus der Schwertbohne, welches Glukose- und Mannosereste bindet und aus vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 25.000 Dalton besteht. Ebenfalls zur Gruppe der Einkettenlektine gehört das Lektin PHA-E/-L der Gartenbohne, welches keinen Einfachzucker als Bindungspartner besitzt. Ihre nahezu identischen Untereinheiten weisen ein Molekulargewicht von 30.000 Dalton auf (Rüdiger, 1981). Die zweite Gruppe der Lektine besitzen zwei verschiedenartige Ketten. Die kleinere  $\alpha$ -Kette und eine größere  $\beta$ -Kette kombinieren sich paarweise zu tetrameren Molekülen. Diese  $\alpha\beta_2$ -Struktur weist ein Molekulargewicht von 5000-7000 ( $\alpha$ -Kette) und 14.000-20.000 ( $\beta$ -Kette) bzw. im Tetramer 40.000-50.000 Dalton auf. Unter den Zweikettenlektinen befinden sich unter anderem Lektine der wirtschaftlich wichtigen Pflanzen Erbse, Linse, Saubohne, Futter- und Gartenwicke. Diese Zweikettenlektine weisen alle die gleiche Zuckerspezifität auf. Sie binden Mannose und Glukose sowie deren  $\alpha$ -Glykoside (Rüdiger, 1982). Cunningham und Mitarbeiter (1979) entdeckten eine überraschende Homologie zwischen Lektinen aus diesen verschiedenen Gruppen. Wenn die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des Lektins Favin der Pflanze *Vicia faba* in einem Kreis vorliegt und das Einkettenlektin von ConA zirkulär parallel dazu arrangiert ist, werden Homologien in der Aminosäuresequenz erkennbar, die sich sogar ohne Unterbrechung über den COOH- bis weiter zum NH<sub>2</sub>-Terminus des ConA erstrecken. Die beiden Ketten des Favins bilden somit eine Polypeptidreihe, die äquivalent zu derjenigen des ConA ist. Diese Homologien ergeben eine hohe Ähnlichkeit der beiden Lektine in ihrer dreidimensionalen Struktur. Ebenso gleichen sie sich in Zuckerspezifität und biologischer Aktivität. Cunningham und Mitarbeiter (1979) haben somit bewiesen, dass beide Proteine evolutionär miteinander verwandt sind und ein ungewöhnliches Genereignis in Form einer Permutation zu den nun homologen Sequenzen geführt hat (Cunningham et al., 1979). Drickamer (1988) erkannte, dass die Bindung der spezifischen Kohlenhydrate meist in einem genau abgegrenzten Aminosäuresegment geschieht und definierte diese zuckerbindenden Bereiche als 'carbohydrate-



binding domains' (CRD) (Drickamer, 1988).

Die Einteilung der Lektine erfolgt in Gruppen nach ihrer nominalen Zuckerspezifität. Die Klassifikation basiert auf Ergebnissen mit verschiedenen Inhibitoren (Roth, 2011). Um die Zuckerspezifität eines Lektins zu bestimmen, werden kohlenhydrathaltige Verdünnungsreihen hergestellt und mit der jeweiligen Lektinlösung gemischt. Nach Inkubation mit einer Zellsuspension kann die niedrigste Konzentration des Zuckers, der die Agglutination zu verhindern vermag, rückführend Aufschluss über die Affinität zwischen agglutinierenden Lektin und spezifischen Zucker geben (Rüdiger, 1998; Roth, 2011).

Zur ersten Gruppe gehören die Mannose und Glukose bindenden Lektine. Sie stammen zum großen Teil aus Hülsenfrüchtlern (Leguminosen). Dazu gehören das Lektin ConA der Schwertbohne (*Canavalis ensiformis*), das zu den am besten erforschten Lektinen zählt. Ebenfalls zu dieser Gruppe gehören die Lektine PSA der Erbse (*Pisum sativum*) und LCA der Speiselinse (*Lens culinaris*). Unter den Mannose und Glukose bindenden Lektinen befinden sich Einkettenlektine wie das ConA und Zweikettenlektine wie LCA und PSA. Alle Lektine dieser Gruppe benötigen für ihre Aktivität die Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  und wirken mitogen auf Lymphozyten (Goldstein und Poretz, 1986). Zu den Lektinen die mit Galaktose reagieren zählen unter anderem PNA aus der Erdnuss (*Arachis hypogea*) und VAA aus der Mistel (*Viscum album*) (Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011). WGA, das aus Weizen (*Triticum vulgare*) gewonnene Lektin, wird von N-Acetyl-Gukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure) gebunden (Habermann et al., 2011). Die Bindungsbereitschaft der beiden Moleküle gegenüber WGA basiert auf einer Ähnlichkeit in der chemischen Konfiguration der Bindungspartner. Sialinsäure bindet WGA, vermutlich aufgrund hydrophober Anteile, jedoch mit geringerer Affinität (Monsigny et al., 1980). Die Bindung eines Lektins basiert zu geringen Anteilen auch auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Dies ist auch der Grund, weshalb sich das Bindungsverhalten von succinylierten WGA geringfügig von dem des WGA unterscheidet (Roth, 2011). Succinyliertes WGA (WGAs) besitzt bei physiologischen pH-Wert im Vergleich zum stark basischen WGA (isoelektrischer Punkt: pH: 8,5) eine negative Polarität (isoelektrischer Punkt: pH: 4,2). Zellen, die an ihrer Oberfläche Sialinsäure enthalten, binden vermutlich aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung WGAs mit schwächerer Affinität (Monsigny et al., 1980). Ebenfalls zwei Bindungspartner besitzen die Lektine der nächsten Gruppe. SBA aus der Sojabohne (*Glycine max*) und SNA des schwarzen Holunders (*Sambucus nigra*) binden an N-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose (Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011). Bei der folgenden Gruppe handelt es sich um Fukose spezifische Lektine. Zu ihnen gehören die Lektine LTA der roten Spargelerbse (*Lotus tetragonolobus*) und UEA-1 des Stechginsters (*Ulex europaeus*). Da die Lektine dieser Gruppe eine sehr unterschiedliche Herkunft haben, weisen sie nur wenige strukturelle

Gemeinsamkeiten auf (Goldstein und Poretz, 1986). In der letzten Gruppe befinden sich Lektine, für die keine Monosaccharide als Ligand bekannt sind. Diese Lektine binden an definierte Oligosaccharide. Die Liganden dieser Lektine werden im Folgenden als definierte Oligosaccharide beschrieben. Zu dieser Gruppe gehören das Lektin PHA-E/-L aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) und das Lektin MAA aus dem asiatischen Gelbholz (*Maackia amurensis*) (Gabijs et al., 2011; Habermann et al., 2011). In nachfolgender Tabelle werden die verschiedenen Gruppen mit einigen Beispielen aufgeführt.

Tabelle 4: Zuckerspezifität und Herkunft der Lektine

Zuckerspezifität	Herkunft	Abk.
Glukose/Mannose	Canavalis ensiformis (Schwertbohne) Lens culinaris (Speiselinse) Pisum sativum (Erbse)	ConA LCA PSA
Galaktose	Erythrina cristagalli (Korallenstrauch) Arachis hypogea (Erdnuss) Ricinus communis (Rizinusbohne) Viscum album (Mistel)	ECA PNA RCA-I/II VAA
N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminidase	Triticum vulgare (Weizen) Triticum vulgare (Weizen) succinyliert	WGA WGAs
N-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose	Glycine max (Sojabohne) Sambucus nigra (Schwarzer Holunder)	SBA SNA
N-Acetyl-Galaktosamin	Dolichos biflorus (Afrikanische Pferdebohne) Griffonia simplicifolia (Afri. Schwarzbohne) Sophora japonica (Chinesischer Schnurbaum)	DBA GSA-I/GSL-1 SJA
L-Fukose	Lotus tetragonolobus (Rote Spargelerbse) Ulex europaeus (Stechginster)	LTA UEA-1
Definierte Oligosaccharide	Phaseolus vulgaris (Gartenbohne) Maackia amurensis (Asiatisches Gelbholz)	PHA-E/-L MAA

Modifiziert nach Gabius, Habermann, Rüdiger, Monsigny und Roth (Monsigny et al., 1980; Gabius und Rüdiger, 2009; Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011; Roth, 2011).

Glc=Glukose, Man=Mannose, Gal=Galaktose, GlcNAc=N-Acetyl-Glukosamin, NeuNAc=N-Acetyl-Neuraminsäure, GalNAc= N-Acetyl-Galaktosamin; Fuc=Fukose

Die Fähigkeit der Lektine spezifisch Kohlenhydratepitope zu erkennen und zu binden, läßt sie zu einem weit verbreiteten Instrument der Glykophenotypisierung werden (Gabius und Rüdiger, 2009).

### 2.4.1.3 Funktion und Anwendung von Lektinen

Die Vielfalt der Lektine sowohl in struktureller als auch in zuckerspezifischer Hinsicht, läßt vermuten, dass sie sehr unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen können (Gabius und Rüdiger, 2009). Sie sind sehr weit verbreitet und kommen in fast jedem lebenden Organismus vor (Rüdiger, 1998). Lektine wurden zunächst aus Pflanzen, später aus niederen Tieren und schließlich aus Säugetieren isoliert. Die vielen verschiedenen Funktionen der Lektine basieren letztendlich auf ihrer Fähigkeit, komplexe Moleküle spezifisch zu erkennen und zu binden (Rüdiger, 1981; Franz, 1990).

Viele Proteine und Lipide tragen biologische Informationsträger in Form von Zuckerketten auf ihrer Oberfläche (Gabius und Uhlenbruck, 1988). Mikroskopische Studien haben gezeigt, dass eukaryotische Zellen sowie Bakterien eine gemeinsame Struktur auf ihrer Oberfläche aufweisen, die als ‚sugary coating‘ bzw. Glykokalix beschrieben wurde (Benett, 1963; Gabius et al., 2011). Kohlenhydrate haben aufgrund verschiedener Verknüpfungen, unterschiedlichen anomeren Positionen und Ringgrößen, linearem oder verzweigtem Auftreten eine hohe Kodierungskapazität. Dies wird als Zuckercode bezeichnet (Gabius, 2009; Gabius et al., 2011). Die Glykosylierung führt zum höchsten Grad struktureller Komplexität und ist eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen (Gabius et al., 2011). Jedes Glykosid hat eine einzigartige Gestalt und stellt somit ein Wort im Zuckercode dar, welches von Proteinen, die mit ihm wechselwirken, gelesen werden kann (Nelson und Cox, 2008).

Die Frage nach der physiologischen Funktion der Lektine bezog sich zu Beginn der Lektinforschung vor allem auf die Pflanzenlektine. Viele der Lektine schützen die Pflanze vor phytopathogenen Mikroorganismen, Insekten und samenfressenden Tieren (Sharon und Lis, 2004). So wurde in Studien nachgewiesen, dass die Lektine WGA, PNA und SBA fähig sind, Sporulation und Wachstum von Pilzen wie *Trichoderma viride*, *Penicillium notatum* und *Apergillus niger* zu verhindern (Barkai-Golan et al., 1978). In anderen Studien wurde die insektizide bzw. giftige Wirkung des Lektins der

Schwarzbohne ermittelt, die nach Fütterung an Käfern zum Tode der Larven führte (Janzen et al., 1976; Sharon und Lis, 2004). Viele Lektine sind auch für höhere Tiere und Menschen giftig. Die Toxizität wird hervorgerufen durch die Bindung der Lektine beispielsweise an Glykokonjugate der intestinalen Mukosa. Dies führt zu schädlichen Sekundäreffekten an der Darmmukosa, der intestinalen Bakterienflora sowie anderen Organen. Hier wurde vor allem das Lektin der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) untersucht, welches in ungekochtem Zustand giftig für Mensch und Tier ist (Gabius und Rüdiger, 2009). Ganz anders verhält sich das toxische Lektin RCA der Rizinusbohne (*Ricinus communis*). Es besitzt zwei Untereinheiten. Die eine stellt über Kohlenhydratbindung den Zellkontakt her und führt das Lektin ins Zytosol über (Haptomer). Die zweite Untereinheit beherbergt das Enzym N-Glykosidase (Effektor), welches Adenin aus der 28-S ribosomalen RNA spaltet und somit das Ribosom bzw. die Zelle unfähig zum Überleben macht (Endo et al., 1989).

Von grosser Bedeutung für die Leguminosen ist die lektinvermittelte Symbiose zwischen stickstoffbindenden Bakterien der Gattung *Rhizobium* und den an den Wurzelhaaren der Pflanze lokalisierten bakterienbindenden Lektine (Franz, 1990; Gabius und Rüdiger, 2009). Die Bodenbakterien werden von der Pflanze in sogenannten ‚Wurzelknöllchen‘ eingeschlossen. Die Bakterien fixieren atmosphärischen Stickstoff zu Ammoniak, den sie der Pflanze zur Verfügung stellen. Die Pflanze versorgt ihrerseits die Bakterien mit organischen Verbindungen. Aufgrund dieser Symbiose benötigen die Leguminosen, obwohl sie wertvolle Eiweißlieferanten sind, keine Stickstoffdüngung (Rüdiger, 1981). Eine grosse Bedeutung spielt die Fähigkeit der Lektine als Erkennungs- und Adhäsionsmoleküle in Zellen, an Zelloberflächen oder gelöst in physiologischen Flüssigkeiten zu agieren (Rüdiger, 1981; Franz, 1990; Sharon und Lis, 2004). Ashwell und Morell (1974) haben ein Galaktose-spezifisches Lektin in der Leber nachgewiesen, welches gealterte, sogenannte Asialo-Glykoproteine aus dem Blutkreislauf eliminiert. Die Leberzellmembranen enthalten Lektine, die die Zuckerstrukturen an der Oberfläche der zirkulierenden Serum-Glykoproteine sondieren. Diese Lektine binden  $\beta$ -glykosidisch gebundene Galaktose, die bei ‚frischen‘ Proteinen von Sialinsäure maskiert ist. Im Laufe der Zeit wird die Sialinsäure durch Hydrolyse abgebaut und gibt die Bindungsstelle für die Leberlektine frei, die somit die gealterten Serumproteine binden und letztendlich den lysosomalen Abbau einleiten (Ashwell und Morell, 1974; Rüdiger, 1981). Lektine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle im Ablauf einer Infektion. So vermitteln Lektine, die auf Erregern lokalisiert sind, deren Anheftung, beispielsweise an Schleimhäuten. In diesen Fällen werden die Lektine auch als Pathogenitätsmarker bezeichnet (Franz, 1990). In den Fünfziger Jahren demonstrierte Alfred Gottschalk, dass das Hämagglutinin des Influenza Virus für den Kontakt zwischen Virus und Zielzelle verantwortlich ist (Sharon und Lis, 2004). Aronson und Mitarbeiter (1979) konnten nachweisen, dass Lektine auf *Escheria coli* mannosenspezifisch Urogenitaltraktentzündungen auslösen. Die Infektion konnte durch Gabe von

Methyl- $\alpha$ -D-mannoside gehemmt werden (Aronson et al., 1979). Nicht nur Mikroorganismen, sondern auch Tumorzellen binden sich lektinvermittelt an Zellen. Lektine spielen hierbei eine Rolle im Metastasierungsprozess sowie der Organotropie einiger Tumore (Franz, 1990). Aub und Mitarbeitern (1963) gelang es mit Hilfe von WGA maligne Zellen zu identifizieren (Aub et al., 1963). Dies hat nicht nur diagnostische Relevanz. Auch therapeutisch kann diese Eigenschaft der Lektine genutzt werden. Versuche wurden unternommen, in denen Lektine die spezifisch auf transformierte Zellen reagieren, mit einem Zytostatikum gekoppelt wurden. Wird das Medikament auf diese Weise nur von der veränderten Zelle aufgenommen, könnten Dosis und Nebenwirkungen immens reduziert werden (Kitao und Hattori, 1977; Tsuruo et al., 1980). Von bedeutendem Interesse ist auch die mitogene Wirkung einiger Lektine (zum Beispiel PNA, ConA) auf Lymphozyten, vor allem T-Lymphozyten (Franz, 1990; Gabius et al., 2004; Buddecke, 2009). Die mitogene Stimulation dieser Lektine ist von großer klinischer Relevanz in Bezug auf die Immunkompetenz von Patienten, die beispielsweise an Lupus erythematosus, HIV oder Leukämie erkrankt sind (Lis und Sharon, 1986).

Ihre hohe Stabilität und die meist bekannte Zuckerspezifität macht die Lektine zu einem wichtigen Hilfsmittel in der Forschung (Gabius und Rüdiger, 2009). In der Frühphase der Lektinologie wurden die Lektine vor allem zur Blutgruppenerkennung genutzt (Franz, 1990). Durch die selektive Agglutinierung Erythrozyten bestimmter Blutgruppen, (beispielsweise bindet LBA der Limabohne *Phaseolus limensis* spezifisch Typ A Erythrozyten, jedoch nicht Typ B und 0), erwiesen sich die Lektine als geeignetes Mittel zur Blutgruppentypisierung (Sharon und Lis, 2004). Auch in der mikrobiellen Diagnostik werden Lektine verwendet. Schottelius (1982) gelang es mittels RCA aus *Ricinus communis* Leishmanien und Trypanosomen zu differenzieren (Schottelius, 1982).

Weit verbreitet sind die Lektine als Hilfsmittel zur Charakterisierung und Isolierung von Glykokonjugaten (Franz, 1990). Membranständige Proteine und Lipide sowie frei im Blutplasma zirkulierende Proteine tragen meist hohe Anteile kovalent gebundene Zuckerreste (Rüdiger, 1981). Kohlenhydrate sind nicht nur Energielieferanten und Bestandteile von Zellwänden. Durch den Prozess der Glykosylierung entsteht auf engstem Raum eine enorme Dichte an spezifischen Zuckerstrukturen, die unzählige Informationen kodieren können (Gabius et al., 2004; Gabius et al., 2011). Lektine sind daher ideale Reagenzien, um die Zuckerbeladung dieser Moleküle zu erkennen. Mittels Affinitätselektrophorese lassen sich durch Lektine die Glykokonjugate, Membranfraktionen oder ganze Zellen präparativ trennen (Rüdiger, 1981; Gabius und Rüdiger, 2009).

#### 2.4.1.4 Technik

Um anhand spezifischer Lektine bestimmte Kohlenhydratgruppen auf und in Zellen nachzuweisen, gibt es mehrere Möglichkeiten, die sich in direkte und indirekte Methoden gliedern lassen. Zu den direkten Methoden der Glykohistochemie gehört die Kopplung des Lektins an einen Marker. Dies kann ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Enzym oder kolloidale Goldpartikel sein (Roth, 2011). Bei den indirekten Methoden wird mit markierten Antikörpern, die gegen das eingesetzte Lektin gerichtet sind oder auch mit Biotin-konjugierten Lektinen, die über markiertes Streptavidin sichtbar gemacht werden, gearbeitet. Auch die Verwendung Biotin-gekoppelter Antikörper kommt bei den indirekten Methoden zum Einsatz (Brooks et al., 1997). Siehe auch Kapitel 2.5.2 (Technik in der Immunzytochemie).

#### 2.4.1.5 Zuckerstrukturen auf aviären Blutzellen

Kohlenhydrate erfüllen im Organismus verschiedene Aufgaben. Zum einen dienen sie als Energiespeicher (Stärke, Glykogen und Dextran) und als Strukturmaterialien (Zellulose, Chitin und Peptidoglykan). Neben diesen wichtigen Aufgaben fungieren Mono-, Di- und Oligosaccharide auch als Informationsträger. An fast allen eukaryotischen Zellen bilden Saccharide der Plasmamembran eine mehrere Nanometer dicke Kohlenhydratschicht, die sogenannte Glykokalix (Nelson und Cox, 2008). Diese komplex strukturierte Oberfläche der Zelle spielt eine wichtige Rolle in Zell-Zell-Erkennung und Zell-Matrixinteraktion, bei der Zellwanderung während der Entwicklung, bei der Blutgerinnung, der Wundheilung, der Immunantwort und anderen zellulären Prozessen (Jörns et al., 2003; Nelson und Cox, 2008). Meist treten die Kohlenhydratketten in Verbindung mit Proteinen oder Lipiden als sogenannte Glykokonjugate auf. Bei den Glykoproteinen sind ein oder mehrere Kohlenhydrate kovalent an ein Protein gebunden. Diese Gruppe der Glykokonjugate sind Bestandteil der Außenseite der Zellmembran, der extrazellulären Matrix und des Blutes. Intrazellulär befinden sich Glykoproteine in Organellen wie Golgi-Apparat, sekretorischen Granula und Lysosomen. Sie bilden, genau wie die zweite Gruppe, die Glykolipide bzw. Membransphingolipide, höchst spezifische Erkennungs- und Bindungsstellen für die Lektine (Nelson und Cox, 2008). Die terminalen Zuckerreste der Glykokalix sowie die restlichen Glykokonjugate können anhand von Lektinen, die jeweils spezifisch an Kohlenhydrate binden, ermittelt werden (Jörns et al., 2003; Gabius et al., 2011).

#### 2.4.1.6 Lektinbindungsstellen von aviären Blutzellen

Untersuchungen mit dem Lektin ConA an Erythrozyten von Hühner zeigten, dass Glukose/Mannosereste sowohl in der Glykokalix der Zellmembran als auch in der Kernhülle vorkommen (Moraes und Mello, 2006). Dabei ist zu beachten, dass die Struktur des Lektins pH-abhängig ist. Bei einem pH-Wert unter 5,6 liegt ConA als Dimer vor, bei einem pH-Wert zwischen 5,6 und 7 erscheint das Lektin als Tetramer und bei einem Wert über 7 werden noch komplexere Aggregate gebildet (Kanellopoulos et al., 1996). Bei einem pH-Wert von über 7 kann ConA zwar die Zellmembran passieren, dringt jedoch nicht in die Kernhülle ein. Zur Darstellung intranuklear gelegener Glykoproteine sollte die Lektinlösung demnach einen pH-Wert zwischen 6 und 7 aufweisen. In diesem Bereich erscheint ConA als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 104 kDa und dies erlaubt dem Proteinkomplex die Kernporen zu passieren (Greer et al., 1970; Pante und Kann, 2002). Auch die Interaktion zwischen ConA und den Kohlenhydraten wird durch den pH-Wert beeinflusst. Sinkt der pH-Wert unter 5,6 reagieren die Lektine kaum noch mit ihren Reaktionspartnern (Moraes und Mello, 2006). Sasmal und Mitarbeiter (2002) konnten im Zuge einer Hämagglutinationsstudie N-Acetyl-D-Glukosamin in der Zellmembran von Hühnererythrozyten nachweisen (Sasmal et al., 2002). DaMatta und Mitarbeiter (1998) untersuchten die Lektinbindungsstellen auf Hühnerthrombozyten. Mit Hilfe des Lektins UEA-1 des Stechginsters (*Ulex europaeus*) erhielten sie positive Reaktionen für Fukose auf der Oberfläche der aviären Thrombozyten. Für Galaktose konnten sie ebenfalls Bindungsstellen über PNA aus der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) feststellen (DaMatta et al., 1998). Bei eosinophilen Granulozyten des Huhns wurden anhand von ConA Mannose bzw. Glukosereste nachgewiesen (Moriya und Ichikawa, 1979). Auf basophilen Granulozyten sowie auf Mastzellen von Hühnern konnte Sorell (1988) anhand von PNA die Existenz terminaler Galaktosylreste nachweisen. Diese haben vermutlich eine wichtige Funktion in der Interaktion zwischen ausgewanderten Leukozyten und der extrazellulären Matrix (Sorrell, 1988). Flower und Wilcox (1981) untersuchten das Lektinbindungsverhalten der Lymphozyten von Hühnern. Nach Zentrifugieren des Blutes erhielten sie eine reine Lymphozytenpopulation. Dabei stellten sie fest, dass die Lymphozyten eine starke Affinität zu den Lektinen ConA, welches an Glukose/Mannosereste bindet und WGA, welches an N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure bindet, aufweisen. UEA-1, spezifisch für Fukose, wird nicht von Lymphozyten gebunden (Flower und Wilcox, 1981; Jörns et al., 2003). Schauenstein und Mitarbeiter (1983) untersuchten das Bindungsverhalten der Lymphozyten des Huhnes für das Lektin PNA. Bei circa 70 % der zirkulierenden Lymphozyten konnten sie positive Reaktionen feststellen. Interessanterweise agglutinierten die restlichen Lymphozyten ebenfalls mit PNA, wenn die Zellen mit Neuraminidase vorbehandelt wurden. Neuraminidase löst die endständige Sialinsäure von Zuckerresten und ermöglicht so die Bindung an zuvor maskierten Galaktoseresten (Schauenstein et al., 1983). Jörns und Mitarbeiter (2003) untersuchten ebenfalls die Lektinbindungsstellen von

Lymphozyten der Hühner. Die terminalen Kohlenhydratreste der Immunzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausführung spezifischer Aufgaben innerhalb der Immunantwort wie Interaktion mit Endothelien und Migration ins Gewebe (Lowe, 1994). Dabei stellten Jörns und Mitarbeiter fest, dass die Zellen des aviären Immunsystems in Masse und Diversität der Lektinbindungsstellen ähnlich den Säugetieren sind (Jörns et al., 2003). Sie untersuchten die Lektinbindungsstellen unter anderem aus bestimmten Bereichen von Thymus und Bursa Fabricii. Für die T-Zell-Region der Thymusrinde konnten sie schwache Bindungen von WGA, PNA und PHA-L feststellen. LCA und ConA wird schwach bis moderat von den T-Lymphozyten gebunden und für MAA, SNA und PHA-E konnten keine Bindungsstellen nachgewiesen werden. Im B-Zell-Areal der Bursa Fabricii wurden moderate bis intensive Bindungen von ConA, eine schwache Bindung von PNA, moderat bis schwache Bindung von WGA sowie schwache Bindung von LCA, MAA und SNA nachgewiesen. PHA-E und PHA-L zeigten kein Bindungsverhalten (Jörns et al., 2003). Bei Monozyten der Enten und Hühner wurden mittels positiven Reaktionen mit ConA Glukose bzw. Mannosereste festgestellt (Moriya und Ichikawa, 1979; Huang et al., 2011).

## **2.5 Immunzytochemie**

### **2.5.1 Definition und Anwendung**

Unter Immunzytochemie versteht man den spezifischen Nachweis von Makromolekülen (Proteine, Polysaccharide, Lipide, Nukleinsäuren usw.) in Zellen und Geweben mittels daran bindender Antikörper (Pschyrembel, 2004; Romeis, 2010). Um die Immunmarkierung sichtbar zu machen, werden verschiedene Markersubstanzen eingesetzt. Als Marker dienen Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder Goldpartikel, die an die Antikörper gekoppelt werden (Sinowatz und Hees, 2000; Romeis, 2010). 1941 wurden die ersten Versuche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern unternommen. Seitdem haben sich die immunzytochemischen Methoden immer weiter verbessert und spielen heute eine wichtige Rolle in Forschung und Diagnostik (Denk, 1989).

### **2.5.2 Technik**

Grundsätzlich kann zwischen der direkten und der indirekten Methode unterschieden werden. Bei der direkten Methode werden markierte Antikörper auf das Präparat aufgebracht und binden dort spezifisch an das zu ermittelnde Antigen, dessen Lokalisation dadurch im Mikroskop festgestellt werden kann. Bei der wesentlich häufiger angewendeten indirekten Methode werden im ersten Schritt



spezifische unmarkierte Antikörper auf das Präparat aufgetragen, die sich fest mit dem zu suchenden Antigen verbinden. Nach Spülen der Schnitte, bei dem alle überschüssigen Antikörper entfernt werden, folgt eine zweite Überschichtung mit markierten Antikörpern, die gegen den ersten Antikörper gerichtet sind (Sinowatz und Hees, 2000). Dieser Sekundärantikörper wird in einer anderen Tierart gegen IgG der Tierart hergestellt, die den Primärantikörper produziert hat und bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers. Vorteil der indirekten Methode ist vor allem eine Signalverstärkung, da viele markierte Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können (Romeis, 2010).

Eine weitere, häufig angewendete Methode ist die (Strept-) Avidin-Biotin Technik. Avidin, ein Protein aus dem Hühnereiweiß und Streptavidin, ein Protein aus *Streptomyces avidinii*, haben beide eine hohe Affinität zu Biotin. Avidin bzw. Streptavidin verbindet nun bei dieser Methode einen biotinylierten Marker (Biotinenzym, Biotingold, Peroxidase oder FITC) mit einem biotinylierten Primär- oder Sekundärantikörper (direkte bzw. indirekte Immunmarkierung). Der Komplex besteht aus sehr vielen markierten Biotinmolekülen, wobei auch geringe Antigenmengen in einem Präparat, durch ein vielfach verstärktes Signal sichtbar werden (Romeis, 2010).

Die Detektion der Immunmarkierung erfolgt über verschiedene Markersubstanzen. Diese sind Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder Goldpartikel. Die Vorteile des Fluoreszenznachweises sind die schnelle und einfache Durchführung, die hohe Empfindlichkeit und die gute Darstellung unter dem Fluoreszenzmikroskop. In dieser Arbeit verwendete Fluorochrome sind FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und TRITC (Tetramethylrhodamineisothiocyanat). Nachteile dieser Methode sind zum einen eine eventuelle Eigenfluoreszenz der Präparate und zum anderen die fortschreitende Ausbleichung der Markersubstanzen.

Die enzymgekoppelten Antikörper sind nicht direkt sichtbar und müssen in einem weiteren Schritt durch Umsetzung eines geeigneten Substrats farbig sichtbar gemacht werden beispielsweise Wasserstoffperoxid für Meerrettich-Peroxidase. Wichtig für ein exaktes Ergebnis ist die Einhaltung der optimalen Inkubationsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Puffer, Zeit, Substratkonzentration) für das jeweilige Enzym. Eventuell bereits natürlich vorhandene Enzyme müssen vor der Nachweisreaktion deaktiviert werden. Diese falsch positiven Ergebnisse sowie der vermehrte Aufwand gehören zu den Nachteilen der Enzymmarkierung. Vorteile sind die hohe Sensitivität, die breite Auswahl an Substraten und die gut sichtbaren positiven Reaktionen unter dem Lichtmikroskop (Romeis, 2010). Eine Modifikation dieser Technik ist die sogenannte Enzym-Anti-Enzym-Komplex-Methode, bei der ein primärer Antikörper durch einen Sekundärantikörper (Brückenantikörper) an einen enzymgekoppelten Antikörper binden. Beispiele dafür sind der Peroxidase-Anti-Peroxidase-(PAP)-Komplex sowie der alkalische-Phosphatase-Anti-alkalische-Phosphatase-(APAAP)-Komplex (Denk, 1989). Die Komplexe enthalten mehrere aktive Enzymmoleküle, wodurch das Signal verstärkt

wird (Romeis, 2010).

Goldmarkierte Antikörper wurden lange Zeit fast ausschließlich für die Immunelektronenmikroskopie verwendet. Als charakteristisch runde und elektronendichte Partikel sind sie gut unter dem Elektronenmikroskop zu erkennen. Die Empfindlichkeit kann durch Silberpartikel, die sich auf den Goldpartikeln ablagern und zur Vergrößerung und Schwarzfärbung führen, noch verstärkt werden (Romeis, 2010).

## 2.6 Zytoskelett

### 2.6.1 Allgemeines

Die Fähigkeit eukaryotischer Zellen, zum einen eine gewisse mechanische und physikalische Stabilität, zum anderen Verformbarkeit und Anpassung aufzuweisen, beruht auf einem bemerkenswerten, als Zytoskelett bezeichneten Filamentsystem (Rudiger und Weber, 1993; Alberts et al., 2004). Dieses filamentös- bis netzförmige System besteht hauptsächlich aus Aktin, Tubulin und Komponenten aus der Familie der Intermediärfilamente. Es formt eine kontinuierliche dynamische Verbindung zwischen der Zellmembran und zytoplasmatischen Strukturen und reguliert unterschiedlichste Aufgaben (Draberova et al., 1999). Das Zytoskelett zieht beispielsweise während der Mitose die Chromosomen auseinander und trennt sich teilende Zellen. Es leitet den intrazellulären Transport von Organellen und stützt die zarte Plasmamembran. Des Weiteren ermöglicht das Zytoskelett Mobilität wie das Schwimmen der Spermien oder das Kriechen von Fibroblasten (Rudiger und Weber, 1993; Alberts et al., 2004). Selbst die Gravitation wird der Zelle über das Zytoskelett übermittelt (Meloni et al., 2011). Neben diesen und noch weiteren Aufgaben ermöglicht das Zytoskelett die erstaunliche Vielfalt an Gestalt und Form eukaryotischer Zellen (Rudiger und Weber, 1993; Alberts et al., 2004). Es wurde herausgefunden, dass nach experimenteller Zerstörung des Zytoskeletts beziehungsweise der assoziierten Proteine, Metabolismus, Signaltransduktion und Zellwachstum der Zelle gestört sind (Meloni et al., 2011).

### 2.6.2 Aktinfilamente

Aktinfilamente legen die Form der Zelloberfläche fest, bilden Mikrovilli oder Pseudopodien und sind für das Wandern der ganzen Zelle verantwortlich. Sie sind ubiquitär in der Zelle zu finden, ihre größte Dichte erreichen sie aber direkt unterhalb der Plasmamembran (Stossel, 1984). Zu ihren Aufgaben

gehört die Ausbildung von dynamischen und starren Strukturen an der Oberfläche der Zellen wie Filopodien oder Lamellopodien. Diese befinden sich bei der wandernden Zelle am führenden Pol (engl.: leading edge) (De Brabander, 1982). Auch im Inneren der Zelle werden aus Aktinfilamenten kurzlebige oder aber stabile Strukturen gebildet wie beispielsweise der kontraktile Ring, der die Zelle während der Zytokinese teilt oder die Anordnung, die der Zelle Kontraktionen ermöglicht (Stossel, 1984; Alberts et al., 2004). Aktinfilamente, auch als Mikrofilamente bezeichnet, sind aus zwei Strängen aufgebaute, helikale Polymere aus dem Protein Aktin. Die Filamente bilden als flexible Gebilde mit 5-9 nm Durchmesser lineare, oft parallel verlaufende Bündel, flächige Netze oder räumliche Gele (Alberts et al., 2004).

### 2.6.3 Mikrotubuli

Eine zweite Art der Zytoskelettproteine sind die Mikrotubuli. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Organisation des Zytoplasmas. Mikrotubuli regulieren die Lokalisation der Zellorganellen und deren intrazellulären Transport (De Brabander, 1982). Mikrotubuli sind in der Interphase oft sternförmig in der Zelle angeordnet und formieren sich während der Zellteilung zu den bipolaren Mitosespindeln (Rudiger und Weber, 1993; Alberts et al., 2004). Ausgehend vom Zentrosom, welches auch Mikrotubuli-Organisation-Zentrum (engl.: MTOC) genannt wird, strahlen die Mikrotubulifasern in Richtung Zellperipherie. Hier enden die Tubuli oder verlaufen unterhalb der Zellmembran weiter. Zwischen dem Tubulinnetzwerk und der Anordnung der Zellorganellen besteht eine deutliche Beziehung. Elemente des Golgi-Apparates sind einheitlich am Zentrosom lokalisiert, diese wiederum organisieren Lysosomen, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum um sich. Intrazelluläre Transporte von Organellen laufen an definierten, von Mikrotubuli gebildeten Pfaden ab (De Brabander, 1982). Mikrotubuli sind indirekt mit den Rezeptoren an der Zelloberfläche verbunden und modulieren so die Interaktion zwischen der Zelle und ihrer Umgebung (De Brabander, 1982). Des Weiteren bilden sie die Grundlage der beweglichen Zilien oder Flagellen auf der Zelloberfläche (Rudiger und Weber, 1993; Alberts et al., 2004). Auch beim Vorgang der Motilität koordinieren sie anhand ihres Einflusses auf Zellpolarität, Form und Bewegung wichtige Abläufe (De Brabander, 1982). Bei aviären Erythrozyten sind die Mikrotubuli als sogenanntes marginales Band peripher, direkt unterhalb der Plasmamembran angeordnet und stabilisieren, nach Meinung vieler Autoren, somit die typische Form der Zelle bzw. spielen eine wichtige Rolle bei der Formveränderung von rund zu ellipsoid während des Reifungsprozesses (Meves, 1911; Fawcett und Witebsky, 1964; Barrett und Dawson, 1974; Swan und Solomon, 1984; Kamau et al., 2002). Bei den Mikrotubuli handelt es sich um lange Hohlzylinder, bestehend aus dem Protein Tubulin mit einem äußeren Durchmesser von 25 nm (Alberts et al., 2004) und einem inneren Durchmesser von 20 nm (De Brabander, 1982). Tubulin

ist aufgebaut aus zwei geringgradig unterschiedlichen Untereinheiten, dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (De Brabander, 1982; Rudiger und Weber, 1993).

#### 2.6.4 Intermediärfilamente

Bei den Intermediärfilamenten handelt es sich um seilähnliche Mikrofasern mit einem Durchmesser von etwa 9 nm (Granger und Lazarides, 1982; Alberts et al., 2004). Zu dem Aufgabengebiet der Intermediärfilamente gehören die mechanische Festigkeit und der Widerstand gegen Scherkräfte (Steinert et al., 1984; Alberts et al., 2004). Generell besitzen sie eine höhere Stabilität im Vergleich zu Aktin und Tubulinstrukturen (De Brabander, 1982). Sie interagieren mit der Zellmembran, durchziehen das Zytoplasma und sorgen für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität (Chou et al., 1997; Houseweart und Cleveland, 1998). Sie befinden sich zum Beispiel als Geflecht direkt unterhalb der Kernhülle und schützen so als Kernlamina die DNA der Zelle (Alberts et al., 2004). Der Zellkern erhält durch die dichte Assoziation mit Vimentin eine gewisse mechanische Unterstützung und wird innerhalb der Zelle besser in Position gehalten (Lazarides, 1980; Houseweart und Cleveland, 1998). Außerdem befinden sich Vimentinfasern, zu festen Kabeln verdreht, im Zytoplasma. Hier durchziehen sie das Zytosol, sorgen für mechanische Festigkeit, Zusammenhalt von Epithelschichten (Desmosomen) und bilden zähe Fortsätze, die beispielsweise Bestandteil von Haaren und Fingernägeln sind (Alberts et al., 2004). Zu den Intermediärfilamenten gehören mindestens fünf verschiedene, jedoch verwandte Proteinklassen. Diese sind Neuro- und Gliafilamente, Desmin, Keratin und Vimentin (Lazarides, 1980; Steinert et al., 1984). Die verschiedenen Intermediärfilamente sind mit relativer Gewebespezifität in unterschiedlichen Zellen vertreten. Vimentin ist die Komponente der Zellen mesenchymalen Ursprungs (Steinert et al., 1984) und ist wiederum aus drei Untereinheiten aufgebaut, der amino-terminalen Komponente (head domain), dem zentralen Kern (rod domain) und der Carboxyl-terminalen Komponente (tail domain) (Moisan und Girard, 2006). Die Organisation der Intermediärfilamente regulieren verschiedene Proteine, die die einzelnen Filamentelemente untereinander verbinden sowie zwischen Vimentin und den beiden anderen großen Zytoskelettgruppen, Aktin und Tubulin Vernetzungen herstellen (Chou et al., 1997).

Die zum Teil durch die ganze Zelle reichenden Zytoskelettelemente werden durch wiederholte Aneinanderreihung kleinerer Untereinheiten gebildet. Diese Untereinheiten können im Gegensatz zu den großen Filamenten rasch im Zytosol diffundieren. Dadurch können sich die Zellen schnell strukturell umorganisieren. Auch dass die drei Zytoskelett-Polymere durch schwache, nicht kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden, ist hilfreich für einen schnellen Auf- und Umbau (Alberts et al., 2004).

Das Zytoskelett wäre jedoch alleine wirkungslos. Besondere Hilfsproteine binden an die Zytoskeletteinheiten und stellen Kontakt untereinander und zu anderen Strukturen her. Durch Einsatz der Hilfsproteine wird die Struktur des Zytoskeletts unter die Kontrolle extra- und intrazellulärer Signale gebracht (Alberts et al., 2004).

## 2.7 Blutgruppen beim Vogel

### 2.7.1 Die Blutgruppensysteme und deren Bestimmung

Auf der Zellmembran der Erythrozyten befinden sich verschiedene Moleküle, die in das Plasma ragen und antigene Eigenschaften besitzen. Gegen diese können eliminierende Antikörper gebildet werden, was im Falle einer Bluttransfusion von Bedeutung sein kann. Anhand dieser Antigene wird das Blut in verschiedene Blutgruppen eingeteilt. Dabei gibt es mehrere Einteilungssysteme. Beim humanen Blutgruppensystem ist das AB0- sowie das Rhesussystem am bekanntesten (Horn et al., 2003). Landsteiner, ein Wiener Arzt und Bakteriologe, beschäftigte sich im Jahre 1900 mit dem Phänomen der Agglutination nach Vermischen verschiedener humaner Blutproben und wies in umfangreichen Studien das AB0-System beim Menschen nach (Landsteiner, 1900; Buschmann und Schmid, 1985). Für diese Entdeckung erhielt Karl Landsteiner 1930 den Nobelpreis (Buschmann und Schmid, 1985). Bei diesem System bestehen die Antigene aus Glykoproteinen, wobei der Zuckerrest am peripheren Ende der Kette ausschlaggebend für die antigene Wirkung und somit für die Einteilung ist. Alle drei Typen besitzen das gleiche Grundgerüst, bestehend aus einer Proteinkomponente, die am Blutkörperchen lokalisiert ist sowie eine Oligosaccharidkette, bestehend aus N-Acetyl-D-Glukosamin, D-Galaktose und L-Fukose. Bei der Blutgruppe 0 oder auch H (=human) genannt, endet das Antigen mit dem Grundgerüst, Blutgruppe A enthält zusätzlich N-Acetyl-D-Galaktosamin als äußerstes Kohlenhydrat und Blutgruppe B besitzt ein weiteres Molekül D-Galaktose. Da die Gene die Merkmale für A und B kodominant vererben, entsteht bei entsprechender Kombination die Blutgruppe AB. Der Träger dieser Blutgruppe besitzt Erythrozyten mit beiden Kohlenhydratenden. A und B verhalten sich wiederum dominant gegenüber der Blutgruppe 0. So entstehen die Genotypen A0 und B0. Damit die Blutgruppe 0 phänotypisch ausgeprägt wird, muss das Merkmal homozygot vererbt werden. Die Antikörper werden jeweils gegen das andere Antigen (A gegen B, B gegen A, 0 gegen AB, AB bildet keine Antikörper) gebildet (Horn et al., 2003). Das zweite wichtige Blutgruppensystem ist das Rhesus-System. Rhesus-positive Menschen besitzen im Gegensatz zu Rhesus-negativen Menschen, neben den AB0-Glykoproteinen, ein weiteres Antigen auf ihrer Erythrozytenmembran. Bei Rhesus-negativen Menschen fehlt das zusätzliche Antigen (Horn et al., 2003). Nach Landsteiner, der das AB0-System

bei humanen Erythrozyten nachwies, waren Ehrlich und Morgenroth (1900) die ersten, die ähnliche antigene Eigenschaften bei den roten Blutkörperchen der Ziege entdeckten. Seitdem wurden zahlreiche Blutgruppenantigene bei Mensch und Tier nachgewiesen. Die Antigene aller Blutgruppensysteme eines Individuums, (beim Schwein handelt es sich beispielsweise um 15 verschiedene Blutgruppensysteme), haben einen Platz auf der Erythrozytenoberfläche. Manche Antigene sind, wenn auch in geringerer Konzentration, auch auf Leukozyten, Thrombozyten oder anderen Organen lokalisiert (Jain, 1993). Der Nachweis der Blutgruppen bei den Tieren erfolgt durch die Hämagglutinationsreaktion, die Konglutation und durch die Immunhämolysereaktion.

### **2.7.2 Beschreibung der Blutgruppensysteme der Vögel**

Landsteiner und Miller (1924) gelang es zuerst, verschiedene Antigenstrukturen auf Hühnererythrozyten nachzuweisen. Bis 1962 wurden von verschiedenen Wissenschaftlern insgesamt 13 (Buschmann und Schmid, 1985) bzw. 12 Blutgruppenantigene entdeckt (Jain, 1993), die in acht Blutgruppensysteme eingeordnet werden können. Wie bei den Säugetieren, sind auch bei den Vögeln die Erythrozytenantigene autosomal vererbt und es können nur die Antigene auftreten, die auch bei den Elterntieren nachweisbar sind (Buschmann und Schmid, 1985). Bei der Ente wies Podliachouk (1964) durch Isoimmunisierung ein Blutgruppensystem A, kodiert durch zwei Allele A1 und A2 und ein Blutgruppensystem B bestehend aus den Allelen B1, B2 und B3, nach (Podliachouk et al., 1964). 1968 bis 1970 beschäftigte sich Losonczy mit den Blutgruppen der Gänse und fand 21 (Blutgruppen: A-V) verschiedene Arten. Der Blutgruppennachweis erfolgt bei den Gänsen über die Hämagglutination und dient in erster Linie der Abstammungskontrolle (Buschmann und Schmid, 1985). Bei den Tauben war Irwin, der auch als Vater der Immungenetik gilt, der Erste, der sich mit der Blutgruppenforschung beschäftigte. Er isolierte insgesamt sechs (A-F) Blutgruppenantigene (Buschmann und Schmid, 1985). Die japanische Wachtel verfügt auf ihrer Erythrozytenmembran über drei Blutgruppenantigene QN<sub>1</sub>, R und H. Diese werden autosomal dominant vererbt (Katoh und Wakasugi, 1981).

### **2.7.3 Bedeutung der Blutgruppenbestimmung**

Eine der wichtigsten Intentionen der Blutgruppenforschung war die Suche nach dem Zusammenhang zwischen Blutgruppen und körperlichen Eigenschaften der Tiere. Drei verschiedene genetische Phänomene spielen hier eine Rolle: Die Pleiotropie bezeichnet die Kodierung der Blutgruppe sowie ein bestimmtes Leistungsmerkmal durch ein und dasselbe Gen. Diese Beziehung ist stabil. Bei der Koppelung liegen Blutgruppenmerkmal und Leistungsmerkmal benachbart auf demselben Chromosom. Diese Beziehung ist temporär, da sie durch ein eventuelles Crossing over getrennt

werden können. Als letztes beeinflusst bei der Heterosis die Blutgruppe durch Heterozygotie den Allgemeinzustand des Tieres (Buschmann und Schmid, 1985). Der Heterosis-Effekt beschreibt die ausgeprägte Leistungsfähigkeit von Hybriden. Durch die Kreuzung möglichst unterschiedlicher reinrassiger Elterntiere verfügen die heterozygoten Nachkommen über eine größere Auswahl unterschiedlicher Allele und können sich so besser an ihre Umgebung anpassen. Sie sind dadurch robuster und nachteilige rezessive Merkmale können überboten werden (Odenbach, 1997).

Ein zweites wichtiges Ziel der Blutgruppenforschung war die bessere Prophylaxe für Bluttransfusionen. Unter anderem bei Schock, Anämien, Verbrennungen, umfangreichen operativen Eingriffen und akutem Blutverlust stellen Bluttransfusionen eines der wichtigsten Hilfsmittel der Medizin dar. Auch in der Tiermedizin sind Blutübertragungen keine Seltenheit mehr. Um der Gefahr einer Unverträglichkeitsreaktion des Empfängertieres entgegenzuwirken, werden vor Transfusionsbeginn das Allgemeinbefinden des Spendertieres geprüft, um mögliche Infektionskrankheiten auszuschließen. Prinzipiell ist eine Überprüfung der Blutgruppe, wie sie in der Humanmedizin obligatorisch ist, auch bei den Tieren möglich. Da aber eine viel höhere Anzahl an Blutgruppenfaktoren beim Tier existiert und diese, beispielsweise beim Rind, theoretisch über eine Milliarde Kombinationsmöglichkeiten ergeben, würde die Suche nach einem gruppengleichen Spender einen zu großen Aufwand darstellen. Im Unterschied zum Menschen ist bei den Tieren eine Gruppenungleichheit nicht mit einer Unverträglichkeit gleichzusetzen. Beim Rind verlaufen circa 80 % aller Ersttransfusionen ohne Zwischenfälle und etwa 50 % der Pferde besitzen in ihrem Serum keine Blutgruppenagglutinine. Dennoch empfiehlt es sich für die Praxis eine serologische Vorauswahl an Dauerspendern zu treffen, die nicht Ak-Träger der häufigsten Blutgruppen (z.B. beim Rind: Anti-J,A,V,M) sind (Buschmann und Schmid, 1985).

Im Gegensatz zur Blutgruppenbestimmung besitzen die serologischen Verträglichkeitsproben die alle Blutgruppenfaktoren erfassen große Bedeutung. Hierbei handelt es sich um den einfachen Hämagglutinationsversuch, die Kreuzprobe und den großen Kreuzversuch. Den Proben liegt jeweils dasselbe Prinzip zugrunde, sie unterscheiden sich nur im Aufwand und proportional dazu, in der Sicherheit ihrer Aussage.

Beim Agglutinationsversuch wird auf einem Objektträger Empfängerplasma mit Erythrozyten des Spenders vermischt. Es wurde hierbei angenommen, dass im Falle eines genügend hohen Ak-Titers im Empfängerplasma vor allem die Blutkörperchen des Spenders die Gefahrenquelle darstellen. Ak des Spenders wurden aufgrund der starken Plasmaverdünnung lange Zeit vernachlässigt. Da es jedoch immer wieder zu Zwischenfällen aufgrund einer ungünstigen Kombination aus Spenderplasma und Empfängerblut kam, ist die einfache Agglutinationsprobe heute nicht mehr vertretbar (Buschmann und Schmid, 1985). Bei der Kreuzprobe wird daher zusätzlich das Spenderplasma mit den

Empfängererythrozyten getestet. Kleine Kreuzprobe (Empfängererythrozyten+Spenderserum) und große Kreuzprobe (Spendererythrozyten+Empfängerserum) werden mit einer Negativkontrolle (Spendererythrozyten+Spenderserum) inkubiert (Couto, 2006).



### III Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

Für die lichtmikroskopischen, ultrastrukturellen, enzymhistochemischen, glykohistochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen wurden Blutproben von insgesamt 31 Straußen verwendet. Bei den Straußen handelt es sich um eine Kreuzung der Rassen Blauhals- und Schwarzhalsstrau. Die Tiere stammen ausnahmslos von der Straußenfarm Donaumoos, auf der während der Schlachtung die Blutentnahme erfolgte. Nach Betäubung durch Stromfluß wurde zunächst ein Halsschnitt und in direkter Folge der Herzstich gesetzt. Hierbei wurde das Blut direkt aus dem Herzen in Lithium-Heparinrhrchen bzw. Objektträger übertragen. Die Proben stammen von insgesamt 18 weiblichen und 13 männlichen, circa 14 Monate alten Tieren. Von jedem der Tiere wurde eine Blutprobe ins Labor Synlab, Augsburg geschickt und ein kleines Blutbild erstellt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Strauße

Strauße	m/w	Alter	Rasse	EM	LM	GHC	EHC	IHC
Strauß 1	w	14 Mo	B/S	x	x			
Strauß 2	m	14 Mo	B/S	x	x			
Strauß 3	w	14 Mo	B/S		x			
Strauß 4	m	14 Mo	B/S		x			
Strauß 5	w	14 Mo	B/S		x			
Strauß 6	w	14 Mo	B/S		x			
Strauß 7	w	14 Mo	B/S		x	x		
Strauß 8	m	14 Mo	B/S		x	x		
Strauß 9	m	14 Mo	B/S		x	x		
Strauß 10	w	14 Mo	B/S	x	x	x		
Strauß 11	w	14 Mo	B/S	x	x	x		
Strauß 12	m	14 Mo	B/S		x	x		
Strauß 13	w	14 Mo	B/S		x	x		
Strauß 14	m	14 Mo	B/S		x	x		
Strauß 15	w	14 Mo	B/S		x	x		x

Strauß 16	w	14 Mo	B/S		x	x		x
Strauß 17	w	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 18	w	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 19	m	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 20	m	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 21	w	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 22	w	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 23	w	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 24	m	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 25	w	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 26	m	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 27	m	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 28	w	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 29	m	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 30	m	14 Mo	B/S			x	x	x
Strauß 31	w	14 Mo	B/S			x	x	x

(EM=Elektronenmikroskopie; LM=Lichtmikroskopie; GHC=Glykohistochemie; EHC=Enzymhistochemie; IHC=Immunhistochemie)

Das Blut der einzelnen Tiere wurde mit einer Glaspipette aus dem Lithium-Heparinröhrchen entnommen und dünn auf Super Frost<sup>®</sup> Objektträgern ausgestrichen. Die Blutausrüche wurden bei Zimmertemperatur luftgetrocknet und abgedunkelt aufbewahrt.

## 3.2 Lichtmikroskopie

### 3.2.1 Übersichtsfärbungen

Die Blutproben von insgesamt 16 Tieren wurden neun verschiedenen lichtmikroskopischen Färbungen unterzogen. Nach Färbung und Lufttrocknung wurden die Objektträger mit Eukitt<sup>®</sup>-Kunststoff und Deckglas eingedeckt um einen permanenten Schutz der Präparate zu gewährleisten.

Die gefärbten Präparate wurden unter einem „Aristoplan“ Lichtmikroskop der Firma Leitz (Leitz, Wetzlar) ausgewertet.

### 3.2.1.1 Diff-Quick-Färbung

Diese Färbung ist die einfachste und schnellste Methode um Zellen spezifisch anzufärben. Die dazu benötigten Färbelösungen sind als Kombinationspaket erhältlich. Es besteht aus drei gebrauchsfertig gelieferten Reagenzien.

Die Objektträger wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

1. Eintauchen der Präparate in Fixierlösung 5 Sekunden
2. Eintauchen der Präparate in Eosinlösung 5 Sekunden
3. Eintauchen der Präparate in Hämalaunlösung 5 Sekunden
4. Abtropfen und Spülen der OT in Aqua dest.
5. Lufttrocknen
6. Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup> und Deckglas

Die Thrombozyten erscheinen blassviolett bis lila. Die Granula der heterophilen Granulozyten erscheinen hellrosa, die der eosinophilen Granulozyten färben sich rot bis orange und die Granula der basophilen Granulozyten dunkellila bis schwarz. Monozyten zeigen einen violetten Zellkern und ein hellblaues Zytoplasma.

### 3.2.1.2 Giemsa-Färbung

Diese Färbelösung ist als fertige Lösung erhältlich und besteht aus in Methanol und Glycerin gelösten Eosin, Methylenblau, Methylenazur und Methylenviolett.

Die Ausstriche wurden wie folgt behandelt:

1. Fixieren der OT in Methanol 10 Minuten
2. Verdünnte ( 1:20 ) Giemsa-Lösung aufgießen 30 Minuten
3. Spülen mit Aqua dest.
4. Lufttrocknen
5. Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup> und Deckglas

Die Erythrozyten zeigen sich blassrötlich, die Thrombozyten dagegen färben sich blau an. Die Zellkerne werden durch Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot angefärbt. Die Granula der neutrophilen Granulozyten färben sich rotviolett, die der eosinophilen Granulozyten färben sich rötlich-braun und die der basophilen Granulozyten blau. Das Zytoplasma der Lymphozyten und Monozyten stellt sich blau dar und enthält zum Teil feine purpurrote Azurkörperchen. (Romeis und Böck, 1989).

### 3.2.1.3 May-Grünwald-Färbung

Die Färbelösung nach May-Grünwald enthält eosinsaures Methylenblau. Aus Eosin und Methylenblau wird ein Farbstoff gemischt, welcher dann in Methanol gelöst wird.

Nach folgendem Protokoll wurden die Blutausstriche angefärbt:

- |    |  |            |
|----|--|------------|
| 1. | Färbelösung auf OT auftropfen                  | 3 Minuten  |
| 2. | Gleiche Menge Aqua dest. auftragen             | 10 Minuten |
| 3. | Abgießen und Spülen in Aqua dest.              |            |
| 4. | Lufttrocknen                                   |            |
| 5. | Eindecken mit Eukitt <sup>®</sup> und Deckglas |            |

Die May-Grünwald-Färbung ist aufgrund ihrer pH-abhängigen Farbgebung besonders für die Anfärbung der Granula geeignet. Basophile Granula erscheinen im lichtmikroskopischen Bild durch die Anfärbung mit Methylenblau tiefblau bis violett während eosinophile Granula den sauren Farbstoff anreichern und damit leuchtend rot erscheinen. Neutrale Granula weisen nach der Färbung einen hell- bis purpurroten blassen Farbton auf. Das Zytoplasma der Erythrozyten wird hellrot, das der Thrombozyten leicht bläulich gefärbt (Romeis, 2010).

### 3.2.1.4 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Diese Färbung ist eine Kombination aus der May-Grünwald und der Giemsa-Färbung. Sie enthält demnach als basische Komponente Methylenblau und als saure Komponente Eosin.

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Schema gefärbt:

- |    |  |             |
|----|--|-------------|
| 1. | 1 ml May-Grünwald-Färbelösung auf OT auftragen | 3 Minuten   |
| 2. | 1 ml Aqua dest. auftragen, Inkubieren          | 60 Sekunden |
| 3. | Verdünnte Giemsalösung (1:20) auftragen        | 20 Minuten  |
| 4. | Spülen mit Aqua dest.                          |             |
| 5. | Lufttrocknen                                   |             |
| 6. | Eindecken mit Eukitt <sup>®</sup> und Deckglas |             |

Die Zellkerne färben sich rötlich-violett, das Zytoplasma der Erythrozyten rosa, das der Lymphozyten hellblau und das der Monozyten grau-blau. Die Granula der neutrophilen Granulozyten färben sich hellviolett, die der Eosinophilen stellen sich ziegelrot bis orange und die der Basophilen färben sich dunkel violett an (Romeis, 2010).

### 3.2.2 Substrathistochemische Färbungen

#### 3.2.2.1 Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS)

Bei der PAS-Reaktion werden unsubstituierte 1,2-Glykole durch die Perjodsäure zu Aldehyden oxidiert, die mit dem Schiff-Reagenz eine farbige Verbindung eingehen (Romeis, 2010). Somit ist die PAS-Reaktion eine Darstellungstechnik für Kohlenhydrate bzw. kohlenhydrathaltige Strukturen und Substanzen wie Glykoproteine und -Lipide, Mukoproteine und hochmolekulare Kohlenhydrate. In Blutzellen wird auf diese Weise hauptsächlich Glykogen nachgewiesen, welches sich als magentafarbenes Reaktionsprodukt fokal, diffus oder granulär niederschlägt (Raskin und Valenciano, 2000). Die Färbung ist äußerst spezifisch, da eine chemische Reaktion abläuft (Romeis, 2010).

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Schema angefärbt:

- |    |   |            |
|----|---|------------|
| 1. | Fixation in Formoldampf                         | 5 Minuten  |
| 2. | Spülen in Leitungswasser                        |            |
| 3. | Einstellen der OT in Perjodsäurelösung, dunkel, | 10 Minuten |
| 4. | Spülen mit Leitungswasser                       |            |
| 5. | Einstellen in Schiffs-Reagenz, dunkel,          | 30 Minuten |
| 6. | Spülen in SO <sub>2</sub> -Wasser               | 4 Minuten  |
| 7. | Spülen in Leitungswasser                        |            |
| 8. | Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer      | 5 Minuten  |

9. Spülen in fließenden Leitungswasser (Bläuen) 5 Minuten
10. Lufttrocknen
11. Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup> und Deckglas

Die Zellkerne stellen sich blau-violett dar. Kohlenhydrathaltige Komponenten färben sich pink an (Romeis, 2010).

### 3.2.2.2 Sirius-Red-Färbung

Die Färbung mit Sirius-Red dient der gezielten Darstellung eosinophiler Granulozyten im Blut und Gewebe (Wehrend et al., 2004). Der rote Farbstoff bindet sich dabei an Proteine, die basische Polyaminosäuren enthalten (Nielsen et al., 1998; Santos et al., 2003) wie beispielsweise die kationischen Proteine Arginin, Cystein und Lysin. Somit ist die Sirius-Red-Färbung auch ein Marker für bakterizide Eigenschaften (Evans et al., 1994).

Nach folgendem Schema wurden die Präparate gefärbt:

1. Fixation in Methanol 10 Minuten
2. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer 10 Minuten
3. Spülen in fließenden Leitungswasser (Bläuen) 15 Minuten
4. Einstellen in Sirius-Red-Färbelösung 60 Minuten
5. Lufttrocknen
6. Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup> und Deckglas

Die Granula der eosinophilen Granulozyten stellen sich leuchtend rot dar.

### 3.2.2.3 Toluidinblau-Färbung

Durch diese Färbung kann die charakteristische metachromatische Granulation der basophilen Granulozyten dargestellt werden. Sie entsteht durch die im Heparin veresterte anorganische Schwefelsäure (Freund, 2008).

Herstellung der Färbelösung:

Das gesättigte Toluidinblau-Methanol wird durch das Lösen von 1 g Toluidinblau in 100 ml Methanol hergestellt.

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Schema angefärbt:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche
2. Bedecken der OT mit der Färbelösung 5 Minuten
3. Abgießen der Färbelösung und Spülen mit Aqua dem.
4. Lufttrocknen
5. Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup> und Deckglas

Die Granula der basophilen Granulozyten zeigen aufgrund der Metachromasie eine leuchtend rotviolette Farbe. Alle übrigen Zellen sind graublau.

#### **3.2.2.4 Alcianblau-Färbung**

Alcianblau ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff. Bei einem pH-Wert von 2,5 können Carboxyl- und Sulfatgruppen nachgewiesen werden. Bei einem pH-Wert von 1 werden überwiegend sulfatierte Mukosubstanzen angefärbt. Die Mukosubstanzen färben sich dabei leuchtend blau an (Romeis, 2010).

Herstellung der Alcianblau-Färbelösung pH 2,5:

In einer 3 %-igen Essiglösung aus 485 ml Aqua dest. und 15 ml Essigsäure 100 % werden 5 g Alcianblau 8 GX Certistain<sup>®</sup> unter Rühren gelöst.

Herstellung der Alcianblau-Färbelösung pH 1,0:

5 g Alcianblau 8 GX Certistain<sup>®</sup> werden in 500 ml mit 0,1 N Salzsäure gelöst.

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche
2. Fixation in Methanol 10 Minuten
3. Einstellen der OT in die Färbelösung 5 Minuten
4. Spülen in fließenden Leitungswasser 3 Minuten
5. Einstellen in Kernechtrotlösung 10 Minuten
6. Spülen in fließenden Leitungswasser 3 Minuten
7. Lufttrocknen
8. Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup> und Deckglas

### 3.3 Enzymhistochemie

#### 3.3.1 Peroxidase

Prinzip: Peroxidasen sind lysosomale Katalasen, die Wasserstoff von einem Donor auf ein Peroxid übertragen. Dabei wird der Donor oxidiert und in einen schwarzbraunen unlöslichen Farbstoff umgewandelt (Burstone, 1962).

Material: Als Material wurden dünn ausgestrichene, luftgetrocknete, frische Blutaussstriche verwendet, bei denen auf jegliche Gerinnungshemmer verzichtet wurde.

Protokoll:

a) Zunächst werden Lösung A und B hergestellt:

-Lösung A: 1 Flasche 4-Chlor-1-Naphthol in 15 ml Ethanol lösen.

-Lösung B: 45 ml Aqua dest. werden mit 10 Tropfen Tris- (hydroxymethylaminomethan)-HCL-Puffer und 2 Tropfen Wasserstoffperoxid-Lösung unter Rühren vermengt.

-Lösung A zu Lösung B geben.

b) Durchführung der Färbung:

- |    |  |             |
|----|--|-------------|
| 1. | Fixierung mit Leucognost <sup>®</sup> -Fixiergemisch | 60 Sekunden |
| 2. | Spülen mit fließenden Leitungswasser                 | 10 Sekunden |
| 3. | Einstellen in die frisch bereitete Färbelösung       | 10 Minuten  |
| 4. | Abspülen mit Aqua dest.                              | 10 Sekunden |
| 5. | Lufttrocknen   |             |
| 6. | Kernfärbung mit Mayers Hämalaunlösung                | 2 Minuten   |
| 7. | Spülen in fließendem Leitungswasser                  | 3-5 Minuten |
| 8. | Lufttrocknen   |             |
| 9. | Mit Aquatex <sup>®</sup> und Deckglas eindecken      |             |

Ergebnis: Ein schwarzbraunes Reaktionsprodukt zeigt ein positives Ergebnis an.

#### 3.3.2 Alkalische Phosphatase

Prinzip: Die alkalische Leukozytenphosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern im alkalischen Milieu. Bei der Umsetzung von 1-Naphthylphosphat wird 1-Naphthol frei und verbindet sich mit Diazoniumsalz zu einem braunen Azofarbstoff, der ausgefällt die Lokalisation und Aktivität innerhalb der Zelle preisgibt.



Material: Als Material wurden dünn ausgestrichene, luftgetrocknete, frische Blutausrichhe verwendet, bei denen auf jegliche Gerinnungshemmer verzichtet wurde.

Protokoll:

a) Zunächst werden Lösung A, B und C hergestellt:

-Lösung A: 4 gestrichene Messlöffel Trishydroxymethylaminomethan werden mit 100 ml destillierten Wasser vermengt.

-Lösung B: 1 Flasche 1-Naphthylphosphatnatriumsalz wird mit 15 ml der Lösung A vermengt.

-Lösung C: 1 Flasche Variamin<sup>®</sup>-Blausalz B und 45 ml der Lösung A werden vermischt und zwei Minuten kräftig geschüttelt. Danach wird Lösung C filtriert und in die Küvette mit der Lösung B gegeben.

b) Durchführung der Färbung:

- |    |   |               |
|----|---|---------------|
| 1. | Fixierung in Leucognost <sup>®</sup> -Fixiergemisch | 1-3 Minuten   |
| 2. | Spülen mit fließendem Leitungswasser                | 10 Sekunden   |
| 3. | Lufttrocknen  |               |
| 4. | Einstellen in frisch bereitete Färbelösung          | 10-15 Minuten |
| 5. | Abspülen mit Aqua dest. und Lufttrocknen            |               |
| 6. | Nachfärben mit Mayers Hämalaunlösung                | 5 Minuten     |
| 7. | Spülen mit fließendem Leitungswasser                | 1-3 Minuten   |
| 8. | Lufttrocknen  |               |
| 9. | Mit Aquatex <sup>®</sup> und Deckglas eindecken     |               |

Ergebnis: Ein braunes granuläres Reaktionsprodukt zeigt ein positives Ergebnis an.

### 3.3.3 Saure Phosphatase

Prinzip: Die saure Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern im sauren Milieu. Aus Naphthol-AS-OL-Phosphat wird Naphthol-AS-BI freigesetzt, welches sich mit einem Diazoniumsalz zu einem rotbraunen Azofarbstoff verbindet, der in der Zelle ausfällt.

Material: Als Material wurden dünn ausgestrichene, luftgetrocknete, frische Blutausrichhe verwendet, bei denen auf jegliche Gerinnungshemmer verzichtet wurde.

Protokoll:a) Zunächst werden die Lösungen A und B hergestellt:

-Lösung A: 2 ml Naphthol-AS-OL-Phosphorsäure werden mit 3 gestrichenen Messlöffeln Natriumacetat vermennt und in 60 ml Aqua dest. gelöst.

-Lösung B: 4-5 Tropfen Paraosanilin-HCL-Lösung (2N) mit 4-5 Tropfen Nitritlösung für 1 Minute mischen und zu Lösung A geben. Die Mischung in eine Küvette filtrieren.

b) Durchführung der Färbung:

- |    |  |             |
|----|--|-------------|
| 1. | Fixierung mit Leucognost <sup>®</sup> -Fixiergemisch | 1-3 Minuten |
| 2. | Abspülen mit Aqua dest.                              | 60 Sekunden |
| 3. | Einstellen in die frisch bereitete Farblösung        |             |
| 4. | Inkubation im Dunkeln                                | 2-3 Stunden |
| 5. | Abspülen mit Aqua dest.                              | 10 Sekunden |
| 6. | Nachfärben mit Mayers Hämalaun                       | 15 Minuten  |
| 7. | Abspülen (Bläuen) mit Leitungswasser                 | 2 Minuten   |
| 8. | Lufttrocknen   |             |
| 9. | Mit Aquatex <sup>®</sup> und Deckglas eindecken      |             |

Ergebnis: Ein rotbraunes Reaktionsprodukt zeigt ein positives Ergebnis an.

### 3.3.4 $\beta$ -Glukuronidase

Prinzip: Universalmethode der Wahl zur intrazellulären Lokalisation ist die simultane Azokupplung mit Naphthol-AS-BI- $\beta$ -Glucuronid (Lojda et al., 1979).

Material: Als Material wurden dünn ausgestrichene, luftgetrocknete, frische Blutausrichie verwendet, bei denen auf jegliche Gerinnungshemmer verzichtet wurde.

Protokoll:a) Zunächst wird eine 0,2 M Natriumacetatlösung, hexazotiertes Pararosanilin, und die Färbelösung hergestellt:

- Herstellung 0,2 M Natriumacetatlösung: 1,312 g Natriumacetat wasserfrei werden mit 80 ml Aqua dest. vermischt.

- Herstellung des hexazotiertem Pararosanilin:

A: 200 mg Pararosanilin Chlorid werden in 4 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wird 1 ml konzentrierte HCL hinzugefügt.

B: Mit 400 mg Natriumnitrit in 10 ml Aqua dem. Wird eine 4 %-ige Natriumnitritlösung hergestellt. Die Lösungen A und B werden zu gleichen Teilen (je 2 ml) unmittelbar vor der Verwendung vermischt, wobei sich rasch eine gelbe Färbung einstellen sollte.

- Herstellung der Färbelösung:

Es werden 19 ml 0,2 M Natriumacetatlösung mit 1 ml hexazotiertem Pararosanilin gemischt und auf einen pH-Wert von 5 (mithilfe von NaOH und HCL) eingestellt. Anschließend werden 4 mg Naphthol-AS-BI- $\beta$ -Glucuronid in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und zu der Inkubationsmischung gegeben.

b) Durchführung der Färbung:

1. Blutausrichie mit Färbelösung betropfen, 37°C, FK 3 Stunden
2. Abspülen mit Aqua dest.
3. Kernfärbung mit Mayers Hämalaun 8 Minuten
4. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) 15 Minuten
5. Luftrocknen
6. Mit Aquatex<sup>®</sup> und Deckglas eindecken

Ergebnis: Ein rotes Reaktionsprodukt zeigt einen positiven Nachweis. Zellkerne zeigen sich blau.

**3.3.5 Naphthol-AS-Acetatesterase-Nachweis (nach Löffler)**

Prinzip: Spezifische und unspezifische Esterasen katalysieren die Hydrolyse von Estern. Hierbei wird ein Teil des Estersubstrats vom Ausgangsmolekül entfernt, welches sich mit einem Farbstoff wie Fast Blue Salt oder hexazotiertem Pararosanilin zu einem unlöslichen farbigen Präzipitat verbindet, welches als Reaktionsprodukt ausfällt (Kass, 1979).

Material: Als Material wurden dünn ausgestrichene, luftgetrocknete, frische Blutausrichie verwendet, bei denen auf jegliche Gerinnungshemmer verzichtet wurde.

Protokoll:a) Zunächst wird ein 0,1 M Phosphatpuffer hergestellt (Puffer für alle Esterasen):

A: 8,9 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat in 500 ml Aqua dest. lösen.

B: 6,9 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat in 500 ml Aqua dest. lösen.

Lösung A mit Lösung B titrieren, bis ein pH-Wert von 7,0 erreicht ist.

b) Herstellung der Färbelösung:

8 mg Naphthol-AS-Acetat in 1 ml Aceton lösen und dieses unter starkem Schütteln tropfenweise zu 80 ml des 0,1 M Phosphatpuffers, vermischt mit 160 mg Fast Blue BB Salt hinzugeben. Die entstandene Lösung in eine Küvette filtrieren.

c) Durchführung der Färbung:

- |    |   |            |
|----|---|------------|
| 1. | Fixation in Formoldampf                         | 5 Minuten  |
| 2. | Einstellen in die frisch bereitete Färbelösung  | 70 Minuten |
| 3. | Abspülen mit Aqua dest.                         |            |
| 4. | Kernfärbung mit Kernechtrot                     | 8 Minuten  |
| 5. | Spülen in fließenden Leitungswasser (Bläuen)    | 15 Minuten |
| 6. | Lufttrocknen                                    |            |
| 7. | Mit Aquatex <sup>®</sup> und Deckglas eindecken |            |

Ergebnis: Am Ort der Enzymaktivität bildet sich bei Verwendung mit Fast Blue BB Salt ein blaubrauner feingranulärer Niederschlag. Die Zellkerne wurden zum besseren Kontrast nicht mit Mayers Hämalaun sondern mit Kernechtrot pinkrot gefärbt.

### 3.3.6 $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase

Prinzip: s.o.

Material: Als Material wurden dünn ausgestrichene, luftgetrocknete, frische Blutausrüche verwendet, bei denen auf jegliche Gerinnungshemmer verzichtet wurde.

Protokoll:

a) Herstellen der Färbelösung: 20 mg 2-Naphthyl-Acetat werden in 0,4 ml Aceton gelöst. Dazu werden 80 ml 0,1 M Phosphatpuffer gegeben. Kräftig Rühren bis die Trübung verschwindet. Anschließend werden 100 mg Fast Blue BB Salt unter Schütteln hinzugefügt und schließlich die

Lösung in eine Küvette filtriert.

Es werden zwei Ansätze mit unterschiedlich eingestellten pH-Werten des Phosphatpuffers gemacht:  
pH-Wert: 6,5 und 8,0

**b) Durchführung der Färbung:**

- |    |   |            |
|----|---|------------|
| 1. | Fixation in Formoldampf                         | 4 Minuten  |
| 2. | Einstellen in die frisch bereitete Färbelösung  | 30 Minuten |
| 3. | Abspülen mit fließendem Leitungswasser          |            |
| 4. | Kernfärbung nach Mayers Hämalaun                | 8 Minuten  |
| 5. | Spülen mit fließendem Leitungswasser (Bläuen)   | 15 Minuten |
| 6. | Lufttrocken                                     |            |
| 7. | Mit Aquatex <sup>®</sup> und Deckglas eindecken |            |

Ergebnis: An der Stelle der Enzymreaktion kommt es zu einem feingranulären, rotbraunen Niederschlag. Die Zellkerne färben sich blau.

**3.3.7 Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Nachweis (nach Moloney)**

Prinzip: Bei der Reaktion der spezifischen Esterase mit seinem Substrat Naphthol-AS-D-Chloracetat entsteht ein Naphtholrest, der sich mit dem Farbstoff Fast Blue Salt zu einem farbigen unlöslichen Reaktionsprodukt verbindet (Kass, 1979).

Material: Als Material wurden dünn ausgestrichene, luftgetrocknete, frische Blutausrüche verwendet, bei denen auf jegliche Gerinnungshemmer verzichtet wurde.

Protokoll:

a) Herstellung der Färbelösung:

Lösung A: 24 mg Naphthol-AS-D-Chloracetat werden in 4 ml N,N-Dimethylformamid gelöst.

Lösung B: 80 mg Fast Blue BB Salt hemi (Zink Chlorid Salz) in 80 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers (Herstellung s.o.) gelöst. Lösung A und B werden gemischt und in eine Küvette filtriert. Es werden drei Ansätze gemacht mit drei verschiedenen eingestellten pH-Werten der Phosphatpuffer (pH-Wert: 6,5/7,4/8,0)

**b) Durchführung der Färbung:**

- |    |   |             |
|----|---|-------------|
| 1. | Fixation in kaltem (4°C) Methanol-Formol (10 %) | 30 Sekunden |
| 2. | Einstellen in die frisch bereitete Färbelösung  | 30 Sekunden |
| 3. | Abspülen mit Aqua dest.                         |             |
| 4. | Kernfärbung mit Mayers Hämalaun                 | 8 Minuten   |
| 5. | Spülen in fließendem Leitungswasser(,Bläuen')   | 15 Minuten  |
| 6. | Lufttrocken                                     |             |
| 7. | Mit Aquatex® und Deckglas eindecken             |             |

Ergebnis: An Stellen der Reaktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase zeigt sich ein blaues granuläres Reaktionsprodukt.

**3.4 Elektronenmikroskopie**

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Blutproben von vier Straußen nach folgenden Arbeitsschritten behandelt. Als erstes wurden die Proben im Röhrchen bei 2000 U/Min. 15 Min. lang zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde vorsichtig abpipettiert. Um die Proben zu fixieren wurde Karnovsky-Gebrauchslösung auf den Leukozytensaum pipettiert (gleiches Volumen wie der Saum). Die Proben wurden nun für eine Stunde bei 4°C fixiert. Danach folgte eine Spülung des entstandenen Zellpellets in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,7), um noch anhaftendes Blut zu entfernen. Die so behandelte Probe wurde über Nacht nochmals in Karnovsky-Lösung eingelegt. Am folgenden Tag wurde das Pellet in 1 mm<sup>3</sup> große Blöcke geschnitten und dreimal in Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,2) gespült. Anschließend wurden die Proben mit 1 %-igen Osmiumtetroxid und 1,5 %-igen Kaliumferrocyanid für zwei Stunden bei 4°C kontrastiert. Es folgte eine dreimalige Waschung mit Natrium-Cacodylatpuffer für jeweils 20 Minuten. Nach Fixierung der Proben folgte eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 50 %, 70 %, 90 %, 100 %, je 30 Minuten) und anschließend die schrittweise Einbettung in Epon (Propylenoxid (MERCK, Darmstadt), je 2 x je 15 Minuten, Propylenoxid-Epon-Gemisch 2:1 1 Stunde, Propylenoxid-Epon-Gemisch 1:1 über Nacht, reines Epon 1 Stunde). Dann folgte eine Polymerisierung der Blöcke in Gelatinekapseln (PLANNET, Wetzlar) für 24 Stunden bei 60°C. Anschließend wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) 1 µm dicke Semidünnschnitte für die erste Übersicht geschnitten und mit Richardson eingefärbt. Es folgten Ultradünnschnitte mit einem Durchmesser von 60 nm. Diese wurden auf Kupfer-Grids (200 Mesh) aufgezogen und mit gesättigten Uranacetat und einer Bleizitrat-Lösung nach Reynolds nachkontrastiert.

### 3.5 Glykohochemie

Für die glykohochemischen Untersuchungen wurden zum einen Lektine an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) zum anderen an Biotin gekoppelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

#### 3.5.1 FITC markierte Lektine

Es wurden insgesamt 14 an FITC gekoppelte pflanzliche Lektine (VECTOR, Burlingame) an jeweils zehn Blutausschnitten auf ihre Bindungsfähigkeit getestet. Die hierbei verwendeten Lektine sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 6: Verwendete FITC-markierte Lektine

	Name	Abk.	Herkunft	Spezifität für Monosaccharide	Potente Oligosaccharide
1	Concanavalin Agglutinin	ConA	Canavalia ensiformis (Schwertbohne)	Glc/Man	GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6(GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3)Man $\beta$ 4GlcNAc
2	Lens culinaris Agglutinin	LCA	Lens culinaris (Speiselinse)	Glc/Man	Bindung an N-Glykane durch Core-Fucosylierung
3	Pisum sativum Agglutinin	PSA	Pisum sativum (Erbse)	Glc/Man	Bindung an N-Glykane durch Core-Fucosylierung
4	Peanut Agglutinin	PNA	Arachis hypogea (Erdnuß)	Gal	Gal $\beta$ 3GalNAc $\alpha$ / $\beta$
5	Ricinus communis Agglutinin	RCA	Ricinus communis (Kastorbohne)	Gal	Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 1R
6	Wheat germ Agglutinin	WGA	Triticum vulgare (Weizen)	GlcNAc/ Neu5Ac	(GlcNAc $\beta$ 4) <sub>n</sub> (Man $\beta$ 4)GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc(1,N-Asn); Geclusterte sialysierte Tn/Tn-Antigene in Muzinen; O-GlcNAcylierung von Proteinen)
7	Wheat germ Agglutinin, succinyliert	WGAs	Triticum vulgare (Weizen)	GlcNAc/NeuNAc	a)

8	Griffonia simplicifolia Agglutinin	GSL-1	Griffonia simplicifolia (Afrik. Schwarzbohne)	GalNAc	GalNAc $\alpha$ 3Gal; GalNAc $\alpha$ 3GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc
9	Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	Dolichos biflorus (Afrik. Pferdebohne)	GalNAc	GalNAc $\alpha$ 3GalNAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Glc>A-Tetrasaccharide
10	Saphora japonica Agglutinin	SJA	Saphora japonica (Chin. Schnurbaum)	GalNAc	GalNAc $\beta$ 6Gal; Gal $\beta$ GalNAc
11	Soybean Agglutinin	SBA	Glycine max (Sojabohne)	Gal/GalNAc	GalNAc $\alpha$ 3Gal( $\beta$ 6Glc), Sialidase-vorbehandelte submaxillare Muzine
12	Ulex europaeus Agglutinin	UEA-1	Ulex europaeus (Stechginster)	Fuc	Fuca2Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6R
13	Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro	PHA-E	Phaseolus vulgaris (Gartenbohne)	b)	Mit $\beta$ 1-> Bindung an zentrale Mannose von komplexen N-Glykanen verknüpfte GlcNAc; Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6(GlcNAc $\beta$ 2-Man $\alpha$ 3)(GlcNAc $\beta$ 4)Man $\beta$ 4GlcNAc
14	Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuco	PHA-L	Phaseolus vulgaris (Gartenbohne)	b)	„Tetraantennary“ und „triantennary“ N-Glykane mit $\beta$ 6-Verzweigung

Übersicht über die in der Arbeit verwendeten direkt FITC markierten Pflanzenlektine (Modifiziert nach Gabius, Habermann, Rüdiger, Monsigny und Roth (Monsigny et al., 1980; Gabius und Rüdiger, 2009; Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011; Roth, 2011).

Glc=Glukose, Man=Mannose, Gal=Galaktose, GlcNAc=N-Acetyl-Glukosamin, NeuNAc=N-Acetyl-Neuraminsäure, GalNAc= N-Acetyl-Galaktosamin; Fuc=Fukose. a) Succinylierung von WGA (WGAs) reduziert die Sensitivität der Bindung an Neuraminsäure in Zellen (Monsigny et al., 1980). b) Keine Spezifität für Monosaccharide bekannt.

Die Blutausrichthe wurden zunächst für zehn Minuten in Methanol fixiert und dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS Puffer (pH: 7,4) gewaschen. Pro Objektträger wurden 100  $\mu$ l des in PBS-Puffer gelösten und direkt an FITC gekoppelten Lektins in einer Konzentration von 10  $\mu$ l/ml aufpipettiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Blutausrichthe anschließend in einer Feuchtkammer für eine Stunde inkubiert. Da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind, wurde die Feuchtkammer



mit Alufolie abgedeckt. Auch die folgenden Schritte wurden im abgedunkelten Bereich vollzogen. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte erneut eine dreimalige Spülung für jeweils fünf Minuten in PBS-Puffer (pH: 7,4). Um die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop identifizieren zu können, wurden die Objektträger mit dem VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI- (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (VECTOR, Burlingame) unter Luftabzug eingedeckt. Da die Lösung nicht aushärtet, wurden die Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Die so fertiggestellten Blutausstriche wurden bei 7°C im Kühlschrank bis zur Auswertung aufbewahrt. Zur Positivkontrolle wurden Blutausstriche des Rindes mit bekannten Lektinbindungseigenschaften herangezogen. Als Negativkontrolle wurden Blutausstriche des Straußes verwendet, bei denen nur die Kernfärbung, aber keine Lektinlösung aufgetragen wurde, um den Eigenfluoreszenzanteil der Zellen zu bestimmen.

Die Präparate wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

- |    |   |               |
|----|---|---------------|
| 1. | Fixation in Methanol                    | 10 Minuten    |
| 2. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)          | 3 x 5 Minuten |
| 3. | 100 µl Lektinlösung (10 µl/ml) / OT     |               |
| 4. | Inkubation in Feuchtkammer, RT, dunkel  | 60 Minuten    |
| 5. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4), dunkel  | 3 x 5 Minuten |
| 6. | Eindecken mit Deckglas und DAPI, dunkel |               |

### 3.5.2 Biotinylierte Lektine

Bei den Lektinen MAA, SNA und VAA (VECTOR, Burlingame) wurde zum Nachweis die Streptavidin-Biotin-Methode angewendet.

In folgender Tabelle sind die wichtigsten Eigenschaften dieser Lektine aufgelistet:

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete biotinylierte Lektine

	Name	Abk.	Herkunft	Zuckerspezifität	Potente Oligosaccharide
1	Maackia amurensis Agglutinin	MAA	Maackia amurensis (Asiatisches Gelbholz)	Oligosaccharide	Neu5Ac/Gc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc/Glc <sup>b</sup> , 9-o-Acetylierung wird toleriert, Core reaktiv bei 3-sulfatierten LacNAc
2	Sambucus nigra Agglutinin	SNA	Sambucus nigra (Schwarzer Holunder)	GalNAc; Gal	Neu5Ac/Gc $\alpha$ 6Gal/GalNAc <sup>c</sup> , clustered Tn-antigen <sup>d</sup> , 9-o-acetylierung wird toleriert
3	Viscum album Agglutinin	VAA	Viscum album (Mistel)	Gal	Gal $\beta$ 2(3)Gal, Gal $\alpha$ 3(4)Gal, Fuca2Gal, Gal $\beta$ 3(4)GlcNAc mit/ohne $\alpha$ 2,6-Sialisierung

GalNAc=N-Acetyl-Galaktosamin; Gal=Galaktose

Modifiziert nach Gabius und Habermann (Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011)

Streptavidin ist ein von *Streptomyces Avidinii* abstammendes Protein welches eine hohe Bindungsaffinität zu dem Vitamin Biotin aufweist. Diese Bindungsbereitschaft wird bei der Streptavidin-Biotin-Methode genutzt um spezifisch Kohlenhydratstrukturen nachzuweisen. Bei diesem indirekten Vorgang wird das an Biotin-gekoppelte Lektin auf den Blutausschrieb aufgetragen und inkubiert. In einem zweiten Schritt wird ein, ebenfalls an Biotin sowie an Streptavidin gebundener Fluoreszenzfarbstoff dazugegeben. Durch die hohe Bindungsbereitschaft des FITC-gekoppelten Streptavidin für Biotin, geht nun dieser Komplex eine Bindung mit dem im ersten Schritt aufgetragenen biotinyliertem Lektin ein. Durch die FITC-Markierung wird die Bindungsstelle und somit die Kohlenhydratstruktur sichtbar.

Für MAA, SNA und VAA wurden jeweils zehn Blutausschriebe angefertigt, welche luftgetrocknet und zehn Minuten in Methanol fixiert wurden. Diese wurden dreimal für fünf Minuten in PBS-Puffer (pH: 7,4) gespült. Für eine Reduktion der Hintergrundfärbung wurden die Objektträger mit Dako Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) beträufelt und zehn Minuten lang bei Raumtemperatur in einer

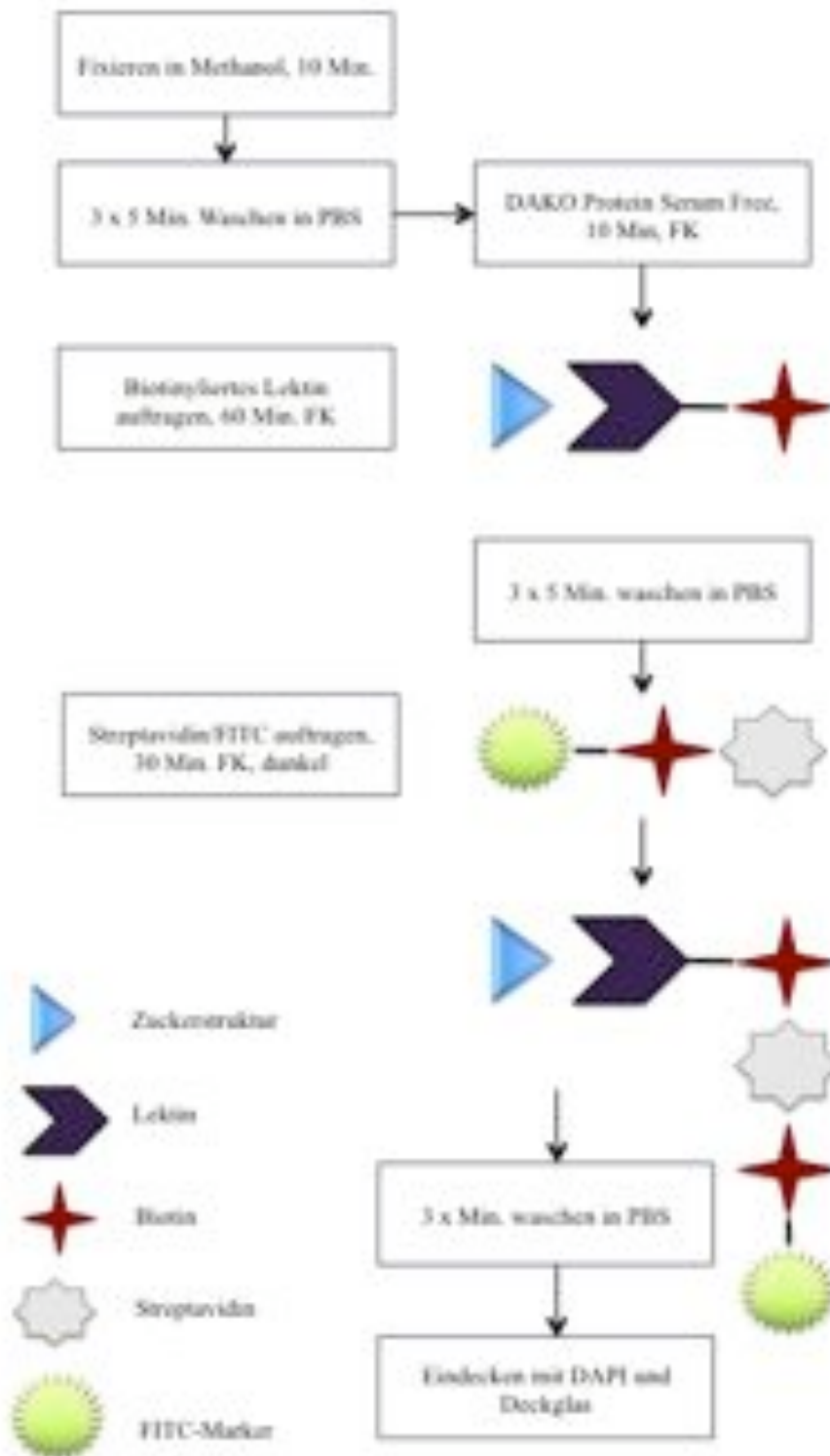
Feuchtkammer inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Lektinlösung angemischt. Bei MAA und SNA betrug die Konzentration der Lektine 5 µl/ml, für VAA 1 µl/ml. Pro Blutausschlag wurden 100 µl Lektinlösung aufpipettiert und anschließend für 60 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneutes dreimaliges Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4). Im folgenden Schritt wurde die Streptavidin-FITC-Lösung angemischt. Auf jeden Objektträger wurden 200 µl aufgetragen und es folgte eine erneute Inkubation für 30 Minuten in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger dreimal in PBS-Puffer (pH: 7,4) abgedunkelt gewaschen und mit DAPI eingedeckt.

Folgend ist der Arbeitsablauf noch einmal beschrieben:

- |    |   |               |
|----|---|---------------|
| 1. | Fixation in Methanol                                      | 10 Minuten    |
| 2. | Auftragen von Dako Protein Block Serum Free, FK, RT       | 10 Minuten    |
| 3. | 100 µl Lektinlösung pro Objektträger, FK, RT              | 60 Minuten    |
| 4. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                            | 3 x 5 Minuten |
| 5. | 200 µl Streptavidin-FITC pro Objektträger, FK, RT, dunkel | 30 Minuten    |
| 6. | Spülen in PBS-Puffer, dunkel, RT                          | 3 x 5 Minuten |
| 7. | Mit DAPI und Deckglas eindecken                           |               |

Folgendes Schema soll das Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode noch einmal verdeutlichen:

Abbildung 3: Streptavidin-Biotin-Methode



### 3.5.3 Vorbehandlung mit Hemmzucker

Bei den Lektinen WGA, WGAs, ConA, LCA, PSA und PHA-E wurde bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop eine stark positive Reaktion festgestellt. Durch eine, im Vorfeld durchgeführte Inkubation des Lektins mit dem jeweiligen spezifischen Kohlenhydrat wurde getestet, ob sich die Bindung des Lektins an die Zuckerstrukturen der Blutzellen hemmen oder vermindern lässt. Die Inhibitoren wurden in einer 0,4 molaren Lösung zu den, in PBS-Puffer gelösten Lektinen gegeben und eine beziehungsweise eine halbe Stunde inkubiert. Jeweils 100 µl Hemmzucker-Lektin-Lösung wurden auf drei Objektträger aufpipettiert. Als Positivkontrolle wurde auf je einen Objektträger das Lektin ohne Hemmstoff aufgetragen. Die weitere Vorgehensweise entspricht dem bereits bekannten Lektinprotokoll unter 3.4.1. In folgender Tabelle sind die Lektine mit den dazugehörigen Hemmzuckern sowie deren Konzentration und Inkubationszeit aufgelistet. Bei PHA-E hat sich aus Ermangelung eines spezifischen Hemmzuckers die Hemmung durch Essigsäure bewährt.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Hemmzucker

Lektin	Hemmstoff	Konzentration	Inkubationszeit
WGA	Chitin-Hydrolysat	1:4	30 Minuten
WGAs	Chitin-Hydrolysat	1:4	30 Minuten
ConA	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside	84,8 mg/ml	60 Minuten
LCA	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside	84,8 mg/ml	60 Minuten
PSA	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside	84,8 mg/ml	60 Minuten
PHA-E	Essigsäure	24 µl/ml	60 Minuten

### 3.5.4 Vorbehandlung mit Neuraminidase

Das Enzym Neuraminidase spaltet von verschiedenen Glykoproteinen die endständige Sialinsäure ab. Sialinsäure wird häufig als Oberbegriff für N- und O-Derivate der Neuraminsäure oder auch als Synonym für die N-Acetylneuraminsäure (NANA) verwendet. Mithilfe dieser Methode kann herausgefunden werden, ob nach vorheriger Behandlung der Blutausrüche mit Neuraminidase nicht bindende Lektine nun in der Lage sind, mit den, vorher durch Sialinsäure maskierten Zuckerstrukturen der Blutzellen Bindungen einzugehen. Die für diesen Versuch verwendete

Neuraminidase stammt von *Vibrio cholerae* (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und spaltet bevorzugt  $\alpha$  (2→3) Verbindungen der Sialinsäure, aber auch  $\alpha$  (2→6) und  $\alpha$  (2→8) Verbindungen. Für eine optimale Enzymaktivität wird eine Temperatur von 37°C und ein pH-Wert von 5,0 benötigt.

Das folgende Protokoll wurde zunächst unter Zuhilfenahme menschlicher Blutproben etabliert und schließlich beim Straußenblut angewendet. Bei den hier verwendeten Positivkontrollen handelt es sich um Straußenblutausstriche, die ohne Neuraminidase mit dem jeweiligen Lektin behandelt wurde.

Die Objektträger wurden nach folgendem Schema behandelt:

- |    |  |               |
|----|--|---------------|
| 1. | Fixation in Methanol                           | 10 Minuten    |
| 2. | Waschen in Natrium-Acetat-Puffer (pH: 5,5)     |               |
| 3. | 200 $\mu$ l Neuraminidaselösung / OT auftragen |               |
| 4. | Inkubation in Feuchtkammer, 37°C               | 60 Minuten    |
| 5. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                 | 3 x 5 Minuten |
| 6. | 100 $\mu$ l Lektinlösung / OT auftragen        |               |
| 7. | Inkubation in Feuchtkammer, dunkel, RT         | 60 Minuten    |
| 8. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                 | 3 x 5 Minuten |
| 9. | Eindecken mit DAPI und Deckglas                |               |

→ Herstellung der Natrium-Acetat-Puffer pH 5,5 (nach Romeis 2010):

- 13,6 g Natrium-Acetat wasserfrei in 1l Aqua dem. lösen , pH 5,5 mit 10 %-iger Essigsäure einstellen

→ Herstellung der Neuraminidaselösung:

- 3  $\mu$ l der Neuraminidaselösung (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) in 1 ml Na-Acetat-Ca-Cl-Puffer lösen (bei konstanten 37°C

→ Herstellung des Na-Acetat-Ca-Cl-Puffer:

- 8,2 g Natrium-Acetat in 1l Aqua dem. lösen
- 0,294 g Calcium-Chlorid hinzugeben
- mit 1M HCl auf pH 5,0 einstellen

CAVE: Temperatur muss immer über 37°C betragen, aber nicht über 40°C.

### 3.6 Zytoskelett

Der Aufbau des Zytoskeletts in den Blutzellen wurde mit verschiedenen histochemischen Techniken untersucht. F-Aktin wurde mithilfe des TRITC-gekoppeltem Toxins Phalloidin nachgewiesen. Tubulin und Vimentin wurden anhand immunhistochemischen Methoden durch FITC-markierte Antikörper festgestellt.

#### 3.6.1 Aktin

Phalloidin-TRITC (SIGMA-ADLRICH, Steinheim, Nr: P1951) bindet 1:1 an polymerisiertes, filamentöses F-Aktin, welches die aktivierte Form der Aktinfilamente darstellt. So kann die Intensität der Fluoreszenz direkt mit der Menge an zellulären F-Aktin gleichgesetzt werden (Carulli et al., 2006). Um die 1:500 verdünnte Phalloidin-TRITC-Lösung herzustellen, wurden pro 10 Blutausstriche 2  $\mu$ l Phalloidin-TRITC-DMSO in 998  $\mu$ l Antibody Diluent gelöst. (Konz. 500  $\mu$ g Phalloidin-TRITC/ml DMSO).

Die Objektträger wurden nach folgendem Schema behandelt:

- |    |   |               |
|----|---|---------------|
| 1. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                            | 3 x 5 Minuten |
| 2. | Dako Protein Block Serum-Free auf OT auftropfen, RT       | 10 Minuten    |
| 3. | 100 $\mu$ l Phalloidin-FITC, 1:500 pro OT, RT, FK, dunkel | 45 Minuten    |
| 4. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                            | 3 x 5 Minuten |
| 5. | Mit DAPI und Deckglas eindecken                           |               |

#### 3.6.2 Tubulin

Um die 1:100 verdünnte Primärantikörperlösung herzustellen, wurden pro 10 Objektträger, 10  $\mu$ l Primärantikörper (Abcam, Cambridge, Nr: AB3194) (von der Maus, monoklonal für Tubulin Konz.: 200  $\mu$ g/ml) in 990  $\mu$ l Antibody Diluent gelöst.

Für die 1:20 verdünnte Sekundärantikörperlösung, wurden pro 10 Objektträger, 50  $\mu$ l FITC-markierte Antimaus IgG vom Kaninchen (DAKO, Hamburg) in 950  $\mu$ l PBS-Puffer (pH: 7,4) unter Lichtausschluß gelöst.

Die Objektträger wurden nach folgendem Schema behandelt:

- |    |  |               |
|----|--|---------------|
| 1. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                         | 3 x 5 Minuten |
| 2. | Dako Protein Block Serum-Free auf OT auftropfen, RT    | 10 Minuten    |
| 3. | 100 µl Primär-AK-Lösung, pro OT, RT, FK, 6 °C          | über Nacht    |
| 4. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                         | 3 x 5 Minuten |
| 5. | 100 µl Sekundär-AK-Lösung, 1:20 pro OT, RT, FK, dunkel | 30 Minuten    |
| 6. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                         | 3 x 5 Minuten |
| 7. | Mit DAPI und Deckglas eindecken                        |               |

### 3.6.3 Vimentin

Um die 1:500 verdünnte Primärantikörperlösung herzustellen, wurden pro 10 Objektträger 2 µl Primärantikörper (Abcam, Cambridge, Nr: AB8069) (von der Maus, monoklonal für Vimentin) in 998 µl Antibody Diluent gemischt. Für die 1:20 Sekundärantikörperlösung wurden pro 10 Objektträger 50 µl FITC-markierte Antimaus IgG vom Kaninchen (DAKO, Hamburg) in 950 µl PBS-Puffer (pH: 7,4) unter Lichtausschluß gelöst.

Die Objektträger wurden nach folgendem Schema behandelt:

- |    |  |               |
|----|--|---------------|
| 1. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                         | 3 x 5 Minuten |
| 2. | Dako Protein Block Serum-Free auf OT auftropfen, RT    | 10 Minuten    |
| 3. | 100 µl Primär-AK-Lösung, 1:500 pro OT, FK, 6 °C        | über Nacht    |
| 4. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                         | 3 x 5 Minuten |
| 5. | 100 µl Sekundär-AK-Lösung, 1:20 pro OT, RT, FK, dunkel | 30 Minuten    |
| 6. | Spülen in PBS-Puffer (pH: 7,4)                         | 3 x 5 Minuten |
| 7. | Mit DAPI und Deckglas eindecken                        |               |

### 3.7 Auswertung

Die mit den Übersichtsfärbungen behandelten Blutaussstriche wurden unter dem Lichtmikroskop „Aristoplan“ der Firma Leitz (Leitz, Wetzlar) untersucht und ausgewertet. Die Auswertung und photographische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Proben erfolgte an dem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 902 (Zeiss, Oberkochen). Die Präparate, die den Fluoreszenzmarker FITC und TRITC enthalten, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop „Dialux 20“ der Firma Leitz (Leitz, Wetzlar) ausgewertet. Die Fotoaufnahmen wurden mit der Kamera „Progress<sup>®</sup>CF cool“ gemacht.



## IV Ergebnisse

### 4.1 Blutbilder der verwendeten Strauße

Von jeder verwendeten Blutprobe wurde von Synlab, Augsburg, ein kleines Blutbild erstellt. Ausgangsmaterial war heparinisiertes Blut. Alle Tiere entstammen einer Kreuzung aus Schwarz- und Blauhalsstrauß und sind bei Blutentnahme circa 14 Monate alt. In dem kleinen Blutbild wurden Erythrozyten und Leukozyten gezählt sowie der Hämatokrit gemessen. In folgender Tabelle sind die Blutwerte der einzelnen Tiere aufgelistet.

Tabelle 9: Blutwerte der einzelnen Strauße

Strauß	ERY (T/l)	LEU (G/l)	HKT %	w/m
1	1,1	9,5	53	w
2	1,45	10,5	50	m
3	1,2	8,0	44	w
4	1,01	17,5	43	m
5	1,1	11,0	44	w
6	0,8	10,0	46	w
7	1,19	17,0	45	w
8	1,08	10,0	43	m
9	0,15	16,8	-	m
10	0,13	8,3	-	w
11	0,14	6,3	-	w
12	-	-	-	m
13	0,12	6,0	-	w
14	0,09	10,5	-	m
15	0,13	16,3	-	w
16	-	-	-	w
17	1,95	12,4	45	w
18	1,55	5,8	50	w
19	1,87	9,8	45	m
20	1,48	13,3	40	m
21	1,45	9,8	43	w
22	1,77	9,3	52	w
23	1,29	6,0	52	w
24	1,49	12,0	39	m
25	1,26	6,5	41	w
26	1,5	5,0	38	m
27	1,38	12,5	38	m
28	1,11	5,3	34	w
29	1,45	11,5	45	m
30	1,3	4,5	38	m
31	1,4	2,5	40	w

(Referenzbereiche: Erythrozyten: 2,5-4,5; Leukozyten: 10,0-25,0; Hämatokrit: 40-55) (Quelle: Synlab, Augsburg)

Die Mittelwerte für die weiblichen Tiere liegen bei den Erythrozytenzahlen bei 1,04, bei den Leukozyten bei 9,78 und somit knapp unter den Mittelwerten der männlichen Tiere mit Erythrozytenzahlen von 1,18 und Leukozyten von 11,15. Der Hämatokrit liegt bei den weiblichen Tieren im Mittel mit 45,8 höher als bei den männlichen Tieren, die einen mittleren Hämatokrit von 41,9 aufweisen. Bis auf die Hämatokritwerte und bei den männlichen Tieren die Leukozytenzahl liegen die Mittelwerte knapp unterhalb des Referenzbereiches, was durch die schnelle Gerinnungsbereitschaft und somit teilweise schwierige Verwendbarkeit des Vogelblutes zu erklären ist. Juvenile Vögel weisen in der Regel niedrigere Werte bei Erythrozytenzahlen, Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit auf (Hodges, 1977; Palomeque et al., 1991; Campbell und Ellis, 2007).

## **4.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen**

Es wurden neun verschiedene Übersichtsfärbungen an Blutaussstrichen von insgesamt 16 Straußen vorgenommen. Von jedem Strauß wurden mindestens acht Blutaussstriche untersucht und die Morphologie der einzelnen Blutzellen ausgewertet.

### **4.2.1 Erythrozyten**

Bei den Erythrozyten des Straußes handelt es sich um ovale, kernhaltige Zellen mit einer glatten Zellmembran. Im homogenen Zytoplasma befindet sich zentral ein spindelförmiger Zellkern mit leicht höckeriger Struktur. Die Vorstufen der Erythrozyten sind größer und weisen eine rundere Zellform und einen größeren, runderen Zellkern auf als die reifen Erythrozyten. Das Chromatin ist lockerer strukturiert als bei den adulten Vertretern. Einige Erythrozyten sind kleiner oder größer als der Hauptteil der roten Blutkörperchen. Dies wird als Anisozytose bezeichnet und ist bis zu einem gewissen Grad physiologisch. Die bei anderen Tierarten beobachtete Stechapfelform sowie die Geldrollenbildung wurde beim Strauß nicht nachgewiesen. Eine basophile Tüpfelung sowie ‚Heinz bodies‘ konnte in keinem Präparat entdeckt werden. Die Farbe der Erythrozyten ist abhängig von der jeweiligen Färbung und ist in Tabelle 10 aufgelistet:

Tabelle 10: Übersichtsfärbungen Erythrozyten:

Struktur	DQ	Giensa	MG	PAP
Zytoplasma	altrosa	blassrot	ziegelfarben	graurosa
Zellkern	dunkelblau	dunkellila	mittelblau	dunkelblau

Bei den substrathistochemischen Färbungen (PAS, PAS mit Amylase-Vorbehandlung, Sirius-Red-Färbung, Toluidinblau-Färbung und Alcianblau-Färbung) zeigten die Erythrozyten keine spezifischen positiven Reaktionsprodukte.

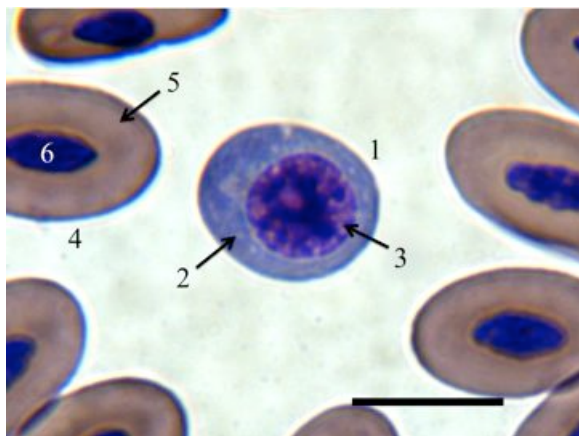


Abbildung 4: Erythrozyten

Strauß 2, männlich, 14 Monate, Diff-Quick-Färbung, Kernfärbung mit Hämalan, SB: 10 µm

Polychromatozyt (1). Das Zytoplasma des Polychromatozyten (2) ist feingranuliert und färbt sich mittelblau an, sein mäßig kondensierter Zellkern (3) ist dunkellila. Reife Erythrozyten (4). Das Zytoplasma färbt sich altrosa, der stark kondensierte Zellkern (6) erscheint dunkelblau.

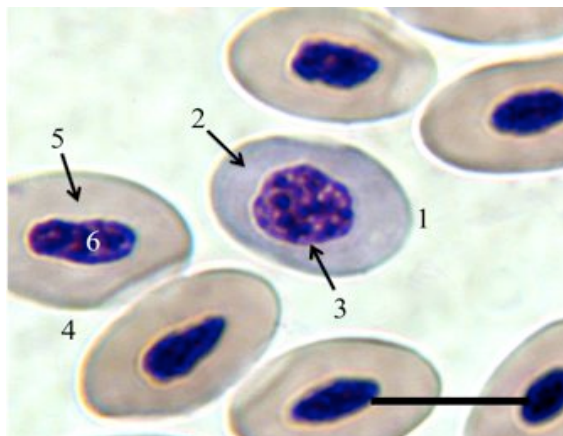


Abbildung 5: Erythrozyten

Strauß 1, weiblich, 14 Monate, Giemsa-Färbung, Kernfärbung mit Hämalan, SB: 10 µm

Polychromatozyt (1). Das Zytoplasma des Polychromatozyten (2) ist graublau und beinhaltet einen runden, locker kondensierten Zellkern (3). Reife Erythrozyten (4). Das blassrote Zytoplasma der Erythrozyten (5) enthält einen ovalen, stark kondensierten, dunkelblauen Zellkern (6).

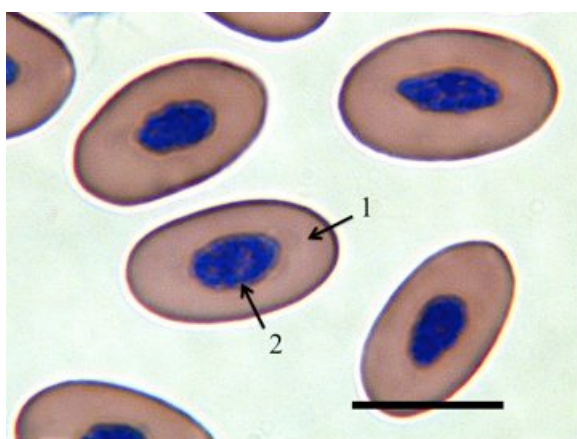


Abbildung 6: Erythrozyten

Strauß 5, weiblich, 14 Monate, May-Grünwald-Färbung, Kernfärbung mit Hämalau, SB: 10 µm

Reife Erythrozyten. Das ziegelfarbene Zytoplasma der Erythrozyten (1) beinhaltet zentral einen ovalen, stark kondensierten mittelblauen Zellkern (2).

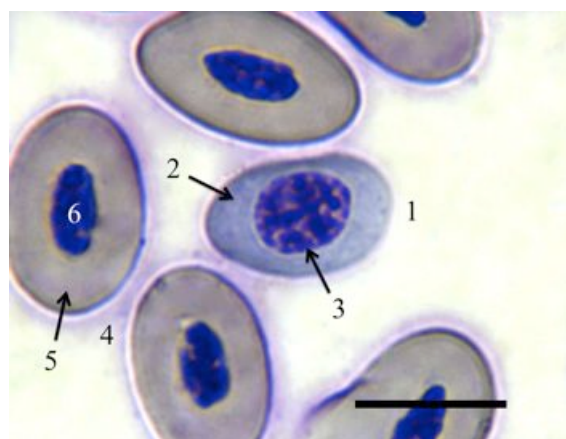


Abbildung 7: Erythrozyten

Strauß 2, männlich, 14 Monate, Pappenheim-Färbung, Kernfärbung mit Hämalau, SB: 10 µm

Polychromatozyt (1). Das Zytoplasma des Polychromatozyten (2) nimmt eine blaue Farbe an, sein noch runder, mäßig geklumpfter Zellkern (3) färbt sich dunkellila.

Reife Erythrozyten (4). Das Zytoplasma der reifen Erythrozyten (5) zeigt eine graurosa Farbe und der ovale stark kondensierte Zellkern (6) ist dunkelblau.

#### 4.2.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten des Straußes stellen sich lichtmikroskopisch als ovale bis runde Zellen dar, die einen zentralen stark kondensierten, ungelappten Zellkern enthalten. Zum Teil weisen die Thrombozyten zytoplasmatische Ausläufer und Granula auf. Bei Fehlen dieser Strukturen ähnelt der aviäre Thrombozyt kleinen Lymphozyten. Die Thrombozyten liegen einzeln, zu zweit oder in Gruppen gelagert vor.

Tabelle 11: Übersichtsfärbung Thrombozyten

Struktur	DQ	Giemsa	MG	PAP
Zytoplasma	graublau	hellblau	hellblau	violett
Zellkern	dunkellila	dunkellila	mittelblau	dunkellila
Granula	dunkellila	dunkellila	lila	dunkellila

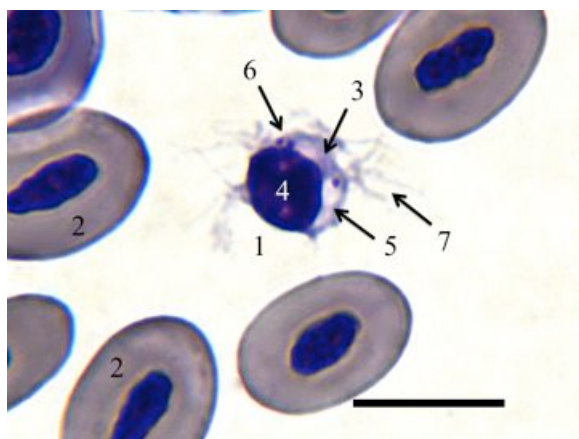


Abbildung 8: Thrombozyt

Strauß 4, männlich, 14 Monate, Diff-Quick-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) befindet sich der Zellkern (4) sowie Vakuolen (5) und Granula (6). Der Thrombozyt weist weiterhin zytoplasmatische Ausläufer auf (7).

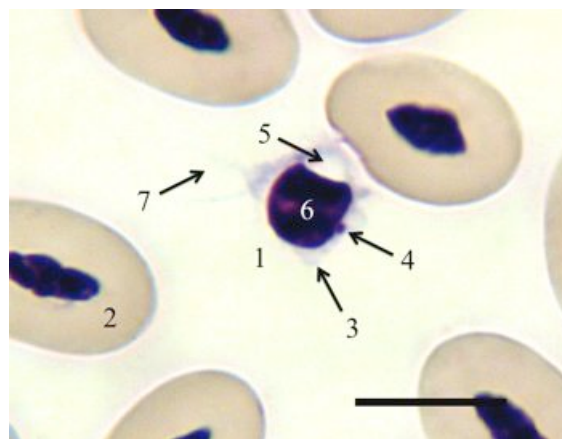


Abbildung 9: Thrombozyt

Strauß 6, weiblich, 14 Monate, Giemsa-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) sind Vakuolen (5) und Granula (4) zu erkennen. Der zentrale Zellkern des Thrombozyten (6) ist stark kondensiert. Zytoplasmatische Ausläufer (7) des Thrombozyten.

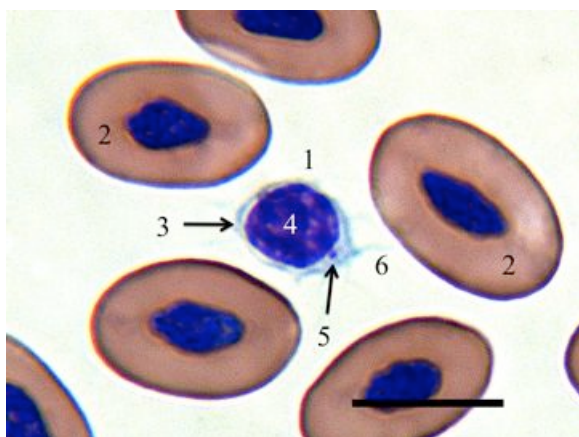


Abbildung 10: Thrombozyt

Strauß 5, weiblich, 14 Monate, May-Grünwald-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Thrombozyten (3) liegt zentral der Zellkern (4) und Granula (5). Zytoplasmatische Ausläufer des Thrombozyten (6).

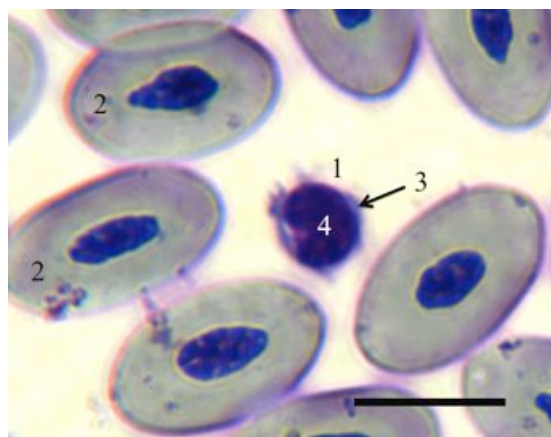


Abbildung 11: Thrombozyt

Strauß 1, weiblich, 14 Monate, Pappenheim-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Thrombozyten (3) liegt zentral ein stark kondensierter Zellkern (4).

Substrathistochemie der Thrombozyten:

Die Thrombozyten zeigen bei der PAS- sowie bei PAS-Färbung mit Amylase-Vorbehandlung ein positives Reaktionsprodukt in ihren zytoplasmatischen Granula.

Tabelle 12: Substrathistochemie der Thrombozyten

Struktur	PAS	PAS mit Amylase-Vorbehandlung
Zytoplasma	blassrosa	blassrosa
Zellkern	mittelblau	mittelblau
Granula	dunkellila	dunkellila
Stärke der Reaktion	+++	+++
Farbe der Reaktion	dunkellila	dunkellila
Lokalisation	granulär	granulär

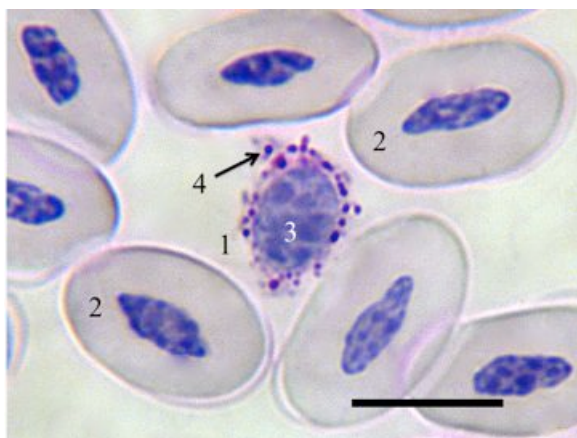


Abbildung 12: Thrombozyt

Strauß 8, männlich, 14 Monate, PAS-Färbung ohne Amylase-Vorbehandlung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Thrombozyten befindet sich zentral der Zellkern (3) und zahlreiche stark PAS-positive Granula (4).

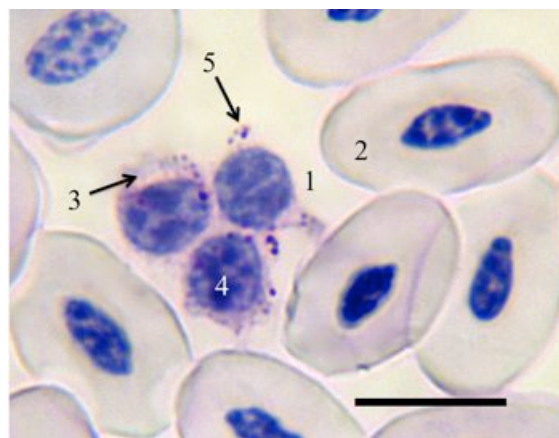


Abbildung 13: Thrombozyten

Strauß 7, weiblich, 14 Monate, PAS-Färbung mit Amylase-Vorbehandlung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Thrombozyten (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Thrombozyten (3) sind ein Zellkern (4) und PAS-positive Granula (5) enthalten.

### 4.2.3 Heterophile Granulozyten

Die heterophilen Granulozyten zeigen sich lichtmikroskopisch als überwiegend runde, zum Teil unregelmäßig geformte Zellen. Das mäßig basophile Zytoplasma wird fast vollkommen von gleichmäßig verteilten eosinophilen spindelförmigen Granula bedeckt. Der meist zwei- mitunter dreifach segmentierte Zellkern färbt sich tief basophil an und enthält stark kondensiertes Chromatin.

Tabelle 13: Übersichtsfärbung heterophile Granulozyten

Struktur	DQ	Giemsa	MG	PAP
Zytoplasma	blassgrau	blassblau	hellblau	hellblau
Kern	lila	lila	mittelblau	lila
Granula	ziegelrot	hellrot	ziegelrot	rotbraun

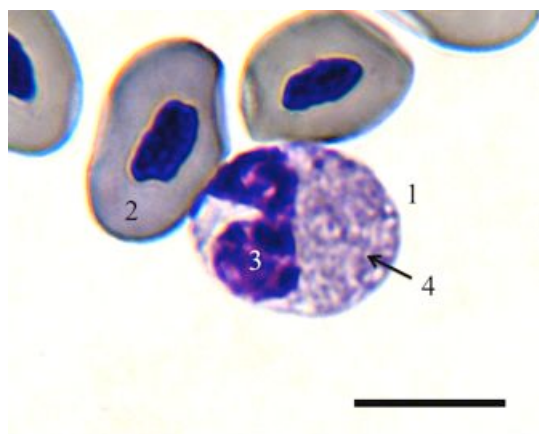


Abbildung 14: Heterophiler Granulozyt

Strauß 4, männlich, 14 Monate, Diff-Quick-Färbung, Kernfärbung mit Hämalan, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des heterophilen Granulozyten liegen zahlreiche ziegelfarbene Granula (4) und ein zweifach segmentierter, tief basophiler Zellkern (3).

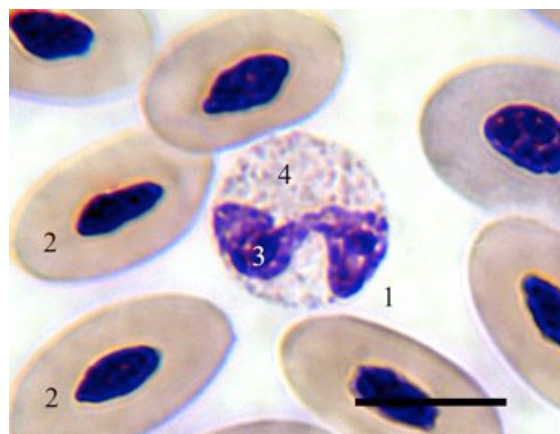


Abbildung 15: Heterophiler Granulozyt

Strauß 1, weiblich, 14 Monate, Giemsa-Färbung, Kernfärbung mit Hämalan, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im blassen Zytoplasma des heterophilen Granulozyten sind hellrote spindelförmige Granula (4) und ein zweifach segmentierter Zellkern (3) enthalten.

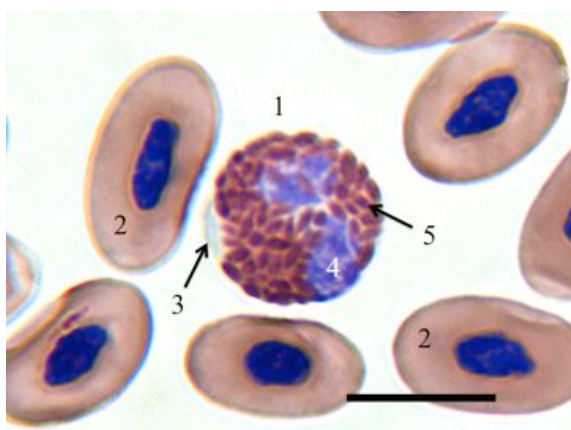


Abbildung 16: Heterophiler Granulozyt

Strauß 5, weiblich, 14 Monate, May-Grünwald-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im hellblauen Zytoplasma des heterophilen Granulozyten (3) liegt ein mittelblauer, segmentierter Zellkern (4) sowie die charakteristisch spindelförmigen Granula (5).



Abbildung 17: Heterophiler Granulozyt

Strauß 8, männlich, 14 Monate, Pappenheim-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das hellblaue Zytoplasma des heterophilen Granulozyten (3) enthält zahlreiche, zum Teil ausgewaschene, rotbraune Granula (5). Die Verbindung des segmentierten Zellkerns (4/4) ist in diesem Präparat nicht zu sehen.

#### Substrathistochemie der heterophilen Granulozyten:

Die Sirius-Red-Färbung dient beim Säugetier zur gezielten Darstellung der eosinophilen Granulozyten. Beim Strauß kann auch eine deutlich positive Reaktion in den Granula der heterophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Bei der PAS-Färbung kann eine diffuse lila Reaktion im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten beobachtet werden. Sie ist meist im Bereich der Zellmembran etwas stärker ausgeprägt. Die Granula reagieren nicht mit dem Farbstoff.

Tabelle 14: Substrathistochemie heterophiler Granulozyten

Struktur	Sirius-Red	PAS
Zytoplasma	hellrosa	lila
Zellkern	rosa	dunkelblau
Granula	pinkrot	blass/ausgewaschen
Stärke der Reaktion	+++	++
Farbe der Reaktion	pinkrot	lila
Lokalisation	granulär	diffus





Abbildung 18: Heterophiler Granulozyt

Strauß 7, weiblich, 14 Monate, Sirius-Red-Färbung, Kernfärbung mit Kernechtrot, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1), Thrombozyt (2) und Erythrozyten (3). Die typisch spindelförmigen Granula des heterophilen Granulozyten (5) reagieren deutlich positiv mit dem pinkroten Farbstoff. Zweifach segmentierter Zellkern (4).

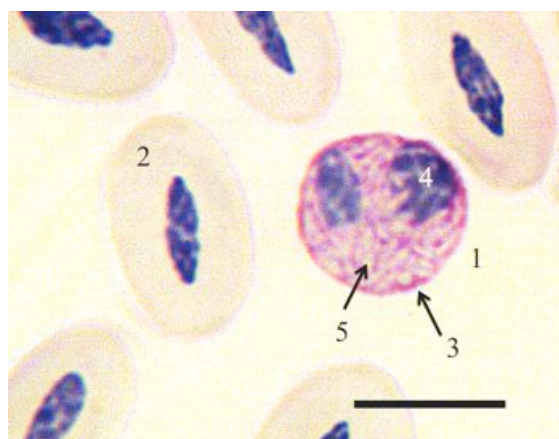


Abbildung 19: Heterophiler Granulozyt

Strauß 18, weiblich, 14 Monate, PAS-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) ist diffus eine deutlich positive Reaktion zu erkennen. Der segmentierte Zellkern des heterophilen Granulozyten (4) färbt sich tief basophil. Die zytoplasmatischen Granula (5) zeigen keine Reaktion bei der PAS-Färbung.

#### 4.2.4 Eosinophile Granulozyten

##### Übersichtsfärbungen: Eosinophile Granulozyten:

Die eosinophilen Granulozyten zeigen sich unter dem Lichtmikroskop als überwiegend runde, zum Teil unregelmäßig geformte Zellen. Das blassere, leicht basophile Zytoplasma sowie der meist zweifach segmentierte, tief basophile Nukleus sind größtenteils von den spezifischen runden Granula bedeckt. Diese treten zahlreich auf und färben sich stark eosinophil an.

Tabelle 15: Übersichtsfärbungen eosinophile Granulozyten

Struktur	DQ	Giensa	MG	PAP
Zytoplasma	graublau	hellblau	hellblau	hellgrau
Kern	dunkellila	dunkellila	mittelblau	lila
Granula	rot	rosarot	dunkelrot	ziegelrot

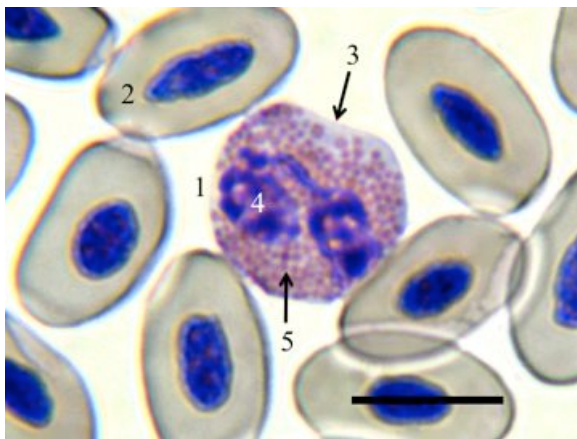


Abbildung 20: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 1, weiblich, 14 Monate, Diff-Quick-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im graublauen Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (3) liegen ein zweifach segmentierter Zellkern (4) und zahlreiche charakteristisch runde eosinophile Granula (5).

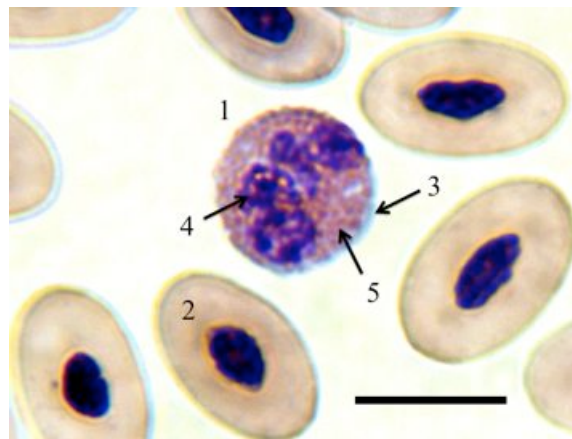


Abbildung 21: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 5, weiblich, 14 Monate, Giemsa-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im hellblauen Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (3) sind zentral ein basophiler Zellkern (4) und zahlreiche rosarote runde Granula (5) enthalten.



Abbildung 22: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 5, weiblich, 14 Monate, May-Grünwald-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im hellblauen Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (4) liegt ein mittelblau gefärbter segmentierter Zellkern (3) und typisch runde, dunkelrot angefärbte Granula (5).

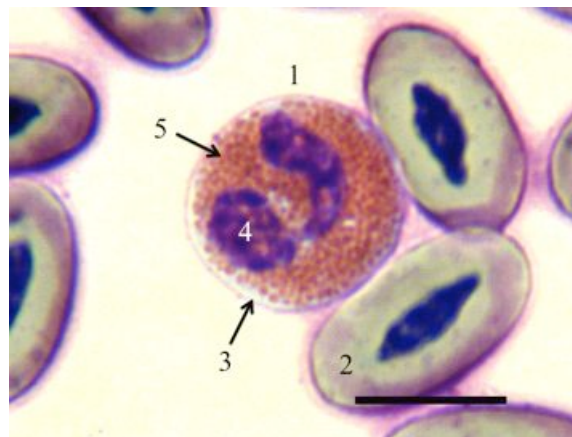


Abbildung 23: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 3, weiblich, 14 Monate, Pappenheim-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im hellgrauen Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (3) liegt ein zweifach segmentierter lila Zellkern (4) und zahlreiche charakteristisch runde, eosinophile Granula (5).

Substrathistochemische Färbungen: Eosinophile Granulozyten:

Bei der Sirius-Red-Färbung zeigen die eosinophilen Granulozyten des Straußes eine stark positive Reaktion in den spezifischen Granula. Bei der PAS-Färbung kommt es zu einem diffusen lila Niederschlag im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten. Die Reaktion ist im Bereich unterhalb der Zellmembran am deutlichsten zu sehen.

Tabelle 16: Substrathistochemische Färbungen: Eosinophile Granulozyten

Struktur	Sirius-Red	PAS
Zytoplasma	hellgrau	lila
Zellkern	mittelblau	mittelblau
Granula	rot	hell, ausgewaschen
Stärke der Reaktion	+++	++
Farbe der Reaktion	rot	lila
Lokalisation	granulär	diffus

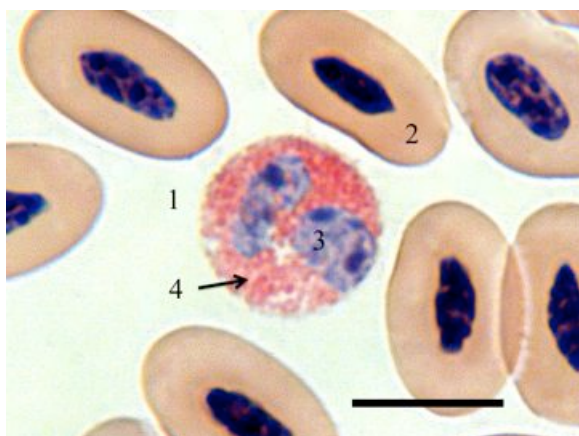


Abbildung 24: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, Sirius-Red-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im hellgrauen Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten befinden sich ein zweifach segmentierter basophiler Zellkern (3) und zahlreiche runde, rot gefärbte Granula (4).

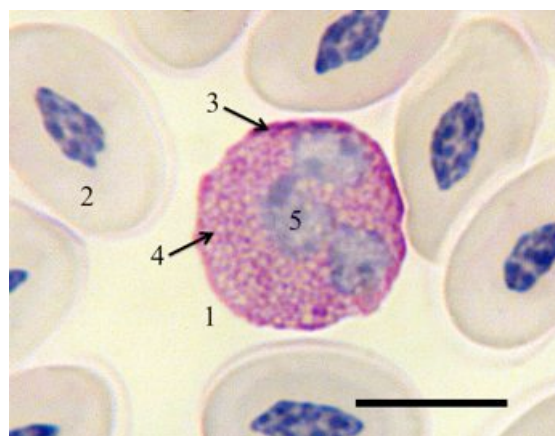


Abbildung 25: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 18, weiblich, 14 Monate, PAS-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm)

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Es ist eine deutlich positive Reaktion im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (3) zu sehen. Diese hat einen diffusen Charakter und ist im Bereich unter der Membran stärker ausgeprägt als zentral der Zelle. Die Granula (4) sind negativ.

#### 4.2.5 Basophile Granulozyten

##### Übersichtsfärbungen: Basophile Granulozyten:

Die basophilen Granulozyten zeigen sich unter dem Lichtmikroskop als überwiegend runde Zellen. Das schwach basophile Zytoplasma ist mit zahlreichen runden, tief basophilen Granula gefüllt, welche bei einem Großteil der basophilen Granulozyten durch die verschiedenen Schritte des Färbeprozesses ausgewaschen sind. Zurück bleiben relativ große helle Vakuolen. Der basophile unsegmentierte ovale Zellkern liegt meist exzentrisch im Zytoplasma. Zum Teil ist er von den zytoplasmatischen Granula bedeckt.

Tabelle 17: Übersichtsfärbungen basophile Granulozyten

Struktur	DQ	Giemsa	MG	PAP
Zytoplasma	blaugrau	lila	hellblau	mittelblau
Kern	dunkelblau	dunkellila	mittelblau	lila
Granula	hell, ausgewaschen	hell, ausgewaschen	dunkelblau	hell, ausgewaschen

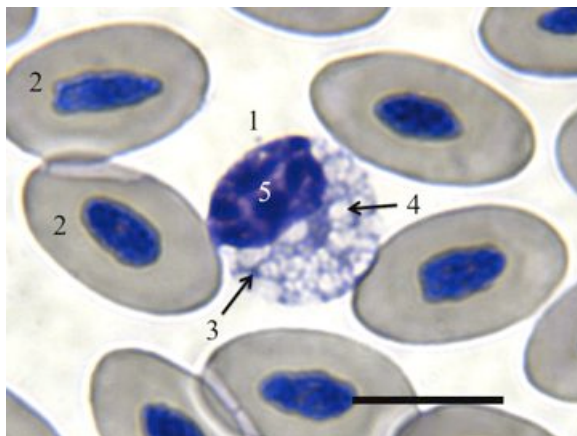


Abbildung 26: Basophiler Granulozyt

Strauß 1, weiblich, 14 Monate, Diff-Quick-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im grau-blau gefärbten Zytoplasma des basophilen Granulozyten (3) befinden sich zahlreiche helle Vakuolen (4) und ein exzentrisch gelagerter, dunkelblau gefärbter Zellkern (5)



Abbildung 27: Basophiler Granulozyt

Strauß 18, weiblich, 14 Monate, Giemsa-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im lila gefärbten Zytoplasma des basophilen Granulozyten (3) sind große helle Vakuolen (4) und ein ovaler, tief basophiler, exzentrisch gelagerter Zellkern (5) zu erkennen.

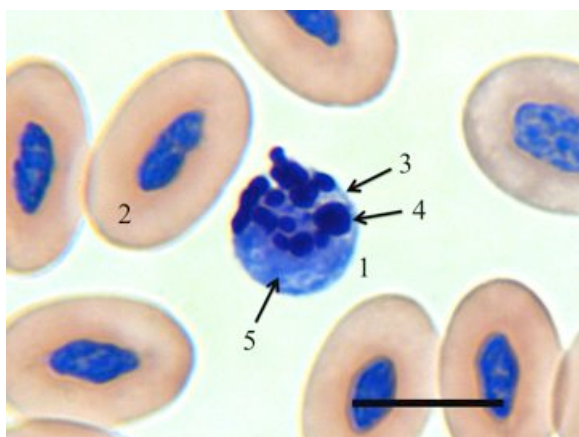


Abbildung 28: Basophiler Granulozyt

Strauß 6, weiblich, 14 Monate, May-Grünwald-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im hellblauen Zytoplasma (3) des basophilen Granulozyten sind gut sichtbar dunkelblau angefärbte Granula (4) und ein schwach kondensierter, unsegmentierter Zellkern (5) zu erkennen.

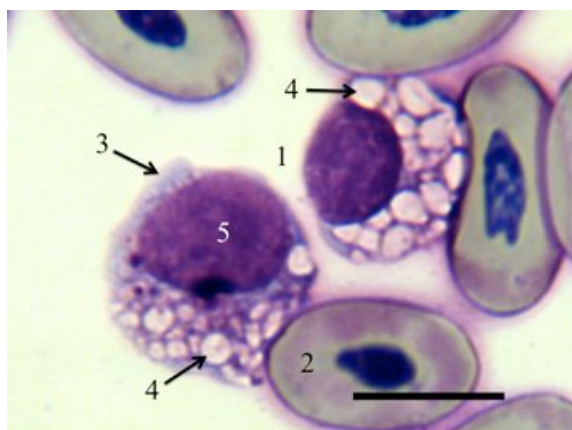


Abbildung 29: Basophiler Granulozyt

Strauß 8, männlich, 14 Monate, Pappenheim-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Basophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Im mittelblau angefärbten Zytoplasma der basophilen Granulozyten (3) sind zahlreiche helle Vakuolen (4) und ein exzentrisch gelegener, basophiler Zellkern (5) zu sehen.

#### Substrahistochemische Färbungen: Basophile Granulozyten:

Bei der PAS-Färbung färbt sich das Zytoplasma schwach lila an. Die Granula können bei dieser Färbung nicht angefärbt werden, da sie bei dem Färbeprozess ausgewaschen werden. Bei der PAS-Färbung mit vorangegangener Amylasebehandlung kann keine Reaktion des Zytoplasmas festgestellt werden. Bei der Toluidinblau-Färbung färben sich die Granula der basophilen Granulozyten tief dunkellila an. Die übrigen Zellelemente nehmen verschiedene Blautöne an. Bei der Alcianblau-Färbung mit einem pH-Wert von 1,0 kommt es im Bereich der Granula zu einem deutlich sichtbaren hellblauen Farbniederschlag. Beim Färbeprozess mit einem pH-Wert von 2,5 färben sich die Granula intensiver an. Zur besseren Abgrenzung und Identifizierung der Zellen wurde mit Kernechtrot gegengefärbt.

Tabelle 18: Substrathistochemische Färbungen: Basophile Granulozyten

Struktur	PAS	Toluidinblau	Alcianblau pH:1,0	Alcianblau pH:2,5
Zytoplasma	lila	blau	weiß	weiß
Zellkern	blau	hellblau	rosa	rosa
Granula	weiß	dunkellila	hellblau	blau
Stärke der Reaktion	+	+++	++	+++
Farbe der Reaktion	lila	dunkellila	hellblau	blau
Lokalisation	diffus	granulär	großflächig granulär	großflächig granulär

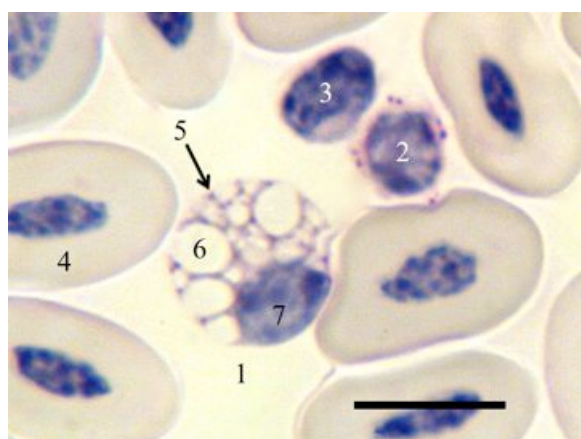


Abbildung 30: Basophiler Granulozyt

Strauß 18, weiblich, 14 Monate, PAS-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1), Thrombozyt (2), Lymphozyt (3) und Erythrozyten (4). Im Zytoplasma des basophilen Granulozyten (5) ist ein schwacher diffuser Farbniederschlag zu erkennen. Die Granula sind ausgewaschen und hinterlassen helle Vakuolen unterschiedlicher Größe (6). Exzentrisch gelagerter unsegmentierter basophiler Zellkern (7).

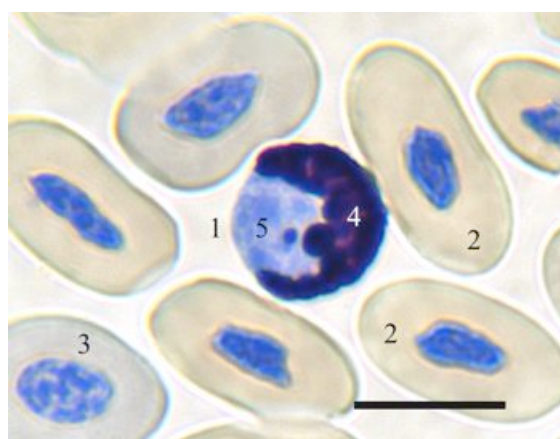


Abbildung 31: Basophiler Granulozyt

Strauß 10, weiblich, 14 Monate, Toluidinblau-Färbung, Kernfärbung mit Toluidinblau, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1), Erythrozyten (2) und Polychromatozyt (3). Die Granula des basophilen Granulozyten (4) sind tief dunkellila angefärbt. Der exzentrisch gelagerte, blau gefärbte Zellkern (5) ist teilweise von den zytoplasmatischen Granula bedeckt.

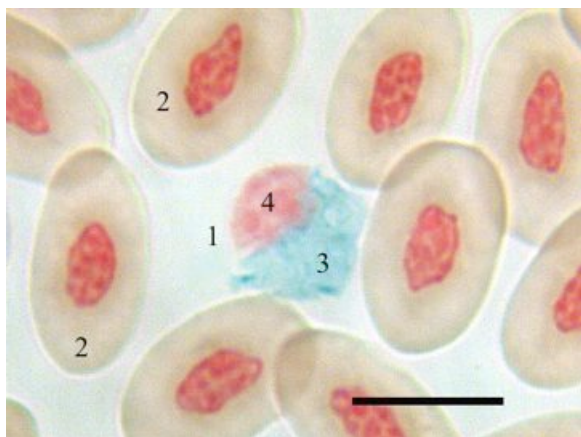


Abbildung 32: Basophiler Granulozyt

Strauß 28, weiblich, 14 Monate, Alcianblau-Färbung, (pH:1), Kernfärbung mit Kernechtrot, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula des basophilen Granulozyten (3) reagieren schwach bis deutlich positiv. Exzentrisch gelagerter, unsegmentierter Zellkern (4).

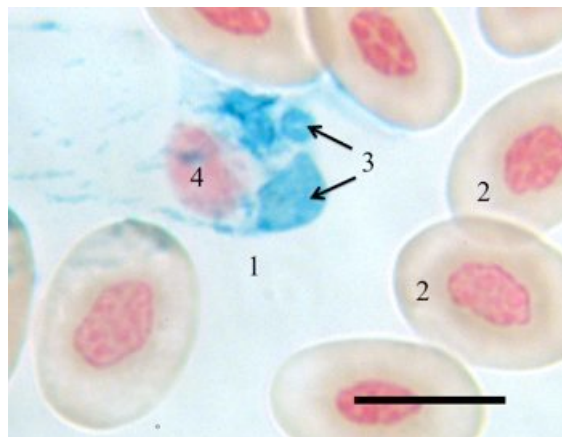


Abbildung 33: Basophiler Granulozyt

Strauß 28, weiblich, 14 Monate, Alcianblau-Färbung, (pH:2,5) Kernfärbung mit Kernechtrot, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula des basophilen Granulozyten weisen eine starke Reaktion auf (3). Rosa gefärbter unsegmentierter, exzentrisch gelegener Zellkern (4).

Anhand folgender Bilderreihe kann deutlich gemacht werden, wie sich die basophilen Granulozyten mit unversehrten Granula, teilweise ausgewaschenen und schließlich gänzlich ausgelösten Granula beziehungsweise verbliebenen Vakuolen darstellen:

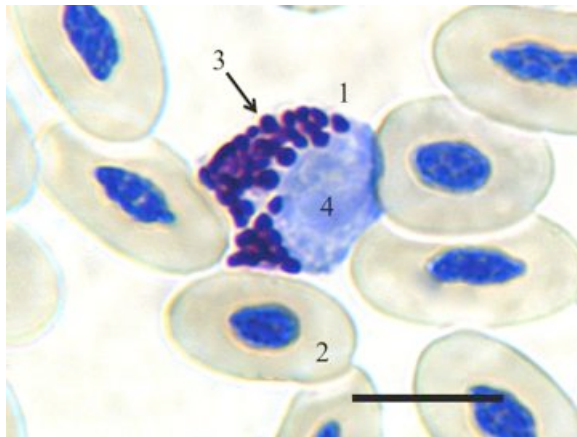


Abbildung 34: Basophiler Granulozyt

Strauß 9, männlich, 14 Monate, Toluidinblau-Färbung, Kernfärbung mit Toluidinblau, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des basophilen Granulozyten sind zahlreiche tief basophile runde Granula (3) zu erkennen. Exzentrisch gelagerter unsegmentierter Zellkern (4) mit schwach kondensiertem Chromatin.

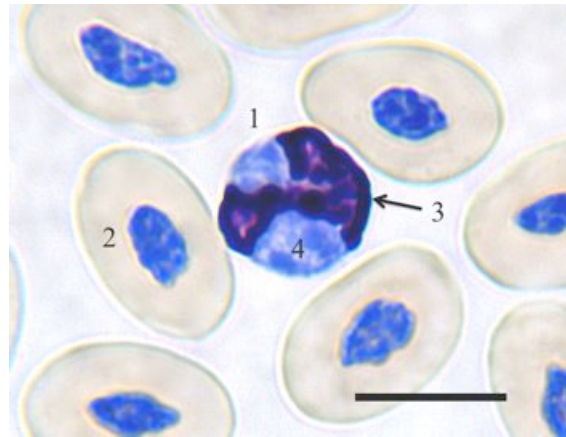


Abbildung 35: Basophiler Granulozyt

Strauß 13, weiblich, 14 Monate, Toluidinblau-Färbung, Kernfärbung mit Toluidinblau, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die stark gefärbten zahlreichen charakteristischen basophilen Granula (3) des basophilen Granulozyten überdecken teilweise den schwach kondensierten Zellkern (4).

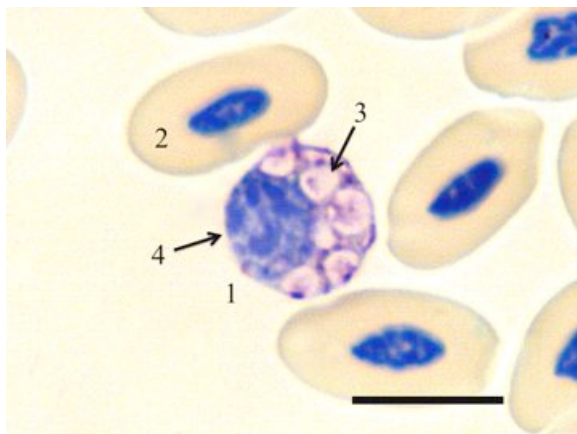


Abbildung 36: Basophiler Granulozyt

Strauß 8, männlich, 14 Monate, Toluidinblau-Färbung, Kernfärbung mit Toluidinblau, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Hier ist bereits eine teilweise Degranulation bzw. Auswaschung der Granula (3) zu sehen. Sie weisen ein vergleichsweise großes Volumen auf. Unsegmentierter, exzentrisch gelegener Zellkern (4) mit schwach kondensiertem Chromatin.

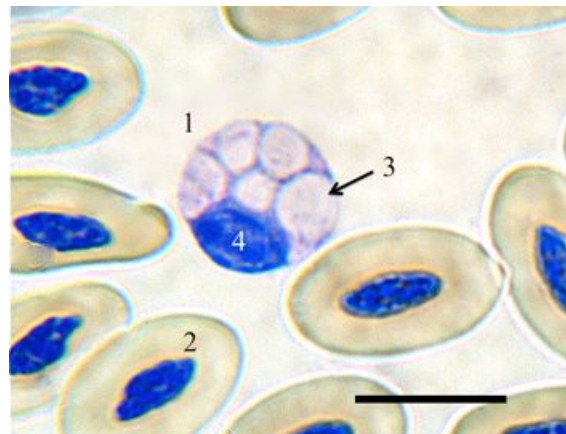


Abbildung 37: Basophiler Granulozyt

Strauß 8, männlich, 14 Monate, Toluidinblau-Färbung, Kernfärbung mit Toluidinblau, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula sind hier vollständig degranuliert bzw. ausgewaschen und hinterlassen große helle Vakuolen (3). Exzentrisch gelegener, basophiler Zellkern des basophilen Granulozyten (4).



#### 4.2.6 Lymphozyten

##### Übersichtsfärbungen: Lymphozyten:

Es werden überwiegend kleine Lymphozyten im Blutbild des Straußes gefunden. Sie haben zum Großteil eine gleichmäßig runde Form mit teilweise auftretenden kleinen zytoplasmatischen Ausläufern. Der charakteristische, meist einseitige Zytoplasmasaum färbt sich schwach basophil an und enthält teilweise sichtbare feine zytoplasmatische Granula, die sich im gleichen Farbton wie das Zytoplasma anfärben. Der basophile unsegmentierte Zellkern enthält schwach bis stark kondensiertes Chromatin und liegt überwiegend exzentrisch in der Zelle.

Tabelle 19: Übersichtsfärbungen Lymphozyten

Struktur	DQ	Giensa	MG	PAP
Zytoplasma	violett	blau	blau	violett
Kern	dunkellila	lila	violettblau	dunkellila
Granula	violett	blau	blau	violett

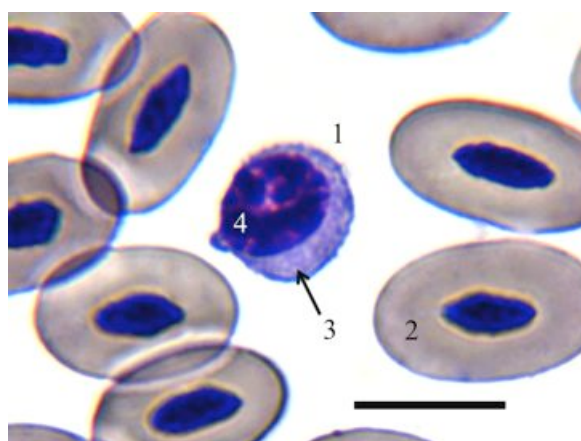


Abbildung 38: Kleiner Lymphozyt

Strauß 2, männlich, 14 Monate, Diff-Quick-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Der Zytoplasmasaum des Lymphozyten (3) färbt sich violett an. Der ovale basophile Zellkern (4) besitzt kondensiertes Chromatin.

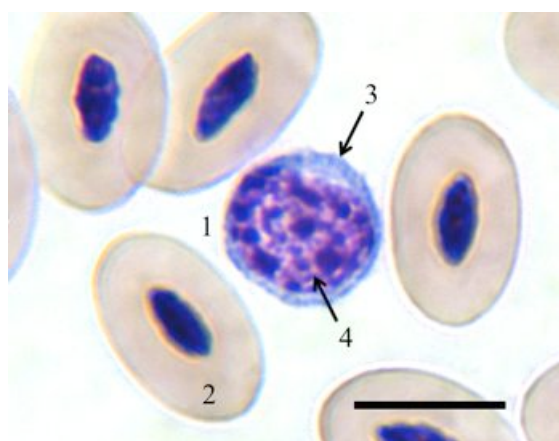


Abbildung 39: Mittelgroßer Lymphozyt

Strauß 6, weiblich, 14 Monate, Giemsa-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Mittelgroßer Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des Lymphozyten (3) färbt sich mittelblau und der zentral gelagerte Zellkern (4) färbt sich unregelmäßig lila an.

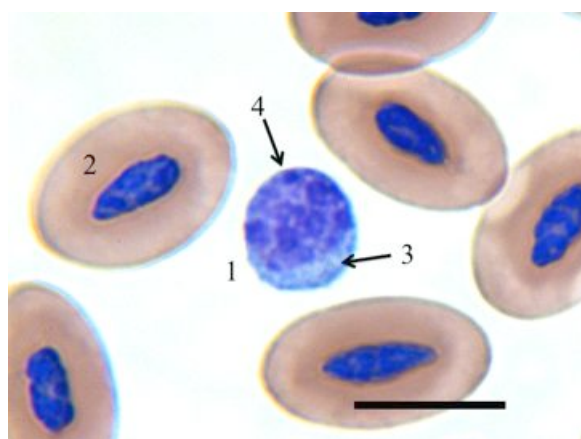


Abbildung 40: Kleiner Lymphozyt

Strauß 4, männlich, 14 Monate, May-Grünwald-Färbung, Kernfärbung mit Hämalan, SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Der charakteristische Zytoplasmasaum des Lymphozyten (3) färbt sich mittelblau an. Der unsegmentierte Zellkern (4) besitzt locker strukturiertes Chromatin und färbt sich violettblau an.

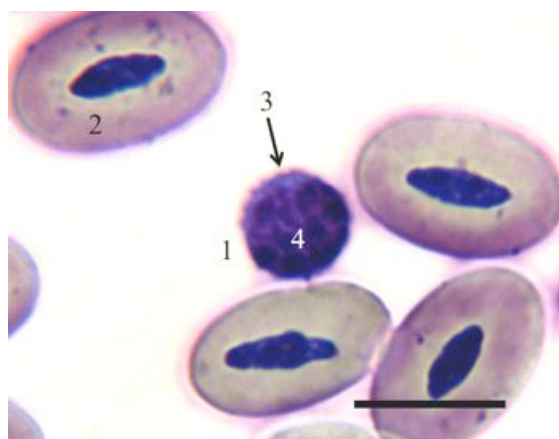


Abbildung 41: Kleiner Lymphozyt

Strauß 2, männlich, 14 Monate, Pappenheim-Färbung, Kernfärbung mit Hämalan, SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Der Zytoplasmasaum des Lymphozyten (3) färbt sich violett an. Der zentral gelegene, basophile Zellkern (4) nimmt fast das ganze Volumen der Zelle ein.

Substrathistochemische Färbungen: Lymphozyten:

Sowohl in der PAS-Färbung, wie auch in der PAS-Färbung mit Amylasevorbehandlung, kann im Zytoplasma der Lymphozyten eine schwach positive Reaktion festgestellt werden. Der lila Farbniederschlag ist diffus im Zytoplasma verteilt. Waren die feinen zytoplasmatischen Granula sichtbar, so färben sich diese im gleichen Farbton. Bei beiden Färbeansätzen wurden auch Lymphozyten gesehen, die keine Reaktion aufweisen.

Tabelle 20: Substrathistochemische Färbungen: Lymphozyten

Struktur	PAS	PAS mit Amylasevorbehandlung
Zytoplasma	lila	lila
Zellkern	dunkelblau	dunkelblau
Granula	lila	lila
Stärke der Reaktion	+	+
Farbe der Reaktion	lila	lila
Lokalisation	diffus/granulär	diffus/granulär

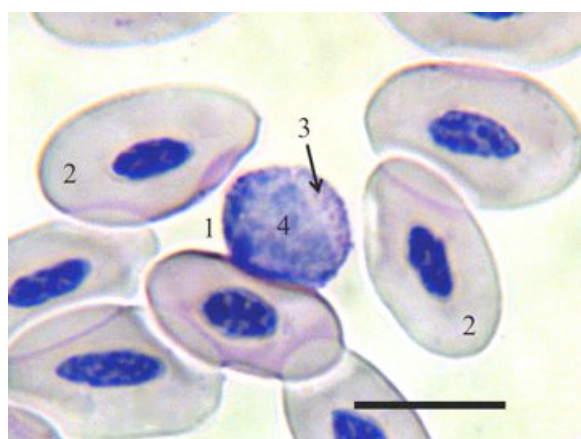


Abbildung 42: Kleiner Lymphozyt

Strauß 9, männlich, 14 Monate, PAS-Färbung ohne Amylase-Vorbehandlung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasmasaum des Lymphozyten (3) sind diffus und granulär schwach positive Reaktionen sichtbar. Unsegmentierter exzentrisch gelegener Zellkern (4).

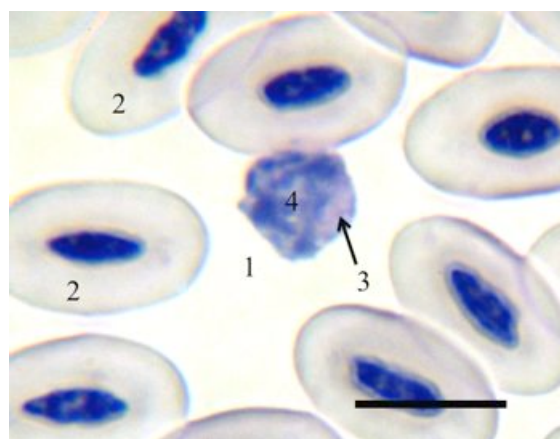


Abbildung 43: Kleiner Lymphozyt

Strauß 9, männlich, 14 Monate, PAS-Färbung mit Amylase-Vorbehandlung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des Lymphozyten (3) ist lila gefärbt und zeigt eine diffus verteilte, schwach positive Reaktion. Exzentrisch lokalisierter Zellkern (4).

#### 4.2.7 Monozyten

##### Übersichtsfärbungen: Monozyten:

Die Monozyten des Straußes weisen lichtmikroskopisch überwiegend eine unregelmäßige Form auf. Mit einer Größe bis zu 17 µm stellen sie die größten Blutzellen dar. Das reichliche Zytoplasma färbt sich in verschiedenen Blautönen an und enthält teilweise feine zytoplasmatische Granula und helle Vakuolen bis zu 1 µm Durchmesser. Der unsegmentierte, ovale bis bohnenförmige Zellkern liegt häufig exzentrisch in der Zelle und besitzt locker kondensiertes Chromatin, welches sich blau bis lila anfärben läßt.

Tabelle 21: Übersichtsfärbungen Monozyten

Struktur	DQ	Giemsa	MG	PAP
Zytoplasma	dunkelblau	blau	blau	graublau
Kern	dunkellila	dunkelblau	violettblau	lila
Granula	dunkelblau	blau	blau	graublau

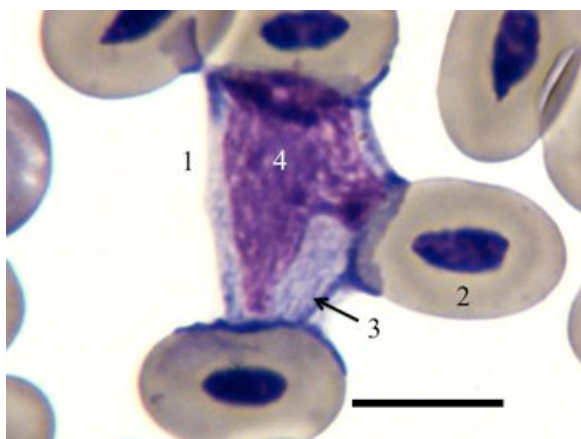


Abbildung 44: Monozyt

Strauß 3, weiblich, 14 Monate, Diff-Quick-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des Monozyten (3) färbt sich dunkelblau an. Der typisch einseitig eingekerbte Zellkern (4) enthält schwach kondensiertes Chromatin.

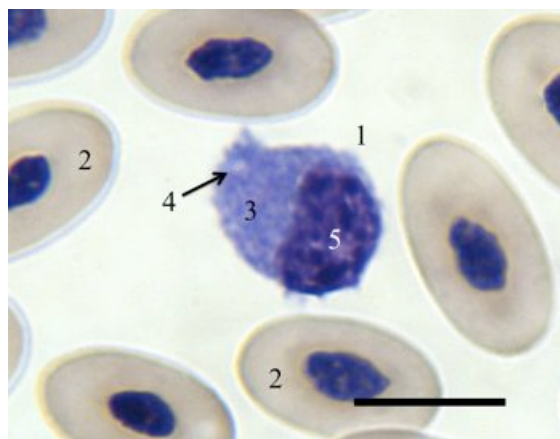


Abbildung 45: Monozyt

Strauß 5, weiblich, 14 Monate, Giemsa-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im basophilen Zytoplasma des Monozyten (3) sind Vakuolen (4) und ein charakteristisch bohnenförmiger Zellkern (5) enthalten.

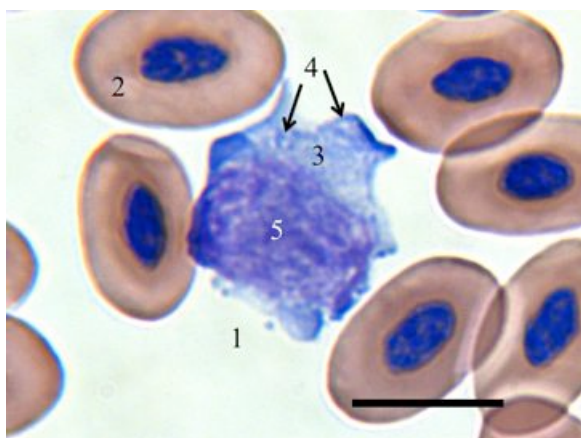


Abbildung: 46: Monozyt

Strauß 5, weiblich, 14 Monate, May-Grünwald-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Das blau gefärbte Zytoplasma des Monozyten (3) enthält zahlreiche kleine helle Vakuolen (4) und einen ovalen Zellkern (5) mit locker strukturiertem Chromatin.

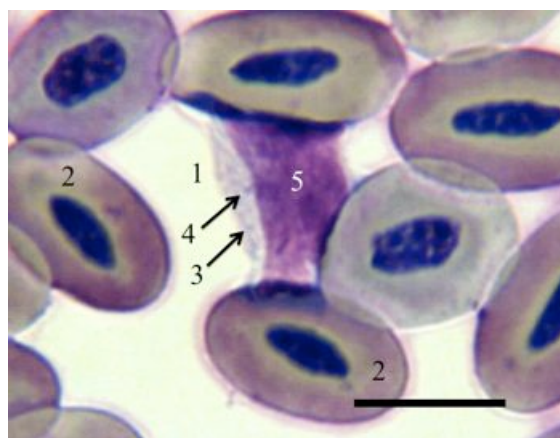


Abbildung 47: Monozyt

Strauß 2, männlich, 14 Monate, Pappenheim-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Das graublau gefärbte Zytoplasma des Monozyten (3) enthält feine zytoplasmatische Granula (4) und einen unsegmentierten, lila gefärbten Zellkern (5).

Substrathistochemische Färbungen: Monozyten:

Die Monozyten zeigen bei der PAS-Färbung einen schwach sichtbaren, lilafarbenen diffusen Farbniederschlag in ihrem Zytoplasma. Auch bei der PAS-Färbung mit Amylasevorbehandlung bleibt im Zytoplasma eine diffuse schwache Reaktion zu erkennen. Die Monozyten enthalten also keine nennenswerte Menge an Glykogen.

Tabelle 22: Substrathistochemische Färbungen: Monozyten

Struktur	PAS	PAS mit Amylasevorbehandlung
Zytoplasma	lila	lila
Zellkern	blau	blau
Granula	lila	lila
Stärke der Reaktion	+	+
Farbe der Reaktion	lila	lila
Lokalisation	diffus	diffus

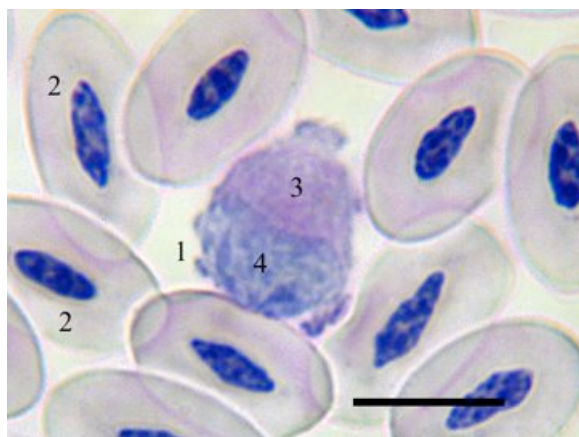


Abbildung 48: Monozyt

Strauß 9, männlich, 14 Monate, PAS-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Monozyten (3) ist ein diffuser lila Farbniederschlag zu erkennen. Der typisch bohnenförmige Zellkern (4) des Monozyten enthält relativ locker strukturiertes Chromatin.

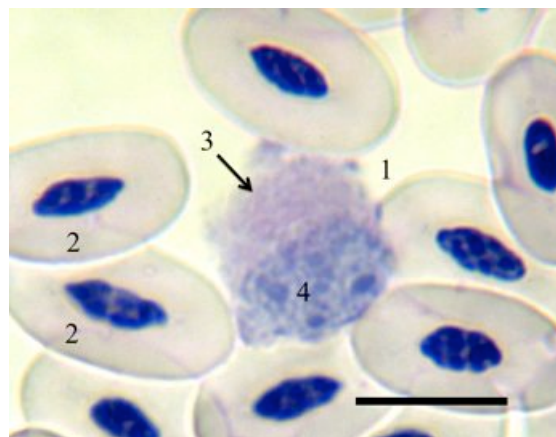


Abbildung 49: Monozyt

Strauß 9, männlich, 14 Monate, PAS-Färbung mit Amylasevorbehandlung. Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Monozyten (3) ist ein diffuses lila Reaktionsprodukt zu sehen. Der charakteristisch bohnenförmiger Zellkern (4) enthält locker strukturiertes Chromatin.

### 3.4 Enzymhistochemie

#### 3.4.1 Erythrozyten

Bei den enzymhistochemischen Nachweisen kann nur bei der unspezifischen Naphthol-AS-Acetat-Esterase eine positive Reaktion festgestellt werden. Im Zytoplasma der Erythrozyten kommt es zu einem deutlich sichtbaren blau-granulärem Farbniederschlag. Zur besseren Identifizierung der Zelle und stärkerem Kontrast zum Reaktionsprodukt wurde mit Kernechtrot gegengefärbt.

Tabelle 23: Enzymfärbungen Erythrozyten

Enzymnachweis	Naphthol-AS-Acetat-Esterase
Särke der Reaktion	++
Farbe	blau
Lokalisation	granulär

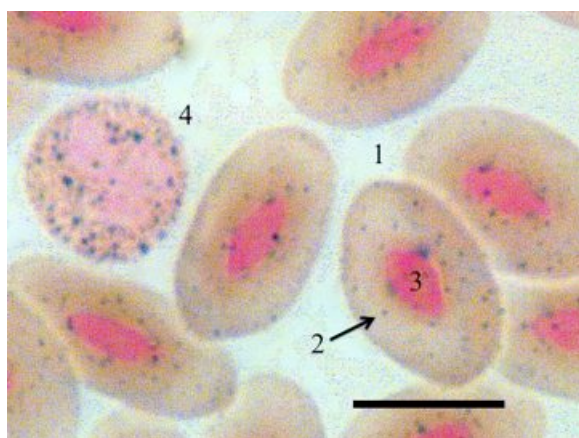


Abbildung 50: Erythrozyten, Eosinophiler Granulozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung, Kernfärbung mit Kernechtrot, SB:10 µm

Im Zytoplasma der Erythrozyten (1) sind zahlreiche blaue granuläre Reaktionsprodukte zu sehen. Ovaler unsegmentierter Zellkern der Erythrozyten (3); Eosinophiler Granulozyt (4).

### 4.3.2 Thrombozyten

Bei den Thrombozyten des Straußes kann eine Aktivität der sauren Phosphatase granulär sowie diffus im Zytoplasma verteilt festgestellt werden. Ebenso zeigt der enzymhistochemische Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase eine positive blau-granuläre Reaktion. Die  $\beta$ -Glukuronidase läßt sich diffus im Zytoplasma der Thrombozyten mit einem rotbrauner Niederschlag nachweisen.

Tabelle 24: Enzymfärbungen Thrombozyten

Enzymnachweis	Saure Phosphatase	Naphthol-AS-Acetat-Esterase	$\beta$ -Glukuronidase
Reaktion	positiv	positiv	positiv
Farbe	rot	blau	rotbraun
Lokalisation	Granulär/diffus	granulär	diffus



Abbildung 51: Thrombozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, Saure Phosphatase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalan, SB: 10 $\mu$ m

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma fällt granulär (3) ein rotes Reaktionsprodukt aus. Ebenso ist eine diffuse Reaktion im Zytoplasma zu erkennen (4). Zellkern (5).

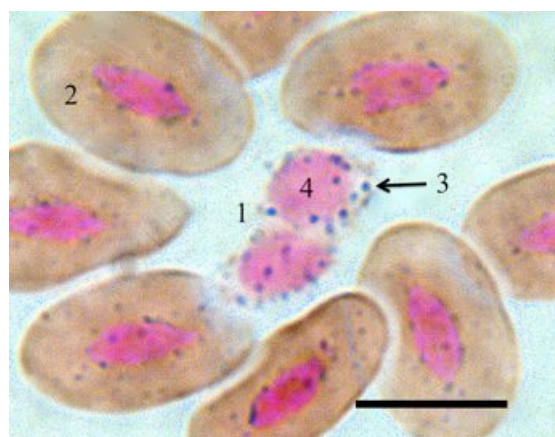


Abbildung 52: Thrombozyten

Strauß 27, männlich, 14 Monate, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung, Kernfärbung mit Kernechtrot, SB: 10 $\mu$ m

Thrombozyten (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma sind zahlreiche blaue granuläre Reaktionsprodukte zu erkennen. Zellkern (4).

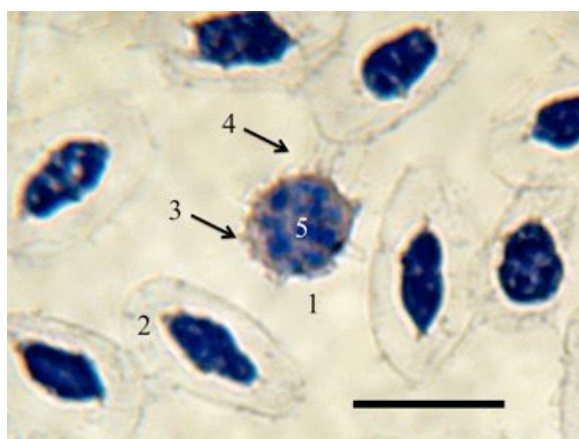


Abbildung 53: Thrombozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate,  $\beta$ -Glukuronidase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10  $\mu$ m

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Thrombozyten ist diffus ein rotbrauner Niederschlag zu sehen. Zytoplasmatische Ausläufer (4); Zellkern (5).

### 4.3.3 Heterophile Granulozyten

Die heterophilen Granulozyten reagieren auf den Nachweis der alkalischen Phosphatase mit einem granulärem schwarzbraunem Reaktionsprodukt, welches gleichmäßig im Zytoplasma verteilt ist. Beim Färbeprozess zum Nachweis der sauren Phosphatase wurden die zytoplasmatischen Granula restlos ausgewaschen und somit ist ein sicherer Nachweis hier nicht möglich. Die  $\beta$ -Glukuronidase kann beim Strauß sowohl diffus als auch granulär als rotbrauner Niederschlag im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die unspezifische Esterase Naphthol-AS-Acetat-Esterase zeigt sich als blaues granuläres Reaktionsprodukt im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten des Straußes.

Tabelle 25: Enzymfärbungen heterophile Granulozyten

Enzymnachweis	Alkalische Phosphatase	Saure Phosphatase	$\beta$ -Glukuronidase	Naphthol-AS-Acetat-Esterase	Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase
<b>Stärke der Reaktion</b>	+++	-	++	++	++
<b>Farbe</b>	schwarzbraun	-	rotbraun	blau	blau
<b>Lokalisation</b>	granulär	-	granulär/diffus	granulär	granulär



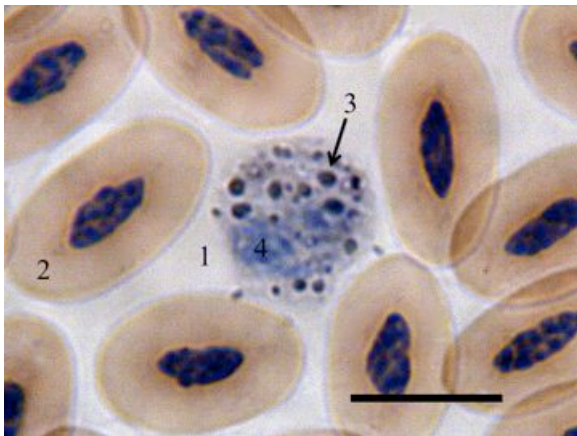


Abbildung 54: Heterophiler Granulozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, Alkalische Phosphatase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma zeigt sich eine deutliche schwarzbraune Reaktion (3) von granulären Charakter. Zellkern (4).

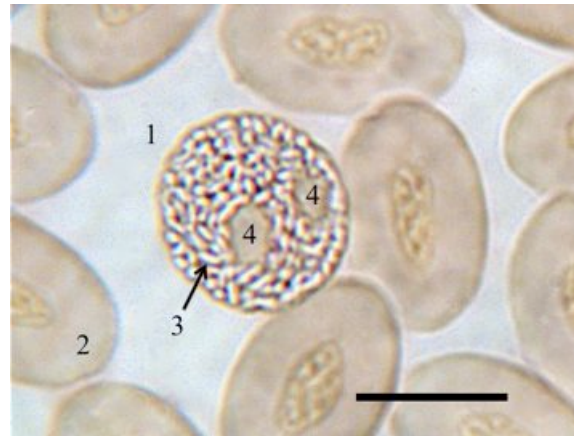


Abbildung 55: Heterophiler Granulozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, Saure Phosphatase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die spindelförmigen Granula (3) sind bei der Färbung restlos ausgewaschen. Die Verbindung des segmentierten Zellkern (4/4) ist nicht im Fokus.

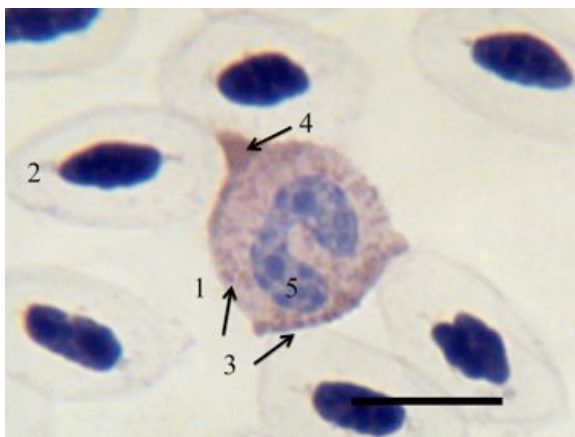


Abbildung 56: Heterophiler Granulozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate,  $\beta$ -Glukuronidase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Es ist sowohl granulär (3) als auch diffus (4) ein rotbrauner Niederschlag zu sehen. Zweifach gelappter Zellkern (5).

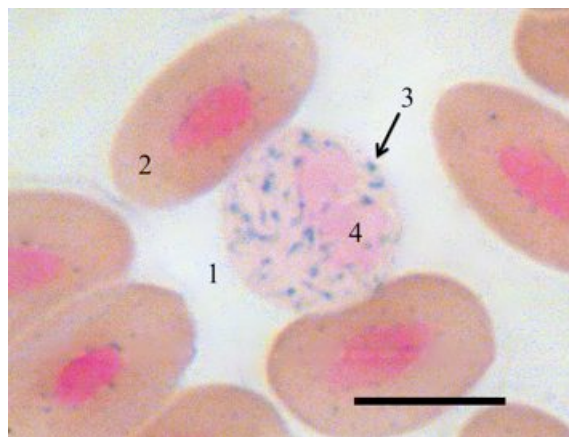


Abbildung 57: Heterophiler Granulozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, Naphthol-AS-Acetat-Esterase, Kernfärbung mit Kernechtrot, SB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). In der Zelle sind zahlreiche blaue granuläre Reaktionsprodukte (3) zu erkennen. Zellkern (4).

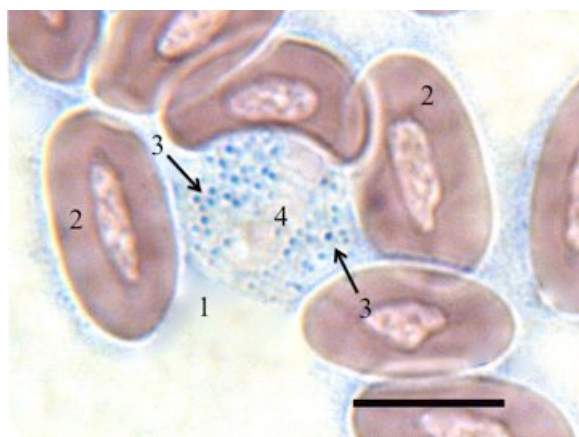


Abbildung 58: Heterophiler Granulozyt

Strauß 21, 14 Monate, Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10  $\mu$ m

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des heterophilen Granulozyten sind deutlich positive Reaktionen zu erkennen. Die Reaktionsprodukte sind blau und haben ein granuläres Erscheinungsbild (3). Zellkern (4).

#### 4.3.4 Eosinophile Granulozyten

Die Granula der eosinophilen Granulozyten färben sich beim Nachweis auf Peroxidase intensiv schwarzbraun an. Bei dem enzymhistochemischen Nachweis für saure Phosphatase kommt es zu stark positiven roten Reaktionen. Diese kommen sowohl diffus als auch granulär im Zytoplasma vor. Die  $\beta$ -Glukuronidase kann anhand eines rotbraunen Niederschlags diffus sowie granulär im Zytoplasma festgestellt werden. Die Naphthol-AS-Acetat-Esterase aus der Gruppe der unspezifischen Esterasen konnte durch ein blaues granuläres Reaktionsprodukt im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten des Straußes nachgewiesen werden.

Tabelle 26: Enzymfärbungen eosinophile Granulozyten

Enzymnachweis	Peroxidase	Saure Phosphatase	$\beta$ -Glukuronidase	Naphthol-AS-Acetat-Esterase
<b>Stärke der Reaktion</b>	+++	+++	++	+++
<b>Farbe</b>	schwarzbraun	rot	rotbraun	blau
<b>Lokalisation</b>	granulär	granulär/diffus	granulär/diffus	granulär

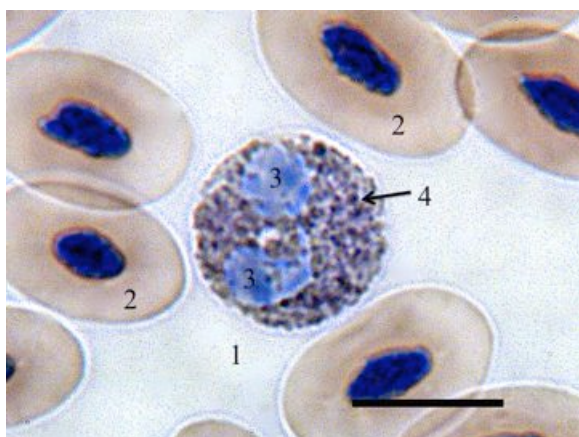


Abbildung 59: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, Peroxidase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten ist ein zweifach segmentierter Zellkern (3) sowie zahlreiche runde Granula zu sehen. Die Granula des eosinophilen Granulozyten (4) zeigen anhand der intensiven schwarzbraunen Färbung eine stark positive Reaktion auf den Peroxidasenachweis (4).

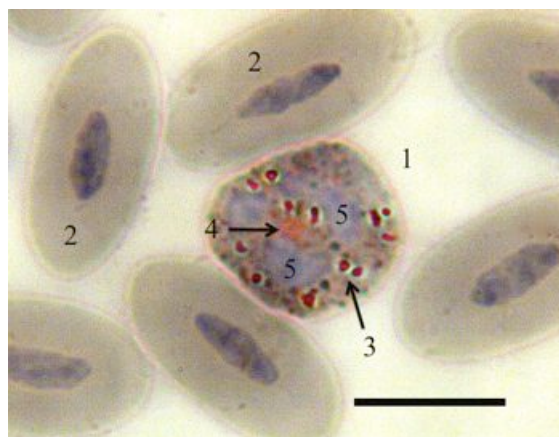


Abbildung 60: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 23, weiblich, 14 Monate, Saure Phosphatase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten sind rote granuläre (3) und diffuse (4) Reaktionsprodukte zu erkennen. Mehrfach segmentierter Zellkern (4).



Abbildung 61: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, β-Glukuronidase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten ist sowohl granulär (3), als auch diffus (4) ein rotbrauner Niederschlag zu sehen. Zweifach segmentierter Zellkern (5).

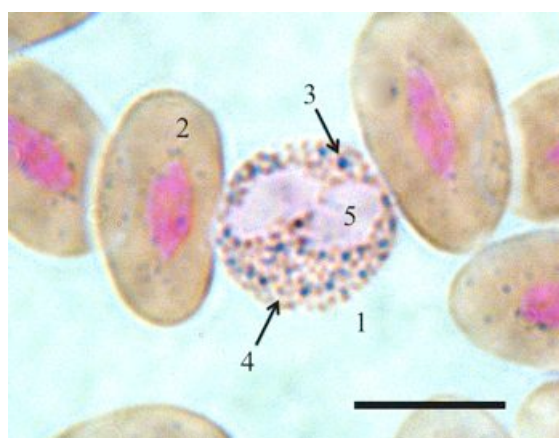


Abbildung 62: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung, Kernfärbung mit Kernechtrot, SB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten sind zahlreiche positive blaue granuläre Reaktionen (3) und rötlich gefärbte Granula (4) zu erkennen. Zweifach segmentierter Zellkern (5).

### 4.3.5 Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten reagieren stark positiv auf den Nachweis auf saure Phosphatase. Da die Granula wasserlöslich sind und bei diesem Färbeporgang ausgewaschen wurden, konnte nur das Zytoplasma beurteilt werden. Beim Nachweis auf  $\beta$ -Glukuronidase kann in den Granula sowie im Zytoplasma ein deutlicher roter Farbniederschlag festgestellt werden. Die  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase zeigt sich im Zytoplasma zwischen den Vakuolen als schwach sichtbares braunes granuläres Reaktionsprodukt. Die unspezifische Naphthol-AS-Acetat-Esterase kann anhand zahlreicher gut sichtbarer blauer Granula im Zytoplasma der basophilen Granulozyten des Straußes festgestellt werden.

Tabelle 27: Enzymfärbungen basophile Granulozyten

Enzymnachweis	Saure Phosphatase	$\beta$ -Glukuronidase	$\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase	Naphthol-AS-Acetat-Esterase
<b>Stärke der Reaktion</b>	+++	++	+	+++
<b>Farbe</b>	rot	rot	braun	blau
<b>Lokalisation</b>	diffus	granulär/diffus	granulär	granulär

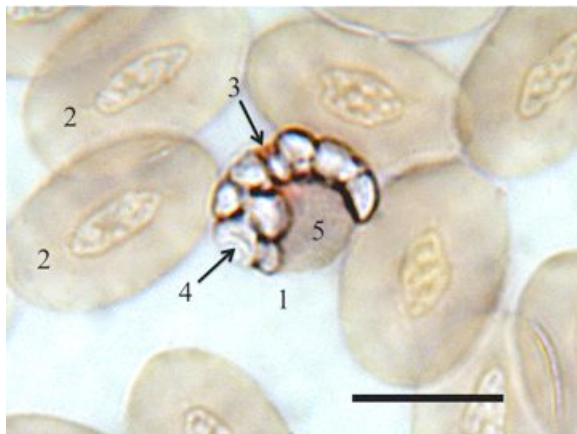


Abbildung 63: Basophiler Granulozyt

Strauß 26, 14 Monate, Saure Phosphatase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun (ausgewaschen), SB: 10  $\mu$ m

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des basophilen Granulozyten ist ein diffuser roter Niederschlag (3) zu erkennen. Ausgewaschene Granula (4); Zellkern (5).

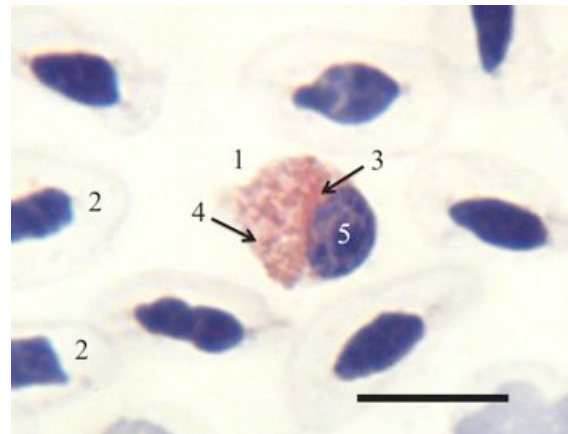


Abbildung 64: Basophiler Granulozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate,  $\beta$ -Glukuronidase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10  $\mu$ m

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des basophilen Granulozyten sind diffuse (3) und granuläre (4) rote Reaktionsprodukte zu erkennen. Basophiler unsegmentierter Zellkern (5).

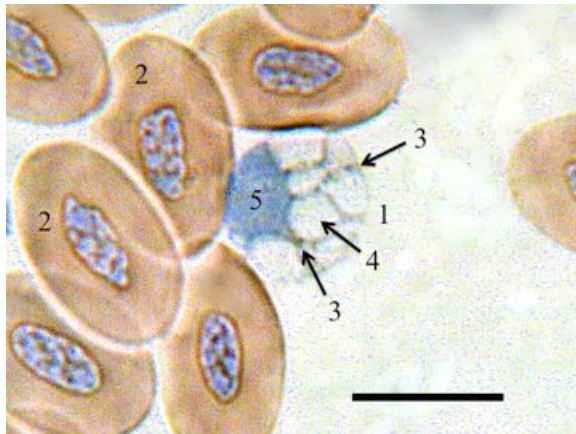


Abbildung 65: Basophiler Granulozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, ANAE-Färbung, (pH: 8,0) Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des basophilen Granulozyten sind schwach positive granuläre, braune Reaktionsprodukte (3) zu erkennen. Vakuolen (4); Ovaler Zellkern (5).

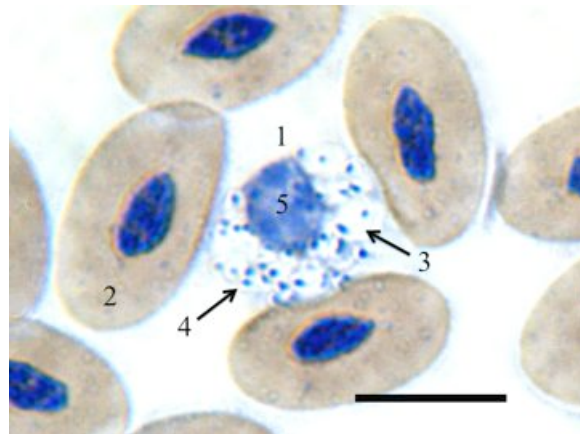


Abbildung 66: Basophiler Granulozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des basophilen Granulozyten sind deutlich die negativen Granula, bzw. Vakuolen (3) sowie zahlreiche dunkelblaue Reaktionsprodukte (4) zu erkennen. Basophiler unsegmentierter Zellkern (5).

### 4.3.6 Lymphozyten

Die Lymphozyten des Straußes reagieren stark positiv auf den Nachweis der sauren Phosphatase. Diese kann mit einem intensiv roten diffus-granulärem Reaktionsprodukt im Zytoplasma festgestellt werden. Auch beim Nachweis der  $\beta$ -Glukuronidase kommt es zu einem stark positiven Ergebnis. Hier färbt sich das Zytoplasma der Lymphozyten diffus rot bis pinkrot an. Die  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase kann im Zytoplasmasaum als feingranulärer brauner Farbniederschlag nachgewiesen werden. Beim enzymhistochemischen Nachweis auf Naphthol-AS-Acetat-Esterase reagieren die Lymphozyten des Straußes stark positiv anhand eines granulären blauen Reaktionproduktes.

Tabelle 28: Enzymfärbungen Lymphozyten

Enzymnachweis	Saure Phosphatase	$\beta$ -Glukuronidase	$\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase, pH: 8,0	Naphthol-AS-Acetat-Esterase
<b>Stärke der Reaktion</b>	+++	+++	+	+++
<b>Farbe</b>	dunkelrot	pinkrot	braun	dunkelblau
<b>Lokalisation</b>	granulär/diffus	diffus	granulär	granulär

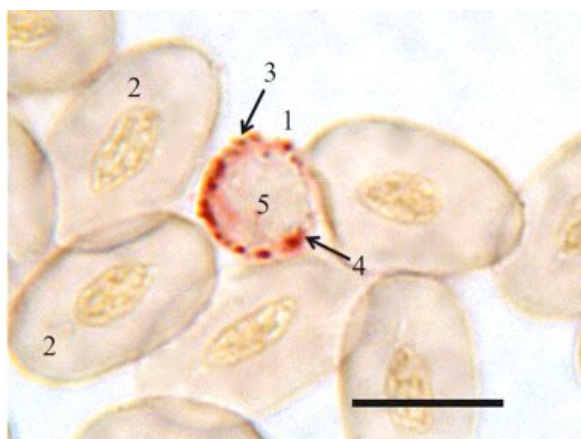


Abbildung 67: Kleiner Lymphozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, Saure Phosphatase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun (ausgewaschen), SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Lymphozyten sind granulär (3) sowie diffus (4) stark positive intensiv rot gefärbte Reaktionsprodukte zu erkennen. Zellkern (4).

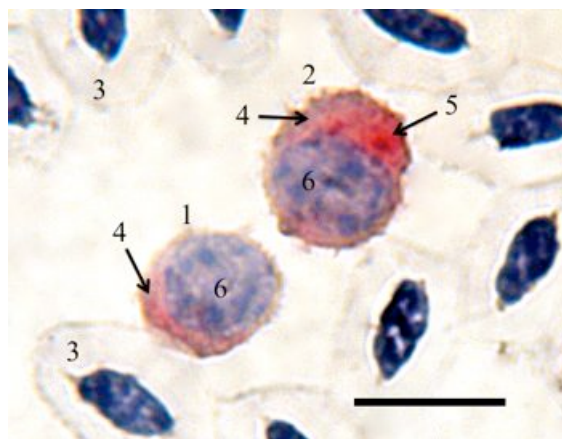


Abbildung 68: Kleiner und mittelgroßer Lymphozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate,  $\beta$ -Glukuronidase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1), mittelgroßer Lymphozyt (2) und Erythrozyten (3). Im Zytoplasma der Lymphozyten ist eine diffuse rote Reaktion (4) zu erkennen. In manchen Bereichen ist sie intensiver ausgeprägt (5). Basophile unsegmentierte Zellkerne der Lymphozyten (6).

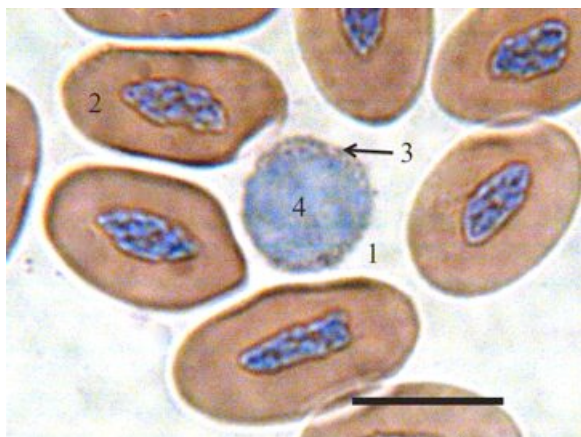


Abbildung 69: Kleiner Lymphozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate,  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung, (pH.8,0) Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasmasaum des Lymphozyten (3) sind zahlreiche feingranuläre braune Reaktionsprodukte zu erkennen. Zellkern (4).

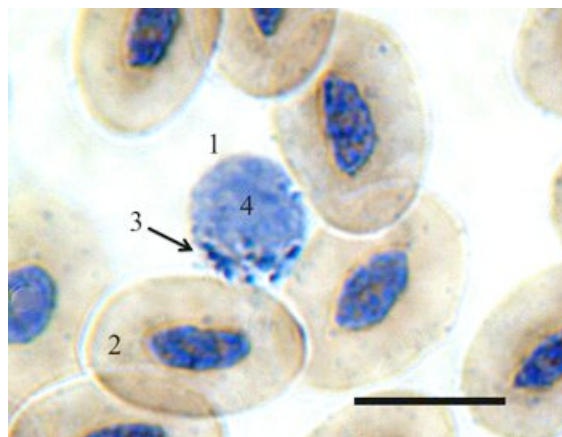


Abbildung 70: Kleiner Lymphozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, Naphthol-AS-Acetat-Esterase, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Kleiner Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasmasaum des Lymphozyten (3) sind zahlreiche blaue granuläre Reaktionsprodukte zu erkennen. Basophiler Zellkern (4).

### 4.3.7 Monozyten

Die Monozyten des Straußes reagieren deutlich positiv auf den Nachweis auf saure Phosphatase. Bei dieser Färbung kommt es im Zytoplasma zu einem roten granulären sowie diffusen Farbniederschlag. Bei der  $\beta$ -Glukuronidase-Färbung kann eine schwache blassrote Reaktion diffus im Zytoplasma beobachtet werden. Die spezifische Esterase Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase zeigt sich in den Monozyten des Straußes mit einem deutlich sichtbarem blau-granulärem Reaktionsprodukt. Bei den Nachweisfärbungen für die unspezifischen Esterasen können ebenfalls positive Reaktionen festgestellt werde. Die ANAE wird anhand eines diffus sichtbarem Farbniederschlag im Zytoplasma nachgewiesen. Bei der Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung kommt es im Zytoplasma der Monozyten zu stark positiven blau-granulären Reaktionen. Im Zytoplasma der Monozyten kommt es bei der Nachweisfärbung für  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase (pH: 8,0) zu einer schwachen diffusen Reaktion.

Tabelle 29: Enzymfärbungen Monozyten

Enzymnachweis	Saure Phosphatase	$\beta$ -Glukuronidase	Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase, pH:6,5	Naphthol-AS-Acetat-Esterase	$\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase, pH: 8,0
<b>Stärke der Reaktion</b>	++	+	++	+++	+
<b>Farbe</b>	rot	blassrot	blau	blau	braun
<b>Lokalisation</b>	granulär/diffus	diffus	granulär	granulär	diffus

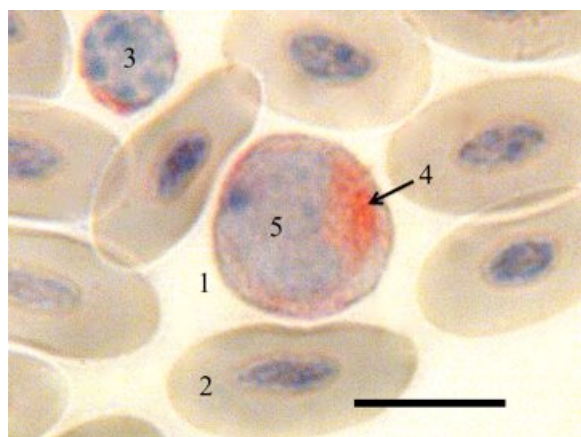


Abbildung 71: Monozyt, Lymphozyt

Strauß 19, männlich, 14 Monate, Saure Phosphatase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1), Erythrozyten (2) und Lymphozyt (3). Im Zytoplasma des Monozyten sind granulär und diffus (4) deutlich positive rote Reaktionsprodukte zu erkennen. Typisch bohnenförmiger Zellkern (5).

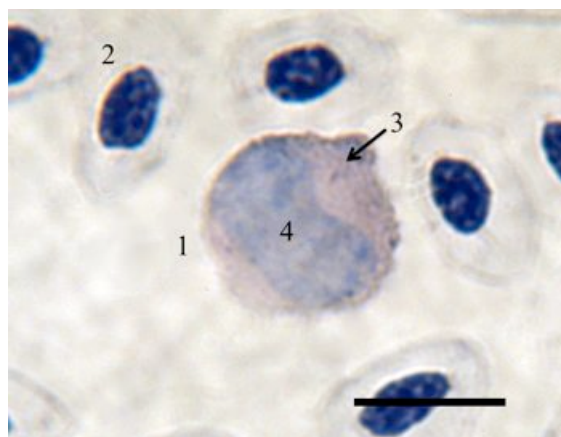


Abbildung 72: Monozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, β-Glukuronidase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Monozyten (3) ist ein diffuser blassroter Farbniederschlag zu erkennen. Charakteristisch bohnenförmiger Zellkern (4).



Abbildung 73: Monozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung (pH:6,5), Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Monozyten (3) sind zahlreiche deutliche blaue granuläre Reaktionsprodukte zu sehen. Typisch bohnenförmiger Zellkern (4).

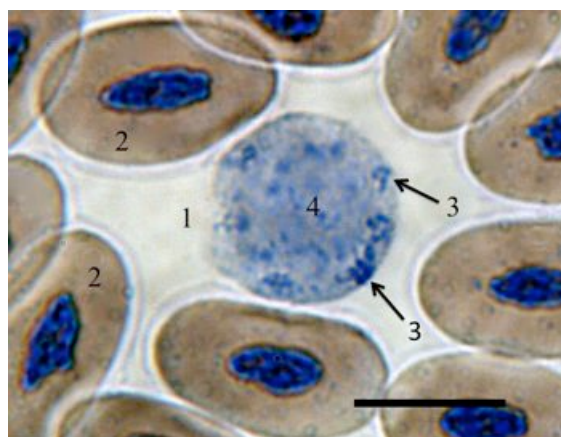


Abbildung 74: Monozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung, Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Monozyten (3) sind stark positive blau-granuläre Reaktionen zu sehen. Zellkern des Monozyten (4).



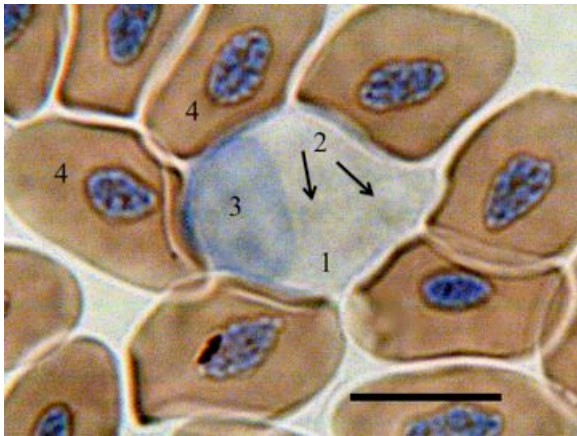


Abbildung 75: Monozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate,  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung, (pH: 8,0), Kernfärbung mit Hämalaun, SB: 10  $\mu$ m

Im Zytoplasma des Monozyten (1) sind diffus schwach braune Reaktionsprodukte (2) zu erkennen. Zellkern (3); Erythrozyten (4).

## 4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

### 4.4.1 Erythrozyten

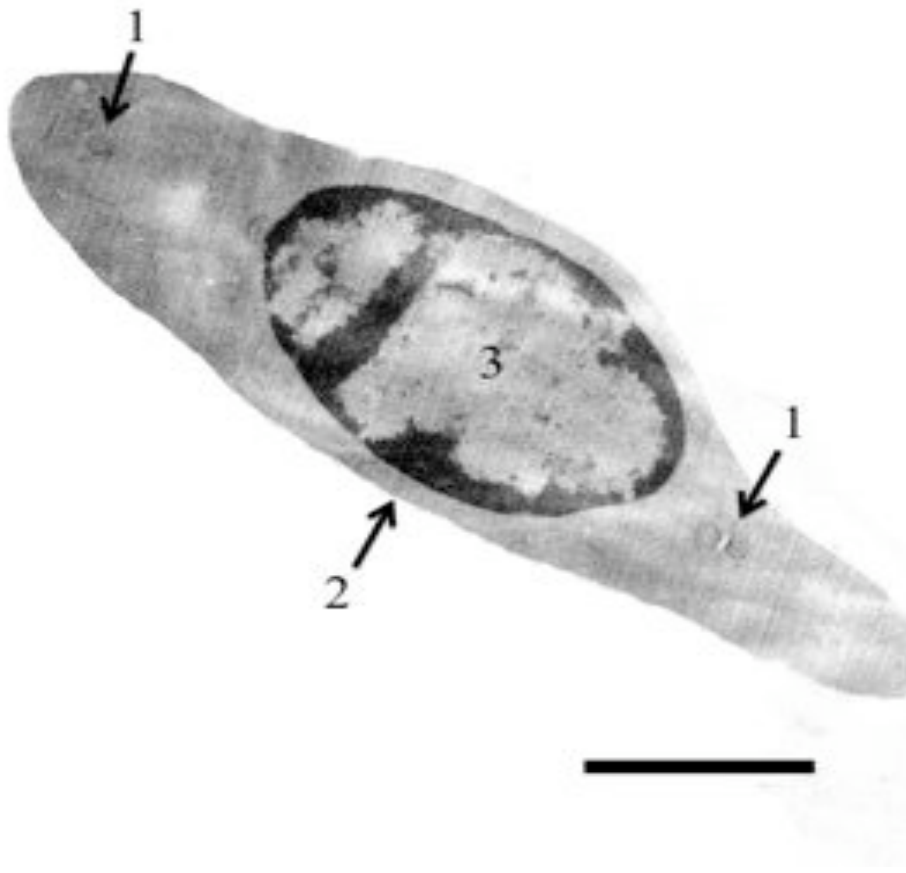


Abbildung 76: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Erythrozyten, SB: 2  $\mu\text{m}$

Reifer aviärer Erythrozyt. Die Erythrozyten weisen unter dem Elektronenmikroskop meist eine längliche unregelmäßig linsenförmige Gestalt auf. Ihre Zellmembran grenzt sich präzise und ohne Ausbildung von Pseudopodien von der Umgebung ab. Im relativ homogenen Zytoplasma befinden sich vereinzelt Mitochondrien (1). Direkt unterhalb der Zellmembran ist das marginale Band aus Mikrotubuli zu erkennen (2). Der ovale Zellkern (3) liegt stets zentral in der Zelle.

#### 4.4.2 Thrombozyten

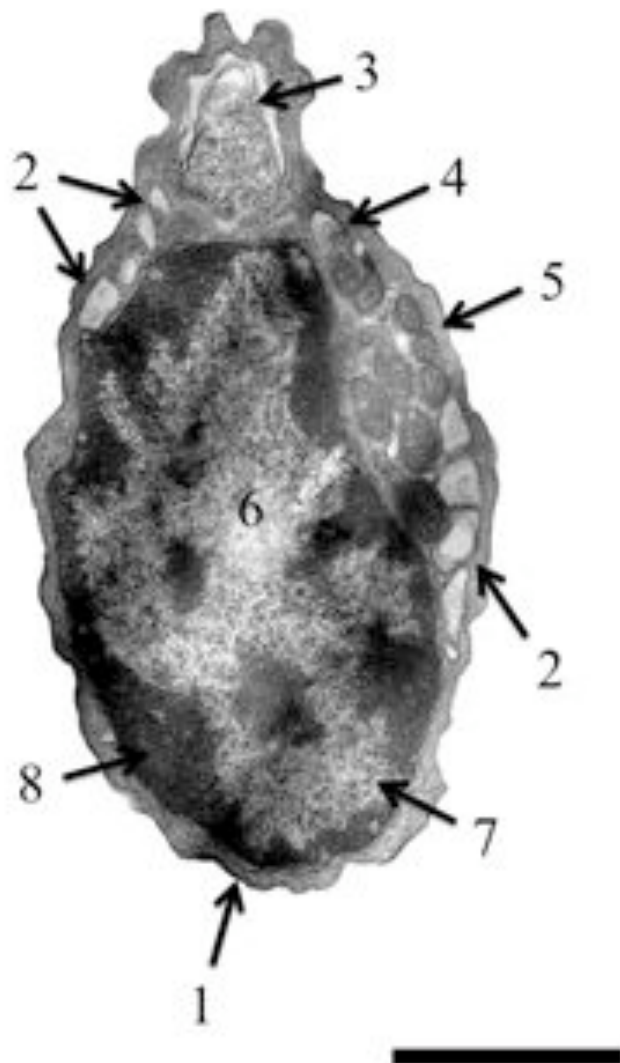


Abbildung 77: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Thrombozyten des Straußes, SB: 2 µm

Direkt unterhalb der Plasmamembran ist ein marginales Band aus Mikrotubulibündel zu erkennen (1). Der aviäre Thrombozyt weist eine Vielzahl an Anschnitten des komplexen kanalikulären Systems auf (2). Im Zytoplasma befinden sich weiterhin Vakuolen (3), spezifische Granula mit exzentrisch gelagerten elektronendichten Inhalt (4) sowie Mitochondrien (5) mit deutlich sichtbaren Cristae. Der Nukleus (6) liegt mittig in der Zelle und besteht aus zentralem Euchromatin (7) und peripheren Heterochromatin (8).

#### 4.4.3 Heterophile Granulozyten

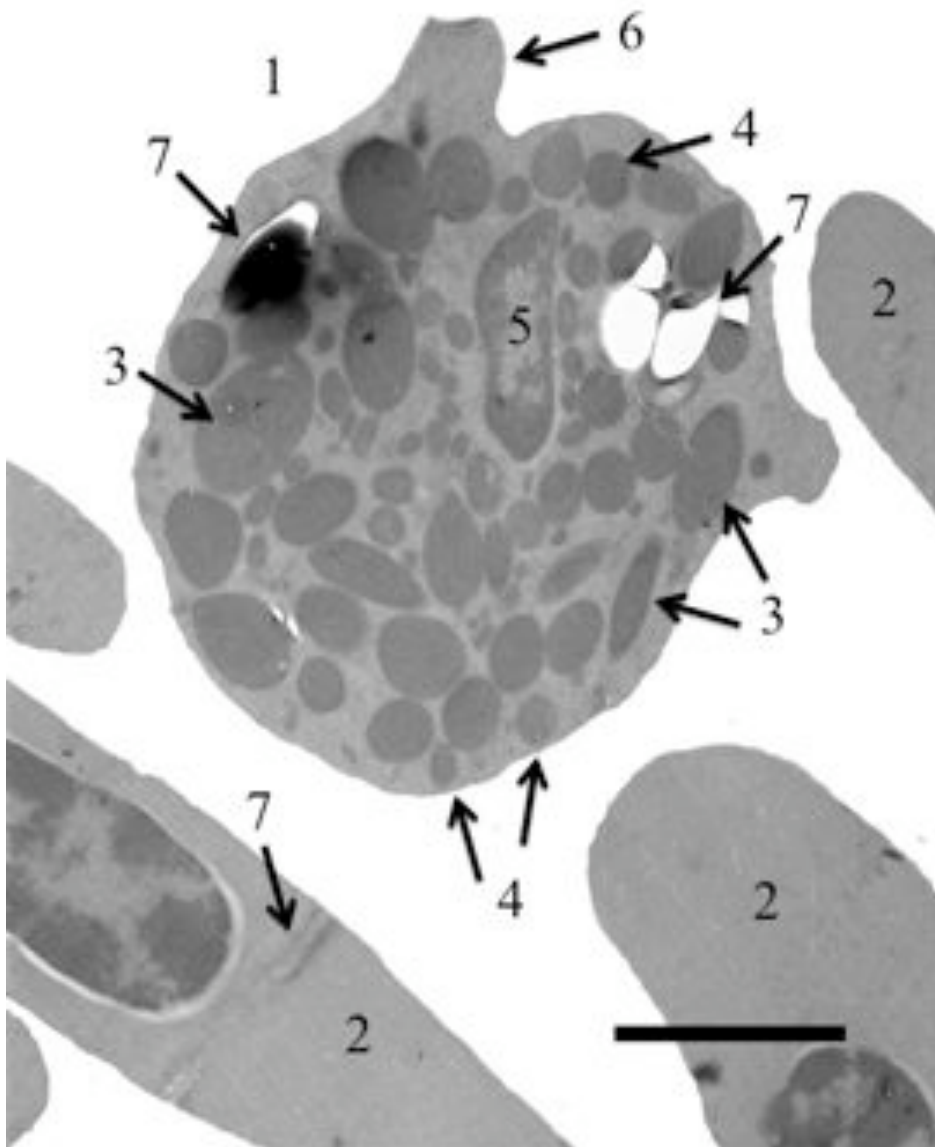


Abbildung 78: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines heterophilen Granulozyten des Straußes, SB: 2µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma befinden sich zwei verschiedene Arten von Granula. Typ 1 Granula (3) sind spindelförmig und etwas größer und als die Typ 2 Granula (4). Diese sind kleiner und haben eine rundliche Form. Der Abschnitt des Zellkerns (5) zeigt zentrales Eu- und peripher gelegenes Heterochromatin. Zytoplasmatischer Ausläufer (6); Artefakte (7).

#### 4.4.4 Eosinophile Granulozyten

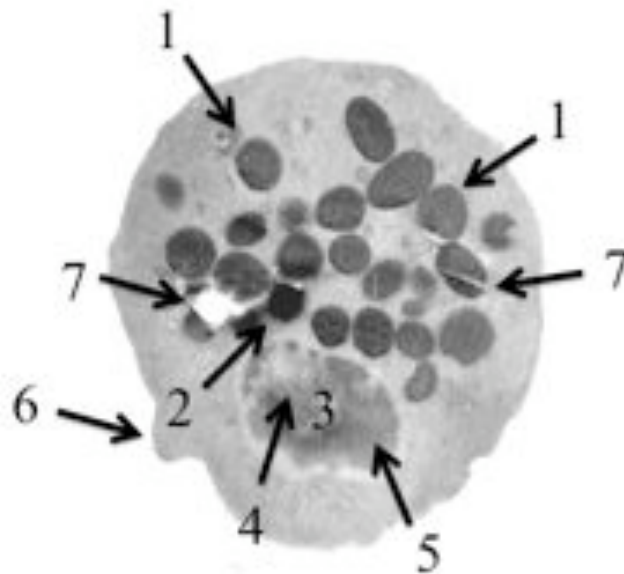


Abbildung 79: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines eosinophilen Granulozyten, SB: 2  $\mu\text{m}$

Die eosinophilen Granulozyten des Straußes stellen sich unter dem Elektronenmikroskop als runde bis unregelmäßige Zellen dar. Im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten sind zahlreiche kugelförmige Granula (1) zu erkennen. Manche weisen eine höhere Elektronendichte auf (2). Der Zellkern des eosinophilen Granulozyten (3) ist in diesem Präparat nur teilweise angeschnitten. Er besteht aus zentral gelagertem Euchromatin (4) und peripheren Heterochromatin (5). Zytoplasmatischer Ausläufer (6); Artefakte (7).

#### 4.4.5 Basophile Granulozyten

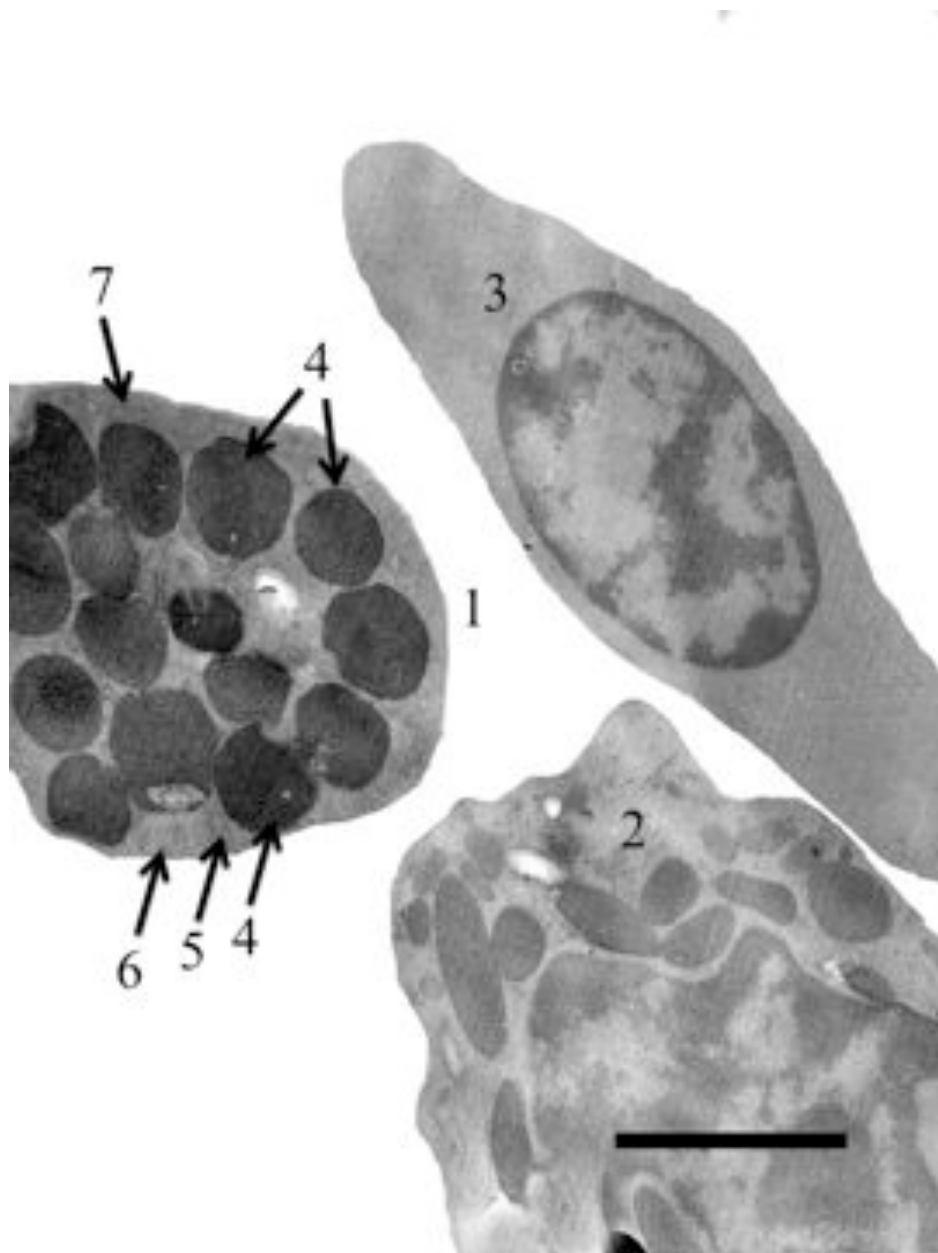


Abbildung 80: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines basophilen Granulozyten, SB: 2  $\mu$ m

Basophiler Granulozyt (1), heterophiler Granulozyt (2) und Erythrozyt (3). Der basophile Granulozyt des Straußes stellt sich unter dem Elektronenmikroskop als relativ gleichmäßig runde Zelle dar. Im Zytoplasma befinden sich einige, überwiegend runde elektronendichte Granula (4). Diese unterscheiden sich geringfügig im Grad der Elektronendichte. Im Zytoplasma sind weiterhin Glykogengranula (5), endoplasmatisches Retikulum (6) und Mitochondrien (7) zu erkennen.

## 4.4.6 Lymphozyten

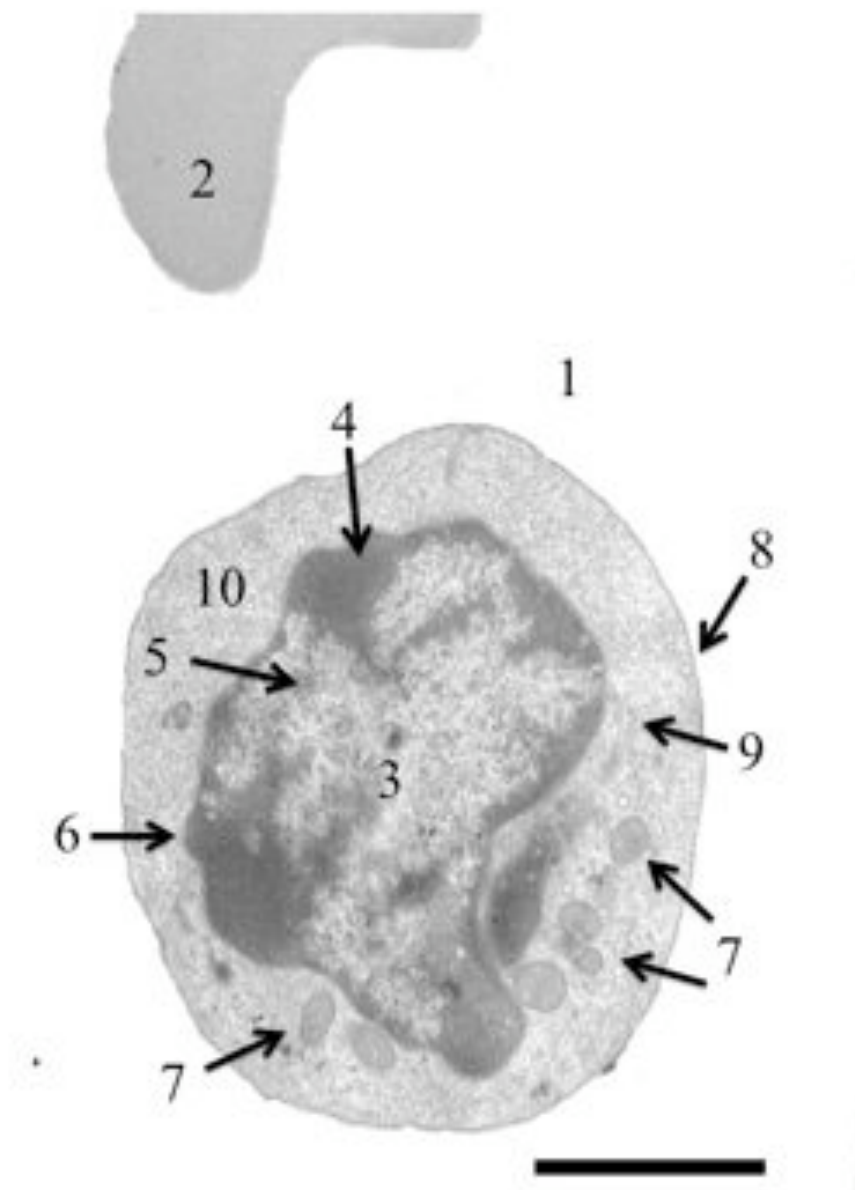


Abbildung 81: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten, SB: 2  $\mu\text{m}$

Lymphozyt (1) und Erythrozyt (2). Im Zytoplasma des Lymphozyten befindet sich zentral der Zellkern (3) mit peripher gelagerten Heterochromatin (4) und zentralem Euchromatin (5). Um den Zellkern ist die perinukleäre Zisterne (6) zu erkennen. Der Zellkern weist an einer Seite eine Einkerbung auf. Nahe dieser Einkerbung befinden sich Mitochondrien (7), Vakuolen (8) und endoplasmatisches Retikulum (9). Im Zytoplasma können zahlreiche freie Ribosomen (10) erkannt werden.

## 4.4.7 Monozyten

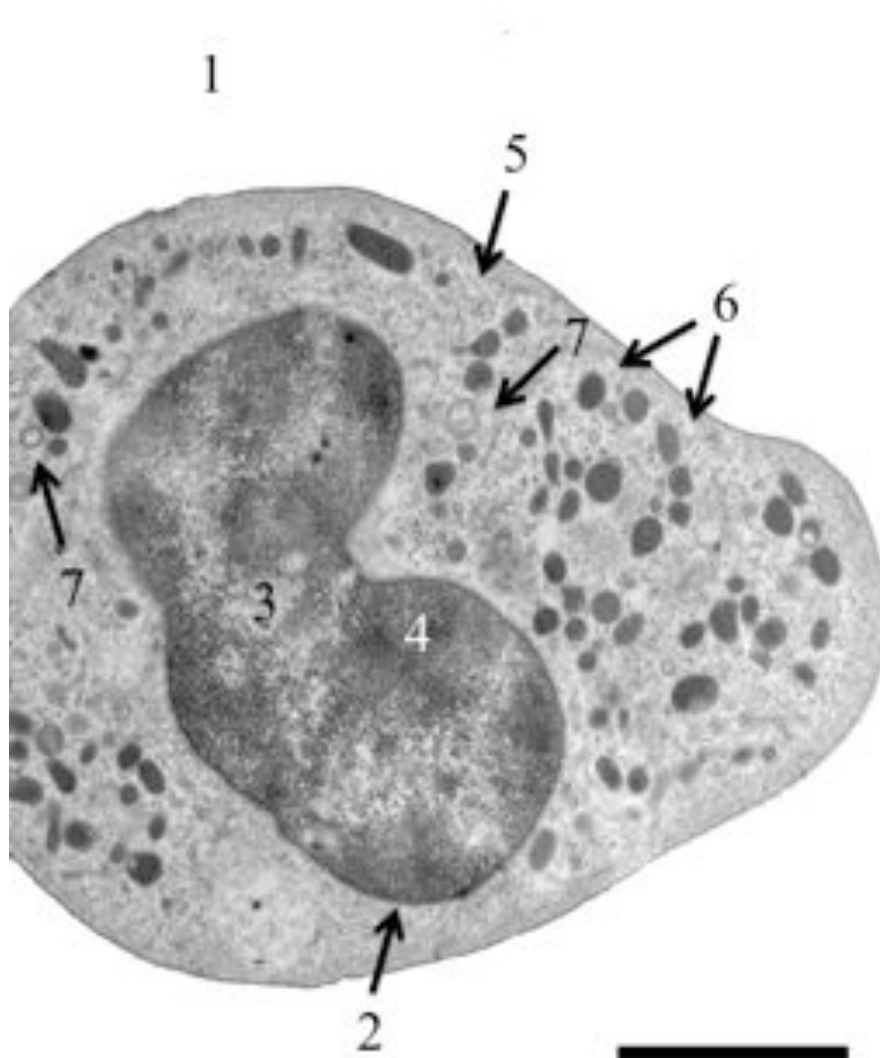


Abbildung 82: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monozyten, SB: 2  $\mu\text{m}$

Der Monozyt (1) des Straußes weist eine runde bis längliche Form auf. Im reichlichen Zytoplasma befindet sich ein nierenförmiger Zellkern (2). Dieser besitzt zentrales Eu- (3) und reichliches, peripher gelagertes Heterochromatin (4). Im Zytoplasma sind viele freie Ribosomen (5) und zahlreiche elektronendichte Granula (6) sowie Vakuolen (7) zu erkennen.



#### 4.5 Glykohistochemische Untersuchungen

Es wurden für die FITC-markierten Lektine sowie für die biotinylierten Lektine je 10 Blutaussstriche 14 Monate alter männlicher und weiblicher Strauße verwendet. Bei der Untersuchung der verschiedenen Blutzellen auf eine mögliche Lektinbindung wurde zwischen keiner (0), schwach positiven (+), deutlich positiven (++) und stark positiven (+++) Reaktion unterschieden. Aufgrund der zusätzlichen Behandlung der Blutzellen mit DAPI-Kernfärbung konnten die Zellen auch bei fehlender Fluoreszenz identifiziert werden. Da die Zellen des Vogels ausnahmslos Kerne besitzen, konnten so Erythrozyten und Thrombozyten auch bei negativer Reaktion erkannt werden.

Für jedes Lektin wurde eine Tabelle erstellt, in der die Bindung des Lektins zusammengefasst ist. Unter „Stärke der positiven Reaktion“ steht die Anzahl der Tiere, bei denen diese Bindungsstärke aufgetreten ist. Bei „Positive Präparate“ steht der prozentuale Anteil an Blutaussstrichen, auf denen diese Zellen zu finden waren. Dies ist deshalb von Bedeutung, da manche Blutzellen wie Monozyten oder eosinophile Granulozyten nicht auf jedem Ausstrich zu finden sind. Die unterschiedliche Anzahl der Gesamtpräparate ergibt sich daraus, dass manche Ausstriche aufgrund mangelhafter Qualität nicht auswertbar waren.

## 4.5.1 Für Glukose/Mannose spezifische Lektine

### 4.5.1.1 Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA-FITC)

Bei den untersuchten Blutaussstrichen kann eine überwiegend schwach bis deutlich positive Reaktion von ConA mit der Erythrozytenmembran festgestellt werden. Das Zytoplasma reagiert in wenigen Präparaten positiv. Die Membran der Thrombozyten zeigt etwa in der Hälfte der Fälle eine schwache beziehungsweise deutliche Bindung mit dem Lektin. Im Bereich des Zytoplasmas der Thrombozyten kann in fast allen Fällen eine schwach positive Reaktion beobachtet werden. Die vereinzelt Granula der Thrombozyten zeigen eine deutliche bis starke Fluoreszenz (s. Tabelle). Bei den heterophilen Granulozyten reagiert das Lektin bei über der Hälfte der Präparate mit der Zellmembran. Die Reaktion variiert hier von schwach bis deutlich positiv. Das Zytoplasma zeigt eine überwiegend deutliche Affinität zu ConA-FITC. Die Granula verhalten sich negativ. Bei den eosinophilen Granulozyten zeigt sich an der Zellmembran eine einheitlich schwach positive Reaktion. Das Zytoplasma dagegen erscheint teilweise ConA-negativ, teilweise schwach positiv. Die Granula stellen sich negativ dar. Beim Großteil der basophilen Granulozyten kann an der Zellmembran eine schwache Bindung des Lektins festgestellt werden. Das Zytoplasma bindet ConA-FITC einheitlich mit einer schwachen Affinität. Die Granula sind negativ. Bei den Lymphozyten zeigt sich, bis auf einige Ausnahmen, eine schwach positive Bindung des Lektins an der Zellmembran (s. Tabelle). Das Zytoplasma weist eine schwache Reaktion auf, im Gegensatz zu den Granula, die sich überwiegend deutlich positiv mit ConA-FITC darstellen. Bei den Monozyten können im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas überwiegend schwach positive Reaktionen festgestellt werden. Die feinen zytoplasmatischen Granula binden das Lektin zum Teil auch mit deutlicher Affinität (s. Tabelle).

Tabelle 30 : Einzelauswertung Lektine: ConA-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	20 %	40 %	30 %	10 %	100 %
Zytoplasma	80 %	20 %	0	0	100 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0	50 %	50 %	0	100 %
Zytoplasma	0	90 %	10 %	0	100 %
Granula	0	10 %	60 %	30 %	100 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	40 %	40 %	20 %	0	100 %
Zytoplasma	0	30 %	70 %	0	100 %
Granula	100 %	0	0	0	100 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	100 %	0	0	100 %
Zytoplasma	40 %	60 %	0	0	100 %
Granula	100 %	0	0	0	100 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	25 %	75 %	0	0	80 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	30 %	60 %	10 %	0	100 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	100 %
Granula	20 %	20 %	60 %	0	100 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	0	100 %	0	0	80 %
Zytoplasma	37,5 %	62,5 %	0	0	80 %
Granula	37,5 %	25 %	37,5 %	0	80 %

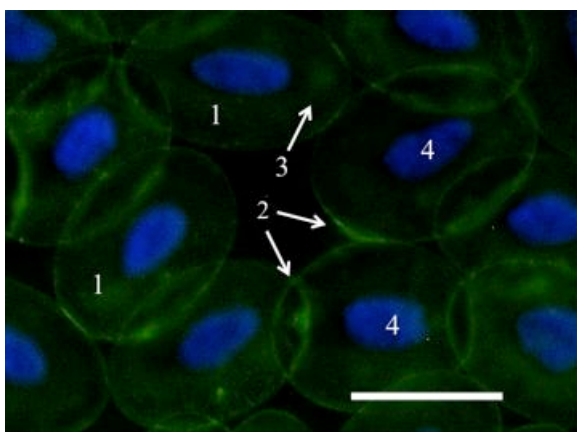


Abbildung 83: Erythrozyten

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, ConA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Erythrozyten (1). Das Lektin bindet schwach an die Zellmembran der Erythrozyten (2). Teilweise sind positive Reaktionen im Zytoplasma zu sehen (3). Ovaler unsegmentierter Zellkern (4).

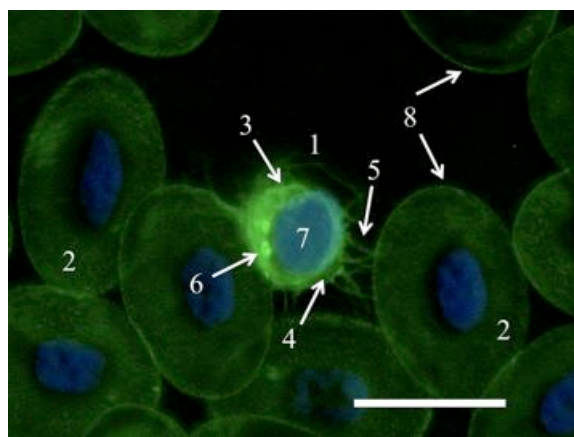


Abbildung 84: Thrombozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, ConA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Thrombozyten (3) zeigt eine deutlich positive Reaktion. Das Zytoplasma (4) reagiert bis in die zytoplasmatischen Ausläufer (5) schwach positiv. Die spezifischen Granula des Thrombozyten (6) zeigen eine stark positive Bindung zu ConA-FITC. Ovaler Zellkern (6). Die Zellmembran (8) der Erythrozyten ist schwach positiv.

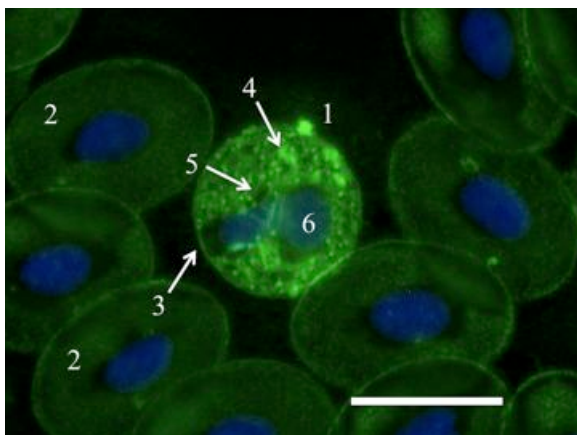


Abbildung 85: Heterophiler Granulozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, ConA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des heterophilen Granulozyten (3) zeigt eine schwache, das Zytoplasma (4) eine deutliche Bindung des Lektins. Die zytoplasmatischen Granula (5) reagieren negativ. Segmentierter Zellkern (6).

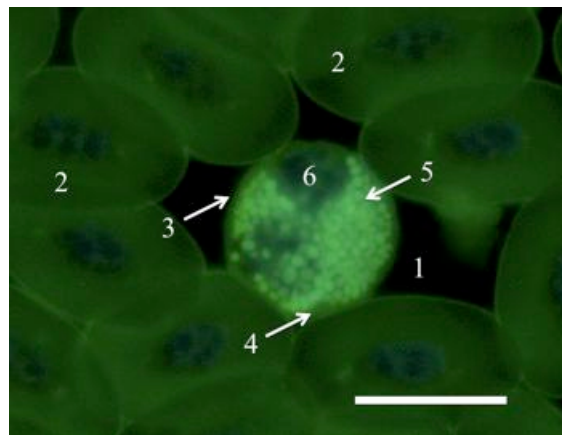


Abbildung 86: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 22, weiblich, 14 Monate, ConA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des eosinophilen Granulozyten (3) und das Zytoplasma (4) gehen eine schwache Bindung mit ConA-FITC ein. Die Granula (5) reagieren negativ. Segmentierter Zellkern (6).

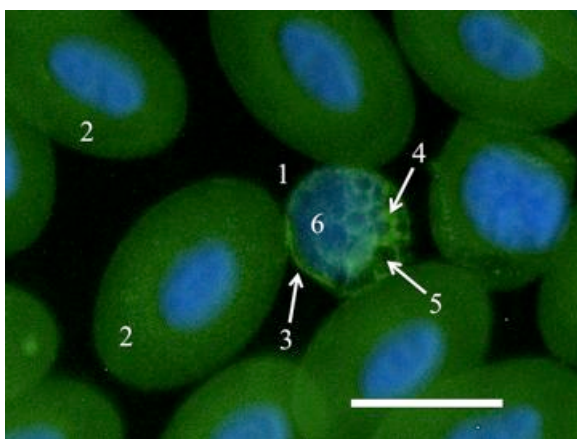


Abbildung 87: Basophiler Granulozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, ConA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des basophilen Granulozyten (3) sowie das Zytoplasma (4) reagieren schwach positiv auf den Lektinnachweis. Die Granula (5) gehen keine Bindung mit ConA-FITC ein. Zellkern (6).

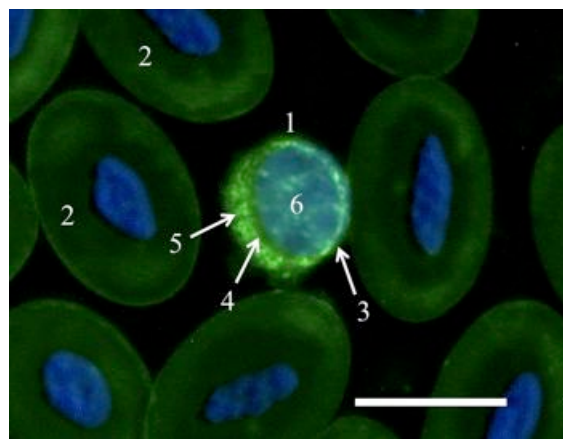


Abbildung 88: Lymphozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, ConA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Lymphozyten (3) und das Zytoplasma (4) zeigen eine schwach positive Reaktion, während die Granula (5) deutlich positiv reagieren. Ovaler Zellkern (6).

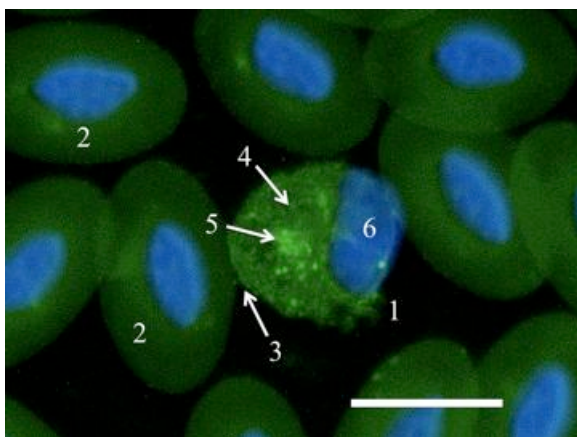


Abbildung 89: Monozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, ConA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Monozyten (3) und das Zytoplasma (4) reagieren schwach positiv mit ConA-FITC. Die zytoplasmatischen Granula (5) zeigen eine deutliche Bindung zu dem Lektin. Nierenförmiger Zellkern (6).

#### 4.5.1.2 Bindung von *Lens culinaris* Agglutinin (LCA-FITC)

Bis auf eine Ausnahme wurde keine Bindung des Lektins an der Zellmembran der Erythrozyten nachgewiesen. Das Zytoplasma der roten Blutkörperchen reagiert in keinem der Ausstriche positiv. Die Zellmembran und das Zytoplasma der Thrombozyten hingegen reagiert überwiegend schwach positiv, die Granula zeigen eine deutliche bis stark positive Bindung des LCA-FITC (s. Tabelle). Bei den heterophilen Granulozyten zeigt die Membran in den meisten Fällen keine Reaktion. Das Zytoplasma dagegen weist bei allen Präparaten eine deutliche Bindung zu dem Lektin auf. Die Granula stellen sich negativ dar. Die Zellmembran der basophilen Granulozyten reagiert zum Teil schwach positiv, zum Teil negativ, das Zytoplasma zeigt dagegen eine schwache bis deutliche Reaktion (s. Tabelle). Die Granula sind LCA-negativ. Bei den eosinophilen Granulozyten kann an Zellmembran und Granula überwiegend keine Bindung des Lektins nachgewiesen werden. Das Zytoplasma dagegen zeigt eine größtenteils schwache Bindung mit LCA-FITC. Bei den Lymphozyten kann eine schwache Bindung an Zytoplasma und der Zellmembran nachgewiesen werden sowie eine deutliche bis starke Fluoreszenz der Granula. Die Monozyten zeigen mehrheitlich eine schwache Reaktion an Zellmembran und Zytoplasma, während die Granula sich deutlich mit LCA-FITC anfärben.

Tabelle 31: Einzelauswertung Lektine: LCA-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	87,5 %	12,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0	87,5 %	12,5 %	0	80 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	80 %
Granula	0	0	50 %	50 %	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	75 %	25 %	0	0	80 %
Zytoplasma	0	0	100 %	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	62,5 %	37,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	0	87,5 %	12,5 %	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	42,9 %	57,1 %	0	0	70 %
Zytoplasma	0	71,4 %	28,6 %	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	70 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	0	100 %	0	0	80 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	80 %
Granula	0	0	75 %	25 %	80 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	12,5 %	75 %	12,5 %	0	80 %
Zytoplasma	0	87,5 %	12,5 %	0	80 %
Granula	0	0	100 %	0	80 %

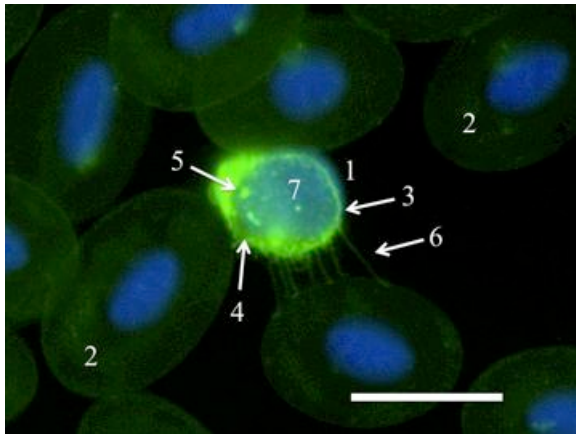


Abbildung 90: Thrombozyt

Strauß 26, männlich, 14 Monate, LCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Thrombozyten (3) zeigt in diesem Präparat eine deutliche Bindung zu dem Lektin. Das Zytoplasma (4) reagiert schwach positiv und die Granula (5) weisen eine stark positive Bindung mit LCA-FITC auf. Zytoplasmatische Ausläufer (6); Ovaler Zellkern (7).

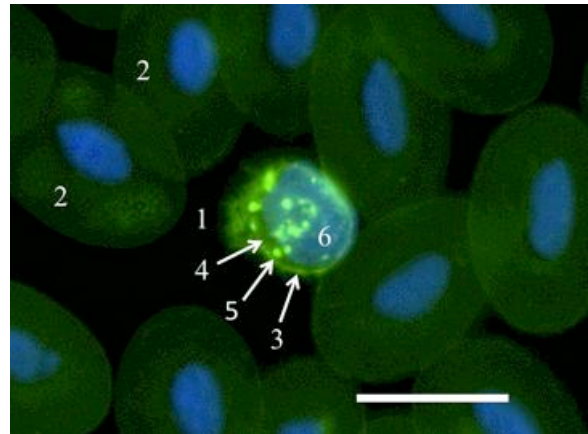


Abbildung 91: Thrombozyt

Strauß 26, männlich, 14 Monate, LCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Thrombozyten (3) reagiert deutlich positiv mit LCA-FITC. Das Zytoplasma (4) zeigt eine schwache Bindung. Die Granula des Thrombozyten (5) reagieren dagegen stark positiv auf den Lektinnachweis. Ovaler Zellkern (6).

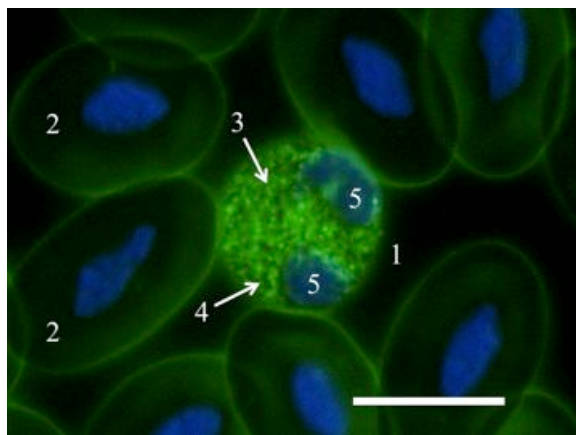


Abbildung 92: Heterophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, LCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des heterophilen Granulozyten (3) zeigt eine schwach positive Reaktion, während die Granula (4) keine Bindung mit dem Lektin aufweisen. Zweifach segmentierter Zellkern (5).

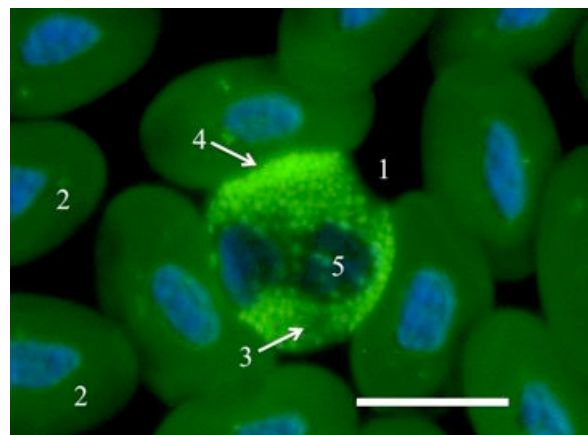


Abbildung 93: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 21, weiblich, 14 Monate, LCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (3) zeigt eine schwach positive Bindung. Die Granula (4) reagieren negativ. Die Aufhellung ist bedingt durch eine Eigenfluoreszenz der Granula. Zweifach segmentierter Zellkern (5).



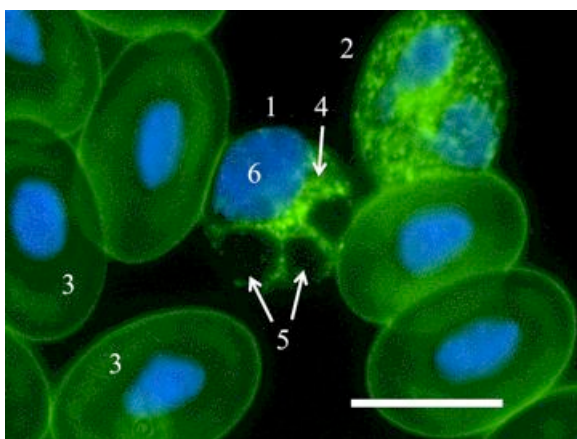


Abbildung 94: Basophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, LCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1), heterophiler Granulozyt (2) und Erythrozyten (3). Das Zytoplasma des basophilen Granulozyten (4) zeigt eine deutlich positive Reaktion, die zytoplasmatischen Granula (5) zeigen keine Bindung von LCA-FITC. Typisch exzentrisch gelagerter Zellkern (6).

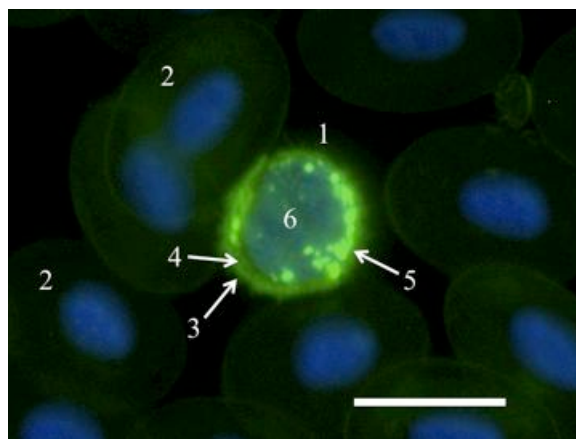


Abbildung 95: Lymphozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, LCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Mittelgroßer Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Lymphozyten (3) und das Zytoplasma (4) zeigen eine schwach positive Reaktion. Die Granula (5) binden LCA-FITC mit starker Affinität. Zellkern (6).

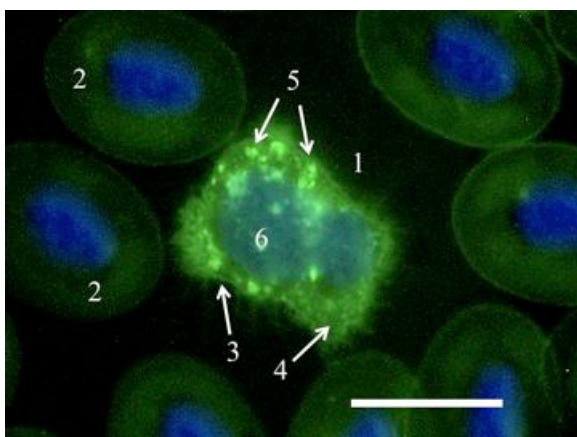


Abbildung 96: Monozyt

Strauß 26, männlich, 14 Monate, LCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Monozyten (3) sowie das Zytoplasma (4) zeigen eine schwach positive Reaktion. Die Granula des Monozyten (5) reagieren deutlich positiv. Nierenförmiger Zellkern (6).

#### 4.5.1.3 Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin (PSA-FITC)

Bei keinem der untersuchten Blutaussstriche konnte eine Bindung des FITC-markierten Lektins an die Erythrozyten weder an der Zellmembran noch im Zytoplasma festgestellt werden. Bei den Thrombozyten reagiert in der Hälfte der Präparate die Zellmembran schwach positiv, die andere Hälfte zeigt keine Bindung des PSA. Das Zytoplasma ist bei allen Thrombozyten negativ. Die Granula färben sich dagegen deutlich mit PSA-FITC an (s.Tabelle). Das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten verhält sich deutlich positiv. Bei den eosinophilen Granulozyten sind sowohl Zellmembran als auch Granula PSA-negativ, während das Zytoplasma bei allen Präparaten eine schwach positive Bindung aufweist. Die basophilen Granulozyten zeigen im Bereich der Zellmembran und den Granula keine Reaktion, das Zytoplasma läßt in der Regel eine schwache, gelegentlich auch eine deutliche Bindung des Lektins erkennen (s.Tabelle). Bei den Lymphozyten reagieren die Zellmembran und das Zytoplasma in den meisten Fällen schwach positiv. Die Granula dagegen zeigen eine deutlich positive Reaktion. Die Zellmembran der Monozyten weist in allen Fällen keine Bindung zu PSA-FITC auf, das Zytoplasma reagiert unterschiedlich, wobei die Reaktionsstärke von negativ bis schwach positiv variiert (s.Tabelle).

Tabelle 32: Einzelauswertung Lektine: PSA-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	0	0	100 %	0	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	12,5 %	87,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	0	0	100 %	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	85,7 %	14,3 %	0	0	70 %
Zytoplasma	0	71,4 %	28,6 %	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	70 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	80 %
Zytoplasma	12,5 %	87,5 %	0	0	80 %
Granula	0	0	100 %	0	80 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	70 %
Zytoplasma	28,6 %	57,1 %	14,3 %	0	70 %
Granula	0	28,6 %	71,4 %	0	70 %

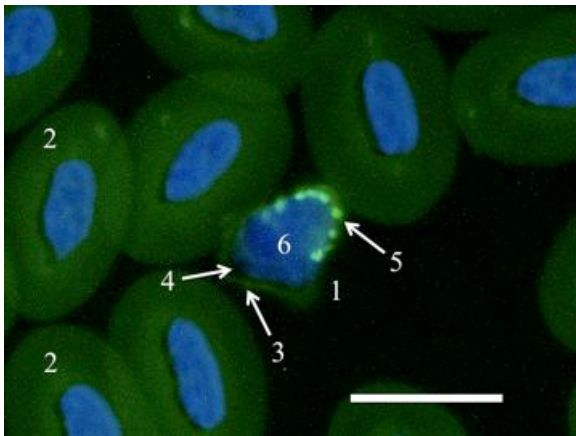


Abbildung 97: Thrombozyt

Strauß 26, männlich, 14 Monate, PSA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Thrombozyten (3) zeigt eine schwache Bindung zu dem Lektin. Das Zytoplasma (4) ist negativ. Eine deutliche Bindung zeigen dagegen die Granula des Thrombozyten (5). Ovaler Zellkern (6).

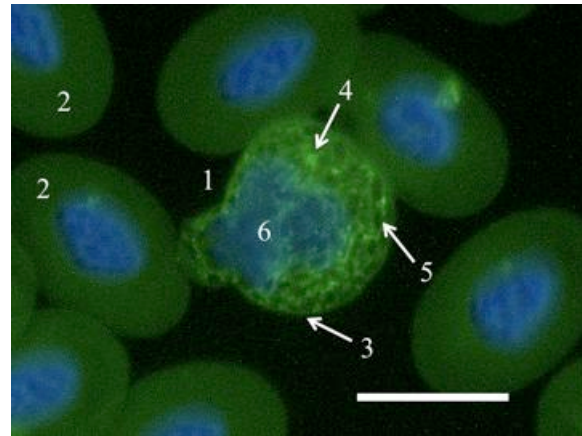


Abbildung 98: Heterophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, PSA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des heterophilen Granulozyten (3) ist schwach positiv, das Zytoplasma (4) zeigt eine deutliche Bindung zu PSA. Die zytoplasmatischen Granula (5) zeigen keine Bindung zu PSA-FITC. Zellkern (6).

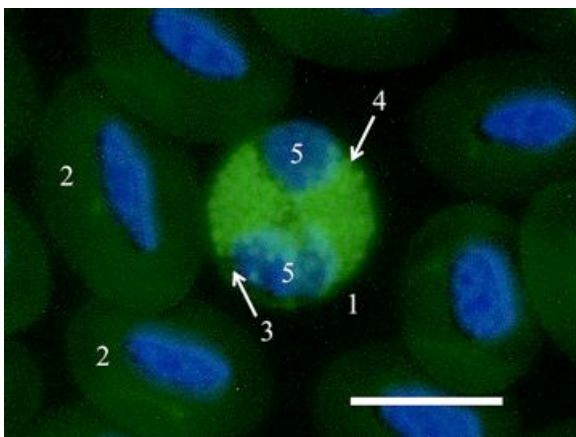


Abbildung 99: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 26, männlich, 14 Monate, PSA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (3) zeigt eine schwach positive Reaktion. Die Granula (4) binden PSA-FITC nicht, sie zeigen nur eine gelb-grüne Eigenfluoreszenz. Zweifach segmentierter Zellkern (5).

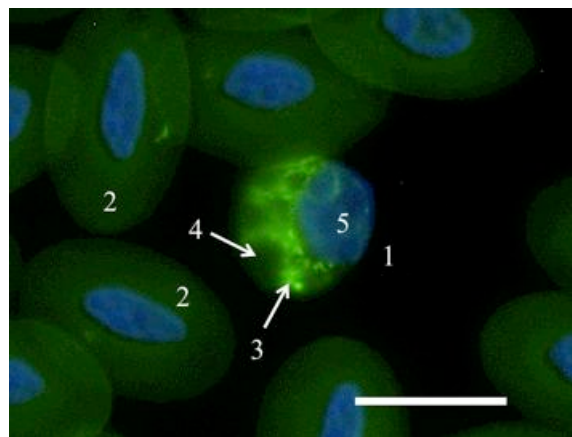


Abbildung 100: Basophiler Granulozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, PSA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Zellmembran und Granula des basophilen Granulozyten (4) zeigen eine negative, das Zytoplasma (3) weist dagegen eine deutliche Bindung von PSA-FITC auf. Zellkern (5).

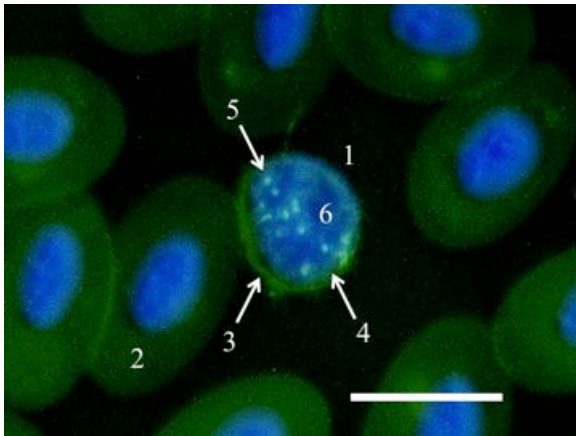


Abbildung 101: Lymphozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, PSA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Lymphozyten (3) und das Zytoplasma (4) reagieren schwach positiv mit dem Lektin. Die Granula (5) zeigen eine deutliche Bindung. Zellkern (6).

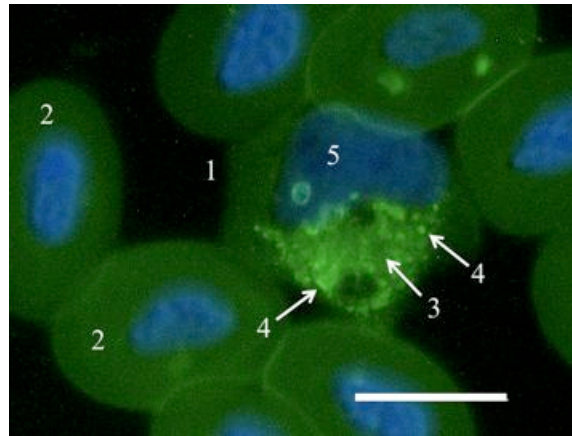


Abbildung 102: Monozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, PSA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des Monozyten (3) zeigt eine schwach positive Reaktion mit PSA-FITC. Das Lektin bindet sich deutlich an die zytoplasmatischen Granula (4). Nierenförmiger Zellkern (5).

## 4.5.2 Für Galaktose spezifische Lektine

### 4.5.2.1 Bindung von Peanut Agglutinin (PNA-FITC)

Die Zellmembran der Thrombozyten reagiert in den meisten Fällen nicht mit PNA-FITC. Das Zytoplasma zeigt überwiegend eine schwach positive Reaktion. Die Granula der Thrombozyten weisen eine schwach bis deutlich positive Bindung zu dem Lektin (s. Tabelle). Bei wenigen Präparaten ist eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten zu erkennen. Die Zellmembran reagiert in so gut wie allen Präparaten nicht mit PNA-FITC. Die Granula der Heterophilen reagieren nicht mit dem Lektin. Bei den basophilen Granulozyten reagiert die Zellmembran teilweise deutlich positiv. Im Zytoplasma sind schwach positive Reaktionen zu erkennen. Die Granula weisen keine Bindung des Lektins auf. Die Lymphozyten des Straußes binden PNA-FITC an Zellmembran und Zytoplasma mit schwacher Affinität. Die Granula reagieren dagegen deutlich positiv mit dem Lektin. Bei den Monozyten kann eine schwach positive Reaktion an den Granula festgestellt werden. Zytoplasma und Zellmembran der Monozyten des Straußes sind negativ. Erythrozyten und eosinophile Granulozyten zeigen keine Bindung zu PNA-FITC.

Tabelle 33: Einzelauswertung Lektine: PNA-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	75 %	25 %	0	0	80 %
Zytoplasma	37,5 %	62,5 %	0	0	80 %
Granula	50 %	25 %	25 %	0	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	87,5 %	12,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	50 %	50 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	20 %	20 %	60 %	0	50 %
Zytoplasma	40 %	60 %	0	0	50 %
Granula	100 %	0	0	0	50 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	62,5 %	37,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	25 %	75 %	0	0	80 %
Granula	25 %	25 %	50 %	0	80 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	75 %	25 %	0	0	80 %

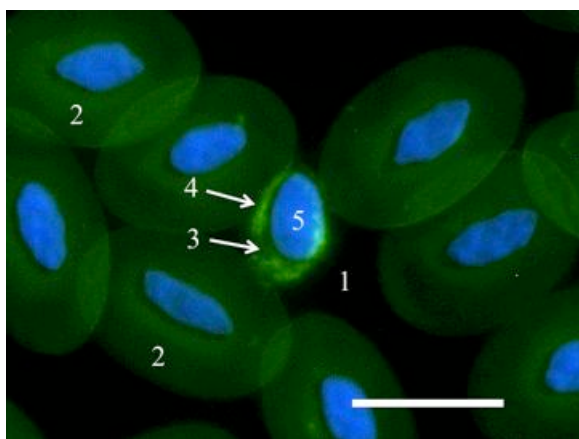


Abbildung 103: Thrombozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, PNA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Thrombozyten (3) ist eine schwache Fluoreszenz erkennbar. Die Granula (4) reagieren deutlich positiv mit PNA-FITC. Ovaler Zellkern (5).

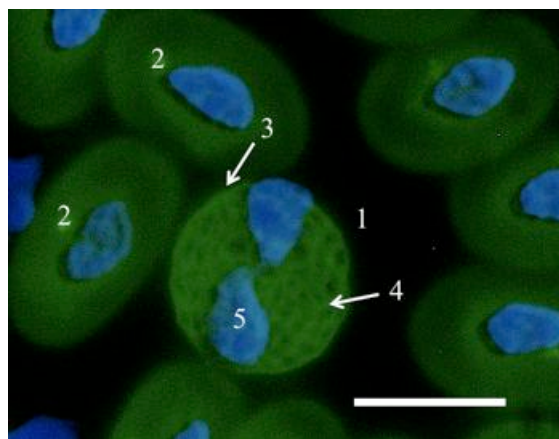


Abbildung 104: Heterophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, PNA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) und das Zytoplasma (4) binden PNA-FITC mit schwacher Affinität. Zweifach segmentierter Zellkern (5).

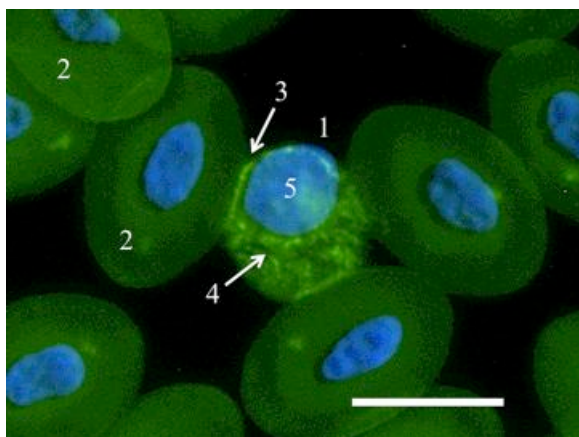


Abbildung 105: Basophiler Granulozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, PNA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) des basophilen Granulozyten zeigt eine deutliche Affinität zu PNA-FITC. Im Zytoplasma (4) kommt es zu einer schwach positiven Reaktion. Charakteristisch exzentrisch gelagerter Zellkern (5).

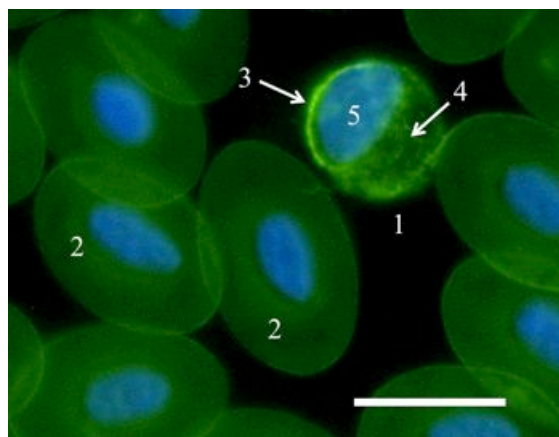


Abbildung 106: Basophiler Granulozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, PNA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). An der Zellmembran (3) des basophilen Granulozyten ist eine deutlich positive Bindung zu dem Lektin erkennbar. Das Zytoplasma (4) bindet PNA-FITC schwach. Typisch exzentrisch gelagerter Zellkern (5).



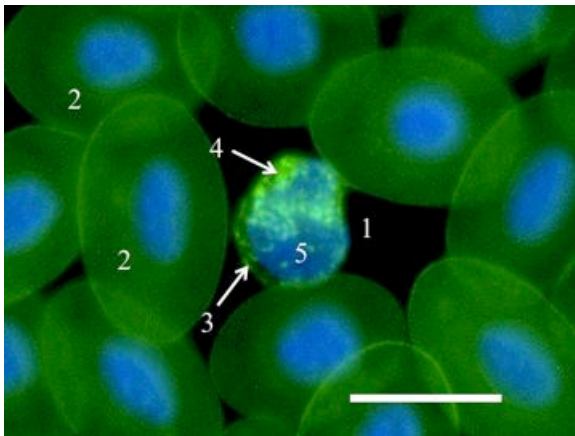


Abbildung 107: Lymphozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, PNA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran und das Zytoplasma des Lymphozyten (3) binden PNA-FITC schwach. Die Granula (4) binden das Lektin mit deutlicher Affinität. Zellkern des Lymphozyten (5).

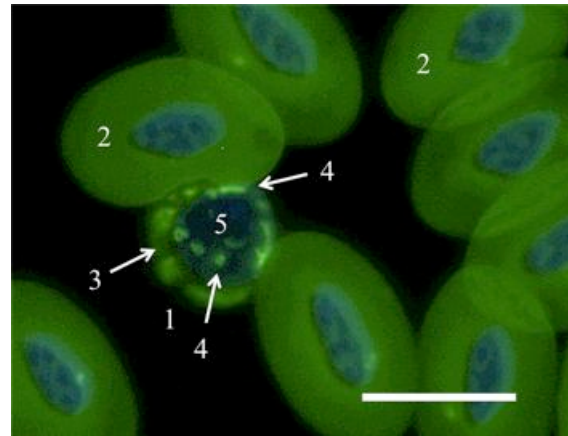


Abbildung 108: Lymphozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, PNA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des Lymphozyten (3) weist eine schwach positive Reaktion auf. Die Granula (4) zeigen eine deutliche Reaktion. Zellkern des Lymphozyten (5).

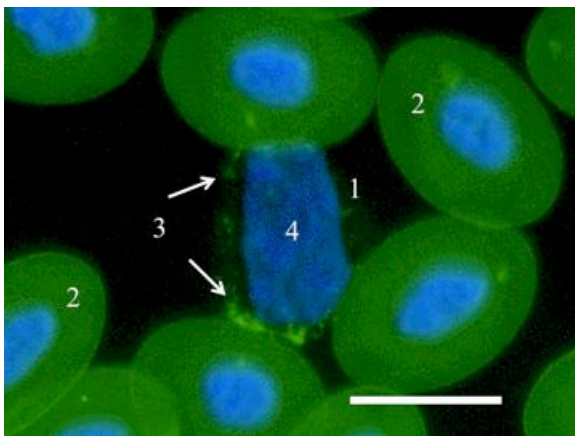


Abbildung 109: Monozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, PNA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Granula des Monozyten (3) weisen eine schwache Affinität zu PNA-FITC auf. Zytoplasma und Zellmembran des Monozyten sind negativ. Zellkern (4).

#### 4.5.2.2 Bindung von *Ricinus communis* Agglutinin (RCA-FITC)

Die Zellmembran der Erythrozyten zeigt in fast allen Präparaten keine Bindung zu dem Lektin. Im Bereich des Zytoplasmas kann ebenfalls keine positive Reaktion festgestellt werden. Bei den Thrombozyten reagiert die Zellmembran sowie die zytoplasmatischen Granula überwiegend negativ auf RCA-FITC, das Zytoplasma weist jedoch in einigen Fällen eine schwach positive Reaktion auf (s.Tabelle). Die Zellmembran und das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten bindet das Lektin mit einer überwiegend schwachen Affinität. Die Granula reagieren nicht mit RCA-FITC. Bei den eosinophilen Granulozyten kann an keiner Struktur eine Lektinbindung festgestellt werden. Bei den basophilen Granulozyten sind Zellmembran und Granula negativ, das Zytoplasma reagiert in allen Fällen schwach positiv. Bei den Lymphozyten reagiert die Zellmembran bis auf eine Ausnahme nicht mit dem Lektin. Das Zytoplasma zeigt sowohl negative wie auch schwach positive Reaktionen. Die Granula der Lymphozyten zeigen in einigen Fällen eine schwache bis deutliche Bindung zu RCA-FITC (s.Tabelle). Bei den Monozyten bindet das Lektin in keinem der Präparate an die Zellmembran. Im Zytoplasma kann in der Mehrzahl der Blutausrichthe eine schwache Bindung festgestellt werden während die Granula zum Teil auch deutliche Bindungen eingehen (s.Tabelle).

Tabelle 34: Einzelauswertung Lektine: RCA-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	87,5 %	12,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	75 %	25 %	0	0	80 %
Zytoplasma	25 %	75 %	0	0	80 %
Granula	75 %	25 %	0	0	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	12,5 %	75 %	12,5 %	0	80 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	70 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	60 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	60 %
Granula	100 %	0	0	0	60 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	87,5 %	12,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	37,5 %	62,5 %	0	0	80 %
Granula	37,5 %	37,5 %	25 %	0	80 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	60 %
Zytoplasma	33,3 %	66,7 %	0	0	60 %
Granula	33,3 %	33,3 %	33,4 %	0	60 %

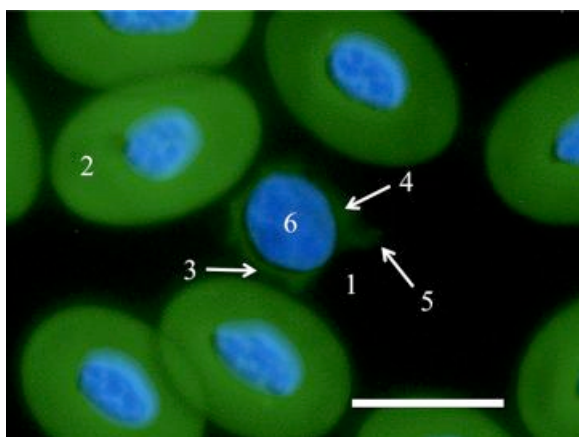


Abbildung 110: Thrombozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, RCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Thrombozyten (3) sowie das Zytoplasma (4) zeigen eine schwach positive Reaktion bis in die zytoplasmatische Ausläufer (5). Ovaler Zellkern (6).

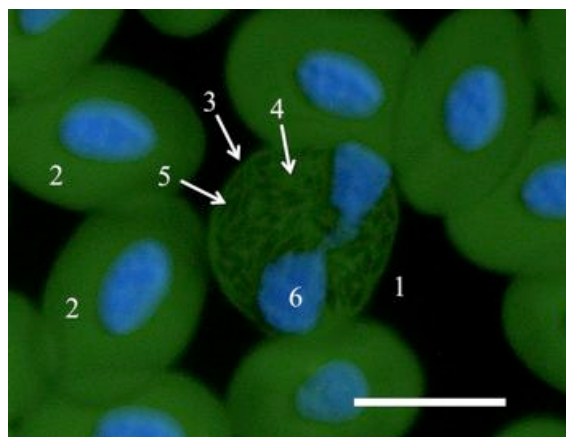


Abbildung 111: Heterophiler Granulozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, RCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Bereich der Zellmembran (3) und im Zytoplasma des heterophilen Granulozyten (4) sind schwach positive Reaktionen zu erkennen. Die Granula (5) reagieren nicht mit RCA-FITC. Zweifach segmentierter Zellkern (6).

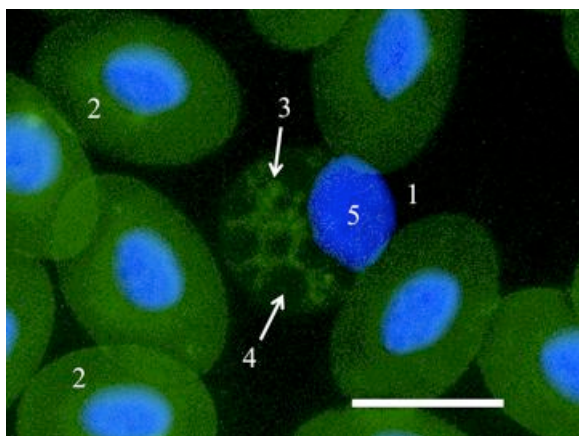


Abbildung 112: Basophiler Granulozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, RCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des basophilen Granulozyten (3) geht eine schwache Bindung mit dem Lektin ein. Die Granula (4) sind negativ. Ovaler Zellkern (5).

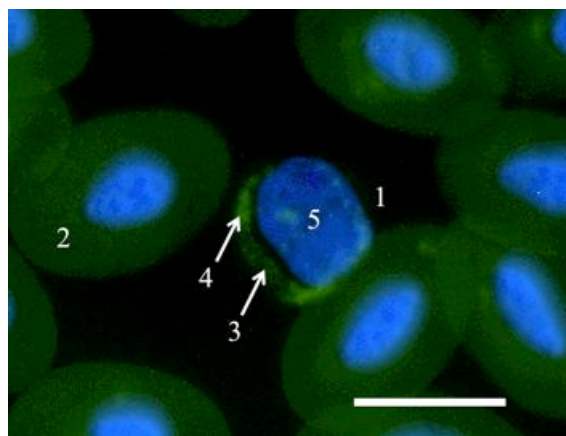


Abbildung 113: Lymphozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, RCA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des Lymphozyten (3) weist eine schwache Bindung, die Granula (4) eine deutliche Bindung zu RCA-FITC auf. Exzentrisch gelagerter Zellkern (5).

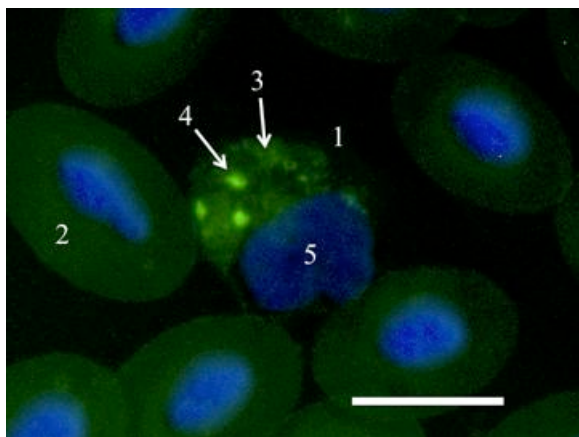


Abbildung 114: Monozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, RCA-FITC-Färbung,  
Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des  
Monozyten (3) reagiert schwach positiv mit RCA-FITC.  
Die zytoplasmatischen Granula (4) gehen eine deutliche  
Bindung mit dem Lektin ein. Zellkern (5).

#### 4.5.2.3 Bindung von *Viscum album* Agglutinin-Biotin (VAA-Biotin)

Die Blutzellen des Straußes reagieren nicht mit VAA-Biotin.

### **4.5.3 Für N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure spezifische Lektine**

#### **4.5.3.1 Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA-FITC)**

Die Zellmembran der Erythrozyten weist bei allen Ausstrichen eine schwach positive Reaktion auf. Das Zytoplasma der Erythrozyten zeigt eine schwache und diffuse Bindung zu WGA-FITC. Die Zellmembran der Thrombozyten, sowie das Zytoplasma erscheint in allen Präparaten schwach positiv. Die Granula der Thrombozyten zeigen eine deutlich positive Fluoreszenz. Die Zellmembran sowie das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten weist in fast allen Ausstrichen eine deutliche Bindung mit WGA-FITC auf, die Granula dagegen zeigen keine Fluoreszenz. Bei den eosinophilen Granulozyten kann an der Zellmembran eine schwach bis deutlich positive Bindung nachgewiesen werden (s. Tabelle). Das Zytoplasma reagiert negativ. Die Granula der eosinophilen Granulozyten reagieren positiv, wobei die Reaktionsstärke von deutlich bis stark positiv variiert. Die basophilen Granulozyten zeigen an der Zellmembran überwiegend eine schwache, zum Teil auch deutlich positive Reaktion auf (s. Tabelle). Das Zytoplasma zeigt ebenfalls in den meisten Fällen eine deutliche Bindung des Lektins. Die Granula sind negativ. Die Zellmembran und das Zytoplasma der Lymphozyten färben sich in allen Fällen schwach positiv an, während die Granula eine deutlich positive Reaktion zeigen. Bei den Monozyten kann in den meisten Präparaten eine schwache Bindung von WGA-FITC an der Zellmembran nachgewiesen werden (s. Tabelle). Das Zytoplasma zeigt sich in allen Ausstrichen schwach positiv, die Granula einheitlich deutlich positiv.

Tabelle 35: Einzelauswertung Lektine: WGA-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	0	100 %	0	0	90 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	90 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0	100 %	0	0	90 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	90 %
Granula	0	0	100 %	0	90 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	11,1 %	88,9 %	0	90 %
Zytoplasma	0	11,1 %	88,9 %	0	90 %
Granula	100 %	0	0	0	90 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	88,9 %	11,1 %	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	90 %
Granula	0	0	22,2 %	77,8 %	90 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	66,7 %	33,3 %	0	90 %
Zytoplasma	0	33,3 %	66,7 %	0	90 %
Granula	100 %	0	0	0	90 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	0	100 %	0	0	90 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	90 %
Granula	0	0	100 %	0	90 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	14,3 %	82,7 %	0	0	70 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	70 %
Granula	0	0	100 %	0	70 %

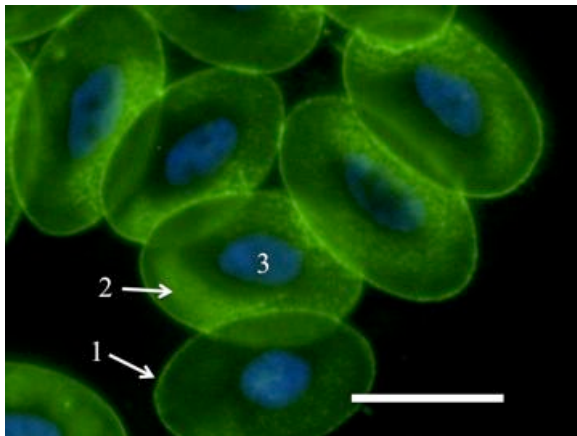


Abbildung 115: Erythrozyten

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, WGA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Reife Erythrozyten. Eine schwache Bindung des WGA-FITC ist an der Zellmembran (1), sowie eine diffuse, schwach positive Reaktion im Zytoplasma (2) der Erythrozyten zu erkennen. Ovaler Zellkern (3).

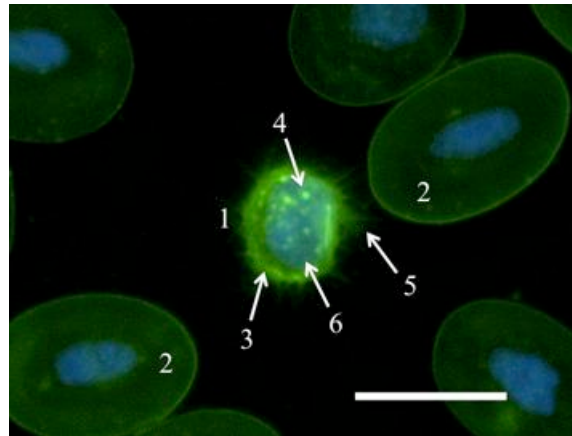


Abbildung 116: Thrombozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, WGA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Zellmembran und Zytoplasma (3) des Thrombozyten zeigen bis in die zytoplasmatischen Ausläufer (5) eine schwach positive Reaktion. Das Lektin reagiert deutlich positiv mit den zytoplasmatischen Granula (4). Ovaler Zellkern (6).

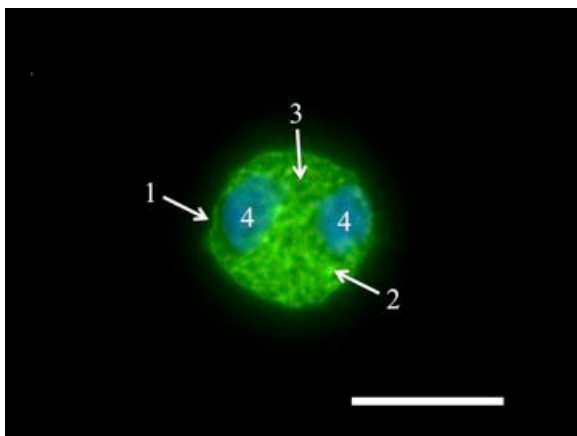


Abbildung 117: Heterophiler Granulozyt

Strauß 24, männlich, 14 Monate, WGA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt. Die Zellmembran (1) und das Zytoplasma des heterophilen Granulozyten (2) zeigen eine deutlich positive Reaktion, während die Granula (3) keine Bindung mit dem Lektin aufweist. Der Kern erscheint segmentiert (4), das Verbindungsstück befindet sich nicht im Fokus.

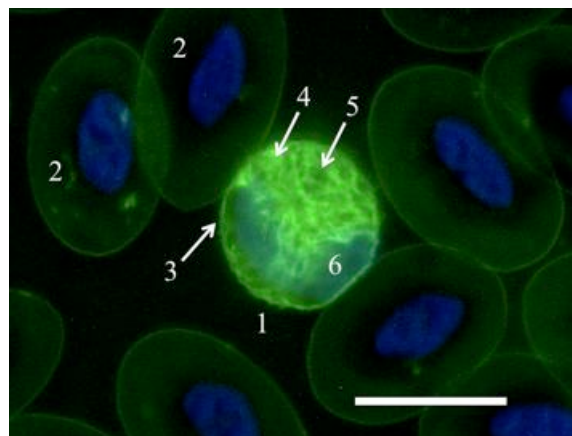


Abbildung 118: Heterophiler Granulozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, WGA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Auch hier geht WGA-FITC eine deutliche Bindung mit der Zellmembran (3) und dem Zytoplasma (4) des heterophilen Granulozyten ein, während die Granula (5) keine Reaktion zeigen. Zweifach segmentierter Zellkern (6).



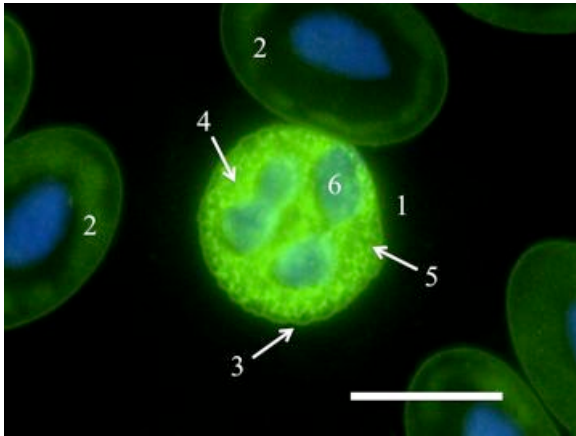


Abbildung 119: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, WGA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des eosinophilen Granulozyten (3) zeigt eine deutlich sichtbare Bindung mit dem Lektin, die Granula (4) fluoreszieren stark. Das Zytoplasma (5) zeigt keine Bindung zu WGA-FITC. Segmentierter Zellkern (6).

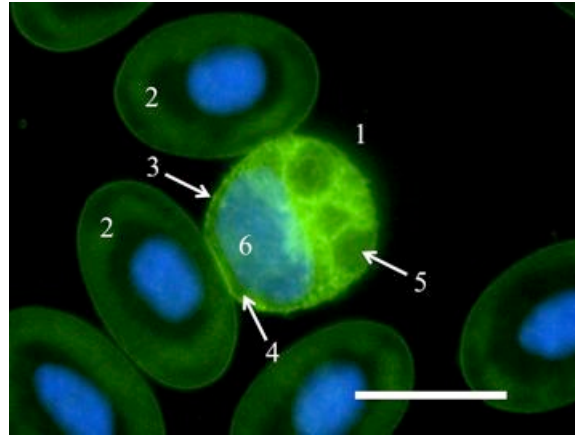


Abbildung 120: Basophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, WGA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). An der Zellmembran des basophilen Granulozyten (3) und im Zytoplasma (4) ist eine deutliche Reaktion mit dem Lektin zu erkennen. Die Granula (5) zeigen keine Reaktion mit WGA-FITC. Typisch exzentrisch gelagerter Zellkern (6).

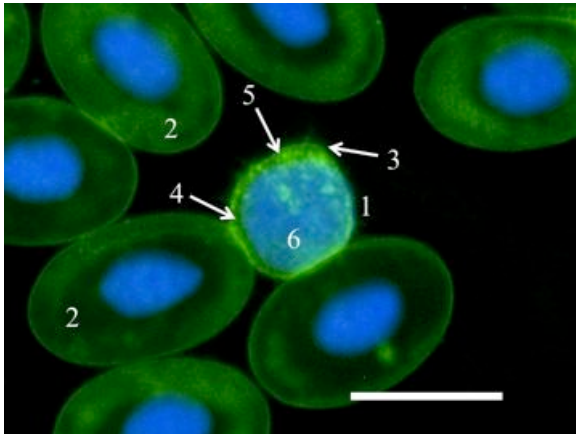


Abbildung 121: Lymphozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, WGA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) und das Zytoplasma (4) des Lymphozyten zeigen eine schwach positive, die Granula (5) eine deutlich positive Bindung zu WGA-FITC. Ovaler Zellkern (6).

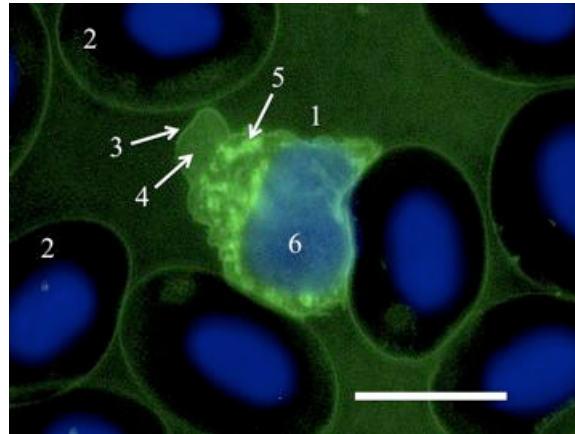


Abbildung 122: Monozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, WGA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Monozyten (3), sowie das Zytoplasma (4) zeigen eine schwach positive Bindung mit WGA-FITC, die zytoplasmatischen Granula (5) färben sich deutlich positiv an. Unsegmentierter, typisch bohnenförmiger Zellkern (6).

#### 4.5.3.2 Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs-FITC)

Es konnte in keinem Ausstrich eine Bindung des Lektins durch die Erythrozyten festgestellt werden. Bei den Thrombozyten zeigt sich dagegen in allen Präparaten eine schwach positive Reaktion an der Zellmembran. Die Granula der Thrombozyten heben sich vom schwach fluoreszierenden Zytoplasma deutlich bis stark hervor (s. Tabelle). Die Zellmembran und das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten zeigen eine starke Reaktion mit WGAs-FITC. Bei den Granula kann keine Fluoreszenz festgestellt werden. Die eosinophilen Granulozyten zeigen an der Zellmembran eine schwache bis deutliche Affinität des Lektins. Das Zytoplasma ist negativ. Die Granula der eosinophilen Granulozyten reagieren in den meisten Fällen deutlich positiv. Bei den basophilen Granulozyten kann eine überwiegend schwache Reaktion an der Zellmembran sowie im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Granula zeigen keine Bindung von WGAs-FITC. Bei den Lymphozyten sind im Bereich der Zellmembran zum Teil schwache, zum Teil deutlich positive Reaktionen zu erkennen (s. Tabelle), das Zytoplasma ist einheitlich schwach positiv. Die Granula der Lymphozyten gehen mehrheitlich eine deutliche Bindung zu WGAs-FITC ein. Bei den Monozyten färbt sich die Zellmembran überwiegend schwach positiv an, das Zytoplasma erscheint einheitlich negativ. Die Granula der Monozyten sind einheitlich schwach positiv.

Tabelle 36: Einzelauswertung Lektine: WGAs-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0	100 %	0	0	80 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	80 %
Granula	0	0	62,5 %	37,5 %	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	0	0	100 %	80 %
Zytoplasma	0	0	0	100 %	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	75 %	25 %	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	0	25 %	75 %	0	80 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	71,4 %	28,6 %	0	70 %
Zytoplasma	0	71,4 %	28,6 %	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	70 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	0	50 %	50 %	0	80 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	80 %
Granula	0	0	75 %	25 %	80 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	28,6 %	71,4 %	0	0	70 %
Zytoplasma	42,9 %	57,1 %	0	0	70 %
Granula	0	100 %	0	0	70 %

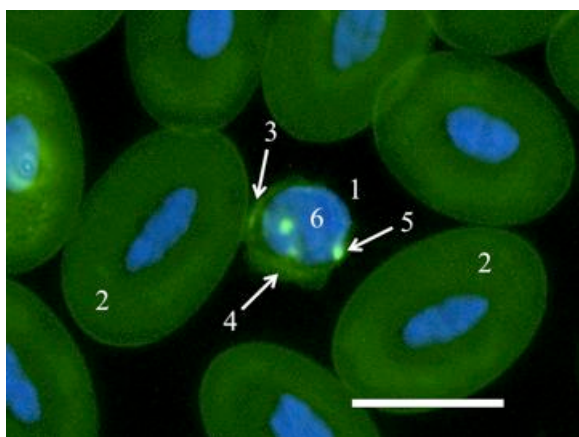


Abbildung 123: Thrombozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, WGAs-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). An der Zellmembran (3) und im Zytoplasma (4) des Thrombozyten ist eine schwache Reaktion zu erkennen. Die Granula (5) reagieren stark positiv mit WGAs-FITC. Die Erythrozyten (2) reagieren nicht mit dem Lektin. Ovaler Zellkern des Thrombozyten (6).

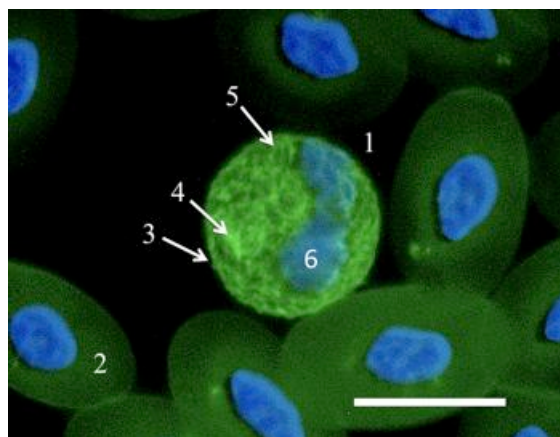


Abbildung 124: Heterophiler Granulozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, WGAs-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) sowie das Zytoplasma (4) des heterophilen Granulozyten zeigen eine starke Affinität zu WGAs-FITC. Die zytoplasmatischen Granula (5) sind negativ. Zellkern (6).

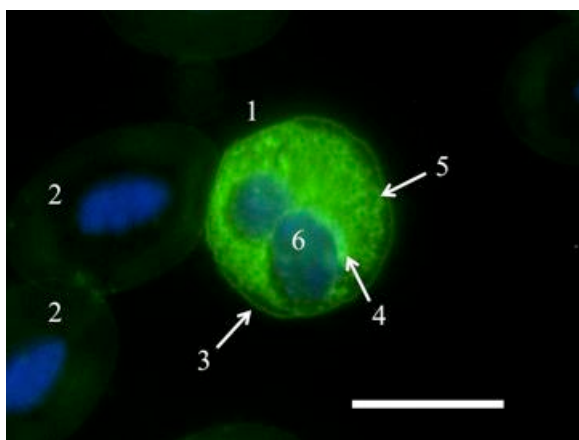


Abbildung 125: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 28, weiblich, 14 Monate, WGAs-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des eosinophilen Granulozyten (3) zeigt eine schwache, die Granula (4) dagegen weisen eine deutlich positive Reaktion auf. Das Zytoplasma (5) zeigt keine Reaktion mit WGAs-FITC. Zweifach segmentierter Zellkern (6).

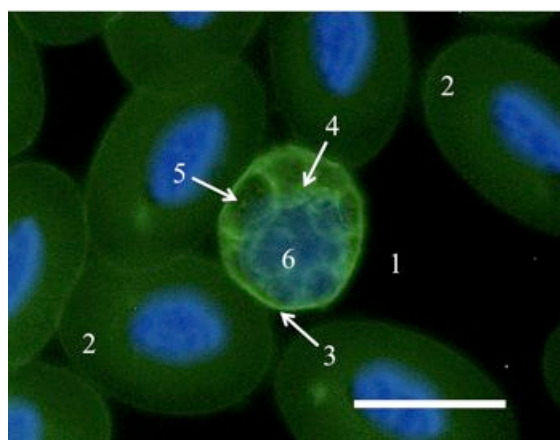


Abbildung 126: Basophiler Granulozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, WGAs-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) und das Zytoplasma (4) des basophilen Granulozyten zeigen eine deutliche Bindung von WGA-FITC. Die Granula (5) zeigen keine Reaktion. Typisch exzentrisch gelagerter Zellkern (6).

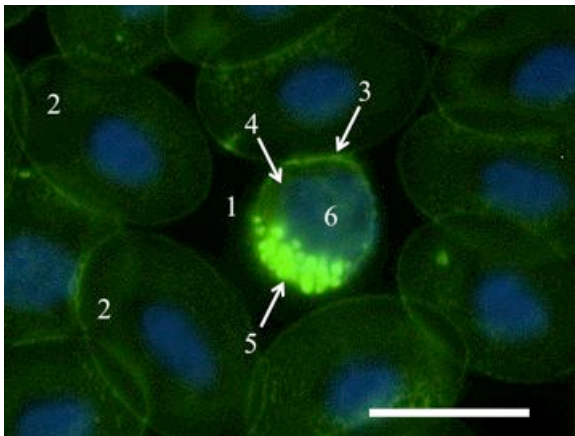


Abbildung 127: Lymphozyt

Strauß 28, weiblich, 14 Monate, WGAs- FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) sowie das Zytoplasma (4) des Lymphozyten zeigen eine schwache Bindung von WGAs-FITC. Die zytoplasmatischen Granula (5) reagieren stark positiv. Zellkern (6).

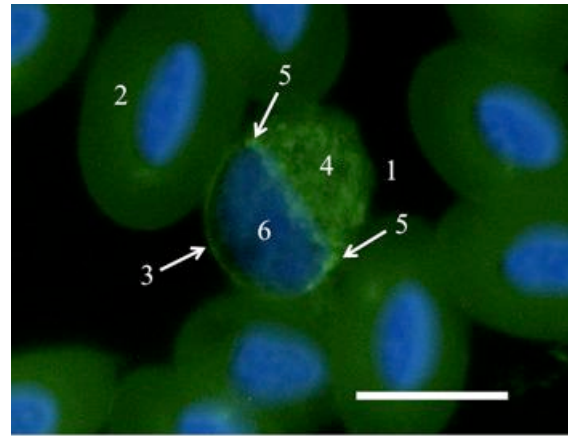


Abbildung 128: Monozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, WGAs-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Monozyten (3), sowie Zytoplasma (4) und Granula (5) reagieren allesamt im schwach positiven Bereich. Nierenförmiger Zellkern (6).

#### **4.5.4 Für N-Acetyl-Galaktosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure spezifische Lektine**

##### **4.5.4.1 Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA-FITC)**

Bei einem überwiegenden Teil der Präparate zeigen die Zellmembran und das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten eine schwache Affinität zu DBA-FITC. Die Granula sowie die übrigen Blutzellen des Straußes reagieren negativ.

Tabelle 37: Einzelauswertung Lektine: DBA-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	90 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	90 %
Granula	100 %	0	0	0	90 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	22,2 %	77,8 %	0	0	90 %
Zytoplasma	22,2 %	77,8 %	0	0	90 %
Granula	100 %	0	0	0	90 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	90 %
Granula	100 %	0	0	0	90 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	50 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	50 %
Granula	100 %	0	0	0	50 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	90 %
Granula	100 %	0	0	0	90 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	90 %
Granula	100 %	0	0	0	90 %

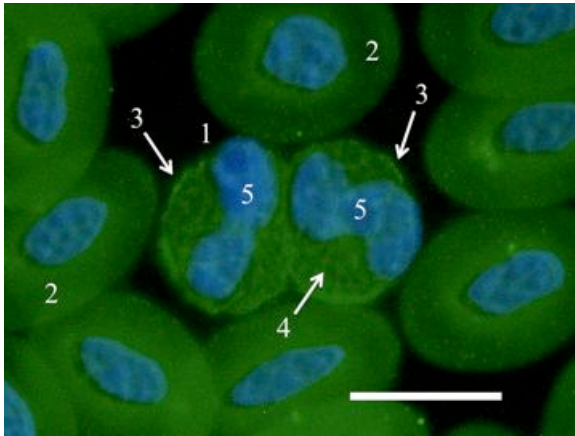


Abbildung 129: Heterophile Granulozyten

Strauß 30, männlich, 14 Monate, DBA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran der heterophilen Granulozyten (3) sowie das Zytoplasma (4) binden DBA-FITC mit schwacher Affinität. Zellkerne der heterophilen Granulozyten (5).

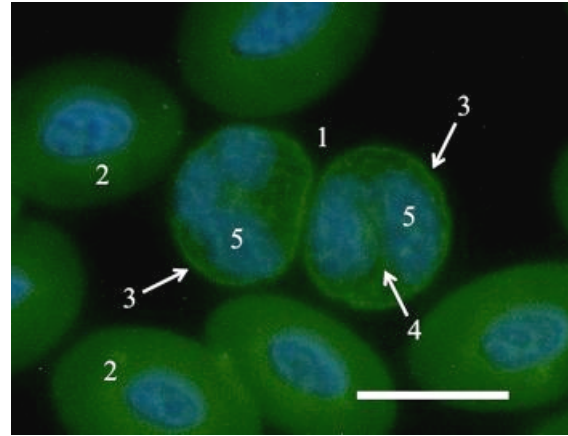


Abbildung 130: Heterophile Granulozyten

Strauß 30, männlich, 14 Monate, DBA-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran der heterophilen Granulozyten (3) und das Zytoplasma (4) zeigen eine schwach positive Reaktion. Zellkerne der heterophilen Granulozyten (5).

#### 4.5.4.2 Bindung von *Griffonia simplicifolia* Agglutinin (GSL-1-FITC)

Die Blutzellen des Straußes reagieren nicht mit GSL-1-FITC.

#### 4.5.4.3 Bindung von *Sophora japonica* Agglutinin (SJA-FITC)

Die Blutzellen des Straußes reagieren nicht mit SJA-FITC.



## **4.5.5 Für N-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose spezifische Lektine**

### **4.5.5.1 Bindung von Sambucus nigra Agglutinin-Biotin (SNA-Biotin)**

Die Zellmembran der Erythrozyten reagiert zum Großteil nicht mit SNA-Biotin. Das Zytoplasma ist negativ. Bei den Thrombozyten reagiert die Zellmembran teilweise schwach, teilweise deutlich bis stark mit dem Lektin. Das Zytoplasma und die Granula der Thrombozyten gehen eine überwiegend schwache Bindung mit SNA-Biotin ein. Bei den heterophilen Granulozyten sind im Bereich der Zellmembran deutlich bis stark positive Reaktionen zu erkennen. Das Zytoplasma weist eine einheitlich schwache Affinität auf. Die Granula der Heterophilen sind negativ. Die eosinophilen Granulozyten binden SNA-Biotin nur an der Zellmembran mit schwacher bis deutlicher Affinität (s. Tabelle). Bei den basophilen Granulozyten des Straußes ist nur im Bereich des Zytoplasmas eine schwach positive Reaktion zu erkennen. Zellmembran und Granula reagieren negativ. Die Lymphozyten zeigen an der Zellmembran eine teilweise schwache, teilweise deutlich starke Reaktion (s. Tabelle) während das Zytoplasma fast ausnahmslos schwach positiv reagiert. Die Granula der Lymphozyten sind SNA-negativ. Bei den Monozyten können nur vereinzelt schwach positive Reaktionen an Zellmembran und Granula nachgewiesen werden (s. Tabelle).

Tabelle 38: Einzelauswertung Lektine: SNA-Biotin

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	85,7 %	14,3 %	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	70 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0	57,1 %	28,6 %	14,3 %	70 %
Zytoplasma	14,3 %	85,7 %	0	0	70 %
Granula	14,3 %	71,4 %	14,3 %	0	70 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	28,6 %	42,8 %	28,6 %	70 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	70 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	57,1 %	42,9 %	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	70 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	50 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	50 %
Granula	100 %	0	0	0	50 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	0	57,1 %	42,9 %	0	70 %
Zytoplasma	14,3 %	85,7	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	70 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	80 %	20 %	0	0	50 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	50 %
Granula	80%	20 %	0	0	50 %

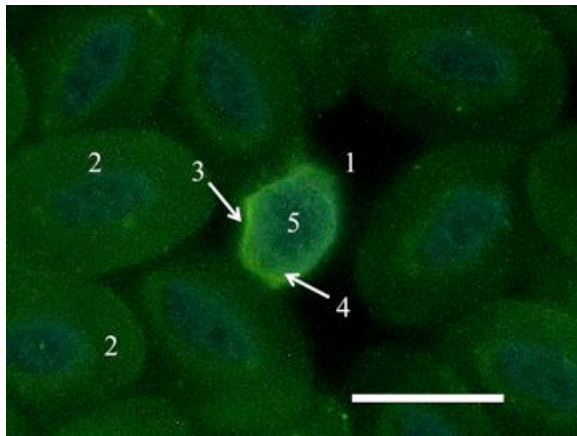


Abbildung 131: Thrombozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, SNA-Biotin-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des Thrombozyten (3) zeigt eine deutliche Bindung zu SNA-Biotin. Das Zytoplasma (4) ist schwach positiv. Zellkern (5).

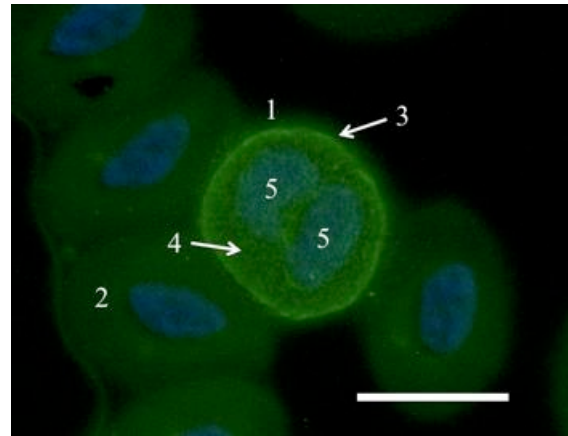


Abbildung 132: Heterophiler Granulozyt

Strauß 26, männlich, 14 Monate, SNA-Biotin-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). In diesem Präparat geht die Zellmembran (3) des heterophilen Granulozyten eine deutliche Bindung mit dem Lektin ein. Das Zytoplasma (4) ist schwach positiv. Zweifach segmentierter Zellkern (5/5). Die Verbindung des Zellkerns ist nicht im Fokus.

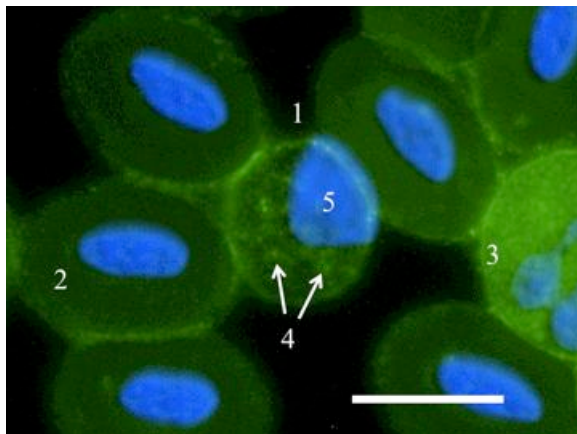


Abbildung 133: Basophiler Granulozyt

Strauß 26, männlich, 14 Monate, SNA-Biotin-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1), Erythrozyten (2) und eosinophiler Granulozyt (3). Das Zytoplasma des basophilen Granulozyten (4) zeigt eine schwach positive Reaktion. Typisch exzentrisch gelagerter Zellkern (5).

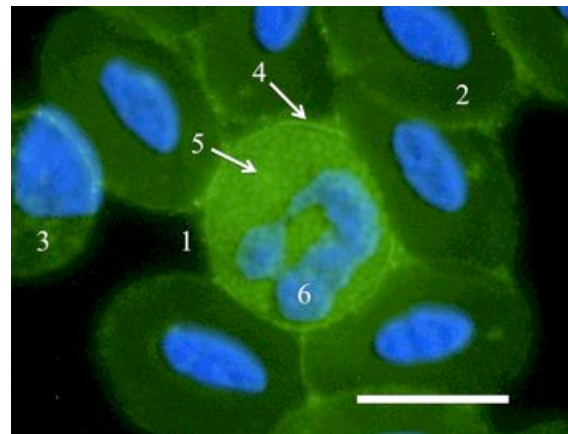


Abbildung 134: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, SNA-Biotin-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1), Erythrozyten (2) und basophiler Granulozyt (3). Die Zellmembran des eosinophilen Granulozyten (4) zeigt eine deutliche Bindung zu dem Lektin ein. Runde SNA-positive Granula (5); Segmentierter Zellkern (6).

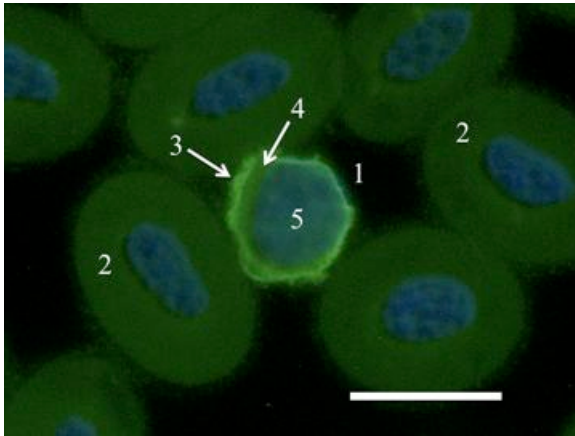


Abbildung 135: Lymphozyt

Strauß 26, 14 Monate, SNA-Biotin-Färbung,  
Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). An der Zellmembran (3) des Lymphozyten ist eine deutlich positive Reaktion zu erkennen. Das Zytoplasma zeigt eine schwache Bindung zu dem Lektin. Der Zellkern (5) füllt bis auf einen Randsaum fast das gesamte Zytoplasma aus.

#### 4.5.5.2 Bindung von Glycine max Agglutinin (SBA-FITC)

Die Blutzellen des Straußes reagieren nicht mit SBA-FITC.

## **4.5.6 Für Fukose spezifische Lektine**

### **4.5.6.1 Bindung von *Ulex europaeus* Agglutinin (UEA-1-FITC)**

Die heterophilen Granulozyten sind die einzigen Blutzellen bei welchen positive Reaktionen beobachtet werden konnten. Die Zellmembran bindet das Lektin mit überwiegend schwacher, in wenigen Fällen deutlicher Affinität (s. Tabelle). Zum Teil verläuft die Reaktion aber auch negativ. Im Bereich des Zytoplasmas kann nur vereinzelt eine schwache Bindung von UEA-1-FITC festgestellt werden. Die Granula sowie die restlichen Blutzellen sind reaktionslos.

Tabelle 39: Einzelauswertung Lektine: UEA-1-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	25 %	50 %	25 %	0	80 %
Zytoplasma	75 %	25 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %

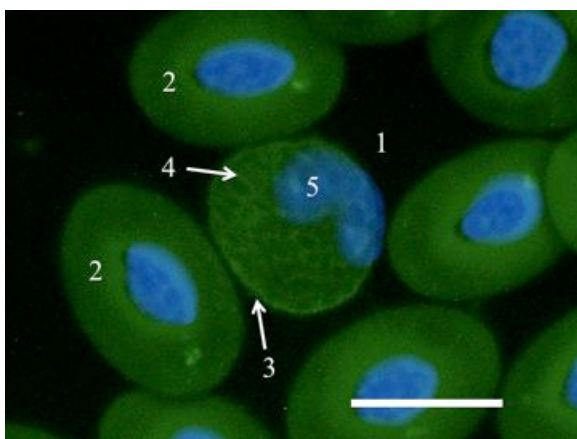


Abbildung 136: Heterophiler Granulozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, UEA-1-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Bereich der Zellmembran (3) und des Zytoplasmas (4) des heterophilen Granulozyten ist eine schwache Bindung zu dem Lektin erkennbar. Zellkern (5).

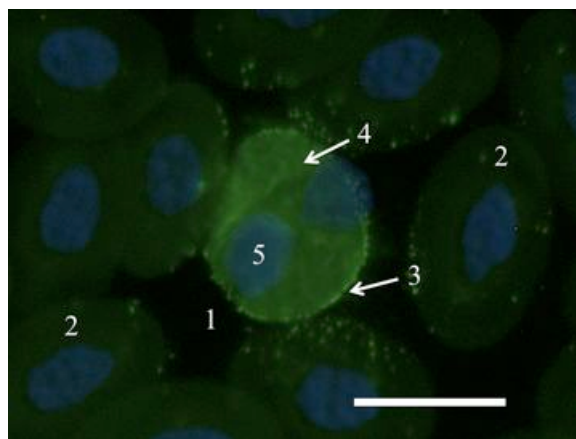


Abbildung 137: Heterophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, UEA-1-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) des heterophilen Granulozyten zeigt eine deutlich positive Reaktion. Das Zytoplasma (4) geht eine schwache Bindung mit UEA-1-FITC ein. Zellkern (5).

## 4.5.7 Für definierte Oligosaccharide spezifische Lektine

### 4.5.7.1 Bindung von *Phaseolus vulgaris* (PHA-E-FITC)

In keinem der Präparate reagieren die Erythrozyten mit dem Lektin. Bei den Thrombozyten weist die Zellmembran überwiegend eine deutlich positive Reaktion auf. Das Zytoplasma reagiert einerseits negativ, andererseits schwach bis deutlich positiv (s.Tabelle). Auch bei den Granula der Thrombozyten treten unterschiedliche Reaktionen auf. In einigen Fällen reagieren sie gar nicht mit PHL-E-FITC, in anderen Fällen zeigen sie eine schwache sowie deutliche und sogar stark positive Reaktion (s.Tabelle). Auch an die Zellmembran der heterophilen Granulozyten bindet das Lektin mit unterschiedlicher Intensität. Im Bereich des Zytoplasmas zeigt sich relativ einheitlich eine schwach positive Reaktion. Die Granula sind in allen Blutaussstrichen negativ. Die eosinophilen und basophilen Granulozyten reagieren nicht mit PHA-E-FITC. Die Zellmembran der Lymphozyten ist bis auf wenige Ausnahmen, bei welchen eine schwache Bindung festgestellt wurde, negativ (s.Tabelle). Das Zytoplasma zeigt in der Hälfte der Präparate eine negative, in der anderen Hälfte eine schwach positive Reaktion. Die Granula der Lymphozyten weisen keine Affinität zu dem Lektin auf. Es konnte in keinem Präparat eine Bindung von PHA-E-FITC an die Zellmembran der Monozyten nachgewiesen werden. Auch Zytoplasma und Granula reagieren bis auf wenige Ausnahmen negativ (s.Tabelle).



Tabelle 40: Einzelauswertung Lektine: PHA-E-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	37,5 %	0	62,5 %	0	80 %
Zytoplasma	37,5 %	25 %	37,5 %	0	80 %
Granula	37,5 %	12,5 %	37,5 %	12,5 %	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	25 %	50 %	25%	0	80 %
Zytoplasma	37,5 %	62,5 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	75 %	25 %	0	0	80 %
Zytoplasma	50 %	50 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	62,5 %	37,5 %	0	0	80 %
Granula	87,5 %	12,5 %	0	0	80 %

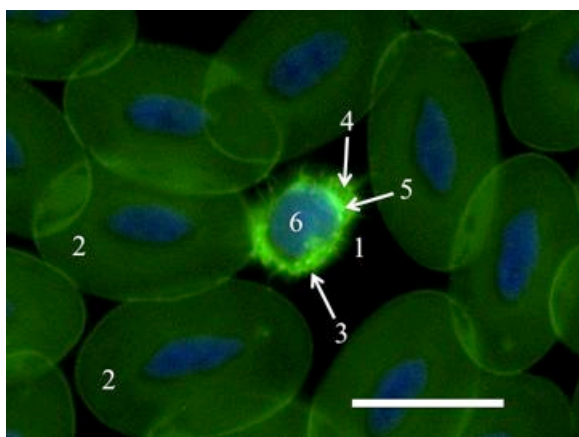


Abbildung 138: Thrombozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, PHA-E-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) und das Zytoplasma (4) des Thrombozyten zeigen eine deutliche Affinität zu PHA-E-FITC. Die spezifischen Granula (5) reagieren stark positiv mit dem Lektin. Ovaler Zellkern (6).

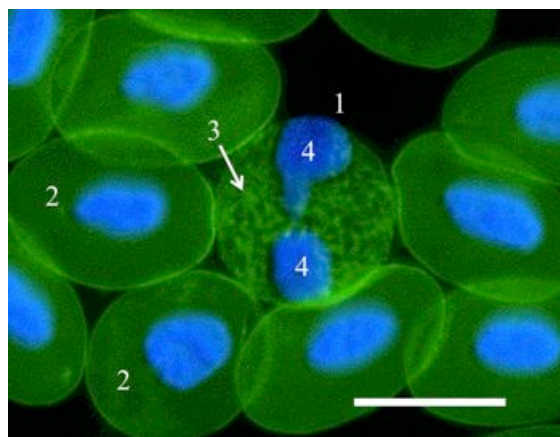


Abbildung 139: Heterophiler Granulozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, PHA-E-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten zeigt eine schwach positive Reaktion. Zweifach segmentierter Zellkern (4).

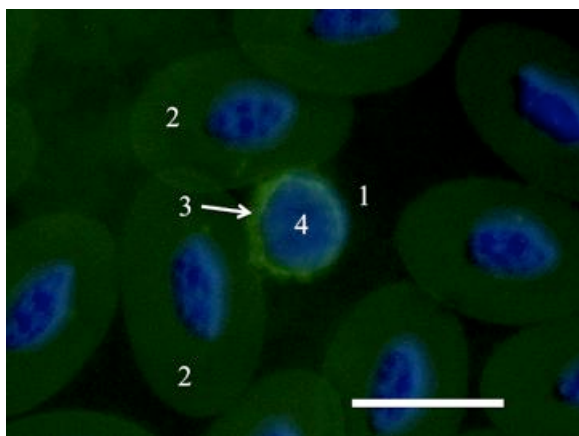


Abbildung 140: Lymphozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, PHA-E-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Das Zytoplasma des Lymphozyten (3) geht eine schwache Bindung mit PHA-E-FITC ein. Ovaler Zellkern (4).

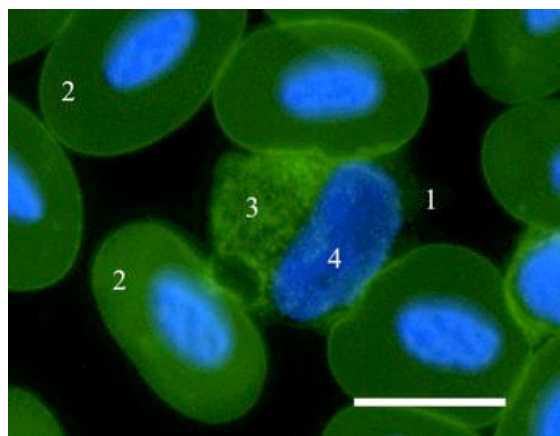


Abbildung 141: Monozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, PHA-E-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Nur das Zytoplasma des Monozyten (3) weist eine schwache Bindung zu PHA-E-FITC auf. Membran und Granula zeigen keine Reaktion. Nierenförmiger Zellkern (4).

#### **4.5.7.2 Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin (PHA-L-FITC)**

Zellmembran und Zytoplasma der Erythrozyten reagieren in allen Präparaten negativ. Die Zellmembran, Granula sowie das Zytoplasma der Thrombozyten färben sich dagegen überwiegend schwach positiv an (s. Tabelle). Bei den heterophilen Granulozyten zeigt PHA-L-FITC einheitlich eine schwache Affinität zu Zellmembran und Zytoplasma. An den Granula kann keine Fluoreszenz festgestellt werden. Basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten sind PHA-L-FITC negativ.

Tabelle 41: Einzelauswertung Lektine: PHA-L-FITC

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0	37,5 %	62,5 %	0	80 %
Zytoplasma	0	37,5 %	62,5 %	0	80 %
Granula	0	0	87,5%	12,5%	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0	100 %	0	0	80 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Membran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Membran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %

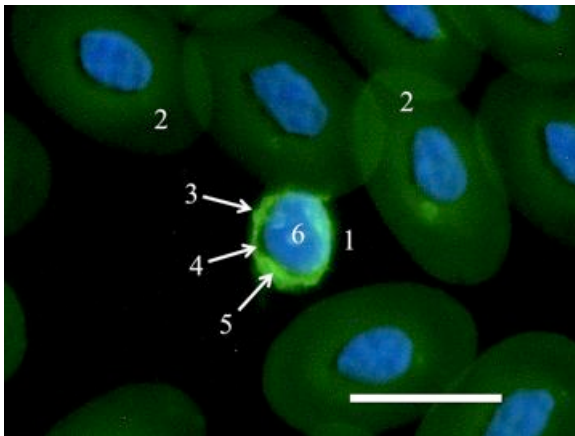


Abbildung 142: Thrombozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, PHA-L-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) und die zytoplasmatischen Granula (5) zeigen eine deutlich positive Reaktion. Im Bereich des Zytoplasmas (4) bindet das Lektin nur schwach. Ovaler Zellkern (6).

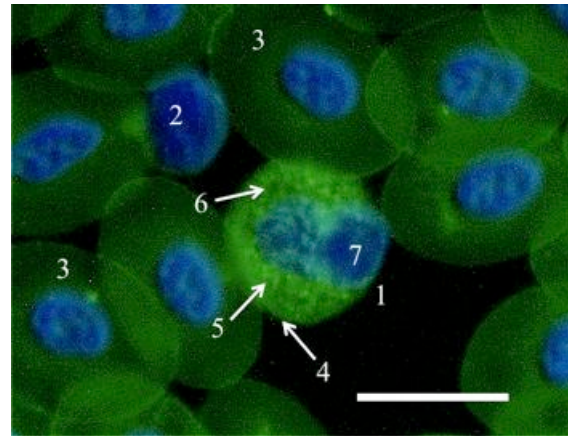


Abbildung 143: Heterophiler Granulozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, PHA-L-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1), Lymphozyt (2) und Erythrozyten (3). Die Zellmembran (4) und das Zytoplasma (5) zeigen eine schwach positive Bindung von PHA-L-FITC, die Granula (6) reagieren negativ. Zellkern (7).

#### **4.4.7.3 Bindung von Maackia amurensis Agglutinin (MAA-Biotin)**

Die Zellmembran und das Zytoplasma der heterophilen und basophilen Granulozyten binden MAA-Biotin überwiegend mit schwacher Affinität. Bei den eosinophilen Granulozyten sind im Bereich der Zellmembran schwach bis deutlich positive Reaktionen zu erkennen. Die Granula sowie die restlichen Blutzellen zeigen keine Bindung von MAA-Biotin.

Tabelle 42: Einzelauswertung Lektine: MAA-Biotin

	Stärke der positiven Reaktion				Positive Präparate
	0 (-)	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>					
Membran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
<b>Thrombozyten</b>					
Membran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Membran	12,5 %	87,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	12,5 %	87,5 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Membran	12,5 %	50 %	37,5 %	0	80 %
Zytoplasma	87,5 %	12,5 %	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Membran	33,3 %	66,7 %	0	0	30 %
Zytoplasma	33,3 %	66,7 %	0	0	30 %
Granula	100 %	0	0	0	30 %
<b>Lymphozyten</b>					
Membran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %
<b>Monozyten</b>					
Membran	100 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	80 %

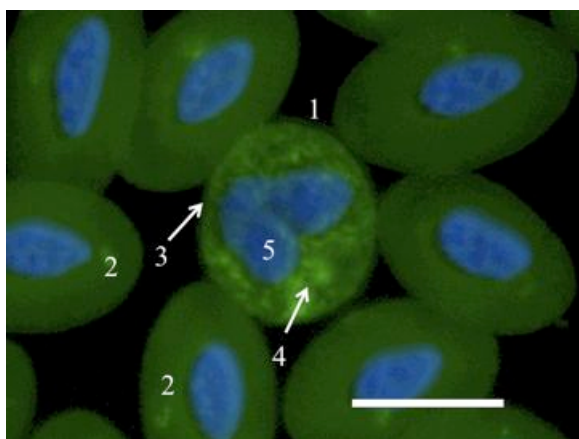


Abbildung 144: Heterophiler Granulozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, MAA-Biotin-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) und das Zytoplasma (4) zeigen eine schwach positive Reaktion. Zellkern (5).

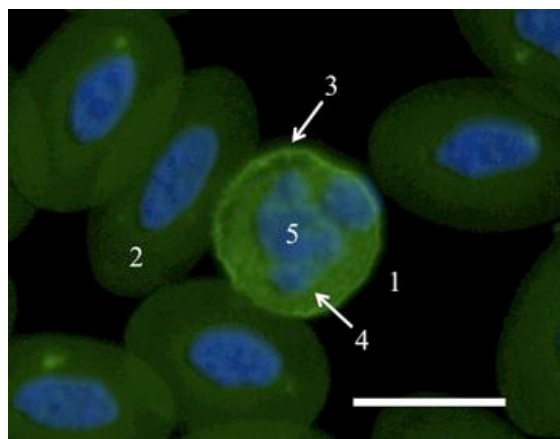


Abbildung 145: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 30, männlich, 14 Monate, MAA-Biotin-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des eosinophilen Granulozyten (3) bindet MAA-Biotin mit deutlicher Affinität. Das Zytoplasma (4) weist eine schwache Bindung auf. Zellkern (5).

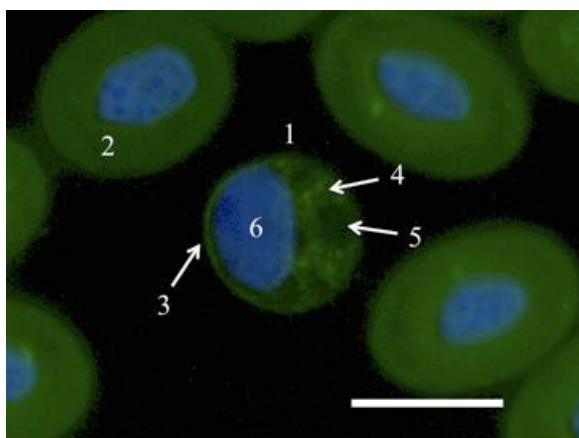


Abbildung 146: Basophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, MAA-Biotin-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran des basophilen Granulozyten (3) und das Zytoplasma (4) weisen eine schwach positive Reaktion auf. Die Granula (5) sind negativ. Typisch exzentrisch gelagerter Zellkern (6).



#### 4.5.8 Ergebnisse der Vorbehandlung mit Hemmzucker

Die Lektine WGA, WGAs, ConA, LCA, PSA und PHA-E wurden mit ihrem spezifischen Hemmzucker bzw. bei PHA-E mit Essigsäure vorinkubiert und anschließend auf jeweils drei Blutausstriche aufgetragen. Im Falle von WGA und PSA reagieren die Lektine schwach positiv, bei den Versuchen mit WGAs, PHA-E, ConA und LCA kann keine Bindung des Lektins nachgewiesen werden. Die Kontrollen zeigen ausnahmslos eine stark positive Reaktion. Somit kann gezeigt werden, dass die Bindung des Lektins an die Zuckerstrukturen der Blutzellen durch die entsprechenden Hemmzucker stark abgeschwächt beziehungsweise verhindert werden kann. Dies soll am folgenden Beispiel des Lektins ConA verdeutlicht werden. Abbildung 147 zeigt den Versuch mit dem spezifischen Hemmzucker Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside vorbehandelten ConA-FITC, Abbildung 148 die Kontrolle ohne Vorbehandlung mit Hemmzucker.

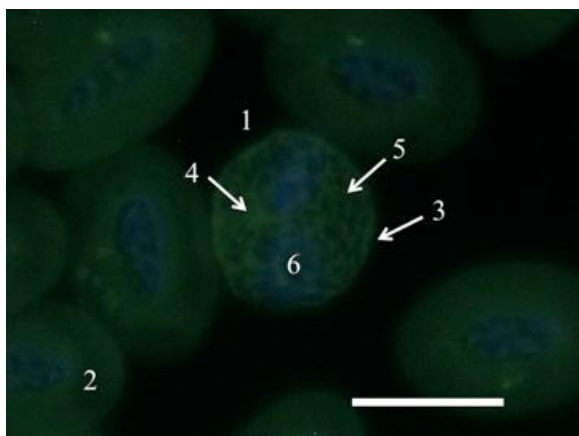


Abbildung 147: Heterophiler Granulozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, ConA-FITC mit Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10  $\mu$ m

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) und das Zytoplasma (4) zeigen eine unspezifische, kaum sichtbare Eigenfluoreszenz. Die zytoplasmatischen Granula (5) zeigen ebenfalls keine Bindung zu ConA-FITC. Zellkern (6). Insgesamt ist die Affinität zu ConA-FITC im Vergleich zur Kontrolle deutlich sichtbar blockiert.

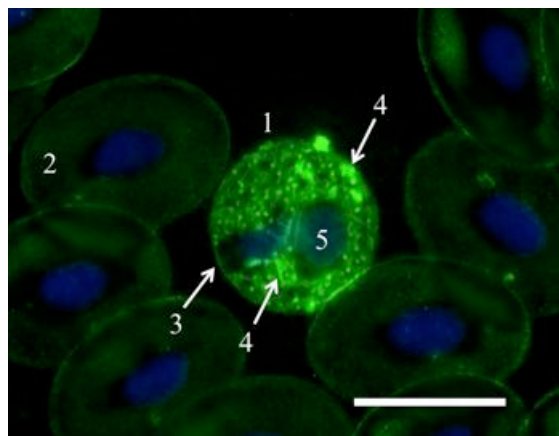


Abbildung 148: Heterophiler Granulozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, ConA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10  $\mu$ m

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Die Zellmembran (3) des heterophilen Granulozyten ist deutlich positiv, das Zytoplasma (4) zeigt eine stark positive Reaktion. Segmentierter Zellkern (5).

#### 4.5.9 Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase

Mithilfe dieser Methode soll herausgefunden werden, ob nach vorheriger Behandlung der Blutausstriche mit Neuraminidase Lektine in der Lage sind, mit den vorher durch Sialinsäure maskierten Zuckerstrukturen der Blutzellen zu reagieren. Jeweils drei Objektträgern wurden mit Neuraminidase vorbehandelt, mit dem jeweiligen Lektin inkubiert und schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Als Kontrolle wurde jeweils ein Blutausstrich nur mit Lektinlösung behandelt.

Die Blutzellen reagieren wie beschrieben nicht mit den Lektinen SJA, SBA und GSL-1. Bei PNA zeigt sich eine schwache Reaktion. Für SJA, SBA und GSL-1 wird nach Neuraminidasevorbehandlung eine deutliche bis starke Bindung bei den heterophilen Granulozyten beobachtet. Die übrigen Blutzellen zeigen keine Bindung der Lektine.

Bei dem Lektin PNA kommt es ohne Neuraminidasevorbehandlung zu schwach positiven Reaktionen bei Thrombozyten, heterophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten sowie negativen Reaktionen bei Erythrozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten. Die Erythrozyten zeigen nach der Behandlung mit Neuraminidase schwach positive Reaktionen im Bereich der Membran sowie im Zytoplasma. Die heterophilen Granulozyten reagieren deutlich bis stark positiv mit PNA-FITC. Die restlichen Blutzellen zeigen keine Veränderung ihres Bindungsverhaltens.

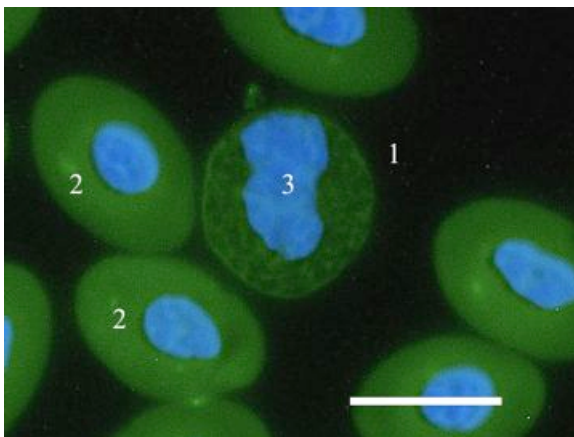


Abbildung 149: Heterophiler Granulozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, SBA-FITC-Färbung ohne Neuraminidase-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Der heterophile Granulozyt (1) zeigt keine Bindung zu SBA-FITC. Zellkern (3).

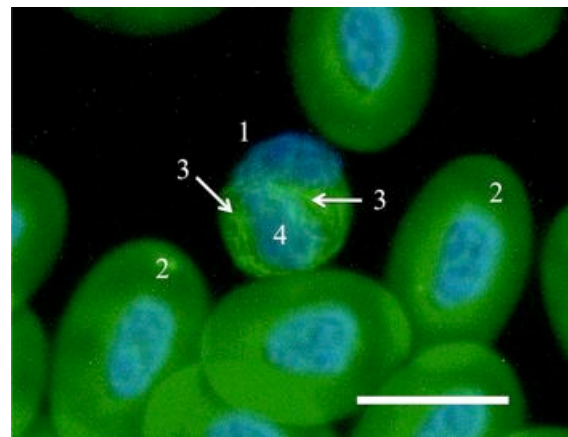


Abbildung 150: Heterophiler Granulozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, SBA-FITC-Färbung mit Neuraminidase-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2) aus dem Blut desselben Straußes. Nach NM-Behandlung bindet das Zytoplasma (3) des heterophilen Granulozyten SBA-FITC mit deutlicher Affinität. Zellkern (4).

## 4.6 Untersuchung des Zytoskelettes

### 4.6.1 Aktin

Rot fluoreszierendes Phalloidin-TRITC bindet 1:1 an polymerisiertes, filamentöses F-Aktin. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert direkt mit der Menge an zellulärem F-Aktin (Carulli et al., 2006).

Bei den Erythrozyten kann nur teilweise und schwach eine positive Reaktion im Bereich der Zellmembran festgestellt werden. Die Thrombozyten binden sehr stark das TRITC-gekoppelte Phalloidin. Besonders auffällig ist, dass die Reaktion bis in die zum Teil weit verzweigten zytoplasmatischen Ausläufer zu erkennen ist. Die heterophilen Granulozyten zeigen im Bereich der Zellmembran sowie im Zytoplasma ebenfalls eine überwiegend starke Affinität gegenüber Phalloidin-TRITC. Hier kann jedoch teilweise eine netzartige Struktur festgestellt werden. Um die eosinophilen Granulozyten sicher von den heterophilen Granulozyten zu unterscheiden, wurde beim Fluoreszenzmikroskop auf DAPI-Filter umgestellt, da in dieser Einstellung die charakteristische gelbliche Eigenfluoreszenz und die runde Form der Granula besser zu erkennen ist. Nach Identifizierung und nachfolgendem Wechsel auf TRITC-Filter zeigen Zellmembran und Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten ebenfalls eine starke Bindung des Phalloidin-TRITC an Zellmembran und Zytoplasma. Auch hier kann teilweise eine netzförmige Struktur festgestellt werden. Die basophilen Granulozyten binden Phalloidin-TRITC gleichmäßig im Bereich der Zellmembran und dem Zytoplasma aber etwas schwächer als bei den übrigen Blutzellen. Phalloidin-TRITC bindet überwiegend deutlich an Zellmembran und Zytoplasma der Lymphozyten. Bei diesem Zelltyp kann am besten die filamentöse bis netzartige Struktur dargestellt werden. Auch bei den Monozyten bindet das TRITC-gekoppelte Toxin im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas.

Tabelle 43: Einzelauswertung Zytoskelett: Aktin

Zytoskelett	Stärke der Reaktion				Positive Präparate
	0	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>	60 %	40 %	0	0	100 %
<b>Thrombozyten</b>	0	0	0	100 %	100 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>	0	0	20 %	80 %	100 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	0	0	40 %	60 %	100 %
<b>Basophile Granulozyten</b>	0	0	100 %	0	100 %
<b>Lymphozyten</b>	0	0	60 %	40 %	100 %
<b>Monozyten</b>	0	0	88,9 %	11,1 %	90 %

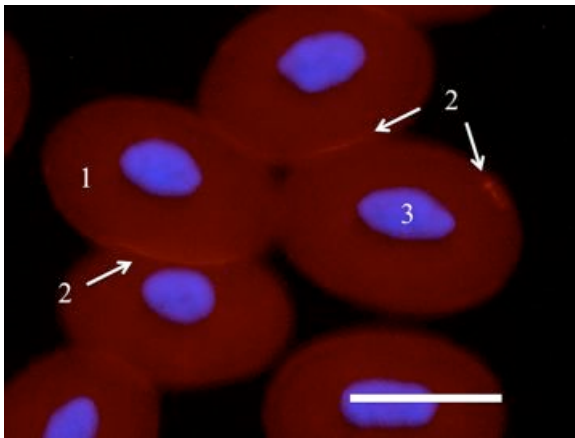


Abbildung 151: Erythrozyten

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, Phalloidin-TRITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Erythrozyten (1). Teilweise kann im Bereich der Zellmembran der Erythrozyten (2) eine schwach positive Reaktion nachgewiesen werden. Zellkern (3).

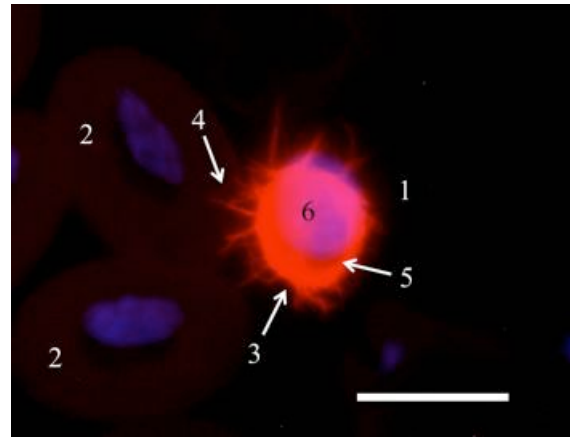


Abbildung 152: Thrombozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, Phalloidin-TRITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). In der Region direkt unter der Zellmembran der Thrombozyten (3) bis in die Pseudopodien (4) sowie im Zytoplasma (5) ist eine stark positive Reaktion erkennbar. Zellkern (6).

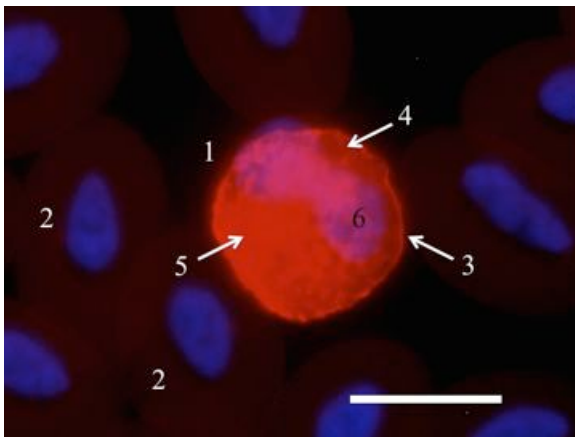


Abbildung 153: Heterophiler Granulozyt

Strauß 30, weiblich, 14 Monate, Phalloidin-TRITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). An der Zellmembran des heterophilen Granulozyten (3) sowie netzförmig im Zytoplasma (4) ist eine starke Bindung zu sehen. Die Granula (5) sind negativ und leuchten aufgrund einer Eigenfluoreszenz. Zweifach gelappter Zellkern (6).

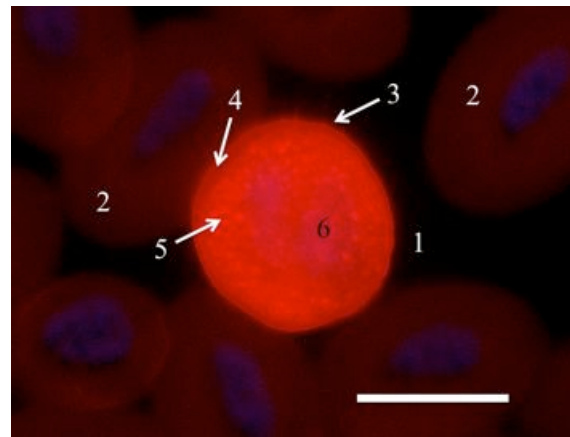


Abbildung 154: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 30, weiblich, 14 Monate, Phalloidin-TRITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10µm)

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Bereich unter der Zellmembran des eosinophilen Granulozyten (3) ist eine starke Bindung zu dem Aktinnachweis sichtbar. Im Zytoplasma (4) ist eine deutliche diffuse Bindung zu erkennen. Die spezifischen Granula des eosinophilen Granulozyten (5) sind negativ und leuchten aufgrund einer Eigenfluoreszenz. Zellkern (6).

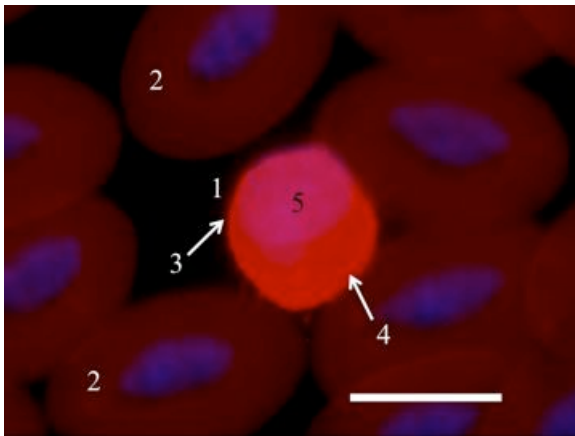


Abbildung 155: Basophiler Granulozyt

Strauß 26, männlich, 14 Monate, Phalloidin-TRITC-Färbung, Kerfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Unter der Zellmembran des basophilen Granulozyten (3) sowie auch im Zytoplasma (4) ist eine deutlich positive Reaktion zu sehen. Charakteristisch exzentrisch gelagerter und unsegmentierter Zellkern (5).

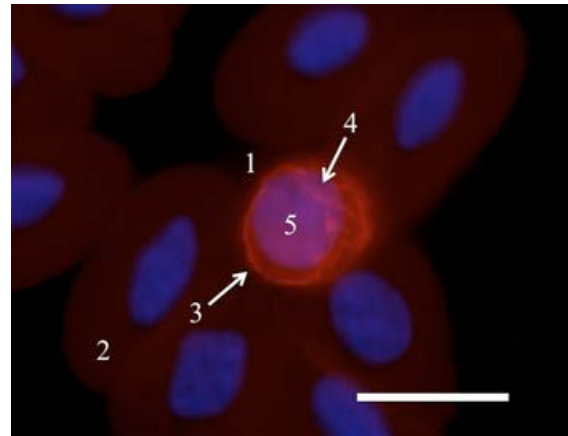


Abbildung 156: Kleiner Lymphozyt

Strauß 30, weiblich, 14 Monate, Phalloidin-TRITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). An der Zellmembran (3) und im Zytoplasma des Lymphozyten (4) sind filamentös deutliche Reaktionen zu erkennen. Zellkern (5).

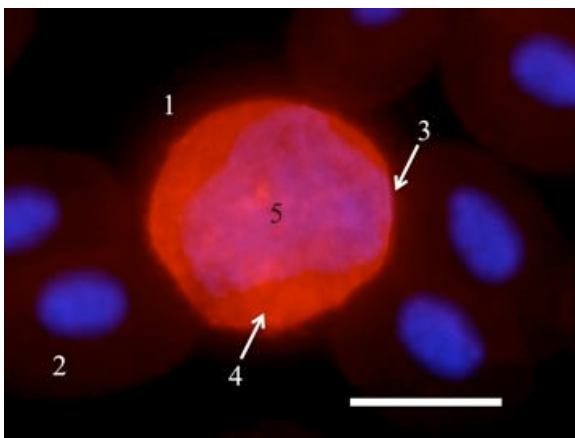


Abbildung 157: Monozyt

Strauß 25, weiblich, 14 Monate, Phalloidin-TRITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). An der Zellmembran des Monozyten (3) ist eine deutliche Bindung zu erkennen. Im Zytoplasma (4) ist eine stark positive netzförmige Reaktion sichtbar. Zellkern (5).

#### 4.6.2 Tubulin

Die Erythrozyten zeigen überwiegend eine schwach positive Reaktion. Diese ist am deutlichsten im Bereich knapp unter der Zellmembran zu erkennen. Teilweise kommt es auch zur Fluoreszenz im Zytoplasma. Die Thrombozyten reagieren stark positiv mit dem Tubulinantikörper. Im Zytoplasma sowie im Bereich der Zellmembran der Thrombozyten sind stark fluoreszierende strangartige Strukturen erkennbar. Bei den heterophilen Granulozyten werden vereinzelt schwach bis deutlich positive Reaktionen im Zytoplasma festgestellt. Die eosinophilen Granulozyten zeigen eine schwach bis deutlich sichtbare diffuse Fluoreszenz im Zytoplasma. Bei den basophilen Granulozyten ist eine überwiegend deutliche Affinität im Zytoplasma der Zellen sichtbar. Die Lymphozyten des Straußes reagieren zum Großteil stark positiv. Im Zytoplasma sind netzartige stark fluoreszierende Strukturen erkennbar. Im Zytoplasma der Monozyten kommt es zu hauptsächlich schwachen, teilweise auch deutlich positiven strangartigen Bindungen des Tubulinantikörpers.

Tabelle 44: Einzelauswertung Zytoskelett: Tubulin

Zytoskelett	Stärke der Reaktion				Positive Präparate
	0	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>	20 %	80 %	0	0	100 %
<b>Thrombozyten</b>	10 %	0	30 %	60 %	100 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>	0	70 %	30 %	0	100 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	0	40 %	60 %	0	100 %
<b>Basophile Granulozyten</b>	0	30 %	70 %	0	100 %
<b>Lymphozyten</b>	0	0	30 %	70 %	100 %
<b>Monozyten</b>	10 %	60 %	30 %	0	100 %



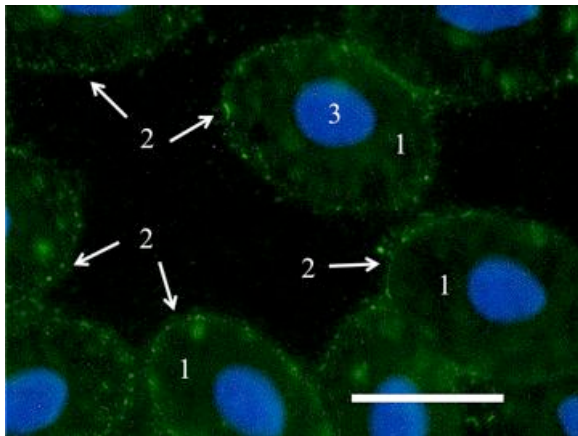


Abbildung 158: Erythrozyten

Strauß 28, weiblich, 14 Monate, Tubulin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Erythrozyten (1). Im Bereich direkt unter der Zellmembran der Erythrozyten können schwach positive Reaktionen (2) festgestellt werden. Ovaler Zellkern (3).

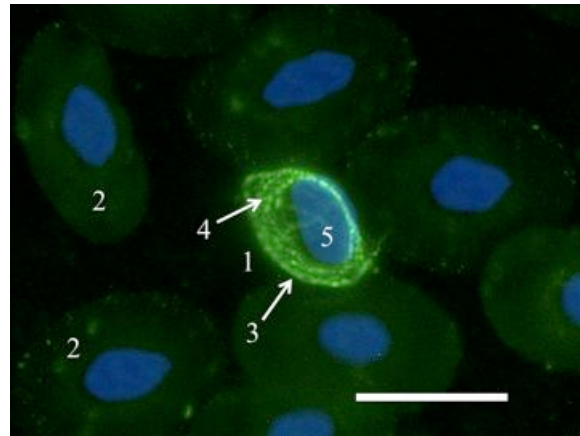


Abbildung 159: Thrombozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, Tubulin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Bereich unter der Zellmembran (3) und im Zytoplasma (4) bindet Tubulin-FITC mit starker Affinität an tubuläre Strukturen. Zellkern (4).

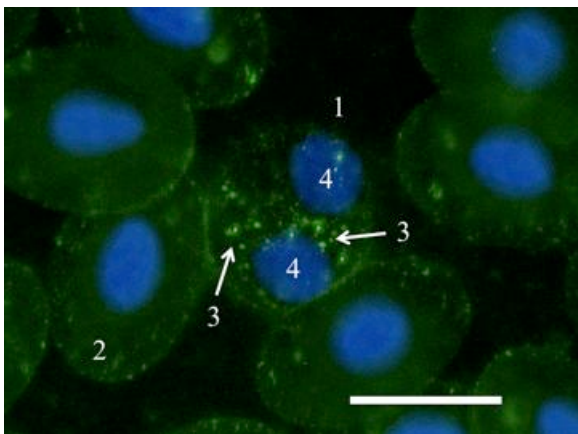


Abbildung 160: Heterophiler Granulozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, Tubulin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Bereich des Zytoplasmas des heterophilen Granulozyten (3) zeigt sich eine deutlich positive Reaktion. Der Kern ist segmentiert (4/4).

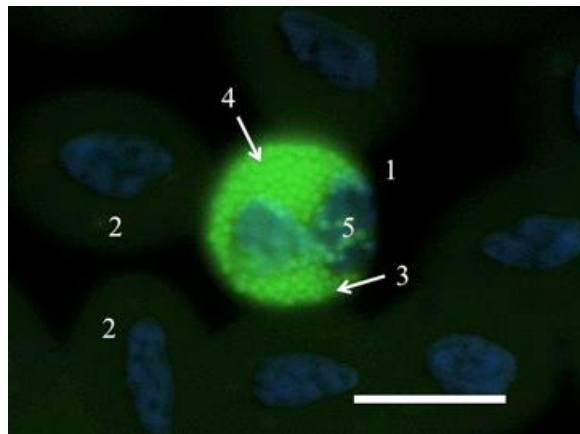


Abbildung 161: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 27, männlich, 14 Monate, Tubulin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (3) ist eine deutliche diffuse Bindung von Tubulin-FITC zu erkennen. Die Granula (4) leuchten aufgrund einer starken Eigenfluoreszenz. Zweifach segmentierter Zellkern (5).

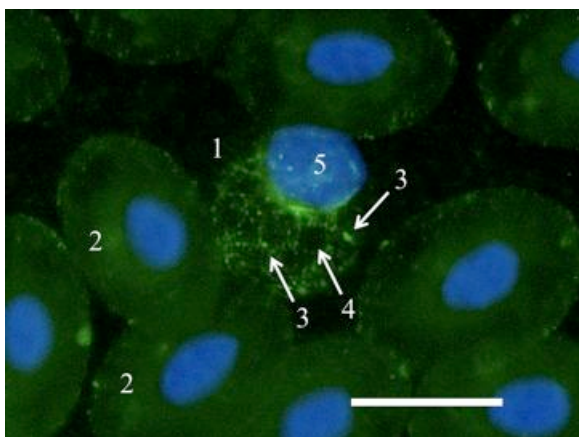


Abbildung 162: Basophiler Granulozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, Tubulin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) bindet Tubulin-FITC mit deutlicher Affinität, die Granula (4) sind negativ. Unsegmentierter exzentrisch gelagerter Zellkern des basophilen Granulozyten (5).

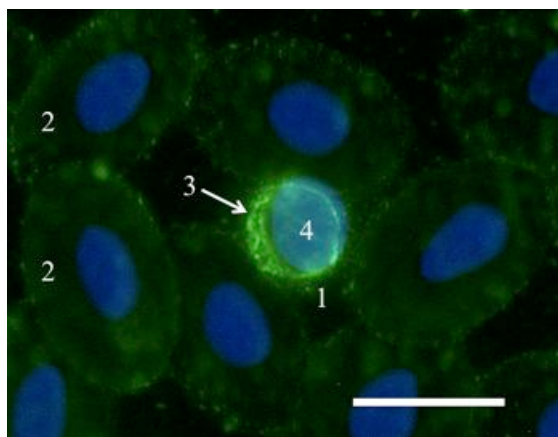


Abbildung 163: Kleiner Lymphozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, Tubulin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Immunpositive tubuläre Strukturen (3) sind gut zu erkennen. Typisch exzentrisch gelagerter Zellkern (4).

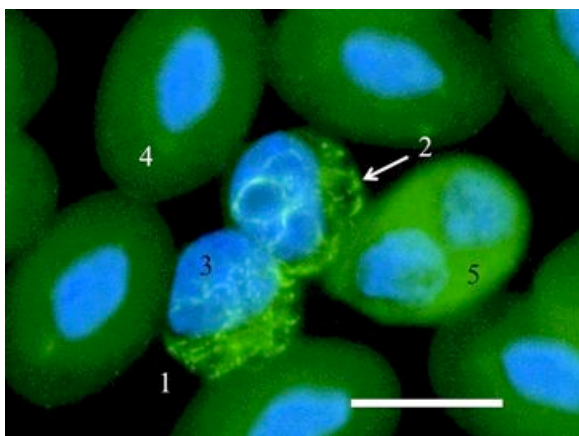


Abbildung 164: Mittelgroße Lymphozyten

Strauß 30, männlich, 14 Monate, Tubulin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Zwei mittelgroße Lymphozyten (1). Auch hier bindet Tubulin-FITC mit starker Affinität an röhrenförmige bis netzartige zytoplasmatische Strukturen (2). Unsegmentierter exzentrisch gelagerter Zellkern (3); Erythrozyten (4); Heterophiler Granulozyt (5).

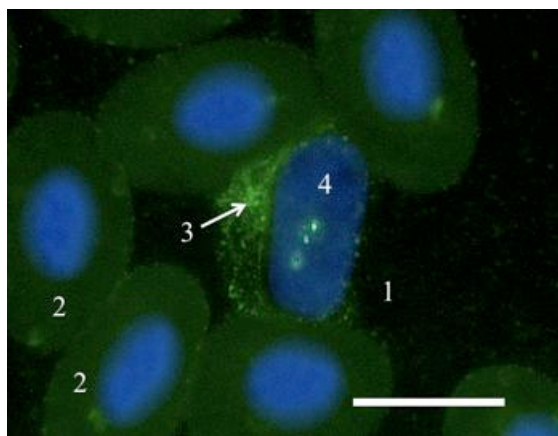


Abbildung 165: Monozyt

Strauß 31, weiblich, 14 Monate, Tubulin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Monozyten (3) zeigt sich eine deutlich positive strangartige Reaktion. Typisch bohnenförmiger Zellkern des Monozyten (4).

### 4.6.3 Vimentin

Bei den Erythrozyten des Straußes kommt es unter der Zellmembran sowie im Zytoplasma zu zahlreichen schwach bis deutlich positiven granulären Reaktionen. Die Thrombozyten zeigen im Bereich der Zellmembran sowie im Zytoplasma deutlich sichtbare strangartige Reaktionen. Bei den heterophilen Granulozyten kann überwiegend eine deutlich positive Reaktion im Zytoplasma festgestellt werden. Das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten binden Vimentin-FITC mit überwiegend schwacher Affinität. Im Zytoplasma der basophilen Granulozyten kann eine stark positive netzartig bis diffuse Reaktion nachgewiesen werden. Die Lymphozyten des Straußes zeigen eine stark positive filamentöse Reaktion im Bereich des Zytoplasmas. Bei den Monozyten reagieren im Zytoplasma stark positive netzartige Strukturen mit dem Vimentinantikörper.

Tabelle 44: Einzelauswertung Zytoskelett: Vimentin

Zytoskelett	Stärke der Reaktion				Positive Präparate
	0	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
<b>Erythrozyten</b>	10 %	90 %	0	0	100 %
<b>Thrombozyten</b>	0	0	40 %	60 %	100 %
<b>Heterophile Granulozyten</b>	0	0	20 %	80 %	100 %
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	16,7 %	83,3 %	0	0	60 %
<b>Basophile Granulozyten</b>	0	10 %	60 %	30 %	100 %
<b>Lymphozyten</b>	0	0	60 %	40 %	100 %
<b>Monozyten</b>	0	0	22,2 %	77,8 %	90 %

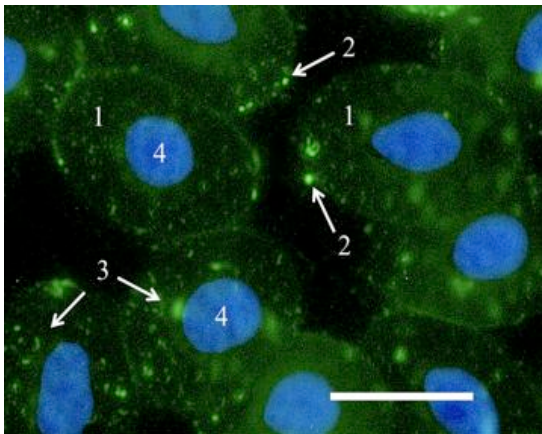


Abbildung 166: Erythrozyten

Strauß 30, männlich, 14 Monate, Vimentin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Reife Erythrozyten (1). Unter der Zellmembran der Erythrozyten (2) sowie im Zytoplasma (3) sind zahlreiche granuläre positive Reaktionen festzustellen. Ovaler Zellkern (4).

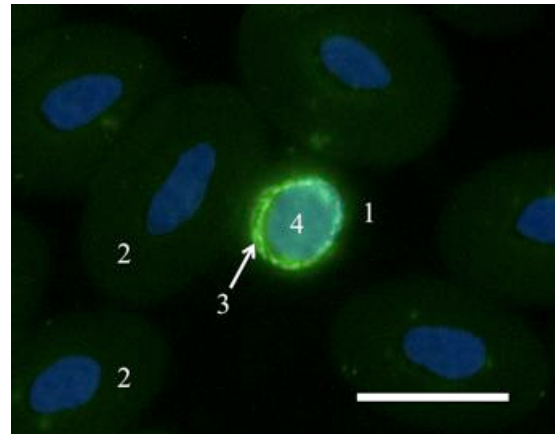


Abbildung 167: Thrombozyt

Strauß 29, männlich, 14 Monate, Vimentin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Thrombozyt (1) und Erythrozyten (2). Unter der Zellmembran sowie im Zytoplasma des Thrombozyten (3) sind deutlich positive strangartige Reaktionen zu erkennen. Ovaler Zellkern (4).

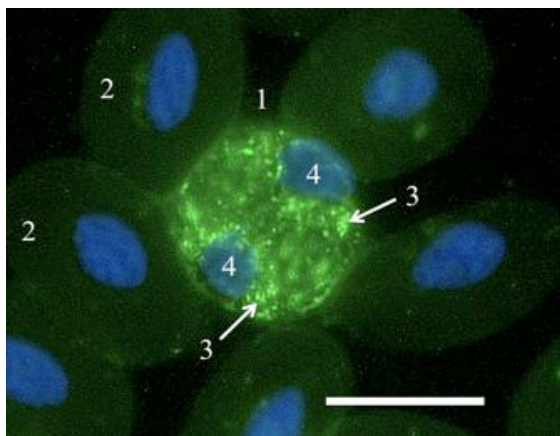


Abbildung 168: Heterophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, Vimentin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des heterophilen Granulozyten (3) ist eine deutlich positive granuläre Reaktion zu erkennen. Zweifach segmentierter Zellkern (4/4)

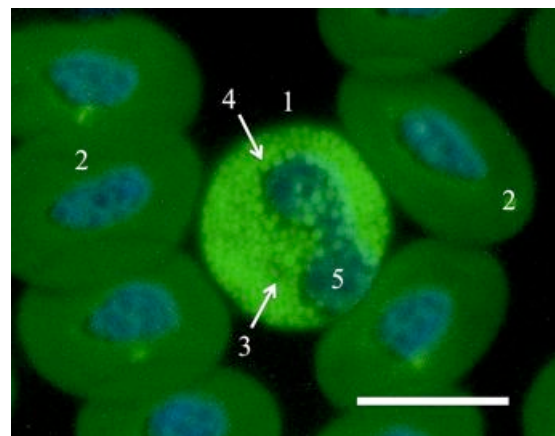


Abbildung 169: Eosinophiler Granulozyt

Strauß 28, männlich, 14 Monate, Vimentin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma (3) des eosinophilen Granulozyten ist eine schwach positive diffuse Reaktion zu erkennen. Die Granula (4) zeigen eine Eigenfluoreszenz. Zellkern (5).

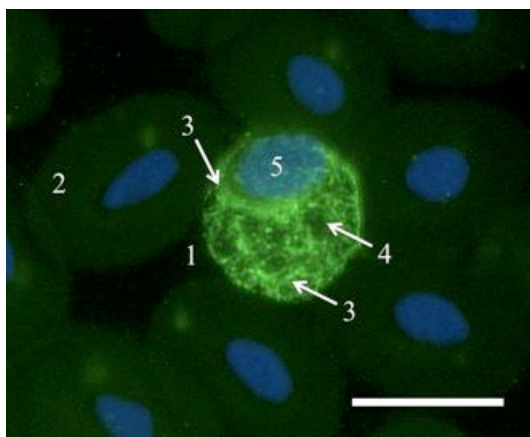


Abbildung 170: Basophiler Granulozyt  
Strauß 28, männlich, 14 Monate, Vimentin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des basophilen Granulozyten kann eine diffuse und strangartige (3) stark positive Reaktion nachgewiesen werden. Die Granula (4) reagieren nicht mit dem Antikörper. Unsegmentierter exzentrisch gelagerter Zellkern des basophilen Granulozyten (5).

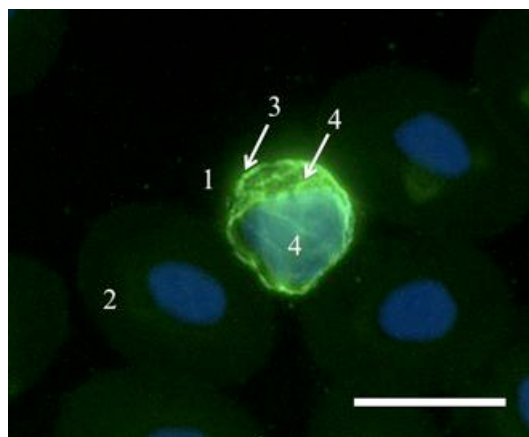


Abbildung: 171: Lymphozyt  
Strauß 29, männlich, 14 Monate, Vimentin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Lymphozyt (1) und Erythrozyten (2). Unter der Zellmembran (3) des Lymphozyten und im Zytoplasma bindet Vimentin-FITC mit starker Affinität an filamentöse Strukturen. Typisch exzentrisch gelagerter Zellkern.

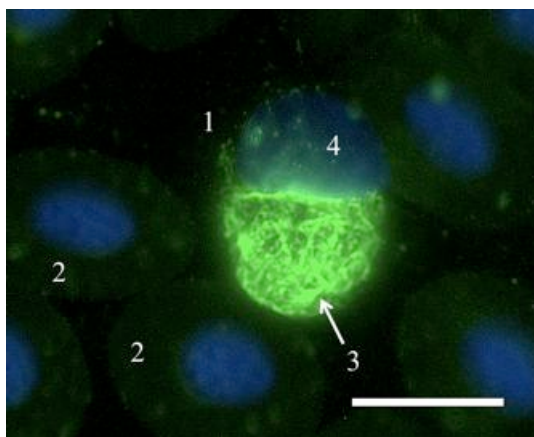


Abbildung 172: Monozyt  
Strauß 29, männlich, 14 Monate, Vimentin-FITC-Färbung, Kernfärbung mit DAPI, WB: 10 µm

Monozyt (1) und Erythrozyten (2). Im Zytoplasma des Monozyten (3) ist eine stark positive netzartige Reaktion zu erkennen. Leicht eingekerbter Zellkern des Monozyten (4).

## V Diskussion

### 5.1 Blutproben

Für meine histochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen wurden von insgesamt 31 Straußen (Rasse Blau/Schwarzhalsstrauß, 14 Monate alt) Blutproben entnommen. Die Proben stammen von 18 weiblichen und 13 männlichen Tieren. Das Blut wurde während dem Herzstich im Zuge der Schlachtung direkt mit heparinisierten Blutröhrchen bzw. für die Enzymhistochemie direkt auf Objektträger aufgefangen. Es wurde von jedem Strauß ein kleines Blutbild vom Labor Synlab, Augsburg, erstellt. In dem kleinen Blutbild wurden Erythrozyten und Leukozyten gezählt sowie der Hämatokrit gemessen. Die Mittelwerte für die weiblichen Tiere liegen bei den Erythrozytenzahlen bei 1,04 T/L, bei den Leukozyten bei 9,78 G/L und somit knapp unter den Mittelwerten der männlichen Tiere mit Erythrozytenzahlen von 1,18 T/L und Leukozyten von 11,15 G/L. Der Hämatokrit liegt bei den weiblichen Tieren im Mittel mit 45,8 % etwas höher als bei den männlichen Tieren, die einen mittleren Hämatokrit von 41,9 % aufweisen. Bis auf die Hämatokritwerte und die Leukozytenanzahl der männlichen Tieren, liegen die Mittelwerte knapp unterhalb des Referenzbereiches (Referenzbereiche: Erythrozyten: 2,5-4,5 T/L; Leukozyten: 10-25 G/L; Hämatokrit: 40-55 %, Quelle: Synlab, Augsburg), was durch die schnelle Gerinnungsbereitschaft und somit teilweise schwierige Verwendbarkeit des Vogelblutes zu erklären ist (Campbell, 2004). Bei der Interpretation der Blutbilder ist zu berücksichtigen, dass juvenile Vögel laut zahlreichen Studien niedrigere Werte bei Erythrozytenzahlen, Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit aufweisen (Hodges, 1977; Palomeque et al., 1991; Campbell und Ellis, 2007). Dabei ist zu beachten, dass im Normalfall die Erythrozytenzahl sowie der Hämatokrit mit dem Alter ansteigen und grundsätzlich bei geschlechtsreifen männlichen Tieren höher sind. Dies ist auf den positiv blutbildenden Effekt von Androgen und Thyroxin zurückzuführen sowie auf den Erythropoese hemmenden Effekt von Östrogenen (Hebert et al., 1989). Bei allen ultrastrukturellen und histochemischen Untersuchungen konnte kein Unterschied zwischen den Blutzellen männlicher und weiblicher Strauße beobachtet werden.

### 5.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden vier Übersichtsfärbungen (Diff-Quick, Giemsa, May-Grünwald und Pappenheim), sowie fünf substrathistochemischen Färbungen (Sirius-Red, PAS, PAS mit Amylase-Vorbehandlung, Toluidinblau und Alcianblau) durchgeführt und anschließend

lichmikroskopisch analysiert. Bei den Übersichtsfärbungen der Blutzellen binden saure Zellbestandteile (meist negativ geladen), basische Farbstoffe und basische Zellkomponenten (meist positiv geladen) saure Farbstoffe. Saure Farbstoffe wie Eosin werden zur Darstellung des Zytoplasmas und der Sekretgranula verwendet. Basische Farbstoffe wie Methyleneblau färben im Wesentlichen das Kernchromatin (Desoxyribonukleinsäure). Entsprechend dieser Trennung führte Ehrlich (1877) die Begriffe von azidophilen, basophilen und neutrophilen Strukturen ein. Bei einer simultanen Färbung wie beispielsweise der Giemsa-Färbung werden mehrere Farbstoffe in einer Lösung angeboten, wodurch es zu einer differenzierten Anfärbung unterschiedlicher Zellkomponenten kommt (Romeis, 2010). Bei bestimmten Farbstoffen färbt sich die Struktur in einem von dem Farbstoff unterschiedlichen Farbton. Eine solche Farbveränderung wird als Metachromasie bezeichnet und findet zum Beispiel bei der Toluidinblau Verwendung (Sinowatz und Hees, 2000).

Die Kernfärbung ist ein wesentlicher Bestandteil des Färbevorgangs. Zum einen können die verschiedenen Zelltypen des Blutes meist schon anhand ihrer charakteristischen Kernform identifiziert werden, zum anderen geben Verteilung und Menge von Eu- und Heterochromatin Aufschluss über die Zellaktivität (Romeis, 2010). Am häufigsten wurde in dieser Arbeit saures Hämalaun nach Mayer für die Kernfärbung der Lichtmikroskopie verwendet. Dieser Farbstoff färbt selektiv Zellkerne in einem starken Blau an (Romeis, 2010). In einigen Färbungen kam zum besseren Kontrast Kernechtrot zum Einsatz.

Die Erythrozyten des Vogels lassen sich bei allen Übersichtsfärbungen gut und deutlich darstellen. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Zellen der Blutausstriche. Wie in der Literatur beschrieben, stellen sie sich als ovale homogene Zellen mit glatter Oberfläche dar, die einen zentral liegenden, stark kondensierten Zellkern mit leicht höckriger Oberflächenstruktur enthalten (Weyrauch und Smollich, 1998; Campbell und Ellis, 2007). Bei den Übersichtsfärbungen der Blutzellen des Straußes reicht die Anfärbung des Zytoplasmas der Erythrozyten von blassrot über verschiedene Rosatöne bis zu ziegelsteinfarben. Die Zellkerne färben sich mittel- bis dunkelblau oder auch dunkellila an. In einigen Ausstrichen konnte festgestellt werden, dass nicht alle Erythrozyten gleich groß sind. Das Auftreten dieser makro- bzw. mikrozytären Zellen wird als Anisozytose bezeichnet. Sie hängt mit der Lebensdauer der einzelnen Zelle zusammen und ist zu einem gewissen Grad physiologisch (Campbell und Ellis, 2007). Ebenfalls konnte bei wenigen Präparaten eine Abweichung der ovalen Zellform nachgewiesen werden. Dies wird als Poikilozytose bezeichnet und ist erst bei vermehrtem Auftreten unphysiologisch (Campbell und Ellis, 2007; Clark et al., 2009). 'Heinz bodies', basophile Tüpfelung und Erythroplastide wurden in keinem Blutausstrich entdeckt.

In einigen Präparaten können polychromatische Zellen beziehungsweise Retikulozyten identifiziert werden. Diese Zellen stellen die Vorläuferzellen der reifen Erythrozyten dar und sind bis zu 5 % in

einem physiologischen Blutbild enthalten (Clark et al., 2009). Unter dem Lichtmikroskop stellen sie sich im Vergleich zu reifen Erythrozyten etwas größer und runder dar. Der zentral liegende Zellkern ist ebenfalls größer, runder und enthält locker strukturiertes Chromatin. Die verstärkte Anfärbbarkeit resultiert aus der Aufnahme von Eosin einerseits, welches an das zytoplasmatische Hämoglobin bindet sowie die Aufnahme von basischen Farbstoffen, die die, in diesen Zellen noch enthaltene RNA anfärben (Bain und Huhn, 1997).

Die Thrombozyten des Straußes stellen sich unter dem Lichtmikroskop als ovale bis runde Zellen dar, die zentral einen stark kondensierten Zellkern enthalten. In den Übersichtsfärbungen Diff-Quick, Giemsa, May-Grünwald und Pappenheim färbt sich das Zytoplasma von graublau über mittelblau bis violett und der Zellkern nimmt eine blaue bis dunkellila Farbe an. Die spezifischen Granula färben sich dunkellila. Zum Teil können helle Areale im Zytoplasma nachgewiesen werden. Diese bis zu 3 µm großen Vakuolen (Hodges, 1974; Maxwell, 1974) sind Überreste freigesetzter Granula und weisen auf einen aktivierten Zustand des Thrombozyten hin (Hawkey und Dennett, 1989; Campbell und Ellis, 2007). Teilweise wurden sie aber sicher auch durch den Färbeprozess herausgelöst. Die zytoplasmatischen Ausläufer können am besten bei der Diff-Quick-Färbung erkannt werden. Diese entwickeln sich im aktivierten Zustand der Zelle und können einzeln oder als pseudopodiale Netzwerke auftreten (du Plessis und van Wilpe, 2009). Bei den substrathistochemischen Färbungen PAS und PAS mit vorangehendem Amylaseverdau färben sich in beiden Ansätzen die spezifischen Granula der Thrombozyten stark dunkellila an. Die spezifischen oder auch eosinophilen Granula liegen meist an den Polen der Zelle (Campbell und Ellis, 2007) und enthalten an ihrer Innenseite neben Kalzium auch Glykosaminoglykane (Daimon et al., 1977). Die PAS-Reaktion dient dem Nachweis von Polysacchariden (Glykogen, Stärke, Zellulose), neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen, Glykolipiden und ungesättigten Fetten und Phospholipiden. Der Nachweis erfolgt indem 1,2-Glykole durch Perjodsäure zu Aldehyden oxidiert werden, die dann mit dem Schiff-Reagenz eine Verbindung eingehen. Glykolhaltige Elemente färben sich rot. Eine weitere Differenzierung erfolgt über die Amylase, da diese Glykogen abbaut (Romeis, 2010). Bleibt die positive PAS-Reaktion nach vorangegangener Amylase-Inkubation erhalten, dann handelt es sich bei den PAS-positiven Strukturen, wie hier beobachtet, um Glykoproteine.

Die heterophilen Granulozyten zeigen sich unter dem Lichtmikroskop als überwiegend runde, vereinzelt auch als unregelmäßig geformte Zellen. Bei den Übersichtsfärbungen stellt sich das Zytoplasma blass basophil dar. Die zahlreichen eosinophilen Granula nehmen eine hellrote bis rotbraune Farbe an. Der meist zweifach segmentierte Zellkern enthält stark kondensiertes Chromatin und färbt sich tief basophil. Am deutlichsten können die charakteristischen Granula bei der May-Grünwald-Färbung angefärbt werden. Wie auch Clark und Mitarbeiter (2009) beschrieben, füllen sie fast das gesamte Zellplasma aus und bedecken teilweise auch den Nukleus (Clark et al., 2009). Sie



haben im Längsschnitt eine Spindel- und im Querschnitt eine runde Form (Campbell und Ellis, 2007). Beim Strauß gehören die heterophilen Granulozyten mit 60 % der Leukozytenpopulation zu den zahlreichsten Abwehrzellen (Mushi et al., 1999).

Bei den substrathistochemischen Färbungen kann bei der Sirius-Red-Färbung eine deutlich pinkrote Reaktion in den eosinophilen Granula der heterophilen Granulozyten des Straußes festgestellt werden. Dies läßt auf die Anwesenheit von basischen Polyaminosäuren schließen, die eine Affinität zu dem Farbstoff besitzen (Nielsen et al., 1998). Diese Proteingruppe repräsentiert die Anwesenheit kationischer Proteine in heterophilen und eosinophilen Granulozyten (Santos et al., 2003). Evans und Mitarbeiter (1994) isolierten fünf kationische Proteine mit antibakteriellen Eigenschaften (unter anderem Arginin, Cystein und Lysin) aus heterophilen Granulozyten des Huhns (Evans et al., 1994). Beim Säuger dient diese Färbung der gezielten Darstellung eosinophiler Granulozyten und deren Unterscheidung zu neutrophilen Granulozyten, da sich die Granula der eosinophilen Granulozyten intensiv pink anfärben, die Granula der Neutrophilen dagegen homogen blassrosa verbleiben (Wehrend et al., 2004). Bei der PAS-Färbung kommt es zu einer diffusen lila Färbung des Zytoplasmas der heterophilen Granulozyten des Straußes. Dies weist auf das Vorkommen von Glykogen im Zytoplasma hin (Romeis, 2010). Dieses Polysaccharid ist eine wichtige Reservesubstanz der Zelle. Bei niedrigem Sauerstofflevel wird durch anaerobe Glykolyse aus Glykogen ATP gebildet (Santos et al., 2003). Die positiven Reaktionen auf die beiden Färbungen konnte auch bei anderen Vogelarten wie beispielsweise beim Wegebussard nachgewiesen werden (Santos et al., 2003).

Die eosinophilen Granulozyten des Straußes stellen sich lichtmikroskopisch als überwiegend runde, selten auch als unregelmäßig geformte Zellen dar. Bei meinen Präparaten können sie regelmäßig, jedoch weniger zahlreich als heterophile Granulozyten gefunden werden. Dies stimmt mit Befunden von Campbell und Ellis sowie Clark und Mitarbeiter überein (Campbell und Ellis, 2007; Clark et al., 2009). Die Größe der eosinophilen Granulozyten des Straußes bewegt sich meist zwischen 10 und 15  $\mu\text{m}$  und übertrifft somit den durchschnittlichen Durchmesser von 4-9  $\mu\text{m}$ , der bei verschiedenen anderen Vogelarten gemessen wurde (Lucas und Jamroz, 1961; Hodges, 1977; Bounous und Stedman, 2000). Bei den Übersichtsfärbungen stellt sich das Zytoplasma relativ blass in grau- bis hellblau dar. Der meist zweifach segmentierte Zellkern färbt sich tief basophil und ist teilweise von spezifischen Granula bedeckt. Diese füllen fast das gesamte Zytoplasma aus, haben eine runde Form und färben sich rosa bis ziegelrot an. Die Größe der spezifischen Granula der eosinophilen Granulozyten des Straußes beträgt ca. 1  $\mu\text{m}$ . Dies stimmt mit Beobachtungen von Maxwell (1978) überein, der eosinophile Granulozyten verschiedener Wasser- und Landvögel untersuchte (Maxwell, 1978). Die charakteristische eosinophile Färbung entsteht aufgrund des hohen Gehaltes an stark kationischer, argininreicher Proteine, vor allem MBP (engl.: major basic protein) und ECP (engl.: eosinophil cationic protein). Beide sind zytotoxisch wirksam und werden zur Bekämpfung von Endoparasiten eingesetzt

(Jain, 1993). Am besten lassen sich die eosinophilen Granulozyten in der May-Grünwald-Färbung darstellen. Hier färben sich die charakteristischen runden Granula tief dunkelrot und heben sich deutlich vom hellblauen Zytoplasma und mittelblau gefärbten Zellkern ab. Im Zuge des substrathistochemischen Nachweises färben sich bei der Sirius-Red-Färbung die runden Granula der eosinophilen Granulozyten des Straußes intensiv rot an. Dies ist auf den hohen Gehalt kationischer Proteine zurückzuführen (Jain, 1993; Santos et al., 2003). Beim Säuger wird diese Färbung unter anderem zur Unterscheidung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten genutzt (Wehrend et al., 2004). Bei der PAS-Färbung färbt sich das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten diffus lila. Der Bereich unterhalb der Membran reagiert stärker als das restliche Zytoplasma. Da die positive Reaktion nach vorangegangener Amylase-Inkubation erhalten bleibt, handelt es sich bei den beobachteten PAS-positiven Strukturen um Glykoproteine. Santos und Mitarbeiter (2003) fanden ebenfalls PAS-positive Strukturen beim Wegebussard (Santos et al., 2003).

Die basophilen Granulozyten zeigen sich lichtmikroskopisch als überwiegend runde Zellen. Sie kommen im Blutbild etwas häufiger vor als die eosinophilen Granulozyten. Diese Besonderheit des aviären Blutbildes stellten auch Mushi und Mitarbeiter (1999) fest. Der Anteil der basophilen Granulozyten beträgt 6 % der Gesamtleukozytenzahl von  $5 \times 10^9$ / L Blut, der der eosinophilen Granulozyten dagegen nur 1 % (Mushi et al., 1999). Auch bei verschiedenen anderen Vogelarten kommen physiologisch basophile häufiger als eosinophile Granulozyten vor (Latimer und Bienzle, 2000). Bei Säugetieren gehören die basophilen Granulozyten zu der am seltensten anzutreffenden Granulozytenart (Lösch et al., 2000). Bei Chinchillas beträgt der prozentuale Anteil der basophilen Granulozyten 2 % der Gesamtleukozytenzahl, beim bengalischen Tiger sind die sie mit circa 1 % vertreten. Mit etwa 0,5 % der Gesamtleukozytenzahl kommen die basophilen Granulozyten beim Rind noch seltener vor (Jain, 1993). Der unsegmentierte, meist ovale basophile Zellkern ist stets exzentrisch in der Zelle lokalisiert und zum Teil von den zytoplasmatischen Granula bedeckt. Dies wurde auch von zahlreichen anderen Autoren bei lichtmikroskopischen Studien aviärer basophiler Granulozyten beobachtet (Hodges, 1977; Kummerfeld, 2007; Clark et al., 2009). Die Größe der basophilen Granulozyten des Straußes bewegt sich zwischen den Angaben von Dieterien-Lievre (1988) der eine Durchschnittsgröße von 8,2  $\mu\text{m}$  beschrieb und den Befunden von Bounous und Stedman (2000), die einen maximalen Durchmesser von 12  $\mu\text{m}$  für die aviären basophilen Granulozyten angaben (Dieterien-Lievre, 1988; Bounous und Stedman, 2000). Bei den Übersichtsfärbungen ist das Zytoplasma in blassen Blautönen angefärbt, die Granula meist ausgewaschen und der Kern stellt sich dunkelblau bis dunkellila dar. Die charakteristischen basophilen Granula können bei den Übersichtsfärbungen am besten in der May-Grünwald-Färbung dargestellt werden. Hier zeigen sie sich als zahlreiche runde dunkelblaue Granula mit einem Durchmesser von circa 1  $\mu\text{m}$ . Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Hodges (1977) weitgehend überein, der für die

aviären basophilen Granula einen Durchmesser von durchschnittlich 0,8 µm angibt (Hodges, 1977). Zwischen den Vogelarten bestehen jedoch Unterschiede in Größe, Dichte und Farbe der Granula (Clark et al., 2009). Da die Granula wasserlöslich sind, können sie durch Färbe- und Waschvorgänge herausgelöst werden (Hodges, 1977; Bounous und Stedman, 2000; Campbell, 2004; Nickel et al., 2004). Zurück bleiben unterschiedlich große, helle Vakuolen die das Zytoplasma weitgehend ausfüllen (Clark et al., 2009). Bei meinen Präparaten ist dies bei einem Großteil der basophilen Granulozyten der Fall. Die hellen Vakuolen erreichen einen Durchmesser von bis zu 4 µm. Bei den substrathistochemischen Untersuchungen färbt sich bei den basophilen Granulozyten des Straußes das Zytoplasma PAS-positiv an. Die Granula wurden bei diesem Färbvorgang ausgewaschen und können als helle Vakuolen im Zytoplasma erkannt werden. Es kann daher nicht geklärt werden, ob eine Anfärbung der Granula stattgefunden hat. Sie enthalten zwar in hohem Maße Heparin, welches zur Gruppe der Mukopolysaccharide gehört und sich somit durch die PAS-Färbung anfärben läßt. PAS weist jedoch nur neutrale Mukopolysaccharide ohne Carboxyl- und Sulfatgruppen nach (Weyrauch und Smollich, 1998) und bei Heparin handelt es sich um ein stark anionisches sulfatiertes Mukopolysaccharid (Weiss, 1988). Bei der PAS-Färbung mit vorangegangenen Amylaseverdau reagiert das Zytoplasma nicht mehr mit dem Farbstoff. Dies läßt darauf schließen, dass es sich bei den PAS-positiven Substanzen im Zytoplasma nicht um Glykoproteine sondern um Glykogen handeln könnte. Auch bei basophilen Granulozyten der Säugetiere und bei Amphibien wurden positive Reaktionen bei der PAS-Färbung erzielt (Cowden, 1965; Salakij et al., 2010). Bei der Toluidinblau-Färbung können bei meinen Präparaten zum Großteil die basophilen Granulozyten gut dargestellt werden. Durch die im Heparin veresterte anorganische Schwefelsäure entsteht eine charakteristische Metachromasie, die sich in einem leuchtend rotvioletten Farbniederschlag zeigt (Freund, 2008). Auch bei der Alcianblau-Färbung läßt sich bei den basophilen Granulozyten des Straußes eine positive Reaktion nachweisen. Bei einem pH-Wert von 1 färben sich die Granula der basophilen Granulozyten in meinen Präparaten schwach bis deutlich blau an. Bei diesem pH-Wert werden sulfatierte Mukosubstanzen angefärbt (Romeis, 2010). Bei einem pH-Wert von 2,5 reagieren die basophilen Granula des Straußes deutlich bis stark mit dem Farbstoff. Hier werden saure Carboxyl- und sulfathaltige Mukosubstanzen angefärbt. Bei den sauren Mukosubstanzen handelt es sich um Glykosaminoglykane (Romeis, 2010). Da bei dieser Färbung die Zellkerne ungefärbt bleiben, wurde zur besseren Identifizierung der Zelle und für einen deutlichen Kontrast zum Reaktionsprodukt mit Kernechtrot gegengefärbt.

In den Blutaussstrichen des Straußes zeigen sich überwiegend kleine, vereinzelt mittelgroße und selten große Lymphozyten. Sie stellen sich lichtmikroskopisch größtenteils als runde Zellen dar, die teilweise kurze zytoplasmatische Ausläufer besitzen. Ihr charakteristischer Zytoplasmasaum färbt sich in den Übersichtsfärbungen violett bis blau. Diesen Randsaum bei aviären Lymphozyten beschrieben bereits

andere Autoren als schmalen, manchmal einseitigen, inkompletten basophilen Saum (Kummerfeld, 2007; Clark et al., 2009). Der Zytoplasmasaum enthält zum Teil feine Granula, die sich im gleichen Farbton wie das Zytoplasma anfärben. Der Zellkern färbt sich in den unterschiedlichen Färbungen violettblau bis dunkellila und enthält manchmal schwach, manchmal stark kondensiertes Chromatin. Bei den Zellen, die einen stark kondensierten Zellkern enthalten, könnte es sich um aktivierte Lymphozyten handeln, da sich diese, wenn sie spezifischem Antigenkontakt ausgesetzt werden, in aktivierte Lymphozyten transformieren. Reaktivierte Lymphozyten sind kleine und mittelgroße Lymphozyten mit stark geklumpstem Chromatin und tief basophilen Zytoplasma (Campbell und Ellis, 2007). Der Zellkern ist stets unsegmentiert und liegt in fast allen Fällen exzentrisch im Zytoplasma. In allen vier Übersichtsfärbungen sind die Lymphozyten gut darzustellen und anhand ihres charakteristischen Zytoplasmasaums sowie der exzentrischen Lage des Zellkerns gut zu identifizieren.

Die Monozyten des Straußes weisen unter dem Lichtmikroskop eine überwiegend unregelmäßige Form auf. Meist haben sie Kontakt zu den Nachbarzellen. Ihre Größe bewegt sich beim Strauß zwischen den, auch von anderen Autoren angegebenen, 8-17  $\mu\text{m}$  (Bezzel und Prinzing, 1977; Loeffler, 1978). Die Monozyten gehören somit wie bei anderen Vogelarten, zu den größten zirkulierenden Blutzellen (Bounous und Stedman, 2000). Sie werden im Blutbild des Straußes relativ selten entdeckt, was mit Aussagen von Mushi und Mitarbeitern (1999) übereinstimmt, die für Monozyten des Straußes einen Anteil von 1 % an der Gesamtleukozytenzahl angaben (Mushi et al., 1999). In meinen Präparaten färbt sich das Zytoplasma der Monozyten in den Übersichtsfärbungen in verschiedenen Blautönen (blau, graublau, dunkelblau) und weist zum Teil feine zytoplasmatische Granula auf. Daneben können in einigen Monozyten helle Vakuolen unterschiedlicher Größe festgestellt werden. Dies deckt sich mit Beobachtungen die Kummerfeld (2007) bei aviären Monozyten gemacht hat. Die Vakuolen weisen auf einen aktivierten Zustand der Zelle hin (Kummerfeld, 2007). Der Zellkern liegt teilweise zentral, meist jedoch exzentrisch in der Zelle und ist in fast allen Fällen einseitig eingekerbt bis bohnenförmig. Er läßt sich nur leicht basophil anfärben. Dies ist auf die locker kondensierte Chromatinstruktur des Zellkerns zurückzuführen (Bezzel und Prinzing, 1977; Clark et al., 2009). Bei den substrathistochemischen Färbungen kommt es bei der PAS-Färbung (mit und ohne Amylasevorbehandlung), zu einem schwach positiven, diffusen Farbniederschlag im Zytoplasma der Monozyten. Da die positive Reaktion nach vorangegangener Amylase-Inkubation erhalten bleibt, handelt es sich bei den PAS-positiven Strukturen um Glykoproteine. Glykogen ist nicht in nennenswerten Mengen vorhanden.

### 5.3 Enzymhistochemie

Die Erythrozyten des Straußes zeigen nur bei der Nachweisfärbung der unspezifischen Naphthol-AS-Acetat-Esterase eine positive Reaktion. Im Zytoplasma der Erythrozyten ist ein deutlicher blau-granulärer Farbniederschlag zu erkennen. Intrazellulär sind unspezifische Esterasen vor allem im endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen und in den Mitochondrien lokalisiert (Lojda et al., 1979).

Die Thrombozyten der Vögel enthalten saure Phosphatase (Daimon und Uchida, 1982). Bei diesem histochemischen Enzymnachweis kommt es zu einem roten granulären Niederschlag sowie teilweise zu einer diffusen Anfärbung im Zytoplasma der Thrombozyten. Die unterschiedliche Lokalisation deckt sich mit den Ergebnissen von Lojda (1979), dass die saure Phosphatase sowohl innerhalb von Lysosomen, als auch außerhalb dieser im endoplasmatischen Retikulum sowie im Grundplasma angeordnet ist (Lojda et al., 1979). Des Weiteren besitzen die Thrombozyten unspezifische Esterasen (Fey, 1966). Die unspezifische Esterase Naphthol-AS-Acetat-Esterase kann anhand eines blauen granulären Reaktionsprodukt bei den Thrombozyten des Straußes ebenfalls nachgewiesen werden. Aviäre Thrombozyten enthalten  $\beta$ -Glukuronidase (Stiller et al., 1975). Dieses Enzym ist zum einen in den Lysosomen, zum anderen am endoplasmatischen Retikulum zu finden (Lojda et al., 1979). Beim Nachweis zeigt sich im Zytoplasma der Thrombozyten ein diffuser rotbrauner Niederschlag. Bei den übrigen Enzymnachweisen kann keine positive Reaktion festgestellt werden.

Bei den Granula der aviären heterophilen Granulozyten handelt es sich um Lysosomen. Sie sind damit funktionell mit den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere gleichzustellen (Montali, 1988). Bei den heterophilen Granulozyten des Straußes ist eine deutlich positive granuläre Reaktion beim Nachweis auf alkalische Phosphatase zu erkennen. Obwohl Säugetiere auch dieses Enzym in ihren neutrophilen Granulozyten aufweisen, scheint es bei vielen anderen Vogelarten nicht in den heterophilen Granulozyten enthalten zu sein (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Campbell, 2004). Da bei der Nachweisfärbung auf saure Phosphatase bei allen Präparaten die Granula der heterophilen Granulozyten herausgelöst waren, kann hier kein sicherer Nachweis erbracht werden. Bei anderen Vogelarten, wurde eine positiv-granuläre Reaktion festgestellt (Topp und Carlson, 1972). Die saure Phosphatase wurde beim Huhn nur in Typ 2 Granula nachgewiesen (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Beim Wegebussard ließen sich ebenfalls nicht alle Granula anfärben (Santos et al., 2003). Dies wurde noch bei weiteren Vogelarten beobachtet und könnte an Unterschieden in der enzymatischen Ausstattung der verschiedenen Granulatypen liegen (Andreasen und Latimer, 1990). Die Reaktionsprodukte der  $\beta$ -Glukuronidase kommen bei meinen Präparaten sowohl als diffuser rotbrauner Niederschlag als auch granulär im Zytoplasma vor. Der unterschiedliche Charakter der Anfärbung lässt sich durch die duale Lokalisation erklären, die für dieses Enzym typisch ist (Lojda et al., 1979). Auch bei heterophilen Granulozyten anderer Vogelarten konnten positive Ergebnisse für

die  $\beta$ -Glukuronidase erzielt werden (Topp und Carlson, 1972; Daimon und Caxton-Martins, 1977; Campbell und Ellis, 2007). Die heterophilen Granulozyten des Straußes reagieren nicht auf den Peroxidasenachweis. Das Fehlen der Peroxidase bei den heterophilen Granulozyten wurde bereits beim Strauß und auch bei vielen anderen Vogelarten vermerkt (Maxwell und Robertson, 1998; Santos et al., 2003; Bonadiman et al., 2009). Es ist anzunehmen, dass die fehlende Peroxidaseaktivität in den Granula der heterophilen Granulozyten zumindest teilweise durch bakterizide Proteine ersetzt wird (Evans et al., 1994). Deren Anwesenheit wird bei meinen Präparaten durch die stark positive Reaktion der heterophilen Granulozyten bei der Sirius-Red-Färbung nachgewiesen. Wie schon einige Autoren beschrieben, zeigen die heterophilen Granulozyten des Straußes, im Gegensatz zu denen der Hühner, Steinhühner und Truthähnen keine positive Reaktion auf den Nachweis von  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase (Ergun et al., 2004; Dönmez und Sur, 2008; Sari et al., 2009). Auch die neutrophilen Granulozyten einiger Säugetiere, einschließlich des Menschen, sind ANAE-negativ (Dönmez und Sur, 2008). Beim histochemischen Nachweis für die spezifische Esterase Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase ist bei allen drei pH-Werten eine positive Reaktion zu erkennen. Am deutlichsten ist sie als granuläres blaues Reaktionsprodukt bei pH 6,5 zu sehen. Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase ist bei humanen neutrophilen Granulozyten in den Lysosomen lokalisiert und wird häufig als Marker für Zellen granulözytären Ursprungs genutzt (Kass, 1979; Lojda et al., 1979; Lang, 2006).

Die Granula der eosinophilen Granulozyten der Vögel werden wie die der Säugetiere, aufgrund der hydrolytischen Enzyme als lysosomale Strukturen eingeordnet (Maxwell, 1978). Beim Strauß kann in den Granula eine stark positive Reaktion bei der Nachweisfärbung auf Peroxidase dargelegt werden. Dieses Enzym wird als effizienter Abwehrstoff gegen Parasiten, vor allem gegen Würmer, eingesetzt (Santos et al., 2003). Bei dem enzymhistochemischen Nachweis auf saure Phosphatase kann bei meinen Präparaten sowohl diffus als auch granulär rote Reaktionsprodukte im Zytoplasma festgestellt werden. Die unterschiedliche Lokalisation deckt sich mit dem Befund von Lojda (1979), dass die saure Phosphatase sowohl innerhalb von Lysosomen, als auch außerhalb dieser im endoplasmatischen Retikulum sowie im Grundplasma vorzufinden ist (Lojda et al., 1979). Die positiven Ergebnisse für Peroxidase und saure Phosphatase stimmen mit enzymhistochemischen Untersuchungen der eosinophilen Granulozyten bei verschiedenen anderen Vogelarten überein (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Maxwell, 1978; Andreasen und Latimer, 1990). Beim Strauß kann weiterhin beim Nachweis der  $\beta$ -Glukuronidase ein diffuser und granulärer rotbrauner Niederschlag im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten gefunden werden. Dieses Enzym ist zum einen in den Lysosomen, zum anderen am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Lojda et al., 1979). Die eosinophilen Granulozyten reagieren beim enzymhistochemischen Nachweis auf alkalische Phosphatase negativ. Auch Daimon und Caxton-Martins (1977) konnten keine alkalische Phosphatase Aktivität in eosinophilen Granulozyten des Huhns feststellen (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Bei der

Nachweisfärbung für Naphthol-AS-Acetat-Esterase sind im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten des Straußes blaue granuläre Reaktionsprodukte zu sehen. Diese treten zahlreich und gleichmäßig auf und lassen sich gut von den eosinophilen Granula abgrenzen.

Die basophilen Granulozyten des Straußes reagieren auf den Nachweis der sauren Phosphatase deutlich bis stark positiv. Zwischen den farblosen Vakuolen, die die ausgewaschenen Granula zurücklassen, ist im Zytoplasma der basophilen Granulozyten ein roter Farbniederschlag zu erkennen. Beim Huhn wiesen Daimon und Caxton-Martins (1977) ebenfalls saure Phosphatase Aktivität in den Granula der basophilen Granulozyten nach. Da bei meinen Präparaten die Granula vollständig ausgewaschen sind, kann die saure Phosphatase nur im Zytoplasma sicher nachgewiesen werden. Dort ist sie am endoplasmatischen Retikulum und im Grundplasma lokalisiert (Lojda et al., 1979). Bei der Nachweisfärbung für  $\beta$ -Glukuronidase ist bei den basophilen Granulozyten des Straußes sowohl in den Granula wie auch im Zytoplasma eine deutlich positive Reaktion zu erkennen. Die duale Lokalisation ist dadurch zu erklären, dass dieses Enzym zum einen in den Lysosomen, zum anderen am endoplasmatischen Retikulum vorhanden ist (Lojda et al., 1979). Auch bei den basophilen Granulozyten der Säugetiere wurde eine Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase beschrieben (Salakij et al., 2010). Bei der Nachweisfärbung auf unspezifische Esterasen sind beim Strauß bei beiden Färbungen positive Reaktionen festzustellen. Bei der ANAE-Färbung kommt es im Zytoplasma zwischen den Vakuolen zu einer schwachen braun-granulären Reaktion. Diese Beobachtungen wurden auch von verschiedenen Autoren bei basophilen Granulozyten des Säugetieres gemacht (Inoue et al., 1991; Salakij et al., 2010). Die unspezifische Esterase Naphthol-AS-Acetat-Esterase lässt sich als granuläres blaues Reaktionsprodukt, welches gleichmäßig im Zytoplasma der basophilen Granulozyten verteilt ist, nachweisen. Intrazellulär kommen die unspezifischen Esterasen vor allem im endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen und in den Mitochondrien vor (Lojda et al., 1979).

Die Lymphozyten des Straußes zeigen eine stark positive Reaktion beim Nachweis auf saure Phosphatase. Die Granula im Zytoplasma färben sich dabei intensiv rot an. Auch diffuse rote Farbniederschläge sind im Zytoplasma zu erkennen. Dieses hydrolytische Enzym wird häufig als B-Zell-Marker genutzt, da es hauptsächlich in Lymphozyten lokalisiert ist, die aus der Bursa Fabricii stammen (Dönmez und Sur, 2008). Die saure Phosphatase ist sowohl innerhalb von Lysosomen, als auch außerhalb dieser im endoplasmatischen Retikulum sowie im Grundplasma vorhanden (Lojda et al., 1979). Ein weiteres Enzym, welches als Differenzierungsmerkmal für aviäre B- und T-Lymphozyten genutzt werden kann, ist die unspezifische  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase (ANAE). B-Lymphozyten sind ANAE-negativ, während T-Lymphozyten positiv auf den Nachweis reagieren (Maiti et al., 1990; Ergun et al., 2004; Sari et al., 2009). Die Enzymexpression entwickelt sich während der Prägungsphase im Thymusmark (Sari et al., 2009). Zicca und Mitarbeiter (1981) fanden bei humanen Lymphozyten heraus, dass die ANAE in der Lysosomenmembran lokalisiert ist (Zicca et

al., 1981). Asti und Mitarbeiter (1999) konnten bei den Lymphozyten des Huhns das Enzym ebenso im Inneren der Lysosomen nachweisen (Asti et al., 1999). Bei meinen Präparaten ist ebenfalls bei einem Teil der Lymphozyten ein feingranuläres braunes Reaktionsprodukt im Zytoplasma nachzuweisen. Dazu färbte ich die Blutaustriehe bei einem pH-Wert von 8,0 und einer Färbedauer von 30 Minuten. Ergun und Mitarbeiter (2004) beschrieben bei 59,3 % der peripheren Blutlymphozyten des Straußes eine positive Reaktion auf  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase (Ergun et al., 2004). Des Weiteren stelle ich beim Strauß eine stark positive blau-granuläre Reaktion im Zytoplasma der Lymphozyten auf den Nachweis der unspezifischen Naphthol-AS-Acetat-Esterase fest. Beim Nachweis auf  $\beta$ -Glukuronidase fallen beim Strauß diffus sowie granulär deutlich sichtbare rote Reaktionsprodukte auf. Dieses Enzym wurde auch bei Plasmazellen bestimmt (Jain, 1993).

Bei den Monozyten des Straußes kann keine Peroxidaseaktivität erkannt werden. Auf den Nachweis der sauren Phosphatase reagieren die Monozyten des Straußes mit einem diffusen sowie granulären roten Farbniederschlag. Die Granula der Monozyten stellen Lysosomen dar und enthalten saure Phosphatase (Weiss, 1988). Im Zytoplasma ist die saure Phosphatase außerdem im endoplasmatischen Retikulum und im Grundplasma lokalisiert (Lojda et al., 1979). Bei meinen Präparaten ist eine schwache Reaktion bei der  $\beta$ -Glukuronidase-Färbung zu erkennen. Hierbei kommt es zu einem gleichmäßigen, blassroten, diffus verteilten Farbniederschlag im Zytoplasma. Dieses Enzym befindet sich neben den Lysosomen auch im endoplasmatischen Retikulum (Lojda et al., 1979). Die Monozyten des Straußes reagieren deutlich positiv auf den Nachweis der spezifischen Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase. Im Zytoplasma sind zahlreiche blaue granuläre Reaktionsprodukte zu erkennen. Nicht nur reife Monozyten, auch deren Vorstufen reagieren positiv auf diesen Enzymnachweis (Parwaresch et al., 1970). Auch bei den Nachweisfärbungen der unspezifischen Esterasen kann ich bei den Monozyten des Straußes Reaktionsprodukte nachweisen. Die  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase, deren Aktivität charakteristisch für Monozyten ist (Jain, 1993), zeigt sich als schwach sichtbares, braunes Reaktionsprodukt, welches diffus im Zytoplasma verteilt ist. Die Monozyten des Straußes reagieren bei der Nachweisfärbung für die unspezifische Naphthol-AS-Acetat-Esterase mit stark positiven blau-granulären Reaktionen.

#### 5.4 Elektronenmikroskopie

Die Erythrozyten stellen sich unter dem Elektronenmikroskop als längliche, überwiegend gleichmäßige linsenförmige Zellen dar. In manchen Anschnitten haben sie eine rundliche oder unregelmäßige Form. Die Zellmembran ist glatt und grenzt sich sichtbar von der Umgebung ab. Im homogenen Zytoplasma können ganz vereinzelt Mitochondrien identifiziert werden. Das homogene Erscheinungsbild des Zytoplasma kommt durch den hohen Gehalt des Blutfarbstoffes Hämoglobin



zustande, der ca. 95 % der Trockensubstanz der Erythrozyten ausmacht (Liebich, 2004). Durch den hohen Eisengehalt des Hämoglobins kommt es zu dem homogenen, elektronendichten Erscheinungsbild des Zytoplasmas (Kolb, 1991). Der Zellkern der Erythrozyten zeigt überwiegend peripher, jedoch auch zentral, stark kondensiertes Chromatin. Als einziges Zytoskelettelement sind im Bereich unterhalb der Plasmamembran linear angeordnete Strukturen zu erkennen, die dem marginalen Band aus Mikrotubuli zugeordnet werden können. Durch den hohen Gehalt von zytoplasmatischen Hämoglobin ist es möglich, dass einige Strukturen der Zelle maskiert sind (Harris und Brown, 1971; Barrett und Dawson, 1974; Hodges, 1977).

Die Thrombozyten stellen sich überwiegend als ovale Zellen mit glatter, unregelmäßiger Membran dar, deren mittig liegender Nukleus zentral Eu- und peripher Heterochromatin enthält. Direkt unterhalb der Plasmamembran sind kontinuierlich Mikrotubuli des marginalen Bandes zu sehen. Dieses Band, welches aus Bündeln von 20-35 Mikrotubulisträngen aufgebaut ist, dient der Aufrechterhaltung der Zellform (Behnke, 1970; Meseguer et al., 2002) und ist in allen kernhaltigen Thrombozyten zu finden (Lee et al., 2004). Im Bereich nahe der Zellmembran können zahlreiche Vesikel und Kanäle beobachtet werden. Dabei handelt es sich um Querschnitte des weit verzweigten kanalikulären Systems, welches sich bei Aktivierung des Thrombozyten ausstülpfen und weitreichende Pseudopodien bilden kann (Daimon und Uchida, 1982). Im Zytoplasma der Zelle können regelmäßig spezifische Granula nachgewiesen werden. Im Inneren der Granula ist eine elektronendichte Struktur erkennbar, die meist exzentrisch an der Membran angelagert ist. Diese Beobachtungen machten auch Daimon und Uchida (1982) bei den Granula der Thrombozyten der Hühner (Daimon und Uchida, 1982). Die spezifischen Granula enthalten neben dem biogenen Amin Serotonin noch Kalzium, Magnesium, ADP, ATP und Pyrophosphate. Somit stellen sie das Äquivalent der sogenannten 'dense bodies' der Säugetiere dar (Daimon und Uchida, 1982). Die Elektronendichte der Granula entsteht durch die Zusammenlagerung von Serotonin, Pyrophosphaten und Kalzium (White, 2007). Die Größe der gefundenen Granula bei meinen Präparaten bewegt sich innerhalb des für Thrombozyten der Vögel in der Literatur beschriebenen Bereiches von 0,2-3 µm (Maxwell, 1974). Bei Aktivierung geben die Granula ihren Inhalt an die Umgebung ab und hinterlassen zytoplasmatische Vakuolen (Maxwell, 1974; Hodges, 1977). Auch diese können regelmäßig im Zytoplasma der Thrombozyten der Strauße entdeckt werden. Zum Teil enthalten sie Strukturen, die mit dem bei Aaseiern gefunden Myelinfiguren übereinstimmen könnten (du Plessis und van Wilpe, 2009). Des Weiteren beinhalten aviäre Thrombozyten noch Lysosomen, Endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, Golgi-Komplexe, Glykogenablagerungen und Lipidtröpfchen (Daimon und Uchida, 1982; Nickel et al., 2004; du Plessis und van Wilpe, 2009), wobei in meinen Präparaten vor allem die zahlreichen Mitochondrien auffallen.

Die heterophilen Granulozyten des Straußes stellen sich elektronenmikroskopisch als unregelmäßig runde Zellen mit kurzen zytoplasmatischen Ausläufern dar. Der meist zweifach segmentierte Zellkern

weist zentrales Euchromatin auf. Peripher ist elektronendichteres Heterochromatin zu sehen. Dies deckt sich mit vorangegangenen ultrastrukturellen Untersuchungen von heterophilen Granulozyten des Straußes (Bonadiman et al., 2009). Bei den verschiedenen Vogelarten werden die zytoplasmatischen Granula aufgrund ihrer Form und Größe in verschiedene Typen eingeordnet. Typ 1 Granula kommen am häufigsten vor. Sie sind ca. 1,5 µm lang und 0,6 µm breit, stäbchenförmig und homogen elektronendicht (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Teilweise können sie einen 'circular central body' enthalten (Campbell und Ellis, 2007). Typ 2 Granula haben einen mittleren Durchmesser von 0,5 µm (Daimon und Caxton-Martins, 1977) und sind vergleichsweise weniger elektronendicht (Maxwell und Robertson, 1998). Manche Vogelarten, zum Beispiel das Huhn, weisen einen dritten Granulatyp auf, der einen mittleren Durchmesser von 0,1 µm besitzt. Er hat einen elektronendichten Kern, der von einer elektronendurchlässigen Membran umgeben ist (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Campbell und Ellis, 2007). Der Truthahn und der Wegebussard besitzen nur eine Granulasorte (Topp und Carlson, 1972; Santos et al., 2003). Einige Autoren sind der Auffassung, dass die verschiedenen Granulatypen unterschiedlichen Reifegraden entsprechen (Dieterien-Lievre, 1988; Santos et al., 2003) Bei meinen Präparaten konnte ich zwei verschiedene Granulatypen entdecken. Wie von Bonadiman und Mitarbeitern (2009) beschrieben, stellen sich die Typ 1 Granula als spindelförmige, unterschiedlich große Strukturen dar während die Typ 2 Granula kleiner, runder und einheitlicher in ihrer Größe sind. 'Circular central bodies' sind in keinem Präparat nachzuweisen. Auch dies deckt sich mit Beobachtungen von Bonadiman und Mitarbeitern (Bonadiman et al., 2009).

Die eosinophilen Granulozyten des Straußes sind runde bis unregelmäßig geformte Zellen, die teilweise kurze zytoplasmatische Ausläufer aufweisen. Im Zytoplasma befindet sich neben zahlreichen runden Granula ein meist zweifach segmentierter Zellkern. Dieser hat bei meinen Präparaten zentral gelagertes helles Euchromatin und peripheres elektronendichteres Heterochromatin. Diese Beobachtungen machten auch Santos und Mitarbeiter (2003) bei ultrastrukturellen Untersuchungen der eosinophilen Granulozyten des Wegebussards (Santos et al., 2003). Die Granula der eosinophilen Granulozyten des Vogels werden von den Autoren unterschiedlich eingeordnet. Maxwell (1978) teilte die Granula von 39 verschiedenen Vogelarten in drei unterschiedliche Kategorien (Maxwell, 1978; Santos et al., 2003). Santos und Mitarbeiter (2003) beschrieben beim Wegebussard zwei voneinander unterscheidbare Granulaformen. Sie führten die unterschiedliche Elektronendichte auf den Gehalt der Fettsäuren zurück. Die weniger elektronendichten Granula enthielten mehr gesättigte Fettsäuren, die elektronendichteren mehr ungesättigte Fettsäuren (Santos et al., 2003). Andere Autoren sind der Meinung, dass die unterschiedlichen Granula verschiedenen Reifegraden zuzuordnen sind. Die größeren, primären Granula stellen somit die unreife Vorstufe der etwas kleineren, ausgereiften, sekundären Granula dar (Dieterien-Lievre, 1988; Campbell und Ellis, 2007). Beim Strauß stellte Bonadiman und Mitarbeiter (2009) in einer ultrastrukturellen Studie drei verschiedene Typen von

Granula fest. Alle drei haben eine runde Form. Typ 1 und 2 kommen am häufigsten vor, Typ 2 besitzt jedoch eine vergleichsweise höhere Elektronendichte. Der dritte Granulotyp enthält einen exzentrisch gelagerten elektronendichten Inhalt. Diese Form konnte nicht in allen eosinophilen Granulozyten festgestellt werden (Bonadiman et al., 2009). Bei meinen Präparaten sind zahlreiche runde, etwa gleich große Granula erkennbar. Manche weisen eine höhere Elektronendichte auf und könnten somit zu den Typ 2 Granula gezählt werden. Ein elektronendichter Inhalt ist in keinem meiner Präparate festzustellen. Nach Angaben verschiedener Autoren können im Zytoplasma der aviären eosinophilen Granulozyten neben den Granula, raues endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Vesikel, Ribosomen und Golgi-Komplexe gesehen werden (Hodges, 1977; Santos et al., 2003).

Die basophilen Granulozyten des Straußes haben einen Durchmesser von bis zu 8  $\mu\text{m}$  und zeigen unter dem Elektronenmikroskop eine relativ runde Form. Das Zytoplasma ist dicht gefüllt mit zahlreichen überwiegend runden circa 1  $\mu\text{m}$  großen homogenen elektronendichten Granula. Die Elektronendichte ist bei einigen Granula stärker ausgeprägt. Im Zytoplasma können weiterhin Glykogengranula, endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien festgestellt werden. Dieterien-Lievre (1988) wies ebenfalls einen mittleren Durchmesser von etwa 8  $\mu\text{m}$  für verschieden Vogelarten nach. Somit sind die basophilen etwas kleiner als die heterophilen Granulozyten (Dieterien-Lievre, 1988). Dies kann ich beim Strauß im direkten Vergleich bestätigen. Übereinstimmend sind auch die Aussagen von Hodges (1977), der die basophilen Granulozyten verschiedener Vogelarten als überwiegend gleichmäßig runde Zellen beschreibt, die in ihrem Zytoplasma Granula, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Lipidtröpfchen und Glykogengranula enthalten. Auch die Granulagröße, die Hodges mit 0,8  $\mu\text{m}$  angibt (Hodges, 1977), ist relativ nah an meinen Messungen. Die Beobachtungen in Bezug auf die Granula unterscheiden sich jedoch zum Teil von anderen Vogelarten bzw. Autoren. Dieterien-Lievre (1988) wies bei verschiedenen Vogelarten drei unterschiedliche Arten von Granula nach. Die erste und häufigste hat eine runde Form und ist elektronendicht. Die zweithäufigste besitzt einen getüpfelten Inhalt und die dritte Art der Granula weist eine Honigwabenstruktur auf (Dieterien-Lievre, 1988). Auch Santos und Mitarbeiter (2003) stellten bei den basophilen Granulozyten des Wegebussards drei Sorten Granula fest, wobei die häufigste Art ebenfalls rund und einen homogenen elektronendichten Inhalt besitzt (Santos et al., 2003). Beim Huhn konnten zwei verschiedene Granulaformen nachgewiesen werden. Beide besitzen einen elektronendichten homogenen Inhalt sowie eine runde Form, unterscheiden sich aber in der Größe (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Die Unterschiede bei den Granula der Granulozyten können laut Meinung einiger Autoren auf verschiedene Reifegrade zurückgeführt werden (Santos et al., 2003). Ebenso bestehen zwischen den Vogelarten Unterschiede in Dichte und Größe der Granula (Clark et al., 2009).

Die Lymphozyten des Straußes erscheinen elektronenmikroskopisch als runde bis unregelmäßig geformte Zellen, die teilweise kurze zytoplasmatische Ausläufer aufweisen. Der Zellkern liegt zentral

oder exzentrisch in der Zelle und besitzt zu etwa gleichen Teilen peripher gelagertes Heterochromatin sowie zentrales Euchromatin. Nahe an der Kernhülle ist eine perinukleäre Zisterne zu erkennen. Des Öftern zeigt der Zellkern einseitig eine Einkerbung. Gegenüber dieser Einkerbung ist der Großteil der Zellorganellen anzutreffen. Es können einige Mitochondrien anhand ihrer charakteristischen Cristae identifiziert werden. Die Form der Mitochondrien ist rund, oval oder nierenförmig. Daneben befindet sich im Zytoplasma endoplasmatisches Retikulum und Vakuolen mit einem Durchmesser von etwa 0,1 µm. Im Zytoplasma des Lymphozyten des Straußes sind weiterhin zahlreiche freie Ribosomen zu erkennen. Diese ultrastrukturellen Beobachtungen beim aviären Lymphozyten stimmen mit Befunden anderer Autoren überein (Nirmalan et al., 1972; Maxwell, 1974; Hodges, 1977). Maxwell (1974) stellte in aviären Lymphozyten elektronenmikroskopisch weiterhin Golgi-Apparat, Mikrotubuli, Zentriolen und elektronendichte Granula mit einem Durchmesser von bis zu 0,5 µm dar (Maxwell, 1974). Diese Granula treten nur gelegentlich auf und ihre Bedeutung ist noch unklar (Bounous und Stedman, 2000; Campbell und Ellis, 2007).

Die Monozyten des Straußes zeigen sich elektronenmikroskopisch als runde bis längliche Zellen, die teilweise Pseudo- und Lobopodien aufweisen. Ihr reichliches Zytoplasma beinhaltet einen zentral bis exzentrisch gelagerten, häufig einseitig eingekerbten Zellkern, der zentrales Eu- und peripher gelagertes Heterochromatin besitzt. Im Zytoplasma des Monozyten sind zahlreiche freie Ribosomen und viele elektronendichte Granula festzustellen. Diese Granula besitzen einen Durchmesser von 0,1-0,5 µm und wurden bereits von Maxwell (1974) bei einer ultrastrukturellen Untersuchung aviärer Monozyten nachgewiesen (Maxwell, 1974). Diese feinen Granula stellen Lysosomen dar (Bienzle, 2000). Weitere Autoren bestimmten neben diesen Zellorganellen noch Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Vesikel und Lipidtröpfchen im Zytoplasma der aviären Monozyten (Nirmalan und Robinson, 1971; Maxwell, 1974).

## 5.5 Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden insgesamt 17 Lektine verwendet. Die Lektine ConA, LCA, PSA, GSL-1, PNA, RCA, WGA, WGAs, DBA, SJA, SBA, UEA-1, PHA-E und PHA-L sind mit FITC markiert, die Lektine MAA, VAA und SNA liegen biotinyliert vor. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt um eine bessere Identifizierung des Zelltyps zu gewährleisten.

Bei den Erythrozyten des Straußes sind für die Lektine ConA, WGA, LCA und RCA positive Reaktionen an verschiedenen Zellstrukturen festzustellen. Die Zellmembran der Erythrozyten des Straußes reagiert überwiegend schwach bis deutlich positiv mit ConA. Dies stimmt mit Untersuchungen von Moraes und Mello (2006) überein, die bei Hühnererythrozyten eine positive

Reaktion der Glykokalix mit ConA beschrieben (Moraes und Mello, 2006). Auch an der Membran der Erythrozyten der Maus (Hunt und Marshall, 1979), des Rindes (Bitzmann, 2009) und des Pferdes (Brückmann, 2010) wurde eine deutlich positiv Bindung von ConA beobachtet, während humane Erythrozyten keine Bindung zu ConA zeigen (Newman und Uhlenbruck, 1977). In manchen Präparaten reagieren die Erythrozyten des Straußes nicht oder sehr stark mit dem Lektin. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass während des Alterns der Erythrozyten, Umbauvorgänge und Veränderungen in der Glykoproteinbeschaffenheit der Erythrozytenmembran stattfinden (Hunt und Marshall, 1979). Zum Teil sind auch diffuse schwach positive Reaktionen im Zytoplasma der Erythrozyten festzustellen. Das Lektin WGA wird von den Erythrozyten des Straußes sowohl im Bereich der Membran als auch im Zytoplasma bei allen Präparaten schwach gebunden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Resultaten einer Studie von Sasmal und Mitarbeitern (2001), die auf der Oberflächenstruktur von Hühnererythrozyten N-Acetyl-Glukosamin identifizierten (Sasmal et al., 2002). Auch bei verschiedenen Säugetieren, einschließlich des Menschen, reagierte die Erythrozytenmembran mit WGA (Newman und Uhlenbruck, 1977; Hunt und Marshall, 1979; Bitzmann, 2009; Brückmann, 2010). Die succinylierte Form des WGA (WGAs) wird von den Straußerythrozyten nicht gebunden. Die Lektine LCA und RCA werden jeweils nur in wenigen Fällen an die Zellmembran der Erythrozyten des Straußes gebunden. In den übrigen Präparaten kann keine Reaktion erkannt werden. Dies könnte mit einem lokalen Überangebot und damit zusammenhängender passiver Anlagerung erklärt werden. Wie bei Erythrozyten des Menschen (Newman und Uhlenbruck, 1977) ist bei den Straußerythrozyten keine Bindung von PNA zu sehen. Newman und Uhlenbruck (1977) beobachteten weiterhin, dass die Reaktion humaner Erythrozyten mit PNA erst nach Vorbehandlung mit Neuraminidase positiv war. Auch beim Strauß kann nach Vorbehandlung mit Neuraminidase eine schwach positive Reaktion in Membran und Zytoplasma gesehen werden. Die Neuraminidase spaltet von verschiedenen Glykoproteinen die endständige Sialinsäure ab und macht so die Bindung der Lektine an subterminale Kohlenhydratreste möglich. Mithilfe dieser Methode kann herausgefunden werden, ob nach vorheriger Behandlung der Blutausrichthe mit Neuraminidase, die zur Abspaltung der terminale Sialinsäure führt, zuvor nicht bindende Lektine in der Lage sind, mit den nun nicht mehr maskierten Zuckerstrukturen der Blutzellen Bindungen einzugehen. Die Ergebnisse meiner glykohistochemischen Untersuchung weisen darauf hin, dass die Erythrozyten des Straußes Mannose bzw. Glukosestrukturen, sowie N-Acetyl-Glukosamin und von Sialinsäure maskierte Galaktose enthalten.

Die Thrombozyten des Straußes reagieren stark positiv mit den Lektinen ConA und LCA. Die Lektine WGA, WGAs, PSA, PNA, PHA-L und PHA-E zeigen deutlich positive Reaktionen. Das Lektin RCA wird von den aviären Thrombozyten nur schwach gebunden. Negativ verhalten sich die Thrombozyten gegenüber den Lektinen GSL-1, SJA, SNA, SBA, UEA-1, VAA, MAA und DBA. Meist zeigen die

Granula der Thrombozyten die stärkste Affinität zu den jeweiligen Lektinen. Diese Ergebnisse weisen auf einen hohen Gehalt von Glukose bzw. Mannoseresten in der Zellmembran und im Zytoplasma der Thrombozyten hin. Ebenso kommen Galaktose, N-Acetyl-Glukosamin, Sialinsäure und die über PHA-E und PHA-L definierten Oligosaccharide vor, jedoch in geringerer Menge. Lektine, welche an N-Acetyl-Galaktosamin (GSL-1, DBA, SNA, SJA) oder L-Fukose (UEA-1) binden, reagieren nicht mit den Thrombozyten. Somit besitzen die Thrombozyten des Straußes nicht diese Zuckerstruktur. Dies unterscheidet sich teilweise von den Beobachtungen, die Matta und Mitarbeiter (1998) bei Hühnerthrombozyten gemacht haben. Diese reagierten unter anderem mit UEA-1, was für ein Vorhandensein von Fukose spricht. Dagegen stimmen die positiven Ergebnisse für Galaktose der Hühnerthrombozyten (DaMatta et al., 1998) mit denen der Strauße überein, da ich anhand von RCA und PNA ebenfalls Galaktosereste auf den Thrombozyten feststellen konnte. Das mit Lektinen ermittelte Muster der Kohlenhydrate der Thrombozyten des Straußes stimmt in vielen Punkten auch mit demjenigen verschiedener Säugetiere überein. So konnten, ähnlich wie beim Strauß, beim Rind Glukose, Mannose, Galaktose, N-Acetyl-Glukosamin und definierte Oligosaccharide bei den Thrombozyten nachgewiesen werden. Auch die negativen Resultate für N-Acetyl-Galaktosamin und Fukose, die bei den Thrombozyten des Straußes nachzuweisen sind, stimmen mit Ergebnissen vom Rind überein (Bitzmann, 2009).

Die heterophilen Granulozyten sind, neben den Thrombozyten, die reaktionsfreudigsten Zellen. Stark positive Bindungen können bei den Lektinen SNA und WGAs festgestellt werden. Die intensive Reaktion bei SNA tritt jedoch nur vereinzelt und stärker an der Zellmembran als im Zytoplasma auf. Bei WGAs dagegen ist in allen Präparaten an Zellmembran und Zytoplasma eine starke Fluoreszenz zu beobachten. Moderat positive Bindungen können bei den Lektinen PHA-E, UEA-1, WGA, ConA, PSA und LCA nachgewiesen werden. Bei PNA, RCA, DBA, PHA-L und MAA zeigen die heterophilen Granulozyten des Straußes eine schwach positive Reaktion. Die Lektine VAA, GSL-1, SBA und SJA sind negativ. Nach Neuraminidasevorbehandlung fällt im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten eine verstärkte Affinität zu dem Lektin PNA auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die heterophilen Granulozyten des Straußes große Mengen N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetyl-Galaktosamin sowie von Sialinsäure maskierte (Galaktose-) Zuckerreste besitzen. Glukose bzw. Mannose ist überwiegend im Bereich des Zytoplasmas in moderaten Mengen vorzufinden. Die Resultate zeigen weiterhin, dass die heterophilen Granulozyten die einzigen Blutzellen sind, die beim Strauß Fukosereste enthalten. In geringen Konzentrationen bzw. maskiert kommt Galaktose bei den heterophilen Granulozyten vor sowie, ebenfalls in geringen Mengen, definierte Oligosaccharide. Die glykohistochemischen Untersuchungen zeigen, dass die heterophilen Granulozyten des Straußes viele verschiedene Kohlenhydratstrukturen aufweisen. Beim Säugetier entsprechen die neutrophilen Granulozyten funktionell den heterophilen Granulozyten der Vögel (Santos et al., 2003; Campbell,

2004; Kummerfeld, 2007). Auch beim Rind wurde das umfangreichste Lektinbindungsmuster bei den neutrophilen Granulozyten beobachtet. Ebenfalls übereinstimmend bei beiden Granulozytenarten ist das Vorhandensein vieler unterschiedlicher Kohlenhydratstrukturen (Bitzmann, 2009), jedoch unterscheiden sich die Konzentrationen der einzelnen Zuckerstrukturen bei Rind und Strauß. Bei humanen neutrophilen Granulozyten haben glykohistochemische Untersuchungen von Elifio-Esposito und Mitarbeiter (2011) ergeben, dass diese Galaktose an der Zelloberfläche besitzen und eine Lektinbindung immunologische Funktionen induziert wie beispielsweise Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, Freisetzung von Granulainhalt, Migration und Phagozytose (Elifio-Esposito et al., 2011). Auch ConA und WGA sollen nach Interaktion mit humanen neutrophilen Granulozyten einen Effekt auf Zellfunktion und -struktur haben. Ebenso reagieren wie auch beim Strauß, RCA, UEA, DBA und PNA mit der Zelloberfläche der humanen Neutrophilen (Christiansen und Skubitz, 1988). North und Mitarbeiter (2011) beschrieben eine weitere Gemeinsamkeit: Ebenso wie aviäre heterophile Granulozyten wiesen neutrophile Granulozyten des Menschen terminale Fukose und Sialinsäure auf (North et al., 2011).

Die eosinophilen Granulozyten des Straußes reagieren mit den Lektinen WGA, WGAs, MAA und SNA deutlich positiv. Bei den Lektinen LCA, PSA und ConA kommt es zu einer schwachen Bindung. Die eosinophilen Granulozyten des Straußes reagieren nicht mit SJA, SBA, VAA, GSL-1, PNA, PHA-E, PHA-L, UEA-1, DBA und RCA. Die Lektinbindung findet meist im Bereich der Zellmembran und dem Zytoplasma statt wobei die stärksten Reaktionen im Zytoplasma beobachtet werden. Bei WGA und WGAs können auch stark positive Reaktionen im Bereich der Granula festgestellt werden. Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchung lässt auf hohe Konzentrationen von N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetyl-Galaktosamin, Galaktose und definierte Oligosaccharide schließen. Die Zellmembran bzw. das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten zeigen geringe Mengen Glukose/Mannosereste. Ein eindeutiges Fehlen einer bestimmten Kohlenhydratstruktur trifft nur auf Fukose zu. Auch bei eosinophilen Granulozyten der Hühner wurden Mannose bzw. Glukosereste mittels ConA nachgewiesen (Moriya und Ichikawa, 1979). Bei humanen eosinophilen Granulozyten reagierten auch die Lektine LCA und PSA positiv. PHA-E, welches beim Menschen ebenfalls eine Bindung mit den eosinophilen Granulozyten einging (Hoffmann et al., 2003) führt beim Strauß jedoch zu keiner Reaktion. Die Kohlehydratausstattung der eosinophilen Granulozyten des Straußes könnte daher ähnlich wie beim Mensch sein, da North und Mitarbeiter (2011) bei eosinophilen Granulozyten große Mengen N-Acetyl-Glukosamin und geringe Mengen terminaler Sialinsäure feststellten (North et al., 2011). Auch beim Strauß habe ich anhand der Lektine WGA und WGAs hohe Konzentrationen von N-Acetyl-Glukosamin nachweisen können. Durch den Vergleich der Resultate von WGA und WGAs (Monsigny et al., 1980) kann auch beim Strauß von einer eher geringen Menge Sialinsäure ausgegangen werden. North und Mitarbeiter (2011)

beschrieben weiterhin große Mengen endständiger Mannose (North et al., 2011), welche ich bei den eosinophilen Granulozyten des Straußes auch, jedoch in geringeren Konzentrationen feststellen konnte.

Bei den basophilen Granulozyten des Straußes sind für die Lektine WGA, WGAs, PSA und LCA deutlich positive Reaktionen festzustellen. Diese sind fast ausnahmslos im Zytoplasma lokalisiert. Die Granula der Basophilen reagieren stets negativ. Dies kann auf das Fehlen einer Lektinbindung oder wahrscheinlicher, aber auf eine Auswaschung der wasserlöslichen Granula zurückzuführen sein. Eine schwache Affinität zeigt das Zytoplasma der basophilen Granulozyten gegenüber den Lektinen SNA, MAA, ConA, PNA und RCA. Auch hier verhalten sich die Granula negativ. Bei den Lektinen PHA-E, PHA-L, VAA, DBA, UEA-1, GSL-1, SBA und SJA habe ich keine Bindung feststellen können. Die Resultate lassen auf die Existenz von größeren Mengen Glukose bzw. Mannose und N-Acetyl-Glukosamin schließen. Da WGA, im Vergleich zu succinylierten WGA von etwa dreimal so vielen Zellen deutlich positiv gebunden wird, ist davon auszugehen, dass die basophilen Granulozyten N-Acetyl-Neuraminsäure besitzen. Da das Zytoplasma eine schwache Bindung mit MAA-Biotin eingeht, weist dies auf die Existenz von geringen Mengen definierter Oligosaccharide in diesem Bereich der basophilen Granulozyten des Straußes hin. Das ebenfalls biotinylierte Lektin SNA reagiert schwach positiv mit dem Zytoplasma. Das Lektin bindet an N-Acetyl-Galaktosamin und an Galaktose. Da jedoch alle Lektine, die spezifisch an N-Acetyl-Galaktosamin binden (GSL-1, DBA, SJA) negativ sind, vermute ich, dass in diesem Fall SNA die Bindung an Galaktoseresten anzeigt. Auch bei humanen basophilen Granulozyten wurde SNA als Bindungspartner identifiziert. Weitere Untersuchungen ergaben, dass SNA, nach Reaktion mit der Zellmembran der basophilen Granulozyten die Freisetzung von IL4 induziert. IL4 gehört zu den Zytokinen spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort (Hoffmann et al., 2003). Ich konnte in keinem Präparat das Vorhandensein von Fukose auf den basophilen Granulozyten des Straußes feststellen. Die Ergebnisse des Straußes stimmen mit Resultaten glykohistochemischer Untersuchungen bei anderen Vogelarten sowie humanen basophilen Granulozyten in vielen Punkten überein. So konnte beispielsweise beim Huhn anhand des Lektins PNA terminale Galaktosylreste nachgewiesen werden (Sorrell, 1988). North und Mitarbeiter (2011) beschrieben bei humanen basophilen Granulozyten hohe Konzentrationen von Mannose und N-Acetyl-Glukosamin sowie die Existenz von terminaler Sialinsäure (North et al., 2011). Die Glykane haben laut einiger Autoren unter anderem die Funktion der Pathogenerkennung und spielen eine Rolle bei der Signalübertragung während der Immunantwort (Sorrell und Weiss, 1982; Sorrell, 1988; North et al., 2011).

Bei den Lymphozyten des Straußes habe ich für die Lektine ConA, LCA, PSA, RCA, PNA, WGA, WGAs eine deutliche bis stark positive Reaktion feststellen können. Die Zellmembran und das Zytoplasma der Lymphozyten reagieren in den meisten Fällen mit schwacher, die Granula mit



deutlicher bis starker Fluoreszenz. Die Lektine PHA-E und SNA werden von der Zellmembran und dem Zytoplasma der Lymphozyten des Straußes nur mit schwacher Affinität gebunden. Die Granula reagieren negativ. PHA-L, UEA-1, SJA, GSL-1, DBA, VAA, MAA und SBA werden nicht von den Lymphozyten gebunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lymphozyten des Straußes Glukose/Mannose und Galaktose in hohen Konzentrationen enthalten. Diese Kohlenhydratreste sind vor allem an den Granula der Lymphozyten, in geringeren Konzentrationen auch im Zytoplasma und in der Glykokalix der Zellmembran lokalisiert. Da WGA, welches mit N-Acetyl-Neuraminsäure sowie N-Acetyl-Glukosamin reagiert, aber WGAs, welches eine geringere Affinität zu N-Acetyl-Neuraminsäure aufweist (Monsigny et al., 1980), noch stärker mit den Granula der Lymphozyten des Straußes reagiert, kann davon ausgegangen werden, dass große Mengen von N-Acetyl-Glukosamin in den Granula enthalten sind. Die, über die Bindung von PHA-E/L und MAA, definierten Oligosaccharide enthalten die Lymphozyten des Straußes in geringer Konzentration in ihrer Zellmembran und im Zytoplasma. Da die Granula der Lymphozyten des Straußes PHA-E-, PHA-L- und MAA-negativ sind, ist anzunehmen, dass diese keine der definierten Oligosaccharide, die mit diesen Lektinen reagieren, enthalten. Weder N-Acetyl-Galaktosamin, welches anhand der Lektine GSL-1, DBA, SBA und SJA dedektiert wird, noch Fukosereste (UEA-1) können bei den Lymphozyten des Straußes registriert werden. Um herauszufinden, ob die schwache Reaktion von SNA eine Existenz von N-Acetyl-Galaktosamin und/oder Galaktose beweist, wäre eine Vorbehandlung mit geeigneten Enzymen, wie Galaktoseoxidase nötig (Roth, 2011). Diese Ergebnisse stimmen mit Studien von Flower und Wilcox (1981) überein, die bei Lymphozyten der Hühner ebenfalls Bindungsstellen für ConA und WGA, sowie ein negatives Bindungsverhalten von UEA-1 feststellten (Flower und Wilcox, 1981). Bei einem Großteil der Blutausrüche des Straußes reagieren die Lymphozyten mit PNA. PNA ist ein T-Lymphozyten Marker (Gershwin et al., 1983). Schauenstein und Mitarbeiter (1983) wiesen ebenfalls bei ca. 70 % der zirkulierenden Lymphozyten der Hühner PNA-positive Reaktionen nach. Die negativen Lymphozyten agglutinierten jedoch nach Neuraminidasebehandlung mit PNA-FITC (Schauenstein et al., 1983). Beim Strauß kommt es nach der Neuraminidasebehandlung zu keinem Unterschied im Bindungsverhalten der Lymphozyten gegenüber PNA. Somit besitzt der Strauß, im Gegensatz zum Huhn keine von Sialinsäure maskierten Galaktosereste. Reisner und Mitarbeiter (1979) beschrieben, dass humane unreife T-Lymphozyten zu 100 % PNA agglutinieren, während reife T-Lymphozyten seltener PNA-positiv sind. Nach Neuraminidasebehandlung binden auch die reifen T-Lymphozyten zu 100 % an PNA. Während der Zelldifferenzierung wird bei den T-Lymphozyten des Menschen demnach der PNA-Rezeptor von Sialinsäure maskiert. Anhand dieser Tatsache könnten akute Leukämien, bei denen vor allem die unreifen, PNA-positiven T-Lymphozyten zirkulieren, von chronischen Leukämien, mit typischerweise vielen reifen, PNA-negativen T-Lymphozyten unterschieden werden. Auch könnte der PNA-Rezeptor als Zielobjekt für Medikamente eingesetzt werden (Reisner et al., 1979). Jörns und Mitarbeiter (2003)

untersuchten die Lymphozyten des Thymus und der Bursa Fabricii von Hühnern und verglichen das jeweilige Lektinbindungsverhalten. Auch sie beschrieben als vorherrschende Kohlenhydratstrukturen Glukose/Mannose, Galaktose und N-Acetyl-Glukosamin (Jörns et al., 2003). Beim Säugetier wie beispielsweise beim Rind unterscheiden sich die Zuckerstrukturen der Lymphozyten in einigen Punkten von denen des Straußes. Gemein ist beiden die hohe Konzentration von Glukose/Mannose und Galaktose sowie das Fehlen von Fukose. Die Lymphozyten des Straußes besitzen jedoch, im Gegensatz zum Rind, große Mengen N-Acetyl-Glukosamin, während beim Rind eine stark positive Reaktion für die über PHA-E/L und MAA definierte Oligosaccharide (Bitzmann, 2009) festgestellt wurde, die beim Strauß nur sehr gering ausfällt.

Die Monozyten des Straußes reagieren mit WGAs, ConA, PNA, PHA-E schwach positiv. Bei den Lektinen WGA, RCA, PSA und LCA kommt es zu deutlich positiven Reaktionen. Diese zeigen sich vor allem an den Granula der aviären Monozyten. Bei den Lektinen SNA, DBA, MAA, VAA, UEA-1, PHA-L, GSL-1, SBA und SJA zeigen die Monozyten keine Bindung. Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchung weisen darauf hin, dass die Monozyten des Straußes keine N-Acetyl-Galaktosamin- und Fukosereste, wenig durch PHA-E/L und MAA gebundene Oligosaccharide, an denen PHA-E/L und MAA binden und hohe Konzentrationen von Glukose/Mannose, Galaktose und N-Acetyl-Glukosamin besitzen. Diese sind überwiegend an den Granula der Monozyten lokalisiert. Auch bei anderen Vogelarten wie Hühnern und Enten wurden bei Monozyten Rezeptoren für ConA und somit Mannose bzw. Glukose festgestellt (Moriya und Ichikawa, 1979; Huang et al., 2011). Da WGAs weniger stark als WGA gebunden wird, ist davon auszugehen, dass die Monozyten des Straußes N-Acetyl-Neuraminsäure enthalten. Durch die Succinylierung verändert sich der isoelektrische Punkt des Lektins und WGAs reagiert mit weniger Affinität zu Sialinsäure. Im Vergleich zu der Bindungsstärke von WGA kann die Zuckerspezifität differenziert werden (Monsigny et al., 1980). Sialinsäure ist involviert in immunmodulatorische Prozesse. Auf humanen Monozyten konnte die Existenz von Sialinsäure bereits bestätigt werden (Videira et al., 2008). Ebenfalls übereinstimmend ist die Aussage von Strauchen (1984), der schwach positive Reaktionen mit ConA und PNA bei humanen Makrophagen entdeckt hatte (Strauchen, 1984). Bei weiteren Säugetieren, beispielsweise beim Rind, unterscheiden sich zwar die Bindungsaffinitäten mancher Lektine, jedoch weisen auch bovine Monozyten (Bitzmann, 2009) genau wie aviäre, größere Mengen Glukose bzw. Mannose und N-Acetyl-Glukosamin auf. Da nach Neuraminidasevorbehandlung keine veränderten Reaktionen an den Strukturen der Monozyten festzustellen waren, kann davon ausgegangen werden, dass sie keine maskierten Kohlenhydratreste besitzen.

Bei den Resultaten der Einteilung in die verschiedenen Stärkestufen der Lektinbindung ist zu beachten, dass es sich dabei um eine semiquantitative Einordnung handelt. Ebenso muss berücksichtigt werden, dass die Bindung der Lektine von vielen Faktoren beeinflussbar ist. Die

Qualität der Lektine, welche abhängig ist von Isolierung und Aufarbeitung, spielt dabei eine große Rolle. Ebenso ist die Spezifität einiger Lektine für verschiedene anomere Stellungen von Bedeutung (Bitzmann, 2009). Auch die Wechselwirkung zwischen einem Kohlenhydrat und der Kohlenhydratbindungsdomäne (CBD) kann durch einige Faktoren beeinträchtigt werden. Teilweise haben Zelloberflächen sogenannte Oligosaccharidcluster, welche mehrere CBDs eines Lektins binden und so die Wechselwirkung stärken können. Neben diesen sehr spezifischen Wechselwirkungen können auch allgemeinere Bindungen zur Interaktion beitragen. Viele Zuckerstrukturen haben eine stärker polare und eine schwächer polare Seite. So können Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zur Affinität der Bindung beitragen, sind jedoch durch den pH-Wert beeinflussbar (Nelson und Cox, 2008).

## 5.6 Zytoskelett

Die Erythrozyten des Straußes reagieren bei der Behandlung mit Phalloidin-TRITC im Bereich unter der Zellmembran mit einer schwach positiven Reaktion. Diese ist teils punktuell, teils strangartig zu erkennen. Verschiedene Autoren beschrieben bei Erythrozyten ein sogenanntes Membranskelett, welches zu 75 % aus Spektrin besteht (Moon und Lazarides, 1984). Weitere Komponenten sind Aktinfilamente, die die Spektrinproteine zusammenhalten sowie Adaptorproteine, welche das Netzwerk mit der Plasmamembran verbindet. Das Membranskelett hält die Scheibenform der Erythrozyten aufrecht und unterstützt die Zelle bei Remodelierung nach Deformation (Bennett, 1990). Mikrotubuli können bei den Erythrozyten des Straußes überwiegend im submembranösen Bereich festgestellt werden. Hier kommt es zu schwach positiven granulären sowie fadenförmigen Reaktionen. Die Mikrotubuli sind für die Formveränderung von kugelig zu ellipsoid in den frühen Entwicklungsstadien ausschlaggebend (Behne, 1970; Barrett und Dawson, 1974). Die Mikrotubuli sind hier direkt unterhalb der Zellmembran als marginales Band angeordnet. Zu den Aufgaben der Mikrotubuli gehören unter anderem die Beteiligung an der Zellteilung, gerichteter Transport von Organellen und intrazelluläre Organisation. Um diese Aufgaben zu bewerkstelligen, können Mikrotubuli sehr schnell auf- und abgebaut werden. Bei aviären Erythrozyten dienen die Mikrotubuli als Stütze und zur Stabilität der Zellen gegen die Scherkräfte der Zirkulation. Im marginalen Band sind sie daher höchst stabil konfiguriert (Linhartova et al., 2002). In meinen Präparaten sind zum Teil auch im Zytoplasma der Erythrozyten fluoreszierende Reaktionsprodukte nachzuweisen. Dies kann damit zusammenhängen, dass Form, Anzahl und Anordnung der Mikrotubuli während des Lebenszyklus einer Zelle stark variieren können (Swan und Solomon, 1984). Beim Vimentinnachweis können bei den Erythrozyten des Straußes im Bereich der Membran und im Zytoplasma zahlreiche schwach bis deutlich positive, größtenteils punktförmige Reaktionen festgestellt werden. Vimentin geht laut einiger

Autoren eine enge Bindung mit dem Polypeptid Ankyrin (Georgatos und Blobel, 1987) des Membranskeletts ein, hat jedoch auch starke Assoziation mit dem Nukleus, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das dreidimensionale Netzwerk Nukleus und Membran verbindet, die Form der Zelle aufrecht erhält und gleichzeitig die zentrale Position den Kerns sichert. (Behnke, 1970; Harris und Brown, 1971; Lazarides, 1980; Granger et al., 1982; Moon und Lazarides, 1983; Georgatos und Blobel, 1987).

Kernhaltige Thrombozyten besitzen ein marginales Band (Lee et al., 2004), das aus 20-35 Mikrotubuli (Behnke, 1970) aufgebaut ist und sich direkt unterhalb der Plasmamembran befindet. Dieses marginale Band sorgt bei den Thrombozyten für die Aufrechterhaltung der Zellform, da die Zelle bei Verlust der Mikrotubuli ihre Form nicht halten kann (Behnke, 1970; Meseguer et al., 2002). Bei Aktivierung und beginnender Formveränderung zerfallen auch die Mikrotubuli und passen sich dann der neuen Zellform an (Debus et al., 1981; Escolar et al., 1986; Lee et al., 2004). Bei den Thrombozyten des Straußes kann sehr deutlich das marginale Band sowie mikrotubuläre Strukturen etwas zentraler im Zytoplasma dargestellt werden. Dies lässt auf eine beginnende Aktivierung schließen, da sich die Mikrotubuli bereits ins Zellinnere orientieren. Vimentin kann bei den Thrombozyten des Straußes als deutlich sichtbare ringartige, filamentöse Strukturen sowohl im Bereich unter der Zellmembran als auch im Zytoplasma angefärbt werden. Vimentin bildet ringartige Netzwerke nahe der Membran sowie im Zytoplasma und ist vermutlich an Transportfunktionen beteiligt (Podor et al., 2002; Ahmed et al., 2008). Sehr deutlich können in meinen Blutausstrichen die Aktinfilamente bei den Thrombozyten nachgewiesen werden. Über Phalloidin-TRITC, welches an filamentöses F-Aktin im Zytoplasma bindet, wird in allen Präparaten Aktin als dichtes Netzwerk, welches sich durch die gesamte Zelle bis in die zum Teil weitverzweigten Pseudopodien zieht, sehr gut dargestellt. Bei Aktivierung der Thrombozyten breitet sich das kortikale Aktin im Zytoplasma aus und bildet bis in die Pseudopodien dichte Faserbündel. Die Aktinfilamente spielen eine prominente Rolle bei der Veränderung der Zellform, da die Formveränderung der Zelle ausbleibt, wenn die Polymerisation von globulären zu filamentösem Aktin gehemmt wird (Debus et al., 1981; Escolar et al., 1986; Lee et al., 2004).

Für die umfangreichen Funktionen der heterophilen Granulozyten wie Chemotaxis, Phagozytose, Degranulation und Apoptose ist eine flexible und schnelle Anpassung der Zytoskelettstrukturen erforderlich (Moisan und Girard, 2006). Aktin gehört beim Säugetier zur Hauptkomponente des Zytoskeletts der neutrophilen Granulozyten. Es nimmt eine zentrale Rolle bei der Migration und Phagozytose ein (Bengtsson et al., 2006; Carulli et al., 2006). Nach Stimulation durch chemotaktische Stoffe formiert sich in einem gut organisierten Ablauf das monomere, globuläre Aktin (G-Aktin) in polymerisiertes, filamentöses Aktin (F-Aktin), welches der Zelle unter anderem die Migration ermöglicht (Carulli et al., 2006). Der Gehalt an Aktin ist jedoch in ruhenden und aktivierten Zellen

konstant (Gupta und Campenot, 1996). Das hier verwendete Phalloidin-TRITC bindet an die aktivierte, filamentöse Form des polymerisierten Aktins (F-Aktin). Da die Reaktion stoichiometrisch abläuft, kann die Intensität der Fluoreszenz direkt mit der zellulären F-Aktin Menge korreliert werden (Carulli et al., 2006). Die heterophilen Granulozyten des Straußes reagieren überwiegend stark mit Phalloidin. Die Reaktion kann bei meinen Präparaten netzförmig im Zytoplasma sowie verstärkt im Bereich der Zellmembran dokumentiert werden. Diese Beobachtung bei den Straußenzellen stimmt mit den Untersuchungen von Bengtsson und Mitarbeitern (2006) überein, die humane neutrophilen Granulozyten auf Aktin untersuchten. Dabei treten die Aktinfilamente mit Rezeptoren der Plasmamembran in Kontakt, erstrecken sich aber auch durchs Zytoplasma, wobei sie auf intrazelluläre Signalwege und Enzyme wie die NADPH-Oxidase einwirken. Die Aktinfilamente reagieren direkt mit dem Enzym, stabilisieren es und ermöglichen dadurch eine längere Aktivität (Bengtsson et al., 2006). Auch Schratl und Heinemann (2009) konnten bei neutrophilen Granulozyten des Menschen ein kortikalen Ring aus Aktinfilamenten nachweisen, welche parallel zur Lipiddoppelschicht der Zell- sowie Organellenmembranen verlief (Schratl und Heinemann, 2009). Mikrotubuli formieren, orientieren und stabilisieren Pseudopodien bei den heterophilen Granulozyten und sind dadurch essentiell für die Motilität der Zelle. Somit trägt Tubulin, genau wie Aktin, zum Ablauf der Immunantwort bei (Nath et al., 1982). Bei den Blutaussstrichen des Straußes kann eine schwache bis deutliche Bindung des Tubulin-FITC im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten registriert werden. Vimentin kann im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten anhand zahlreicher deutlich positiver Reaktionsstellen nachgewiesen werden. Diese treten sowohl netz- als auch vereinzelt punktförmig auf. Olins und Herrmann (2000) untersuchten Zytoskelettstrukturen bei humanen Neutrophilen. Sie konnten bei chemotaktisch aktivierten Zellen eine Polarität der einzelnen Zytoskelettelemente dokumentieren. Dabei war Aktin in Bewegungsrichtung vorne und hinten in der Zelle angeordnet, die Mikrotubuli verliefen parallel zur Migrationsrichtung, während sich die Vimentinfasern im Uropod, gegenüber der führende Seite akkumulierten (Olins et al., 2000). Moisan und Girard (2006) fanden anhand Untersuchungen bei humanen neutrophilen Granulozyten heraus, dass bei bevorstehendem Zelltod, Vimentin an der Zelloberfläche als Apoptosesignal wirkt. In diesem Fall wird jedoch nur eine Komponente, die sogenannte 'tail domain' exprimiert (Moisan und Girard, 2006).

Bei den eosinophilen Granulozyten des Straußes ist eine überwiegend starke Bindung des Phalloidin-TRITC im Bereich der Membran und diffus im Zytoplasma festzustellen. Wie bereits von verschiedenen Autoren berichtet, besitzen humane eosinophile Granulozyten globuläres Aktin, welches sich unter dem rezeptorvermittelten Einfluß von Histamin in F-Aktin polymerisiert und der Zelle Formveränderung, Chemotaxis, Adhäsion und Migration ermöglicht (Buckland et al., 2003; Barnard et al., 2008; Schratl und Heinemann, 2009). Dabei gilt, je höher die Histaminkonzentration, desto mehr Aktin wird polymerisiert und folglich Phalloidin-TRITC gebunden

(Barnard et al., 2008). Das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten des Straußes binden Tubulin-Antikörper mit schwacher bis deutlicher Affinität. Bei Amphibien konnte ebenfalls Tubulin im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten festgestellt werden. Die Mikrotubulibündel waren mit dem Zentrosom und dem Zellkern assoziiert und wirken vermutlich stabilisierend und richtungsweisend während der Motilität (Koonce et al., 1984). Die eosinophilen Granulozyten des Straußes zeigen im Zytoplasma eine schwache und diffuse Affinität zu Vimentin-FITC.

Bei den basophilen Granulozyten des Straußes zeigen sich bei der Phalloidin-TRITC-Färbung im Bereich der Membran sowie im Zytoplasma gleichmäßig verteilte, deutlich positive Reaktionsbereiche. Bei humanen basophilen Granulozyten wurde aufgezeigt, dass nach Inkubation mit IL3, die Zellen rezeptorvermittelt vermehrt Aktin bilden. Bei humanen Mastzellen konnte nachgewiesen werden, dass die Aktinfasern netzförmig um die Granula liegen und bei der Exozytose unterstützend wirken (Nielsen et al., 2004). Beim Strauß kann beim Tubulinnachweis überwiegend eine deutliche Bindungen des FITC-markierten Antikörpers nachgewiesen werden. Tubulin befindet sich im Zytoplasma um die Granula bzw. um die Vakuolen. Wird IL3 mit IgE kombiniert, so wird auch die Tubulinproduktion in humanen Basophilen verstärkt. Es wird vermutet, dass Aktin und Tubulin einen Einfluß auf die Histaminfreisetzung haben. Wurde die Tubulinbildung durch Colchicin unterdrückt, so wurde auch die Histaminfreisetzung gehemmt. (Nielsen et al., 2004). Auch bei basophilen Granulozyten der Ratten wurden von Draberova und Mitarbeitern (1999) Mikrotubuli dokumentiert. Diese waren netzförmig um den Kern angeordnet und strahlten in die Zellperipherie aus. Weiterhin stellten die Autoren fest, dass eine rezeptorvermittelte Aktivierung durch IgE-Komplexe zu einer schnellen morphologischen Veränderungen des Zytoskelettes führt. Dies hat vermutlich weitere Auswirkung auf die intrazelluläre Singnaltransduktion sowie Degranulation und Exozytose (Draberova et al., 1999). Das Intermediärfilament Vimentin kann bei den basophilen Granulozyten des Straußes als stark positiv fluoreszierendes Netzwerk im Zytoplasma sowie im Bereich der Membran festgestellt werden.

Die Lymphozyten des Straußes reagieren deutlich positiv beim Aktinnachweis. Im Bereich der Membran sowie im Zytoplasma sind gut sichtbare filamentöse Strukturen festzustellen. Auch bei humanen Lymphozyten konnten Brown und Mitarbeiter (2001) Aktinfilamente in der subplasmatischen Region darlegen, die bei Aktivierung der Zelle bis in die Pseudopodien reichten (Brown et al., 2001). Mikrotubuli konnte ich in den Lymphozyten des Straußes als überwiegend stark fluoreszierende, filamentöse bis netzartige Strukturen darstellen, die sich gleichmäßig über das Zytoplasma erstrecken. Auch dieses Zytoskelettelement wurde von Atkins und Anderson (1982) sowie von Brown und Mitarbeitern (2001) bei humanen Lymphozyten beschrieben (Atkins und Anderson, 1982; Brown et al., 2001). Die Mikrotubuli strahlten von einem Zentrum in die Peripherie aus und bei Aktivierung der Zelle zogen sie sich knäuelartig zusammen (Brown et al., 2001). Die Lymphozyten

des Straußes reagieren stark positiv beim Nachweis von Vimentin. Der fluoreszenzgekoppelte Antikörper bindet mit hoher Affinität an Vimentin, welches filamentös bis netzartig an der Membran und im Zytoplasma lokalisiert ist. Auch Vimentin konnten Brown und Mitarbeiter (2001) bei ihrer Studie an humanen Lymphozyten feststellen. Sie konnten zeigen, dass Vimentin zum einen für die Stabilität der Lymphozyten während der Zirkulation wichtig ist. Hier lag es als grob strukturiertes Netz im Zytoplasma. Zum anderen ermöglichte Vimentin, welches nach Aktivierung der Zelle zu einem juxtanuklearen Aggregat im Uropod kondensierte, den Eintritt der Zellen aus dem Blut ins Gewebe (Brown et al., 2001).

Die Monozyten des Straußes zeigen beim Aktinnachweis eine deutliche bis starke Reaktion. Die Reaktionsprodukte sind zum einen im Bereich der Membran, zum anderen netzartig im gesamten Zytoplasma sichtbar. Bei humanen Monozyten wurden von Meloni und Mitarbeitern (2001) ebenfalls netzartige Aktinstrukturen in der Zelle entdeckt, die sich bis in die Pseudopodien erstreckten (Meloni et al., 2011). Daneben fanden Marchisio und Mitarbeiter (1987) bei Hühnermakrophagen punktförmige Strukturen, die aus F-Aktin sowie Hilfsproteinen bestehen, die eine Aktin-Membran-Verbindung aufbauen (Marchisio et al., 1987). Teti und Mitarbeiter (1991) wiesen nach, dass diese Strukturen Adhäsionsstellen, sogenannte Podosome darstellen, die aus einem F-Aktinkern bestehen, der von einem Vinculinring umgeben ist (Teti et al., 1991). Mikrotubuli können bei den Monozyten des Straußes überwiegend als schwach sichtbare, strang- bis netzartige immunpositive Strukturen im Zytoplasma dokumentiert werden. Bei einigen wenigen Präparaten reagiert das Zytoplasma nicht mit dem Tubulin-Antikörper. Bei humanen Monozyten beschrieben Meloni und Mitarbeiter (2011) Mikrotubuli, die strahlenförmig vom Kern in die Peripherie verliefen. Die Mikrotubuli sind unter anderem für die polaren Eigenschaften der Zelle wichtig, die eine zielgerichtete Fortbewegung möglich machen (Meloni et al., 2011). Bei den Monozyten des Straußes ist beim Vimentinnachweis im Zytoplasma eine stark ausgeprägte Fluoreszenz zu erkennen. Die Reaktion verläuft netzartig im gesamten Zytoplasma und in Bereichen der Membran. Auch bei humanen Monozyten und Makrophagen wurde Vimentin als umfangreiches Netzwerk nachgewiesen (Lehto et al., 1982; Dellagi et al., 1983). Vimentin spielt eine entscheidende Rolle für die Stabilität der Zelle und Monozyten/Makrophagen Differenzierung. Benes und Mitarbeiter (2006) registrierten bei Monoblasten der Wachtel nach Aktivierung durch verschiedene Mediatoren einen Anstieg der intrazellulären Vimentinproduktion. Bei experimenteller Verringerung des intrazellulären Vimentinlevels, kam es nachfolgend zu einer verminderten Monoblastenproliferation (Benes et al., 2006).

## VI Zusammenfassung

In meiner Doktorarbeit untersuchte ich die Blutzellen des Straußes mit einer Palette von modernen, morphologischen Methoden. Dabei kamen unterschiedliche licht- und elektronenmikroskopische Techniken zum Einsatz.

Spezielles Ziel dieser Arbeit waren die ultrastrukturelle Darstellung der Blutzellen sowie die Charakterisierung der Zuckerstrukturen der Zellen mit glykohistochemischen Methoden. Des Weiteren wurden verschiedene Markerenzyme enzymhistochemisch lokalisiert und das Zytoskelett mit Hilfe von speziellen Techniken (Aktinnachweis mit Phalloidin-TRITC, immunhistochemischer Nachweis von Tubulin und Vimentin) dargestellt.

Es wurden Blutproben von insgesamt 31, vierzehn Monate alten, männlichen und weiblichen Straußen gewonnen. Bei allen anschließenden morphologischen Untersuchungen konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in Struktur, Enzymausstattung, Lektin- und Antikörperbindung bei den Blutzellen festgestellt werden.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden vier Übersichtsfärbungen (Diff-Quick, Giemsa, May-Grünwald und Pappenheim) sowie fünf substrathistochemische Nachweisfärbungen (Sirius Red, PAS, PAS mit Amylase-Vorbehandlung, Toluidinblau und Alcianblau) durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass sich die zum Teil weit verzweigten zytoplasmatischen Ausläufer aktivierter Thrombozyten am besten in der Diff-Quick-Färbung präsentieren. Die spezifischen Granula kommen am deutlichsten bei der PAS und PAS-Färbung mit Amylase-Vorbehandlung zur Darstellung. Die heterophilen und eosinophilen Granulozyten können am besten mit den Färbungen nach May-Grünwald und mit Sirius Red erkannt werden, da diese die charakteristischen Granula dieser Zelltypen am deutlichsten anfärben. Die basophilen Granulozyten werden am einfachsten mit Toluidinblau und Alcianblau identifiziert, da diese Färbungen gezielt die Granula der basophilen Granulozyten sichtbar machen. Erythrozyten, Lymphozyten und Monozyten können in allen Färbungen ähnlich gut erkannt werden.

Weiterhin wurden anhand von sieben enzymhistochemischen Färbungen die Enzyme Peroxidase, alkalische und saure Phosphatase,  $\beta$ -Glukuronidase, Naphthol-AS-Acetat-Esterase, Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase und  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase innerhalb der Zelle lokalisiert. Bei den Esterasen wurden zusätzlich die pH-Werte der Färbungen variiert um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Als Ergebnis dieser Untersuchung ist besonders erwähnenswert, dass bei allen Blutzellen Naphthol-AS-Acetat-Esterase vorkommt, während Peroxidase nur bei den eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte. Interessant ist ebenfalls die Unterscheidung von B- und T-Lymphozyten anhand der zellspezifischen Enzymausstattung. T-Lymphozyten sind in der Regel  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase positiv, während B-Lymphozyten häufig saure Phosphatase enthalten.



Unter dem Elektronenmikroskop konnten verschiedene Organellen der Blutzellen des Straußes näher untersucht werden. So zeigt sich bei den Thrombozyten unterhalb der Zellmembran ein verzweigtes kanalikuläres System und spezifische Granula, die typischerweise an den Polen der Zelle lokalisiert sind. Bei den heterophilen Granulozyten können ultrastrukturell zwei voneinander unterscheidbare Granulatypen nachgewiesen werden. Typ 1 besteht aus großen, spindelförmigen Granula, Typ 2-Granula sind kleiner und runder. Die Granula der eosinophilen Granulozyten zeigen sich als homogene runde Zellstrukturen ohne kristalline Einschlüsse. Die basophilen Granulozyten besitzen im Gegensatz zu anderen Vogelarten nur eine Granulasorte. Diese weist eine überwiegend gleichmäßig runde Form auf und besitzt einen homogenen elektronendichten Inhalt.

Zur Darstellung der Zuckerstrukturen der Blutzellen wurden die Lektine ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, VAA, WGA, WGAs, GSL-1, DBA, SJA, SBA, SNA, UEA-1, PHA-E, PHA-L und MAA verwendet. Bei den Lektinen MAA, VAA und SNA handelte es sich um biotinylierte Lektine. Dabei können große Unterschiede abhängig von dem eingesetzten Lektin und dem Zelltyp registriert werden. Das am stärksten differenzierte Lektinbindungsmuster weisen von den Blutzellen die Thrombozyten und heterophilen Granulozyten auf. Die Lektine WGA, WGAs, LCA und ConA zeigen bei vielen Blutzellen, vor allem bei Thrombozyten, heterophilen Granulozyten und Lymphozyten die stärkste Bindung. Die Lektine VAA, GSL-1, SBA und SJA binden nicht an die Blutzellen des Straußes. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kohlenhydrate Glukose, Mannose und N-Acetyl-Glukosamin bei den Blutzellen des Straußes am häufigsten vorkommen.

Der Aufbau des Zytoskeletts in den Blutzellen wurde mit Phalloidin-TRITC (Nachweis von F-Aktin) sowie immunzytochemisch mit FITC-markierten Antikörpern gegen Tubulin und Vimentin untersucht. Mit diesem Verfahren konnte der Aufbau des Zytoskeletts in den Blutzellen des Straußes gut dargestellt werden.

## VII Summary

### Ultrastructural and histochemical study of ostrich blood cells

In the present investigation the morphology of ostrich blood cells was examined using light and electron-microscopical techniques. For these studies blood samples of 13 ostriches, blue/black neck, male, female) were used. All birds were 14 month old. The pattern of carbohydrate residues within the different cell types was analyzed by glycohistochemical techniques. By using different enzymohistochemical methods several marker enzymes were localized in the distinct cell compartments. For characterization of the cytoskeleton of the blood cells immunohistochemical methods and phalloidin-FITC staining were used.

For light microscopical studies four conventional stainings methods (Diff-Quick, Giemsa, May-Grünwald, Pappenheim) and five substrate-histochemical techniques (PAS, PAS with pre-treatment by Amylase, Touluidin-blue, Alcian-blue) were applied. Staining with Diff-Quick appeared especially well suited for demonstration of pseudopodia of activated thrombocytes. Their specific granulas were most clearly stained by PAS and PAS with pre-treatment by amylase. To distinguish heterophil and eosinophil granulocytes, May-Grünwald and Sirius-Red can be recommended, as they distinctly stains their the characteristic granulas. Basophil granulocytes can be easily identified by using Toluidin-blue and Alcian-blue, due to their selective staining of the basophil granulas. Erythrocytes, lymphocytes and monocytes are equally well demonstrated with any of the seven staining techniques.

By application of seven enzymohistochemical stainings, the enzymes peroxidase, alkaline and acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase, naphthol-AS-acetate-esterase, naphthol-AS-D-chloracetate-esterase and  $\alpha$ -naphthyl-acetate-esterase were localized in the different cytoplasmatic regions of the blood cells. Interestingly, in all blood cells naphthol-AS-acetate-esterase can be demonstrated, whereas peroxidase exclusively occurs in eosinophil granulocytes. B- and T-lymphocytes could be distinguished using acid phosphatase and  $\alpha$ -naphthyl-acetat-esterase.

Electron-microscopical examination demonstrated special features of the different blood cells. Thrombocytes show a widely branched canalicular system beneath the cell membrane and characteristic granulas, which are typically localized at the poles of the cell. The heterophil granulocytes possess two different types of granulas. Typ 1 is large and fusiform, while typ 2 is smaller and rounded. The eosinophil granulocytes contain only one type of granula, which shows a homogeneous, round appearance without any crystalline inclusions.

For the glycohistochemical studies the lectins ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, VAA, WGA, WGAs, GSL-1, DBA, SJA, SBA, SNA, UEA-1, PHA-E, PHA-L and MAA were used. The lectins MAA, VAA and SNA were conjugated with biotin. The results show a characteristic lectin staining pattern

for the different blood cells. Thrombocytes and heterophil granulocytes show the most complex lectin-binding pattern. WGA, WGAs, LCA and ConA intensely bind to the cytoplasm of thrombocytes, heterophil granulocytes and lymphocytes. VAA, GSL-1, SBA and SJA do not react with any of the ostrich blood cells. The results of the glycohistochemical study demonstrate that glucose, mannose and N-acetyl-glucosamine are the most common carbohydrates of ostrich blood cells.

The cytoskeleton of the blood cells was examined using different histochemical techniques. Phalloidin-TRITC was used to detect F-actin. Tubulin and vimentin were demonstrated by immunohistochemical methods using FITC-linked antibodies.

## VIII Anhang

### 1. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AgAk	AntigenAntikörper
ANAE	Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase
BCR	B Zell Rezeptor
CBD	Carbohydrate binding domain
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CSF	Koloniestimulierender Faktor
Da	Dalton
DAPI	4'6'-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPG	2,3-Diphosglycerat
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
EHC	Enzymhistochemie
EM	Elektronenmikroskop
FITC	Fluoreszinisothiocyanat
FK	Feuchtkammer
fl	Femtoliter
Fuc	Fukose
g	Gramm
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
GHC	Glykohistochemie
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
Hb	Hämoglobin
HCO <sub>3</sub>	Hydrogenkarbonat
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HKT	Hämatokrit
H <sub>4</sub> R	Hitamin <sub>4</sub> Rezeptor

HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP <sub>4</sub>	Inositoltriphosphat
IP <sub>5</sub>	Inositolpentaphosphat
L	Liter
LM	Lichtmikroskop
LPS	Lipopolysaccharid
Man	Mannose
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobin Konz.
MCV	Mittleres korpuskuläre Volumen
MHC	Major histocompatibility complex
MPO	Myeloperoxidase
MBP	Major basic protein
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
NANA, NeuNAc	N-Acetyl-Neuraminsäure, Sialinsäure
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	Nicht spezifische Esterase
OT	Objektträger
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
TCR	T Zell Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRITC	Tetramethylrhodamineisothiocyanat
µm	Mikrometer

## 2. Verzeichnis der Gebrauchslösung

### LICHTMIKROSKOPIE

Diff-Quick-Färbelösung (Labor + Technik, Berlin)

Herstellung der verdünnten Giemsa Lösung:

Es wird eine Verdünnung von 1:20 hergestellt. Hierzu wird 1ml der Giemsa- Stammlösung (MERCK, Darmstadt) in 20 ml Aqua dest. gelöst.

Herstellung der Alcianblau- Färbelösung pH 2,5:

In der angerührten 3 %-igen Essigsäurelösung werden 5 g Alcianblau 8 GX Certistain ® (MERCK, Darmstadt) unter Rühren gelöst.

Herstellung der Alcianblau- Färbelösung ph 1:

5 g Alcianblau 8 GX Certistain ® (MERCK, Darmstadt) wurden in 500 ml 0,1 N Salzsäure (MERCK, Darmstadt) gelöst.

Herstellung der Kernechtrotlösung:

10 g Aluminiumsulfat (MERCK, Darmstadt) werden in 100 ml Aqua dest. gelöst. Nach Erhitzen der Lösung wurden 0,1 Kernechtrot Certistain ® (MERCK, Darmstadt) eingerührt, bis sich der Farbstoff gelöst hat. Nach Abkühlen der Lösung wurde sie in eine Küvette filtriert.

Herstellung der Toluidinblau- Färbelösung:

1g Toluidinblau (ROTH, Karlsruhe) wird in 100 ml Methanol (MERCK, Darmstadt) gelöst.

Herstellung der Sirius Red- Färbelösung:

500 mg Sirius Red werden in 45 ml Aqua bidest und 50 ml Ethanol (MERCK, Darmstadt) absolut gelöst. Danach werden 1 ml NaOH (MERCK, Darmstadt) 1 % und 4 ml NaCl (MERCK, Darmstadt) 20 % hinzugegeben und in eine Küvette filtriert.

Herstellung des SO<sub>2</sub> Wassers:

Zuerst werden 3 ml konzentrierte Salzsäure (MERCK, Darmstadt) mit 27 ml Aqua dest vermischt. Danach werden 3 g Natriumdisulfit (MERCK, Darmstadt) in 30 ml Aqua dest. gelöst. Die beiden Flüssigkeiten werden vermischt und in 600 ml Leitungswasser gegeben. Das hergestellte SO<sub>2</sub> Wasser wird auf 3 Kürvetten aufgeteilt.

Herstellung der wässrigen Perjodsäurelösung:

1g Perjodsäurepulver (ROTH, Karlsruhe) wird in 200 ml Aqua dest. gelöst.

### ENZYMISTOCHEMIE

Herstellung der Färbelösung Peroxidase:

1. Eine Flasche 4-Chlor-1-Naphthol (MERCK, Darmstadt) in 15 ml Ethanol (MERCK, Darmstadt) lösen und in eine Farbküvette geben.

2. Unter Umrühren 45 ml Aqua dest, 10 Tropfen Tris-(hydroxymethyl- aminomethan )-HCl- Puffer

(MERCK, Darmstadt) und 2 Tropfen Wasserstoffperoxid- (MERCK, Darmstadt) Lösung hinzugeben.

Herstellung der Färbelösung alkalische Phosphatase:

LÖSUNG A: 4 gestrichene Messlöffel Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (MERCK, Darmstadt) werden in 100 ml destilliertes Wasser gegeben.

LÖSUNG B: Eine Flasche 1-Naphthylphosphat- Natriumsalz (MERCK, Darmstadt) werden in 15 ml der Lösung A gegeben.

LÖSUNG C: 1 Flasche Variamin®- Blausalz B (MERCK, Darmstadt) wird in 45 ml der Lösung A gegeben.

Lösung C wird nun zu Lösung B in eine Färbeküvette gegeben.

Herstellung der Färbelösung Saure Phosphatase:

1. 2 ml Naphthol AS-OL Phosphorsäure (MERCK, Darmstadt) und 3 getrichene Messlöffel Natriumacetat (MERCK, Darmstadt) werden in einen Erlenmeyerkolben mit 60 ml Aqua dest. gegeben.

2. In einem Eppendorfgefäß werden 4-5 Tropfen Pararosanilin-HCl-Lösung (2N) (MERCK, Darmstadt) mit 4-5 Tropfen Nitritlösung (MERCK, Darmstadt) gemischt.

3. Die Mischung aus dem Eppendorfgefäß wird nach 1 Minute zu der Mischung im Erlenmeyerkolben gegeben.

4. Die erstellte Lösung wird nun in eine Küvette filtriert.

Herstellung des 10 %-igen Methanol- Formol:

9 Teile Methanol (MERCK, Darmstadt) wird zu einem Teil Formaldehyd 37 % (ROTH, Karlsruhe) gegeben.

Herstellung der Färbelösung Naphthol AS-D Chloracetat Esterase:

40 mg Naphthol AS-D Chloracetat (APPLICHEM, Darmstadt) werden in 4 ml Aceton (MERCK, Darmstadt) gelöst und danach tropfenweise der Pufferlösung hinzugefügt. Dann werden 100 mg Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride salt) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) in der Pufferlösung gelöst. Dies wird nun in eine Küvette filtriert. Die Färbelösung wird in 3 verschiedenen pH-Werten hergestellt.

Herstellung des Phosphatpuffers:

4,45 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (MERCK, Darmstadt) werden in 250 ml Aqua dest gelöst. Danach werden in einem zweiten Gefäß 3,45 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (MERCK, Darmstadt) in

250 ml Aqua dest gelöst. Die beiden die erste Lösung wird mit der zweiten Lösung so lange titriert bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist.

Herstellung der Färbelösung  $\alpha$ -Naphthyl-Acetat-Esterase:

1. Zu 0,2 ml Aceton (MERCK, Darmstadt) werden 10 mg 2-Naphthyl-Acetat (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) gegeben.

2. 40 ml 0,1M Phosphatpuffer werden zugegeben und gerührt bis die Trübung verschwindet.
3. 50 mg Fast Blue Salt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) werden zugegeben und geschüttelt.
4. Die Lösung wird in eine Küvette filtriert.

#### Herstellung Färbelösung Naphthol-AS-Acetat-Esterase:

1. 8 mg Naphthol-AS-Acetat (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) werden in 1 ml Aceton (MERCK, Darmstadt) gelöst
2. Diese Lösung wird tropfenweise und starkem Schütteln zu 80 ml 0,1M Phosphatpuffer gegeben.
3. Danach werden in dieser Lösung 160 mg Fast Blue BB Salt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) gelöst.
4. Dies wird nun in eine Küvette filtriert.

#### Herstellung des hexazotierten Pararosanilin:

400 mg Pararosanilinchlorid (MERCK, Darmstadt) werden in 8 ml Aqua dest gelöst. Dann werden 2 ml konzentriertes HCl (MERCK, Darmstadt) zugesetzt. Danach wird eine 4 %-ige wässrige Natriumnitritlösung hergestellt, indem man 4 g Natriumnitrit (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. löst. Diese beiden Lösungen werden kurz vor der Verwendung zu gleichen Teilen gemischt wobei sich eine gelbe Färbung einstellt.

#### Herstellung der Färbelösung $\beta$ -Glucuronidase:

Es werden 19 ml des 0,2 M Natriumacetat (AGAR AIDS, Essex, England) und 1ml hexazotierten Pararosanilin (MERCK, Darmstadt) gemischt und mit Hilfe von NaOH und HCl auf einen pH von 5 eingestellt. Dann werden 8 mg Naphthol AS-BI  $\beta$ -D-Glucuronid (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) in 1ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Die beiden Lösungen werden vermischt und in einen Erlenmeyerkolben gegeben.

### **ELEKTRONENMIKROSKOPIE**

#### Herstellung der Bleicitratlösung nach Reynolds:

Es wird zuerst Natriumcitrat Stock hergestellt, indem man 35,7 g Natriumcitrat  $\text{Na}_2(\text{CH}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$  (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest löst. Dann wird Bleinitrat Stock hergestellt indem man 33,1 g Bleinitrat  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest löst. Dann werden 3 ml des Natriumcitrat

Stock, 2 ml Bleinitrat Stock, 16 ml Aqua dest, 4 ml NaOH (1M) (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. gegeben und gemischt.

#### Herstellung des Cacodylat- Puffer:

8,56 g Cacodylat  $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England) werden in 200 ml Aqua dest gelöst. Für einen Puffer mit 0,2 M und pH 7,2 werden 50 ml dieser Lösung mit 4,2 ml HCl (0,2 M)

(MERCK, Darmstadt) und 100 ml Aqua dest gemischt. Für 0,1 M und pH 7,2 werden 50 ml des Cacodylat-Puffer 0,2 M mit pH 7,2 und 50 ml Aqua dest. gemischt.



Herstellung des Epon:

16 ml Poly/bed 812 (Polyscience), 10 ml DDSA (Polyscience), 9 ml NMA (Polyscience) und 0,3- 0,5 ml DMP-30 (Polyscience) werden gemischt. Alle Reagenzien stammen von POLYSCIENCES INC., Warrington, USA.

Herstellung der Fixierlösung nach Karnovsky:

1. 10 g Paraformaldehyd (MERCK, Darmstadt) werden in 100 ml Aqua dest. gelöst und 6 Tropfen NaOH (0,1 M) zugegeben.
2. Die Stammlösung wird hergestellt indem man 20 ml der Lösung 1 mit 50 ml Cacodylat- Puffer (0,2 M) mischt und 0,05 g Kalziumchlorid, wasserfrei (Serva, Heidelberg) zugibt.
3. Die Gebrauchslösung erhält man indem man 10 ml der Stammlösung mit 1037 ml 2,5 %-igen Glutaraldehyd (AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England) mischt.

Herstellung der Kontrastierlösung:

Die Osmiumtetroxid- Lösung 2 % wird durch Mischen von 2 ml 4 %-igen Osmiumtetroxid (Polyscience) mit 2 ml Cacodylat- Puffer (0,1 M) hergestellt. Die Kaliumferrocyanid- Lösung 3 % wird durch Mischen von 0,3 g Kaliumferrocyanid (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) mit 10 ml Cacodylat- Puffer (0,1 M) hergestellt.

Anschließend werden jeweil 4 ml der beiden Lösungen gemischt.

**GLYKOHISTOCHEMIE**

Lektine (VECTOR, Burlingame)

Herstellung des PBS- Puffer:

42,5 g NaCl (MERCK, Darmstadt), 6,35 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MERCK, Darmstadt) und 1,95 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (MERCK, Darmstadt) werden in 5 Litern Aqua demin. gelöst. Danach wird der pH auf 7,4 - 7,6 eingestellt.

Herstellung der FITC markierten Lektinlösung:

In einem schwarzen Eppendorfgefäß werden 1ml PBS und 5 µl miteinander vermischt. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Licht an die Lösung kommt.

Herstellung der Lektin-Hemmstoff- Lösungen:

1. ConA, LCA und PSA: in 1ml PBS werden 5 µl Lektin und 84,8 g Hemmzucker gelöst.
2. WGA: es wird eine Lösung im Verhältnis von Lektinlösung zu Hemmzucker von 1:4 hergestellt.
3. PHA-E: Zu 1 ml der hergestellten Lektinlösung werden 24 µl der Essigsäure (ROTH, Karlsruhe) gegeben.

Herstellung des Natrium-Acetatpuffers pH 5,5:

13,6 g des Natrium-Acetat (AGAR AIDS, Essex, England) werden in 1l Aqua demin. gelöst. Dann wird der pH-Wert mit 10 %-iger Essigsäure auf 5,5 eingestellt.

Herstellung des Natrium-Acetatpuffers mit Calcium-Chlorid pH 5,0:

8,2 g Natrium-Acetat (AGAR AIDS, Essex, England) und 0,294 g Calcium-Chlorid werden in 1l Aqua

demin. gelöst. Der pH wird mit 1M HCl (MERCK, Darmstadt) auf pH 5,0 eingestellt und alles auf 37°C bis 40°C erhitzt. Später wird zu 1ml dieser Lösung 3 µl der Neuraminidase gegeben.

Herstellung der Lektinlösung für MAA und SNA:

Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt jeweils 10 µg/ml. 5 µl der Lektinlösung werden zu 1ml PBS in ein weißes Eppendorfgefäß gegeben. Dieses wird gut gemischt.

Herstellung der Lektinlösung für VAA:

Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt 2 µg/ml. In 1 ml PBS werden 20 µl der Lektinlösung gelöst.

Herstellung der Streptavidin- FITC- Lösung für Lektine:

In einem schwarzen Eppendorfgefäß werden 3 µl Streptavidin-FITC in 1497 µl PBS gelöst. Wichtig ist hierbei, dass kein Licht an die Lösung kommt.

## **IMMUNZYTOCHEMIE**

Zytoskelett:

Herstellung der Phalloidin TRITC-Lösung:

Die Phalloidin-TRITC-DMSO (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) -Lösung ist in einer Konzentration von 500 µg/ml vorhanden. In ein schwarzes Eppendorfgefäß werden 3 µl dieser Lösung zu 1497 µl Antibody Diluent (DAKO, Hamburg) gegeben und gemischt.

Herstellung des Primär-AK Vimentin:

Es wird eine Verdünnung von 1:500 hergestellt. 3 µl der Vimentin-Lösung (Abcam, Cambridge, AB8069)) werden mit 1497 µl Antibody-Diluent (DAKO, Hamburg) gemischt.

Herstellung des Sekundär-AK Vimentin und Tubulin:

Es wird eine Verdünnung von 1:20 hergestellt. 75 µl des Sekundär-AK (DAKO, Hamburg) werden mit 1425 µl PBS gemischt.

Herstellung Primär-AK Tubulin:

Der Primär AK ist in einer Konzentration von 2 µg/ml vorhanden. 10 µl des Primär- AK (Abcam, Cambridge, AB3194)) werden mit 1000 µl Antibody Diluent (DAKO, Hamburg) vermischt.

### 3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1: Zusammensetzung des Blutes .....	4
Abbildung	2: Schema der Hämatopoese .....	7
Abbildung	3: Schema Streptavidin-Biotin Methode .....	99
Abbildung	4: Erythrozyten, Diff-Quick-Färbung .....	106
Abbildung	5: Erythrozyten, Giemsa-Färbung .....	106
Abbildung	6: Erythrozyten, May-Grünwald-Färbung .....	107
Abbildung	7: Erythrozyten, Pappenheim-Färbung .....	107
Abbildung	8: Thrombozyt, Diff-Quick-Färbung .....	108
Abbildung	9: Thrombozyt, Giemsa-Färbung .....	108
Abbildung	10: Thrombozyt, May-Grünwald-Färbung .....	108
Abbildung	11: Thrombozyt, Pappenheim-Färbung .....	108
Abbildung	12: Thrombozyt, PAS-Färbung .....	119
Abbildung	13: Thrombozyten, PAS-Amylase .....	119
Abbildung	14: Heterophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung .....	110
Abbildung	15: Heterophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung .....	110
Abbildung	16: Heterophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung .....	111
Abbildung	17: Heterophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung .....	111
Abbildung	18: Heterophiler Granulozyt, SiriusRed-Färbung .....	112
Abbildung	19: Heterophiler Granulozyt, PAS-Färbung .....	112
Abbildung	20: Eosinophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung .....	113
Abbildung	21: Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung .....	113
Abbildung	22: Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung .....	113
Abbildung	23: Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung .....	113
Abbildung	24: Eosinophiler Granulozyt, Sirius-Red-Färbung .....	114
Abbildung	25: Eosinophiler Granulozyt, PAS-Färbung .....	114
Abbildung	26: Basophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung .....	115
Abbildung	27: Basophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung .....	115
Abbildung	28: Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung .....	116
Abbildung	29: Basophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung .....	116
Abbildung	30: Basophiler Granulozyt, PAS-Färbung .....	117
Abbildung	31: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung .....	117
Abbildung	32: Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung, pH:1 .....	118
Abbildung	33: Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung, pH:2,5 .....	118

Abbildung	34: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung .....	119
Abbildung	35: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung .....	119
Abbildung	36: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung .....	119
Abbildung	37: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung .....	119
Abbildung	38: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung .....	120
Abbildung	39: Lymphozyt, Giemsa-Färbung .....	120
Abbildung	40: Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung .....	121
Abbildung	41: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung .....	121
Abbildung	42: Lymphozyt, PAS-Färbung .....	122
Abbildung	43: Lymphozyt, PAS-Amylase-Färbung .....	122
Abbildung	44: Monozyt, Diff-Quick-Färbung .....	123
Abbildung	45: Monozyt, Giemsa-Färbung .....	123
Abbildung	46: Monozyt, May-Grünwald-Färbung .....	123
Abbildung	47: Monozyt, Pappenheim-Färbung .....	123
Abbildung	48: Monozyt, PAS-Färbung .....	124
Abbildung	49: Monozyt, PAS-Amylase-Färbung .....	124
Abbildung	50: Erythrozyt, Eosinophiler Granulozyt, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung .....	125
Abbildung	51: Thrombozyt, Saure Phosphatase-Färbung .....	126
Abbildung	52: Thrombozyt, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung .....	126
Abbildung	53: Thrombozyt, $\beta$ -Glukuronidase-Färbung .....	127
Abbildung	54: Heterophiler Granulozyt, Alkalische Phosphatase-Färbung .....	128
Abbildung	55: Heterophiler Granulozyt, Saure Phosphatase-Färbung .....	128
Abbildung	56: Heterophiler Granulozyt, $\beta$ -Glukuronidase-Färbung .....	128
Abbildung	57: Heterophiler Granulozyt, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung .....	128
Abbildung	58: Heterophiler Granulozyt, Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung .....	129
Abbildung	59: Eosinophiler Granulozyt, Peroxidase-Färbung .....	130
Abbildung	60: Eosinophiler Granulozyt, Saure Phosphatase-Färbung .....	130
Abbildung	61: Eosinophiler Granulozyt, $\beta$ -Glukuronidase-Färbung .....	130
Abbildung	62: Eosinophiler Granulozyt, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung .....	130
Abbildung	63: Basophiler Granulozyt, Saure Phosphatase-Färbung .....	132
Abbildung	64: Basophiler Granulozyt, $\beta$ -Glukuronidase-Färbung .....	132
Abbildung	65: Basophiler Granulozyt, ANAE-Färbung, pH: 8,0 .....	132
Abbildung	66: Basophiler Granulozyt, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung .....	132
Abbildung	67: Lymphozyt, Saure Phosphatase-Färbung .....	133
Abbildung	68: Lymphozyten, $\beta$ -Glukuronidase-Färbung .....	133

Abbildung	69: Lymphozyt, ANAE-Färbung, pH: 8,0 .....	133
Abbildung	70: Lymphozyt, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung .....	133
Abbildung	71: Monozyt, Lymphozyt, Saure Phosphatase-Färbung .....	135
Abbildung	72: Monozyt, $\beta$ -Glukuronidase-Färbung .....	135
Abbildung	73: Monozyt, Naphthol-AS-D-Chloracetat-Färbung .....	135
Abbildung	74: Monozyt, Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung .....	135
Abbildung	75: Monozyt, ANAE-Färbung, pH: 8,0 .....	136
Abbildung	76: Erythrozyt, Elektronenmikroskopische Aufnahme .....	137
Abbildung	77: Thrombozyt, Elektronenmikroskopische Aufnahme .....	138
Abbildung	78: Heterophiler Granulozyt, Elektronenmikroskopische Aufnahme .....	139
Abbildung	79: Eosinophiler Granulozyt, Elektronenmikroskopische Aufnahme .....	140
Abbildung	80: Basophiler Granulozyt, Elektronenmikroskopische Aufnahme .....	141
Abbildung	81: Lymphozyt, Elektronenmikroskopische Aufnahme .....	142
Abbildung	82: Monozyt, Elektronenmikroskopische Aufnahme .....	143
Abbildung	83: Erythrozyten, ConA-Färbung .....	147
Abbildung	84: Thrombozyt, ConA-Färbung .....	147
Abbildung	85: Heterophiler Granulozyt, ConA-Färbung .....	147
Abbildung	86: Eosinophiler Granulozyt, ConA-Färbung .....	147
Abbildung	87: Basophiler Granulozyt, ConA-Färbung .....	148
Abbildung	88: Lymphozyt, ConA-Färbung .....	148
Abbildung	89: Monozyt, ConA-Färbung .....	148
Abbildung	90: Thrombozyt, LCA-Färbung .....	151
Abbildung	91: Thrombozyt, LCA-Färbung .....	151
Abbildung	92: Heterophiler Granulozyt, LCA-Färbung .....	151
Abbildung	93: Eosinophiler Granulozyt, LCA-Färbung .....	151
Abbildung	94: Basophiler Granulozyt, LCA-Färbung .....	152
Abbildung	95: Lymphozyt, LCA-Färbung .....	152
Abbildung	96: Monozyt, LCA-Färbung .....	152
Abbildung	97: Thrombozyt, PSA-Färbung .....	155
Abbildung	98: Heterophiler Granulozyt, PSA-Färbung .....	155
Abbildung	99: Eosinophiler Granulozyt, PSA-Färbung .....	155
Abbildung	100: Basophiler Granulozyt, PSA-Färbung .....	155
Abbildung	101: Lymphozyt, PSA-Färbung .....	156
Abbildung	102: Monozyt, PSA-Färbung .....	156
Abbildung	103: Thrombozyt, PNA-Färbung .....	159

Abbildung 104:	Heterophiler Granulozyt, PNA-Färbung	159
Abbildung 105:	Basophiler Granulozyt, PNA-Färbung	159
Abbildung 106:	Basophiler Granulozyt, PNA-Färbung	159
Abbildung 107:	Lymphozyt, PNA-Färbung	160
Abbildung 108:	Lymphozyt, PNA-Färbung	160
Abbildung 109:	Monozyt, PNA-Färbung	160
Abbildung 110:	Thrombozyt, RCA-Färbung	163
Abbildung 111:	Heterophiler Granulozyt, RCA-Färbung	163
Abbildung 112:	Basophiler Granulozyt, RCA-Färbung	163
Abbildung 113:	Lymphozyt, RCA-Färbung	163
Abbildung 114:	Monozyt, RCA-Färbung	164
Abbildung 115:	Erythrozyten, WGA-Färbung	167
Abbildung 116:	Thrombozyten, WGA-Färbung	167
Abbildung 117:	Heterophiler Granulozyt, WGA-Färbung	167
Abbildung 118:	Heterophiler Granulozyt, WGA-Färbung	167
Abbildung 119:	Eosinophiler Granulozyt, WGA-Färbung	168
Abbildung 120:	Basophiler Granulozyt, WGA-Färbung	168
Abbildung 121:	Lymphozyt, WGA-Färbung	168
Abbildung 122:	Monozyt, WGA-Färbung	168
Abbildung 123:	Thrombozyt, WGAs-Färbung	171
Abbildung 124:	Heterophiler Granulozyt, WGAs-Färbung	171
Abbildung 125:	Eosinophiler Granulozyt, WGAs-Färbung	171
Abbildung 126:	Basophiler Granulozyt, WGAs-Färbung	171
Abbildung 127:	Lymphozyt, WGAs-Färbung	172
Abbildung 128:	Monozyt, WGAs-Färbung	172
Abbildung 129:	Heterophiler Granulozyt, DBA-Färbung	175
Abbildung 130:	Heterophiler Granulozyt, DBA-Färbung	175
Abbildung 131:	Thrombozyt, SNA-Färbung	178
Abbildung 132:	Heterophiler Granulozyt, SNA-Färbung	178
Abbildung 133:	Basophiler Granulozyt, SNA-Färbung	178
Abbildung 134:	Eosinophiler Granulozyt, SNA-Färbung	178
Abbildung 135:	Lymphozyt, SNA-Färbung	179
Abbildung 136:	Heterophiler Granulozyt, UEA-1-Färbung	182
Abbildung 137:	Heterophiler Granulozyt, UEA-1-Färbung	182
Abbildung 138:	Thrombozyt, PHA-E-Färbung	185

Abbildung 139: Heterophiler Granulozyt, PHA-E-Färbung .....	185
Abbildung 140: Lymphozyt, PHA-E-Färbung .....	185
Abbildung 141: Monozyt, PHA-E-Färbung .....	185
Abbildung 142: Thrombozyt, PHA-L-Färbung .....	188
Abbildung 143: Heterophiler Granulozyt, PHA-L-Färbung .....	188
Abbildung 144: Heterophiler Granulozyt, MAA-Färbung .....	191
Abbildung 145: Eosinophiler Granulozyt, MAA-Färbung .....	191
Abbildung 146: Basophiler Granulozyt, MAA-Färbung .....	191
Abbildung 147: Heterophiler Granulozyt, ConA+HZ-Färbung .....	192
Abbildung 148: Heterophiler Granulozyt, ConA-Färbung, ohne HZ .....	192
Abbildung 149: Heterophiler Granulozyt, SBA-FITC-Färbung .....	193
Abbildung 150: Heterophiler Granulozyt, SBA-FITC-Färbung mit NM .....	193
Abbildung 151: Erythrozyten, Phalloidin-TRITC-Färbung .....	196
Abbildung 152: Thrombozyt, Phalloidin-TRITC-Färbung .....	196
Abbildung 153: Heterophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC-Färbung .....	196
Abbildung 154: Eosinophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC-Färbung .....	196
Abbildung 155: Basophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC-Färbung .....	197
Abbildung 156: Lymphozyt, Phalloidin-TRITC-Färbung .....	197
Abbildung 157: Monozyt, Phalloidin-TRITC-Färbung .....	197
Abbildung 158: Erythrozyten, Tubulin-FITC-Färbung .....	200
Abbildung 159: Thrombozyt, Tubulin-Färbung .....	200
Abbildung 160: Heterophiler Granulozyt, Tubulin-FITC-Färbung .....	200
Abbildung 161: Eosinophiler Granulozyt, Tubulin-FITC-Färbung .....	200
Abbildung 162: Basophiler Granulozyt, Tubulin-FITC-Färbung .....	201
Abbildung 163: Lymphozyt, Tubulin-FITC-Färbung .....	201
Abbildung 164: Lymphozyten, Tubulin-FITC-Färbung .....	201
Abbildung 165: Monozyt, Tubulin-FITC-Färbung .....	201
Abbildung 166: Erythrozyten, Vimentin-FITC-Färbung .....	203
Abbildung 167: Thrombozyt, Vimentin-FITC-Färbung .....	203
Abbildung 168: Heterophiler Granulozyt, Vimentin-FITC-Färbung .....	203
Abbildung 169: Eosinophiler Granulozyt, Vimentin-FITC-Färbung .....	203
Abbildung 170: Basophiler Granulozyt, Vimentin-FITC-Färbung .....	204
Abbildung 171: Lymphozyt, Vimentin-FITC-Färbung .....	204
Abbildung 172: Monozyt, Vimentin-FITC-Färbung .....	204

#### 4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der Lymphozyten .....	45
Tabelle 2: Prozentualer Anteil der Monozyten .....	53
Tabelle 3: Vergleich von Lektinen und Antikörpern .....	62
Tabelle 4: Zuckerspezifität und Herkunft der Lektine .....	65
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Strauße .....	80
Tabelle 6: Verwendete FITC-markierte Lektine .....	94
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete biotinylierte Lektine .....	97
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Hemmzucker .....	100
Tabelle 9: Blutwerte der einzelnen Strauße .....	104
Tabelle 10: Übersichtsfärbungen Erythrozyten .....	106
Tabelle 11: Übersichtsfärbung Thrombozyten .....	107
Tabelle 12: Substrathistochemie der Thrombozyten .....	109
Tabelle 13: Übersichtsfärbung heterophile Granulozyten .....	110
Tabelle 14: Substrathistochemie heterophile Granulozyten .....	111
Tabelle 15: Übersichtsfärbungen eosinophile Granulozyten .....	112
Tabelle 16: Substrathistochemische eosinophile Granulozyten .....	114
Tabelle 17: Übersichtsfärbungen basophile Granulozyten .....	115
Tabelle 18: Substrathistochemische Färbungen: Basophile Granulozyten .....	117
Tabelle 19: Übersichtsfärbungen Lymphozyten .....	120
Tabelle 20: Substrathistochemische Färbungen: Lymphozyten .....	121
Tabelle 21: Übersichtsfärbungen Monozyten .....	122
Tabelle 22: Substrathistochemische Färbungen Monozyten .....	124
Tabelle 23: Enzymfärbungen Erythrozyten .....	125
Tabelle 24: Enzymfärbungen Thrombozyten .....	126
Tabelle 25: Enzymfärbungen Heterophile Granulozyten .....	127
Tabelle 26: Enzymfärbungen Eosinophile Granulozyten .....	129
Tabelle 27: Enzymfärbungen Basophile Granulozyten .....	131
Tabelle 28: Enzymfärbungen Lymphozyten .....	132
Tabelle 29: Enzymfärbungen Monozyten .....	134
Tabelle 30: Einzelauswertung Lektine: ConA-FITC .....	146
Tabelle 31: Einzelauswertung Lektine: LCA-FITC .....	150
Tabelle 32: Einzelauswertung Lektine: PSA-FITC .....	154
Tabelle 33: Einzelauswertung Lektine: PNA-FITC .....	158



Tabelle 34: Einzelauswertung Lektine: RCA-FITC .....	162
Tabelle 35: Einzelauswertung Lektine: WGA-FITC .....	166
Tabelle 36: Einzelauswertung Lektine: WGAs-FITC .....	170
Tabelle 37: Zusammenfassung DBA-FITC .....	174
Tabelle 38: Einzelauswertung Lektine: SNA-Biotin .....	177
Tabelle 39: Einzelauswertung Lektine: UEA-1-FITC .....	181
Tabelle 40: Einzelauswertung Lektine: PHA-E-FITC .....	184
Tabelle 41: Einzelauswertung Lektine: PHA-L-FITC .....	187
Tabelle 42: Einzelauswertung Lektine: MAA-Biotin .....	190
Tabelle 43: Einzelauswertung Zytoskelett: Aktin .....	195
Tabelle 44: Einzelauswertung Zytoskelett: Tubulin .....	199
Tabelle 45: Einzelauswertung Zytoskelett: Vimentin .....	203

## IX Literaturverzeichnis

ABU-BASHA, E. A., GEHRING, R., HANTASH, T. M., AL-SHUNNAQ, A. F. und IDKAIDEK, N. M.: Pharmacokinetics and bioavailability of sulfadiazine and trimethoprim following intravenous, intramuscular and oral administration in ostriches (*Struthio camelus*). *J Vet Pharmacol Ther* 32 (2009), S. 258-263

AHMED, B. A., JEFFUS, B. C., BUKHARI, S. I., HARNEY, J. T., UNAL, R., LUPASHIN, V. V., VAN DER SLUIJS, P. und KILIC, F.: Serotonin transamidates Rab4 and facilitates its binding to the C terminus of serotonin transporter. *J Biol Chem* 283 (2008), S. 9388-9398

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. und WALTER, P.: *Morphologie der Zelle*, 4. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.

ALSAKER, R. D., LABER, J., STEVENS, J. und PERMAN, V.: A comparison of polychromasia and reticulocyte counts in assessing erythrocytic regenerative response in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 170 (1977), S. 39-41

ANDREASEN, C. B. und LATIMER, K. S.: Cytochemical staining characteristics of chicken heterophils and eosinophils. *Vet Clin Pathol* 19 (1990), S. 51-54

ARONSON, M., MEDALIA, O., SCHORI, L., MIRELMAN, D., SHARON, N. und OFEK, I.: Prevention of colonization of the urinary tract of mice with escherichia coli by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. *J Infect Dis* 139 (1979), S. 329-332

ASHWELL, G. und MORELL, A.: The dual role of sialic acid in the hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *Biochem Soc Symp* (1974), S. 117-124

ASTI, R. N., KURTDEDE, N. und OZEN, A.: Light and electron microscopic studies on alpha naphthyl acetate esterase activity of peripheral blood T lymphocytes in chicken. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 106 (1999), S. 397-399

ATKINS, H. und ANDERSON, P. J.: Actin and tubulin of normal and leukaemic lymphocytes. *Biochem J* 207 (1982), S. 535-539

ATWAL, O. S., MCFARLAND, L. Z. und WILSON, W. O.: Hematology of coturnix from birth to maturity. *Poultry science (Archiv)* (1964), S. 1392-1401

AUB, J. C., TIESLAU, C. und LANKESTER, A.: Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50 (1963), S. 613-619

AWADHIYA, R. P., VEGAD, J. L. und KOLTE, G. N.: Demonstration of the phagocytic activity of chicken thrombocytes using colloidal carbon. *Res Vet Sci* 29 (1980), S. 120-122

BAIN, B. und HUHNS, D.: *Roche Grundkurs hämatologische Morphologie*, 7. Aufl. Blackwell, Wien Berlin,

1997.

BARKAI-GOLAN, R., MIRELMAN, D. und SHARON, N.: Studies on growth inhibition by lectins of penicillia and aspergilli. *Arch Microbiol* 116 (1978), S. 119-121

BARNARD, R., BARNARD, A., SALMON, G., LIU, W. und SRECKOVIC, S.: Histamine-induced actin polymerization in human eosinophils: an imaging approach for histamine H4 receptor. *Cytometry A* 73 (2008), S. 299-304

BARRETT, L. A. und DAWSON, R. B.: Avian erythrocyte development: microtubules and the formation of the disk shape. *Dev Biol* 36 (1974), S. 72-81

BEHNKE, O.: A comparative study of microtubules of disk-shaped blood cells. *J. Ultrastruct. Res.* 31 (1970), S. 61-75

BELLEVILLE, J., CORNILLON, B., PAUL, J., BAGUET, J., CLENDINNEN, G. und ELOY, R.: Haemostasis, blood coagulation and fibrinolysis in the japanese quail. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 71 (1982), S. 219-230

BELTRAMO, D. M., ARCE, C. A. und BARRA, H. S.: Tubulin, but not microtubules, is the substrate for tubulin:tyrosine ligase in mature avian erythrocytes. *J Biol Chem* 262 (1987), S. 15673-15677

BENES, P., MACECKOVA, V., ZDRAHAL, Z., KONECNA, H., ZAHRADNICKOVA, E., MUZIK, J. und SMARDA, J.: Role of vimentin in regulation of monocyte/macrophage differentiation. *Differentiation* 74 (2006), S. 265-276

BENETT, H. S.: Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* 11 (1963), S. 14-23

BENGTSSON, T., ORSELIUS, K. und WETTERO, J.: Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. *Cell Biol Int* 30 (2006), S. 154-163

BENNETT, V.: Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 2 (1990), S. 51-56

BEZZEL, E. und PRINZINGER, R.: *Ornithologie*, 2. Aufl. Ulmer, Stuttgart, 1977.

BIENZLE, D.: Monocytes and macrophages. In: *Schalm's Veterinary hematology* B. F., FELDMANN, J. G., ZINKL und N. C., JAIN (Hrsg.). Williams & Wilkins, Lippincott, 2000

BIENZLE, D. und SMITH, S.: Embryonic and fetal hematopoiesis. In: *Schalms Veterinary hematology* FELDMANN, B.F., ZINKL, J.G. und JAIN, N.C. (Hrsg.). 5. Aufl. Williams & Wilkins, Lippincott, 2000

- BITZMANN, D. 2009. Ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchung am Blut des Rindes (*Bos taurus*). München.
- BONADIMAN, S. F., STRATIEVSKY, G. C., MACHADO, J. A., ALBERNAZ, A. P., RABELO, G. R. und DAMATTA, R. A.: Leukocyte ultrastructure, hematological and serum biochemical profiles of ostriches (*Struthio camelus*). *Poult Sci* 88 (2009), S. 2298-2306
- BOUNOUS und STEDMAN: Normal avian hematology. In: *Schalm's Veterinary Hematology* FELDMANN, B.F., ZINKL, J.G. und JAIN, N.C. (Hrsg.). 5. Aufl. Williams & Wilkins, Lippincott, 2000
- BOYD, W. C. und SHAPLEIGH, E.: Specific precipitating activity of plant agglutinins (Lectins). *Science* 119 (1954), S. 419
- BROOKS, S. A., LEATHEM, A. J. C. und SCHUMACHER, U.: *Lectin histochemistry, a concise practical handbook*, Bios. Sci. Pub., 1997.
- BROWN, M. J., HALLAM, J. A., COLUCCI-GUYON, E. und SHAW, S.: Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J Immunol* 166 (2001), S. 6640-6646
- BRÜCKMANN, E. 2010. Ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchung am Blut des Pferdes (*Equus ferus caballus*). München.
- BRUNE, K., LEFFELL, M. S. und SPITZNAGEL, J. K.: Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocytes. *Infect Immun* 5 (1972), S. 283-287
- BUCKLAND, K. F., WILLIAMS, T. J. und CONROY, D. M.: Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H(4) receptor. *Br J Pharmacol* 140 (2003), S. 1117-1127
- BUDDECKE, E.: Proteoglycane. In: *The sugar code. Fundamentals of Glycosciences 1.Aufl.* GABIUS, H.-J. (Hrsg.). Wiley-VHC, 2009
- BURSTONE, M. S.: *Enzyme histochemistry*, Academic Press, New York London, 1962.
- BUSCHMANN, H. und SCHMID, D.: *Blutgruppen bei Tieren*, 1. Aufl. Enke, Stuttgart, 1985.
- CAMPBELL, F.: Fine structure of the bone marrow of the chicken and pigeon. *J Morphol* 123 (1967), S. 405-439
- CAMPBELL, T. W.: Hematology of Birds. In: *Veterinary hematology and clinical chemistry* THRALL, M. A. (Hrsg.). Williams & Wilkins, Lippincott, 2004
- CAMPBELL, T. W. und ELLIS, C. K.: *Avian & exotic animal hematology & cytology* 3. Aufl. Blackwell, Iowa, 2007.

CARULLI, G., MATTII, L., AZZARA, A., BRIZZI, S., GALIMBERTI, S., ZUCCA, A., BENEDETTI, E. und PETRINI, M.: Actin polymerization in neutrophils from donors of peripheral blood stem cells: divergent effects of glycosylated and nonglycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Hematol* 81 (2006), S. 318-323

CHOU, Y. H., SKALLI, O. und GOLDMAN, R. D.: Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. *Curr Opin Cell Biol* 9 (1997), S. 49-53

CHRISTIANSEN, N. P. und SKUBITZ, K. M.: Identification of the major lectin-binding surface proteins of human neutrophils and alveolar macrophages. *Blood* 71 (1988), S. 1624-1632

CLARK, P., BOARDMAN, W. und RAIDAL, S.: *Atlas of clinical avian hematology*, 1. Aufl. Wiley-Blackwell, Sussex, 2009.

COATES, M. L.: Hemoglobin function in the vertebrates: an evolutionary model. *J Mol Evol* 6 (1975), S. 285-307

COUTO, C. G.: Hämatologie und Immunologie. In: *Innere Medizin der Kleintiere* NELSON, R.W. und COUTO, C.G. (Hrsg.). 3. Aufl. Urban und Fischer, 2006

COWDEN, R. R.: Quantitative and qualitative cytochemical studies on the amphiuma basophil leucocyte. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 67 (1965), S. 219-233

CUNNINGHAM, B. A., HEMPERLY, J. J., HOPP, T. P. und EDELMAN, G. M.: Favin versus concanavalin A: Circularly permuted amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979), S. 3218-3222

DAIMON, T. und CAXTON-MARTINS, A.: Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leucocytes. *J Anat* 123 (1977), S. 553-562

DAIMON, T. und UCHIDA, K.: Cytochemical demonstration of amine-storing vacuoles and lysosomes in the chicken thrombocytes. *Histochemistry* 75 (1982), S. 309-317

DAIMON, T. und UCHIDA, K.: Ultrastructural evidence of the existence of the surface connected canalicular system in the thrombocyte of the shark (*Triakis scyllia*). *J Anat* 141 (1985), S. 193-200

DAIMON, T., UCHIDA, K. und MIZUHIRA, V.: Ultrastructural localization of acid protein polysaccharides and calcium in the vacuoles of the chicken thrombocyte. *Histochemistry* 52 (1977), S. 25-32

DAMATTA, R. A., MANHAES, L., SEABRA, S. H. und DE SOUZA, W.: Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. *Biocell* 22 (1998), S. 45-52

DE BRABANDER, M.: Microtubules, central elements of cellular organization. *Endeavour* 6 (1982), S. 124-134

DEBUS, E., WEBER, K. und OSBORN, M.: The cytoskeleton of blood platelets viewed by immunofluorescence microscopy. *Eur J Cell Biol* 24 (1981), S. 45-52

DELLAGI, K., VAINCHENKER, W., VINCI, G., PAULIN, D. und BROUET, J. C.: Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *EMBO J* 2 (1983), S. 1509-1514

DENK, H.: Immunhistochemische Färbemethoden. In: *Mikroskopische Technik* (Hrsg.). P. Böck, Urban & Schwarzenberg, 1989

DIETERIEN-LIEVRE, F.: Birds. In: *Vertebrate blood cells* RAWLEY, A. und RATCLIFFE, N. (Hrsg.). Cambridge University Press, Cambridge, 1988

DIXON, H.: Defining a lectin. *nature* 292 (1981), S. 192

DJEU, J. Y., SERBOUSEK, D. und BLANCHARD, D. K.: Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 76 (1990), S. 1405-1409

DODDS, W. J.: Hemostasis. In: *Clinical biochemistry of domestic animals* KANEKO, HARVEY und BRUSS (Hrsg.). Academic Press, San Diego, 1997

DOERR, J. A. und HAMILTON, P. B.: New evidence for intrinsic blood coagulation in chickens. *Poult Sci* 60 (1981), S. 237-242

DÖNMEZ, H. H. und SUR, E.: Hematology and enzyme histochemistry of the peripheral blood leucocytes in rock partridges (*Alectoris graeca*). *Poult Sci* 87 (2008), S. 56-60

DRABEROVA, L., DRABEROVA, E., SURVILADZE, Z. und DRABER, P.: Protein tyrosine kinase p53/p56(lyn) forms complexes with gamma-tubulin in rat basophilic leukemia cells. *Int Immunol* 11 (1999), S. 1829-1839

DRI, P., BISIACCHI, B., CRAMER, R., BELLAVITE, P., DE NICOLA, G. und PATRIARCA, P.: Oxidative metabolism of chicken polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. *Mol Cell Biochem* 22 (1978), S. 159-166

DRICKAMER, K.: Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 263 (1988), S. 9557-9560

DU PLESSIS, L. und VAN WILPE, E.: Thrombocyte morphology and morphometric observations in two vulture species. *Vet Clin Pathol* 38 (2009), S. 316-320

EASLEY, J. R.: Erythrogram and red cell distribution width of equidae with experimentally induced anemia. *Am J Vet Res* 46 (1985), S. 2378-2384

- ELIFIO-ESPOSITO, S., TOMAZELI, L., SCHWARTZ, C., GIMENEZ, A. P., FUGII, G. M., FERNANDES, L. C., ZISHLER, L. F., STUELP-CAMPELO, P. M. und MORENO, A. N.: Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from bothrops jararacussu venom. *BMC Immunol* 12 (2011), S. 10
- ENDO, Y., OKA, T., TSURUGI, K. und FRANZ, H.: The mechanism of action of the cytotoxic lectin from Phoradendron californicum: the RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett* 248 (1989), S. 115-118
- ERGUN, E., ERGUN, L., OZEN, A. und ASTI, R. N.: Determination of ANAE activity in the peripheral blood leukocytes of the ostrich. *Revue de medecine veterinaire* 155 (2004)
- ESCOLAR, G., KRUMWIEDE, M. und WHITE, J. G.: Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol* 123 (1986), S. 86-94
- ESPADA, Y.: Avian hemostasis. In: *Schalm's veterinary hematology* FELDMANN, B.F., ZINKL, J.G. und JAIN, N.C. (Hrsg.). 5. Aufl. Wiley & Blackwell, 2000
- EVANS, E. W., BEACH, G. G., WUNDERLICH, J. und HARMON, B. G.: Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *J Leukoc Biol* 56 (1994), S. 661-665
- F.SINOWATZ und H.HEES: *Histologie*, 3.Aufl. Deutsche Ärzte-Verlag, 2000.
- FAIS, S. und MALORNI, W.: Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *J Leukoc Biol* 73 (2003), S. 556-563
- FAWCETT, W. und WITEBSKY, F.: Observations on the ultrastructure of nucleated erythrocytes and thrombocytes, with particular reference to the structural basis of their discoidal shape. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 62 (1964), S. 785-806
- FERNANDEZ, F. und GRINDEM, C.: Reticulocyte Response. In: *Schalm's veterinary hematology* FELDMANN, B. F., ZINKL, J.G. und JAIN, N.C. (Hrsg.). 5. Aufl. Wiley & Blackwell, 2000
- FEY, F.: [Comparative hemocytology of lower vertebrates. II Thrombocytes]. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 85 (1966), S. 205-217
- FITZGERALD, T. C.: *The coturnix quail*, Iowa State Press, 1969.
- FLOWER, R. L. und WILCOX, G. E.: Identification of a subpopulation of chicken B lymphocytes by the lectin from lotus tetragonolobus. *J Immunol Methods* 46 (1981), S. 347-352
- FOLLETTE, J. H., VALENTINE, W. N. und LAWRENCE, J. S.: The beta glucuronidase content of human leukocytes in health and in disease. *J Lab Clin Med* 40 (1952), S. 825-840

- FRANZ, H.: [100 years of lectin research--a balance]. *Naturwissenschaften* 77 (1990), S. 103-109
- FREUND, M.: *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*, 11. Aufl. Urban & Fischer, München, 2008.
- GABIUS, H.-J.: *The sugar code*, 1. Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2009.
- GABIUS, H.-J. und RÜDIGER, H.: Plant Lectins. In: *The sugar code 1. Aufl.* GABIUS, H.-J. (Hrsg.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2009
- GABIUS, H.-J. und UHLENBRUCK, G.: Lektine. *Spektrum der Wissenschaft* (1988), S. 50-80
- GABIUS, H. J., ANDRE, S., JIMENEZ-BARBERO, J., ROMERO, A. und SOLIS, D.: From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem Sci* 36 (2011), S. 298-313
- GABIUS, H. J., SIEBERT, H. C., ANDRE, S., JIMENEZ-BARBERO, J. und RUDIGER, H.: Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem* 5 (2004), S. 740-764
- GASSMANN, M. und LUTZ, T. A.: Blut. In: *Physiologie der Haustiere* ENGELHARDT, W.V. und BREVES, G. (Hrsg.). 2. Aufl. Enke, Stuttgart, 2004
- GEERTS, W. J., LAMERS, W. H. und MOORMAN, A. F.: Differences in erythropoiesis in normal chicken and quail embryos. *Histochem J* 25 (1993), S. 280-290
- GEORGATOS, S. D. und BLOBEL, G.: Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. *J Cell Biol* 105 (1987), S. 105-115
- GERSHWIN, L. J., LANCE, P. und ROKITO, A. S.: Comparison of analysis of bovine surface immunoglobulin bearing and peanut agglutinin binding lymphocytes by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Vet Immunol Immunopathol* 5 (1983), S. 185-196
- GLICK, B.: Immunphysiology. In: *Sturkie's avian physiology* WHITTOW, G. C. (Hrsg.). 5. Aufl. Academic press, 2000
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. und SHARON, N.: What should be called a lectin? *nature* 285 (1980), S. 66
- GOLDSTEIN, I. J. und PORETZ, R.: Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. LIENER, I.E., SHARON, N. und GOLDSTEIN, I.J. (Hrsg.). Academic Press, 1986
- GRANGER, B. L. und LAZARIDES, E.: Structural associations of synemin and vimentin filaments in avian erythrocytes revealed by immunoelectron microscopy. *Cell* 30 (1982), S. 263-275



GRANGER, B. L., REPASKY, E. A. und LAZARIDES, E.: Synemin and vimentin are components of intermediate filaments in avian erythrocytes. *J Cell Biol* 92 (1982), S. 299-312

GRECCHI, R., SALIBA, A. M. und MARIANO, M.: Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mono-nuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. *J Pathol* 130 (1980), S. 23-31

GREER, J., KAUFMAN, H. W. und KALB, A. J.: An x-ray crystallographic study of concanavalin A. *J Mol Biol* 48 (1970), S. 365-366

GUPTA, A. P. und CAMPENOT, E. S.: Cytoskeletal F-actin polymerization from cytosolic G-actin occurs in the phagocytosing immunocytes of arthropods (*Limulus polyphemus* and *Gromphadorhina portentosa*): does [cAMP] play any role? *J Invertebr Pathol* 68 (1996), S. 118-130

GYLSTORFF, I. und GRIMM, F.: *Vogelkrankheiten*, 2. Aufl. UTB, Stuttgart, 1998.

HABERMANN, F. A., ANDRE, S., KALTNER, H., KUBLER, D., SINOWATZ, F. und GABIUS, H. J.: Galectins as tools for glycan mapping in histology: comparison of their binding profiles to the bovine zona pellucida by confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cell Biol* 135 (2011), S. 539-552

HAGEMANN, F.-G. 2009. Naphthol-As-D-Chloracetatesterase-Färbung.

HARRIS, J. R. und BROWN, J. N.: Fractionation of the avian erythrocyte: an ultrastructural study. *J. Ultrastruct. Res.* 36 (1971), S. 8-23

HAWKEY, C. M. und DENNETT, T. B.: *Color atlas of comparative veterinary hematology*, 1. Aufl. Iowa State University press, 1989.

HAYDON, G. B. und TAYLOR, D. A.: Microtubules in hamster platelets. *J Cell Biol* 26 (1965), S. 673-676

HEBERT, R., NANNEY, J., SPANO, J. S., PEDERSOLI, W. M. und KRISTA, L. M.: Erythrocyte distribution in ducks. *Am J Vet Res* 50 (1989), S. 958-960

HODGES, R. D.: Thrombocytes. In: *The histology of the fowl* HODGES, R.D. (Hrsg.). Academic Press, London, 1974

HODGES, R. D.: Normal Avian (Poultry) Haematology. In: *Comparative clinical haematology* R.K., ARCHER und L.B., JEFFCOTT (Hrsg.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977

HOFFMANN, H. J., DAHL, C., SCHIOTZ, P. O., BERGLUND, L. und DAHL, R.: Lectins interact differentially with purified human eosinophils, cultured cord blood-derived mast cells and the myeloid leukaemic cell line AML14.3D10: induction of interleukin-4 secretion is conserved among granulocytes, but is not proportional to agglutination or lectin-glycoprotein interaction. *Clin Exp Allergy* 33 (2003), S. 930-935

HORN, F., LINDENMEIER, G., IMOC, GRILLHÖSL, C., BERGHOLD, S., SCHNEIDER, N. und MÜNSTER, B.: *Biochemie des Menschen*, 2. Aufl. Thieme, Stuttgart New York, 2003.

HOUSEWEART, M. K. und CLEVELAND, D. W.: Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. *Curr Opin Cell Biol* 10 (1998), S. 93-101

HUANG, Z., FANG, J., GU, J., YAN, Y. und ZHOU, J.: Development of a capture ELISA to determine kinetics of soluble CD25 following in vitro and in vivo stimulation of duck peripheral blood monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 140 (2011), S. 102-109

HUNT, R. C. und MARSHALL, L. M.: The interaction of lectins with the surface of differentiating erythroleukaemic cells. *J Cell Sci* 38 (1979), S. 315-329

IAZBIK, M. C. und COUTO, C. G.: Morphologic characterization of specific granules in Greyhound eosinophils. *Vet Clin Pathol* 34 (2005), S. 140-143

INOUE, M., YAMAMOTO, H. und HIHARA, H.: Ultrastructural cytochemical characterization of alpha-naphthyl acetate esterase in chicken monocytic cell lines. *J Vet Med Sci* 53 (1991), S. 415-418

ISAACKS, R., HARKNESS, D., SAMPSELL, R., ADLER, J., ROTH, S., KIM, C. und GOLDMAN, P.: Studies on avian erythrocyte metabolism. Inositol tetrakisphosphate: the major phosphate compound in the erythrocytes of the ostrich (*struthio camelus camelus*). *Eur J Biochem* 77 (1977), S. 567-574

ISAACKS, R. E., KIM, C. Y., LEGATO, T. J., JOHNSON, A. E., GOLDMAN, P. H., HARKNESS, D. R. und COSTA, A.: Studies on avian erythrocyte metabolism. IX. Relationship of changing organic phosphate composition to whole blood oxygen affinity during development of the ostrich (*struthio camelus camelus*). *Dev Biol* 75 (1980), S. 485-491

JAIN, N. C.: *Essentials of veterinary hematology*, 1. Aufl. Wiley-Blackwell, 1993.

JANEWAY, C. A., JR. und MEDZHITOV, R.: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20 (2002), S. 197-216

JANZARIK, H.: Nucleated thrombocytoid cells. II. Phase- and interference-contrast microscopic studies on blood cells of the domestic fowl. *Cell Tissue Res* 219 (1981), S. 497-510

JANZEN, D. H., JUSTER, H. B. und LIENER, I. E.: Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science* 192 (1976), S. 795-796

JÖRNS, J., MANGOLD, U., NEUMANN, U., VAN DAMME, E. J., PEUMANS, W. J., PFULLER, U. und SCHUMACHER, U.: Lectin histochemistry of the lymphoid organs of the chicken. *Anat Embryol (Berl)* 207 (2003), S. 85-94

KAMAU, J. M., PATRICK, B. T. und MUSHI, E. Z.: The effect of mixing and translocating juvenile ostriches

(*Struthio camelus*) in botswana on the heterophil to lymphocyte ratio. *Trop Anim Health Prod* 34 (2002), S. 249-256

KANELLOPOULOS, P. N., PAVLOU, K., PERRAKIS, A., AGIANIAN, B., VORGAS, C. E., MAVROMMATIS, C., SOUFI, M., TUCKER, P. A. und HAMODRAKAS, S. J.: The crystal structure of the complexes of concanavalin A with 4'-nitrophenyl-alpha-D-mannopyranoside and 4'-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside. *J Struct Biol* 116 (1996), S. 345-355

KASS, L.: Cytochemistry of esterases. *vrv vrit rev clin lab sci* 10 (1979), S. 205-223

KATOH, H. und WAKASUGI, N.: Studies on blood groups in the japanese quail: the common antigens possessed by red blood cells and leukocytes, and their inheritance. *Immunogenetics* 13 (1981), S. 109-114

KIM, J. Y., LEE, Y. G., KIM, M. Y., BYEON, S. E., RHEE, M. H., PARK, J., KATZ, D. R., CHAIN, B. M. und CHO, J. Y.: Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization. *Biochem Pharmacol* 79 (2010), S. 431-443

KITAO, T. und HATTORI, K.: Concanavalin A as a carrier of daunomycin. *Nature* 265 (1977), S. 81-82

KOCOUREK, J. und HOREJSI, V.: Defining a lectin. *nature* 290 (1981), S. 188

KOLB, G. M. H.: *Vergleichende Histologie: Zytologie und Mikroanatomie der Tiere*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1991.

KOONCE, M. P., CLONEY, R. A. und BERNIS, M. W.: Laser irradiation of centrosomes in newt eosinophils: evidence of centriole role in motility. *J Cell Biol* 98 (1984), S. 1999-2010

KRAFT, W., DÜRR, U., FÜRLI, M., BOSTEDT, H. und HEINRITZI, K.: Hämatologie. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin* SCHATTAUER (Hrsg.). W. Kraft U. Dürr 1997

KROEGEL, C., VIRCHOW, J. C., JR., LUTTMANN, W., WALKER, C. und WARNER, J. A.: Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur Respir J* 7 (1994), S. 519-543

KUMMERFELD, N.: Hämatologie. In: *Kompendium der Ziervogelkrankheiten* KALETA, E. und KRAUTWALD-JUNGHANN, M.-E. (Hrsg.). 3. Aufl. Schlütersche, Hannover, 2007

LAM, K. M.: Activation, adhesion, migration and death of chicken thromocytes. *Com. Haematology Int.* 1 (1997)

LANDSTEINER, K.: Zur Erkenntnis des antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutsersums. *Zbl. Bakt.* 27 (1900), S. 357-362

- LANG, G.: *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*, Springer, Wien, New York, 2006.
- LATIMER, K. und BIENZLE, D.: Determination and interpretation of the avian leukogram. In: *Schalm's veterinary hematology* B.F., FELDMANN, J.G., ZINKL und JAIN, N. C. (Hrsg.). 5. Aufl. Williams & Wilkins, Lippincott, 2000
- LAZARIDES, E.: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283 (1980), S. 249-256
- LEE, K., MILLER, T., ANASTASSOV, I. und COHEN, W. D.: Shape transformation and cytoskeletal reorganization in activated non-mammalian thrombocytes. *Cell Biology Int.* 28 (2004), S.
- LEE, K. G., MILLER, T., ANASTASSOV, I. und COHEN, W. D.: Shape transformation and cytoskeletal reorganization in activated non-mammalian thrombocytes. *Cell Biol Int* 28 (2004), S. 299-310
- LEHTO, V. P., HOVI, T., VARTIO, T., BADLEY, R. A. und VIRTANEN, I.: Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* 47 (1982), S. 391-399
- LIEBICH, H.-G.: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*, 4. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 2004.
- LINHARTOVA, I., NOVOTNA, B., SULIMENKO, V., DRABEROVA, E. und DRABER, P.: Gamma-tubulin in chicken erythrocytes: changes in localization during cell differentiation and characterization of cytoplasmic complexes. *Dev Dyn* 223 (2002), S. 229-240
- LIS, H. und SHARON, N.: Applications of Lectins. In: *The Lectins* LIENER, I. E., SHARON, N. und GOLDSTEIN, I. (Hrsg.). Academic Press, 1986
- LOEFFLER, K.: *Nutz- und Ziergeflügel*, Eugen-Ulmer, Stuttgart-Hohenheim, 1978.
- LOJDA, Z., GOSSRAU, R. und SCHIEBLER, T. H.: *Enzyme Histochemistry*, 1. Aufl. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1979.
- LÖSCH, U., CIHAK, J., ERHARD, M. und KASPERS, B.: Blut und Abwehr. In: *Physiologie der Haustiere* ENGELHARDT, W. und BREVES, G. (Hrsg.). Enke, 2000
- LOWE, J.: Carbohydrate recognition in cell-cell-interaction. *Molecular glycobiology* (1994)
- LUCAS, A. und JAMROZ, C.: *Atlas of avian hematology*, 1. Aufl. Agricultural monograph, Washington DC, 1961.
- MAHMUDI-AZER, S., ODEMUYIWA, S. O. und MOQBEL, R.: Intelligent granules: are eosinophil crystalloid granules inimitable? *J Allergy Clin Immunol* 126 (2010), S. 28-30

- MAITI, N. K., SAINI, S. S. und SHARMA, S. N.: Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet Res Commun* 14 (1990), S. 207-210
- MALAWISTA, S. E. und BENSCH, K. G.: Human polymorphonuclear leukocytes: demonstration of microtubules and effect of colchicine. *Science* 156 (1967), S. 521-522
- MANGEAT, P. H.: Interaction of biological membranes with the cytoskeletal framework of living cells. *Biol Cell* 64 (1988), S. 261-281
- MARCHISIO, P. C., CIRILLO, D., TETI, A., ZAMBONIN-ZALLONE, A. und TARONE, G.: Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp Cell Res* 169 (1987), S. 202-214
- MARSHALL, T., SHULT, P. und BUSSE, W. W.: Release of lysosomal enzyme beta-glucuronidase from isolated human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 82 (1988), S. 550-555
- MASER, M. D. und PHILPOTT, C. W.: Marginal bands in nucleated erythrocytes. *Anat Rec* 150 (1964), S. 365-381
- MAXWELL, M. H.: An ultrastructural comparison of the mononuclear leucocytes and thrombocytes in six species of domestic bird. *J Anat* 117 (1974), S. 69-80
- MAXWELL, M. H.: Electron cytochemistry of developing and mature eosinophils in the bone marrow of the fowl and the duck. *Histochem J* 10 (1978), S. 63-77
- MAXWELL, M. H.: The fine structure of granules in eosinophil leucocytes from aquatic and terrestrial birds. *Tissue Cell* 10 (1978), S. 303-317
- MAXWELL, M. H.: The ultrastructure of eosinophil granules of the black-necked crowned crane. *J Anat* 128 (1979), S. 53-63
- MAXWELL, M. H.: The distribution and localisation of acid trimetaphosphatase in developing heterophils and eosinophils in the bone marrow of the fowl and the duck. *Cell Tissue Res* 235 (1984), S. 171-176
- MAXWELL, M. H. und ROBERTSON, G. W.: The avian heterophil leucocyte: a review. *World's Poultry Sci* 54 (1998), S. 155-178
- MELONI, M. A., GALLERI, G., PANI, G., SABA, A., PIPPIA, P. und COGOLI-GREUTER, M.: Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68 (2011), S. 125-137
- MELROSE, W. D. und NICOL, S. C.: Haematology, red cell metabolism and blood chemistry of the black-faced cormorant *Leucocarbo fuscescens*. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 102 (1992), S. 67-70

MESEGUER, J., ESTEBAN, M. A. und RODRIGUEZ, A.: Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microsc Res Tech* 57 (2002), S. 491-497

MEVES, F.: *Arch. Mikroskop. Anat.* 77 (1911)

MOISAN, E. und GIRARD, D.: Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol* 79 (2006), S. 489-498

MONSIGNY, M., ROCHE, A. C., SENE, C., MAGET-DANA, R. und DELMOTTE, F.: Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *Eur J Biochem* 104 (1980), S. 147-153

MONTALI, R. J.: Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *J Comp Pathol* 99 (1988), S. 1-26

MOON, R. T. und LAZARIDES, E.: Synthesis and post-translational assembly of intermediate filaments in avian erythroid cells: vimentin assembly limits the rate of synemin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983), S. 5495-5499

MOON, R. T. und LAZARIDES, E.: Biogenesis of the avian erythroid membrane skeleton: receptor-mediated assembly and stabilization of ankyrin (goblin) and spectrin. *J Cell Biol* 98 (1984), S. 1899-1904

MORAES, A. S. und MELLO, M. L.: The Con-A-peroxidase method for tissue localization of glucosyl and mannosyl groups applied to mouse hepatocytes and chicken erythrocytes. *Acta Histochem* 108 (2006), S. 475-479

MORIYA, O. und ICHIKAWA, Y.: Accumulation of eosinophils and monocytes in lymphoid organs of chick-embryos. II. Effect of mitogenic stimulation. *Microbiol Immunol* 23 (1979), S. 523-531

MUELLER, J., BRUN DEL RE, G., BUERKI, H., KELLER, H. U., HESS, M. W. und COTTIER, H.: Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol* 5 (1975), S. 270-274

MUSHI, E. Z., BINTA, M. G., CHABO, R. G., ISA, J. F. und KAPAATA, R. W.: Selected hematologic values of farmed ostriches (*struthio camelus*) in Botswana. *J Vet Diagn Invest* 11 (1999), S. 372-374

NATH, J., FLAVIN, M. und GALLIN, J. I.: Tubulin tyrosinolation in human polymorphonuclear leukocytes: studies in normal subjects and in patients with the chediak-higashi syndrome. *J Cell Biol* 95 (1982), S. 519-526

NELSON, D. und COX, M.: *Lehninger Biochemie*, Springer, 2008.

NEWMAN, R. A. und UHLENBRUCK, G. G.: Investigation into the occurrence and structure of lectin receptors on human and bovine erythrocytes milk fat globule and lymphocyte plasma-membrane glycoproteins. *Eur J Biochem* 76 (1977), S. 149-155

- NICKEL, R., SCHUMMER, A. und SEIFERLE, E.: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, 3. Aufl. Thieme, 2004.
- NICKEL, R., SCHUMMER, A. und SEIFERLE, E.: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere* VOLLMERHAUS, B. (Hrsg.). Parey, 2004
- NICOL, S. C., MELROSE, W. und STAHEL, C. D.: Haematology and metabolism of the blood of the little penguin, eudyptula minor. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 89 (1988), S. 383-386
- NIELSEN, H. V., JOHNSEN, A. H. und SCHIOTZ, P. O.: Expression of actin and tubulins in purified human basophil leukocytes upon stimulation with IL-3. *Int Arch Allergy Immunol* 133 (2004), S. 340-347
- NIELSEN, L. F., MOE, D., KIRKEBY, S. und GARBARSCHE, C.: Sirius red and acid fuchsin staining mechanisms. *Biotech Histochem* 73 (1998), S. 71-77
- NIRMALAN, G. P., ATWAL, O. S. und CARLSON, H. C.: Ultrastructural studies on the elucocytes and thrombocytes in the circulating blood of Japanese quail. *Poult Sci* 51 (1972), S. 2050-2055
- NIRMALAN, G. P. und ROBINSON, G. A.: Haematology of the japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Br Poult Sci* 12 (1971), S. 475-481
- NORTH, S. J., VON GUNTEN, S., ANTONOPOULOS, A., TROLLOPE, A., MACGLASHAN, D. W., JR., JANG-LEE, J., DELL, A., METCALFE, D. D., KIRSHENBAUM, A. S., BOCHNER, B. S. und HASLAM, S. M.: Glycomic analysis of human mast cells, eosinophils and basophils. *Glycobiology* (2011), S.
- ODENBACH, W.: *Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung*, Aufl. Parey, Stuttgart, 1997.
- OLAH, I. und VERVELDE, L.: Structure of the avian lymphoid system. In: *Avian immunology* DAVISON, F., KASPERS, B. und SCHAT, K. (Hrsg.). Academic press, 2008
- OLINS, A. L., HERRMANN, H., LICHTER, P. und OLINS, D. E.: Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization. *Exp Cell Res* 254 (2000), S. 130-142
- PAAPE, M. J., BANNERMAN, D. D., ZHAO, X. und LEE, J. W.: The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 34 (2003), S. 597-627
- PALOMEQUE, J., PINTO, D. und VISCOR, G.: Hematologic and blood chemistry values of the Masai ostrich (*Struthio camelus*). *J Wildl Dis* 27 (1991), S. 34-40
- PANTE, N. und KANN, M.: Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* 13 (2002), S. 425-434
- PARVARI, R., AVIVI, A., LENTNER, F., ZIV, E., TEL-OR, S., BURSTEIN, Y. und SCHECHTER, I.:

Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J* 7 (1988), S. 739-744

PARWARESCH, M. R., DANNENBERG, K. und LEDER, L. D.: [The demonstration of naphthol-AS-D-chloracetate esterase in normal basophil granulopoietic cells]. *Klin Wochenschr* 48 (1970), S. 1008-1009

PODLIACHOUK, L., BOESIGER, E. und BENOIT, J.: [on the Blood Groups of Domestic Ducks]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 258 (1964), S. 2435-2437

PODOR, T. J., SINGH, D., CHINDEMI, P., FOULON, D. M., MCKELVIE, R., WEITZ, J. I., AUSTIN, R., BOUDREAU, G. und DAVIES, R.: Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. *J Biol Chem* 277 (2002), S. 7529-7539

POLLACK, C., CARPENTER, J. W. und ANTINOFF, N.: Birds. In: *Exotic Animal Formulary* CARPENTER, J. (Hrsg.). 3. Aufl. Elsevier Saunders, St. Louis, 2005

PSCHYREMBEL: *Klinisches Wörterbuch*, 260. de Gruyter, Berlin, 2004.

QURESHI, M. A. und TAYLOR, R. L., JR.: Analysis of macrophage functions in Rous sarcoma-induced tumor regressor and progressor 6.B congenic chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 37 (1993), S. 285-294

RASKIN, R. E. und VALENCIANO, A.: Cytochemistry of normal leukocytes. In: *Schalm's veterinary hematology* N.C., JAIN, B.F., FELDMANN und J.G., ZINKL (Hrsg.). 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins, 2000

REED, G. L.: Platelet secretion. In: *Platelets* MICHELSON, A. D. (Hrsg.). 2. Aufl. Elsevier Science, 2007

REISNER, Y., BINIAMINOV, M., ROSENTHAL, E., SHARON, N. und RAMOT, B.: Interaction of peanut agglutinin with normal human lymphocytes and with leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979), S. 447-451

ROBERTSON, G. W. und MAXWELL, M. H.: Fine structure of secondary granule inclusions in fowl heterophils after ruthenium tetroxide fixation. *Res Vet Sci* 50 (1991), S. 121-122

ROMEIS: *Mikroskopische Technik*, 18. Aufl. Spektrum, Heidelberg, 2010.

ROMEIS, P. und BÖCK, P.: *Mikroskopische Technik*, 17. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, 1989.

ROSSE, W. F. und WALDMANN, T. A.: Factors controlling erythropoiesis in birds. *Blood* 27 (1966), S. 654-661

ROTH, J.: Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem Cell Biol* 136 (2011), S. 117-130



- RÜDIGER, H.: Lectine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. *Chemie in unserer Zeit* 15 (1981), S. 155-162
- RÜDIGER, H.: Phythemagglutinins. *Planta Med* 46 (1982), S. 3-9
- RÜDIGER, H.: Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat (Basel)* 161 (1998), S. 130-152
- RUDIGER, M. und WEBER, K.: Characterization of the post-translational modifications in tubulin from the marginal band of avian erythrocytes. *Eur J Biochem* 218 (1993), S. 107-116
- RÜSSE, I. und SINOWATZ, F.: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, 2. Aufl. Parey, Berlin, 1998.
- SALAKIJ, C., SALAKIJ, J., PRIHIRUNKIT, K., NARKKONG, N. A. und PITAKKINGTHONG, D.: Characterization of blood cells in the Leopard Cat (*Prionailurus bengalensis*). *Vet Clin Pathol* 39 (2010), S. 193-198
- SANTOS, A. A., DA SILVA, A. M., SILVA, M. R., SEGRETO, H. R. und EGAMI, M. I.: Structural, cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural characterization of blood granulocytes of the roadside hawk *Buteo magnirostris* (Gmelin, 1788) (Avian, Falconiform). *J Submicrosc Cytol Pathol* 35 (2003), S. 351-357
- SARI, E. K., KOZLU, T., KOCAMIS, H., DEPREM, T., ASTI, R. N. und NAZLI, M.: The determination of alpha naphthyl acetat esterase activities in the peripheral blood leukocytes of geese (anser anser). *Revue de medecine veterinaire* 160 (2009), S. 176-179
- SASMAL, D., GUHATHAKURTA, B., BHATTACHARYA, S. K., PAL, C. R. und DATTA, A.: N-acetyl-D-glucosamine specific hemagglutinin receptor of vibrio cholerae O1 in chicken erythrocyte membranes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32 (2002), S. 187-189
- SCHAUENSTEIN, K., GLOBERSON, A., ROSENBERG, M., SHARON, N. und WICK, G.: Characterization of chicken lymphocyte subsets separated by peanut agglutinin. *Cell Immunol* 80 (1983), S. 288-300
- SCHOTTELIUS, J.: The identification by lectins of two strain groups of *Trypanosoma cruzi*. *Z Parasitenkd* 68 (1982), S. 147-154
- SCHRATL, P. und HEINEMANN, A.: Differential involvement of Ca<sup>2+</sup> and actin filament in leukocyte shape change. *Pharmacology* 83 (2009), S. 131-140
- SEMENZA, G. L.: Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 8 (1994), S. 863-884
- SHARON, N. und LIS, H.: History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14 (2004), S. 53R-62R

SINOWATZ, F. und HEES, H.: *Histologie*, 3. Aufl. Deutsche Ärzte-Verlag, 2000.

SMITH, F. M., WEST, H. H. und JONES, D. R.: The cardiovascular system. In: *Sturkie's avian physiology* WHITTOW, G. (Hrsg.). 5. Aufl. Academic Press, San Diego, 2000

SORRELL, J. M.: Ultrastructural localization of peanut lectin binding to extravascular white blood cells in the bone marrow of embryonic chicks. *Cell Tissue Res* 251 (1988), S. 301-305

SORRELL, J. M. und WEISS, L.: Intercellular junctions in the hematopoietic compartments of embryonic chick bone marrow. *Am J Anat* 164 (1982), S. 57-66

SPANGENBERG, P.: Cytoskeleton of thrombocytes. *Acta histochemica* 39 (1990), S. 385-395

STEINERT, P. M., JONES, J. C. und GOLDMAN, R. D.: Intermediate filaments. *J Cell Biol* 99 (1984), S. 22s-27s

STILLER, R. A., BELAMARICH, F. A. und SHEPRO, D.: Aggregation and release in thrombocytes of the duck. *Am J Physiol* 229 (1975), S. 206-210

STINSON, R. S., MASHALY, M. M. und GLICK, B.: Thrombocyte migration and the release of thrombocyte inhibitory factor (ThrIF) by T and B cells in the chicken. *Immunology* 36 (1979), S. 769-774

STOSSEL, T. P.: Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol* 99 (1984), S. 15s-21s

STRAUCHEN, J. A.: Lectin receptors as markers of lymphoid cells. II. Reed-Sternberg cells share lectin-binding properties of monocyte macrophages. *Am J Pathol* 116 (1984), S. 370-376

STURKIE, P. und GRIMINGER, P.: Body fluids. In: *Avian physiology* STURKIE, PD. (Hrsg.). 4. Aufl. Springer, New York, 1986

SWAN, J. A. und SOLOMON, F.: Reformation of the marginal band of avian erythrocytes in vitro using calf-brain tubulin: peripheral determinants of microtubule form. *J Cell Biol* 99 (1984), S. 2108-2113

TETI, A., MARCHISIO, P. C. und ZALLONE, A. Z.: Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *Am J Physiol* 261 (1991), S. C1-7

THOMAS, J. S. und BLUE-MCLENDON, A.: The effects of in vitro incubation with acetylsalicylic acid on thrombocyte aggregation in whole blood from ormal ostriches. *Comparative Haematology International* (1998), S. 137-141

TIZARD, I. R.: *Veterinary immunology*, 4. Aufl. Saunders Elsevier, 1992.

- TOPP, R. C. und CARLSON, H. C.: Studies on avian heterophils. 3. Phagocytic properties. *Avian Dis* 16 (1972), S. 374-380
- TOPP, R. C. und CARLSON, H. C.: Studies on avian heterophils. II. Histochemistry. *Avian Dis* 16 (1972), S. 369-373
- TRAILL, K. N., BOCK, G., BOYD, R. und WICK, G.: Chicken thrombocytes. Isolation, serological and functional characterisation using the fluorescence activated cell sorter. *Dev Comp Immunol* 7 (1983), S. 111-125
- TSCHUDI, P. und HEES, H.: Blut und Knochenmark. In: *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere* MOSIMANN, W. und KOHLER, T. (Hrsg.). Parey, 1990
- TSURUO, T., YAMORI, T., TSUKAGOSHI, S. und SAKURAI, Y.: Enhanced cytotoxic action of methotrexate by conjugation to concanavalin A. *Int J Cancer* 26 (1980), S. 655-659
- UHLENBRUCK, G.: *Funct. Biol. Med.* 2 (1983)
- VIDEIRA, P. A., AMADO, I. F., CRESPO, H. J., ALGUERO, M. C., DALL'OLIO, F., CABRAL, M. G. und TRINDADE, H.: Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconj J* 25 (2008), S. 259-268
- WEHREND, A., HETZEL, U., HUCHZERMAYER, S., KLEIN, C. und BOSTEDT, H.: Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. *Anat Histol Embryol* 33 (2004), S. 180-182
- WEISS, L.: *Cell and tissue biology*, 6. Aufl. Urban & Schwarzenberger, 1988
- WEKSLER, B. B. und NACHMAN, R. L.: Rabbit platelet bactericidal protein. *J Exp Med* 134 (1971), S. 1114-1130
- WELSCH, U.: *Lehrbuch Histologie*, Urban & Fischer 2003
- WENGER, R. H. und GASSMANN, M.: Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378 (1997), S. 609-616
- WEYRAUCH, K. D. und SMOLLICH, A.: *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*, 1. Aufl. Enke, Stuttgart, 1998.
- WHITE, J. G.: Platelet Structure. In: *Platelets* MICHELSON, A. D. (Hrsg.). 2. Aufl. Elsevier Science, 2007
- WIECZOREK, J.: 2003. *Monozytopoese* [Online]. München-Jena: Urban & Fischer Verlag GmbH & CO.KG. [Accessed].

WIGLEY, P., HULME, S. D. und BARROW, P. A.: Phagocytic and oxidative burst activity of chicken thrombocytes to salmonella, escherichia coli and other bacteria. *Avian Pathology* 28 (1999), S. 567-572

WINCKLER, B. und SOLOMON, F.: A role for microtubule bundles in the morphogenesis of chicken erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991), S. 6033-6037

WURZINGER, L. J. und PESCHL, C.: *Histologie*, Springer Heidelberg, 2005.

WURZINGER, L. J. und ZANNER, R.: Blut. In: *Histologie* L.JUNQUEIRA, CARNEIRO, J.undGRAZL, M. (Hrsg.). 6. Aufl. Springer, Heidelberg, 2005

ZICCA, A., LEPRINI, A., CADONI, A., FRANZI, A. T., FERRARINI, M. und GROSSI, C. E.: Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acid esterase in human TM lymphocytes. *Am J Pathol* 105 (1981), S. 40-46

## **X Danksagung**

Ich möchte mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für dieses Dissertationsthema und die stets sehr freundliche und fachliche Beratung bedanken. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Tieranatomie II, insbesondere Frau Neumüller für ihre universelle Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich weiterhin bei den Besitzern der Straußenfarm Donaumoos, Familie Engelhardt für die Möglichkeit der Probenentnahme sowie für viele interessante Einblicke in die Straußenhaltung bedanken. Auch meinen jeweiligen Begleitern und Helfern (Stephanie Riegler, Lena Seifert, Johannes Meilhammer und Arnd zur Megede) möchte ich für das frühe Aufstehen, die langen Fahrten und das unermüdliche Röhrenreichen danken.

Bei Caroline Zauter, Stephanie Riegler und Katharina Merten möchte ich mich für die gemeinsame Zeit und gegenseitige Unterstützung im Labor bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Fabian Keim, der mir mit viel Geduld, Hilfsbereitschaft und technischem Wissen zur Seite stand.

Ich danke allen meinen Freunden für die stete Unterstützung und ihr Verständnis, vor allem in der Endphase der Doktorarbeit.

Meinen herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da sind und mir in jeder Situation eine unschätzbar große Hilfe sind. Meinem Bruder möchte ich für viele gute und lustige Momente danken und dafür, dass ich zu jeder Zeit auf ihn zählen kann.