

Aus dem Lehrstuhl für Tieranatomie II  
des Veterinärwissenschaftlichen Departments  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil F. Sinowatz

---

**Ultrastrukturelle, immunzytochemische  
und glykohistochemische Untersuchungen  
am Blut des Rindes**  
*(Bos tauris)*

---

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Daniela Bitzmann  
aus Bobingen

München, 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

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

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Für meine Eltern,  
Alex und Flo

# Inhaltsverzeichnis

|          |  |          |
|----------|--|----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                    | <b>1</b> |
| <b>2</b> | <b>Literaturübersicht</b>                            | <b>3</b> |
| 2.1      | Allgemeines zum Blut des Rindes . . . . .            | 3        |
| 2.1.1    | Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes . . . . .    | 3        |
| 2.1.2    | Hämatopoese . . . . .                                | 4        |
| 2.1.3    | Spezielle Hämatologie des Rindes . . . . .           | 7        |
| 2.2      | Charakterisierung der einzelnen Blutzellen . . . . . | 9        |
| 2.2.1    | Erythrozyten . . . . .                               | 9        |
| 2.2.1.1  | Allgemeines . . . . .                                | 9        |
| 2.2.1.2  | Bildung . . . . .                                    | 9        |
| 2.2.1.3  | Morphologie . . . . .                                | 10       |
| 2.2.1.4  | Aufgaben . . . . .                                   | 11       |
| 2.2.2    | Thrombozyten . . . . .                               | 11       |
| 2.2.2.1  | Allgemeines . . . . .                                | 11       |
| 2.2.2.2  | Bildung . . . . .                                    | 11       |
| 2.2.2.3  | Morphologie . . . . .                                | 12       |
| 2.2.2.4  | Zytochemische Eigenschaften . . . . .                | 15       |
| 2.2.2.5  | Aufgaben . . . . .                                   | 15       |
| 2.2.3    | Lymphozyten . . . . .                                | 16       |
| 2.2.3.1  | Allgemeines . . . . .                                | 16       |
| 2.2.3.2  | Bildung . . . . .                                    | 16       |
| 2.2.3.3  | Morphologie . . . . .                                | 17       |
| 2.2.3.4  | Zytochemische Eigenschaften . . . . .                | 17       |
| 2.2.3.5  | Aufgaben . . . . .                                   | 18       |
| 2.2.4    | Neutrophile Granulozyten . . . . .                   | 18       |
| 2.2.4.1  | Allgemeines . . . . .                                | 18       |
| 2.2.4.2  | Bildung . . . . .                                    | 19       |
| 2.2.4.3  | Morphologie . . . . .                                | 20       |
| 2.2.4.4  | Zytochemische Eigenschaften . . . . .                | 23       |
| 2.2.4.5  | Aufgaben . . . . .                                   | 23       |
| 2.2.5    | Eosinophile Granulozyten . . . . .                   | 24       |
| 2.2.5.1  | Allgemeines . . . . .                                | 24       |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.2.5.2  | Bildung . . . . .   | 24        |
| 2.2.5.3  | Morphologie . . . . .   | 25        |
| 2.2.5.4  | Zytochemische Eigenschaften . . . . .                         | 25        |
| 2.2.5.5  | Aufgaben . . . . .  | 26        |
| 2.2.6    | Basophile Granulozyten . . . . .                              | 26        |
| 2.2.6.1  | Allgemeines . . . . .   | 26        |
| 2.2.6.2  | Bildung . . . . .   | 27        |
| 2.2.6.3  | Morphologie . . . . .   | 27        |
| 2.2.6.4  | Zytochemische Eigenschaften . . . . .                         | 28        |
| 2.2.6.5  | Aufgaben . . . . .  | 28        |
| 2.2.7    | Monozyten . . . . .   | 28        |
| 2.2.7.1  | Allgemeines . . . . .   | 28        |
| 2.2.7.2  | Bildung . . . . .   | 28        |
| 2.2.7.3  | Morphologie . . . . .   | 29        |
| 2.2.7.4  | Zytochemische Eigenschaften . . . . .                         | 30        |
| 2.2.7.5  | Aufgaben . . . . .  | 30        |
| 2.3      | Glykohistochemie . . . . .                                    | 31        |
| 2.3.1    | Entstehung und Definition des Begriffs „Lektin“ . . . . .     | 31        |
| 2.3.2    | Geschichte der Lektine . . . . .                              | 32        |
| 2.3.3    | Struktur und Einteilung der Lektine . . . . .                 | 33        |
| 2.3.4    | Funktion und Anwendung von Lektinen . . . . .                 | 35        |
| 2.3.5    | Zuckerstrukturen auf den bovinen Blutzellen . . . . .         | 37        |
| 2.3.6    | Lektinbindungsstellen der bovinen Blutzellen . . . . .        | 38        |
| 2.4      | Immunzytochemie . . . . .                                     | 43        |
| 2.4.1    | Definition und Anwendung . . . . .                            | 43        |
| 2.4.2    | Technik . . . . .   | 43        |
| 2.4.3    | Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten . . . . . | 44        |
| 2.5      | Blutgruppen beim Rind . . . . .                               | 45        |
| 2.5.1    | Die Blutgruppensysteme und deren Bestimmung . . . . .         | 45        |
| 2.5.2    | Beschreibung einzelner Blutgruppensysteme . . . . .           | 48        |
| 2.5.3    | Bedeutung der Blutgruppenbestimmung beim Rind . . . . .       | 49        |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden</b>                                  | <b>51</b> |
| 3.1      | Untersuchungsmaterial . . . . .                               | 51        |
| 3.2      | Lichtmikroskopie . . . . .                                    | 54        |
| 3.2.1    | Diff-Quick-Färbung . . . . .                                  | 54        |
| 3.2.2    | Giemsa-Färbung . . . . .                                      | 55        |
| 3.2.3    | Färbung nach May-Grünwald . . . . .                           | 55        |
| 3.2.4    | Panoptische Färbung nach Pappenheim . . . . .                 | 56        |
| 3.3      | Elektronenmikroskopie . . . . .                               | 57        |
| 3.4      | Glykohistochemie . . . . .                                    | 57        |
| 3.4.1    | FITC markierte Lektine . . . . .                              | 57        |
| 3.4.2    | Hemmszucker . . . . .   | 61        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.4.3    | Vorbehandlung mit Neuraminidase . . . . .                                    | 62        |
| 3.4.4    | Biotinylierte Lektine . . . . .  | 62        |
| 3.5      | Immunzytochemie . . . . .  | 65        |
| 3.6      | Auswertung . . . . .   | 68        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>69</b> |
| 4.1      | Blutbilder der verwendeten Rinder . . . . .                                  | 69        |
| 4.2      | Lichtmikroskopische Untersuchungen . . . . .                                 | 71        |
| 4.2.1    | Erythrozyten . . . . .   | 71        |
| 4.2.2    | Thrombozyten . . . . .   | 71        |
| 4.2.3    | Lymphozyten . . . . .  | 72        |
| 4.2.4    | Neutrophile Granulozyten . . . . .   | 74        |
| 4.2.5    | Eosinophile Granulozyten . . . . .   | 77        |
| 4.2.6    | Basophile Granulozyten . . . . .   | 78        |
| 4.2.7    | Monozyten . . . . .  | 78        |
| 4.3      | Elektronenmikroskopische Untersuchungen . . . . .                            | 80        |
| 4.3.1    | Erythrozyten . . . . .   | 80        |
| 4.3.2    | Thrombozyten . . . . .   | 80        |
| 4.3.3    | Lymphozyten . . . . .  | 83        |
| 4.3.4    | Neutrophile Granulozyten . . . . .   | 88        |
| 4.3.5    | Eosinophile Granulozyten . . . . .   | 95        |
| 4.3.6    | Basophile Granulozyten . . . . .   | 98        |
| 4.3.7    | Monozyten . . . . .  | 98        |
| 4.4      | Glykohistochemische Untersuchungen . . . . .                                 | 100       |
| 4.4.1    | Für Glukose/Mannose spezifische Lektine . . . . .                            | 100       |
| 4.4.1.1  | Bindung von <i>Concanavalin Agglutinin</i> (ConA–FITC) . . . . .             | 100       |
| 4.4.1.2  | Bindung von <i>Lens culinaris Agglutinin</i> (LCA–FITC) . . . . .            | 103       |
| 4.4.1.3  | Bindung von <i>Pisum sativum Agglutinin</i> (PSA–FITC) . . . . .             | 106       |
| 4.4.2    | Für Galaktose spezifische Lektine . . . . .                                  | 109       |
| 4.4.2.1  | Bindung von <i>Griffonia simplicifolia Agglutinin</i> (GSL–1–FITC) . . . . . | 109       |
| 4.4.2.2  | Bindung von <i>Peanut Agglutinin</i> (PNA–FITC) . . . . .                    | 111       |
| 4.4.2.3  | Bindung von <i>Ricinus communis Agglutinin</i> (RCA–FITC) . . . . .          | 114       |
| 4.4.2.4  | Bindung von <i>Viscum album Agglutinin</i> (VAA–Biotin) . . . . .            | 117       |
| 4.4.3    | Für N–Acetylglukosamin spezifische Lektine . . . . .                         | 119       |
| 4.4.3.1  | Bindung von <i>Wheat germ Agglutinin</i> (WGA–FITC) . . . . .                | 119       |
| 4.4.3.2  | Bindung von <i>Wheat germ Agglutinin succinyliert</i> (WGAs–FITC) . . . . .  | 122       |
| 4.4.4    | Für N–Acetylgalaktosamin spezifische Lektine . . . . .                       | 125       |
| 4.4.4.1  | Bindung von <i>Dolichos biflorus Agglutinin</i> (DBA–FITC) . . . . .         | 125       |
| 4.4.4.2  | Bindung von <i>Soybean Agglutinin</i> (SBA–FITC) . . . . .                   | 127       |
| 4.4.4.3  | Bindung von <i>Sophora japonica Agglutinin</i> (SJA–FITC) . . . . .          | 130       |
| 4.4.5    | Für Fukose spezifische Lektine . . . . .                                     | 133       |
| 4.4.5.1  | Bindung von <i>Ulex europaeus Agglutinin 1</i> (UEA–1–FITC) . . . . .        | 133       |
| 4.4.6    | Für Sialinsäure spezifische Lektine . . . . .                                | 135       |

|  |   |            |
|--|---|------------|
| 4.4.6.1                                    | Bindung von <i>Maackia amurensis</i> Agglutinin (MAA–Biotin) . . .  | 135        |
| 4.4.6.2                                    | Bindung von <i>Sambucus niger</i> Agglutinin (SNA–Biotin) . . . . . | 137        |
| 4.4.7                                      | Für komplexe Kohlehydratstrukturen spezifische Lektine . . . . .    | 140        |
| 4.4.7.1                                    | Bindung von <i>Phaseolus vulgaris</i> E Agglutinin (PHA–E–FITC)     | 140        |
| 4.4.7.2                                    | Bindung von <i>Phaseolus vulgaris</i> L Agglutinin (PHA–L–FITC)     | 143        |
| 4.4.8                                      | Ergebnisse der Zuckerhemmung . . . . .                              | 146        |
| 4.4.9                                      | Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase . . . . .            | 146        |
| 4.5  | Immunzytochemische Untersuchungen . . . . .                         | 146        |
| 4.5.1                                      | Bindung der LCT30A–Antikörper . . . . .                             | 146        |
| 4.5.2                                      | Bindung der CD4–Antikörper . . . . .                                | 149        |
| 4.5.3                                      | Bindung der CD8–Antikörper . . . . .                                | 152        |
| <b>5</b>                                   | <b>Diskussion</b>   | <b>155</b> |
| 5.1  | Blutproben . . . . .  | 155        |
| 5.2  | Lichtmikroskopie . . . . .  | 156        |
| 5.3  | Elektronenmikroskopie . . . . .                                     | 160        |
| 5.4  | Glykohistochemie . . . . .  | 162        |
| 5.5  | Immunzytochemie . . . . .   | 166        |
| <b>Zusammenfassung</b>                     |   | <b>169</b> |
| <b>Summary</b>                             |   | <b>171</b> |
| <b>A Abkürzungsverzeichnis</b>             |   | <b>173</b> |
| <b>B Verzeichnis der Gebrauchslösungen</b> |   | <b>177</b> |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>               |   | <b>182</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>                 |   | <b>185</b> |
| <b>Literaturverzeichnis</b>                |   | <b>188</b> |
| <b>Danksagung</b>                          |   | <b>202</b> |





# Kapitel 1

## Einleitung

Rinder werden von den Menschen seit frühester Zeit an als Nutztiere gehalten. Sie dienen ihm als wertvolle Milch- und Fleischlieferanten und haben große wirtschaftliche Bedeutung. Daher besteht ein großes Interesse daran, Krankheiten des Rindes so weit wie möglich vorzubeugen, beziehungsweise diese so schnell wie möglich zu diagnostizieren. Sehr viele Krankheiten – vor allem die Infektionskrankheiten – gehen mit Veränderungen des Blutbildes einher. Diese Veränderungen spiegeln sich zum größten Teil als eine Erhöhung oder Erniedrigung der Anzahl bestimmter Blutzellen wieder. Aus diesem Grund ist es wichtig, physiologische Blutwerte zu kennen und die einzelnen Blutzellen morphologisch voneinander unterscheiden zu können. In einem Blutaussstrich können mittels verschiedener Färbungen die Blutzellen sichtbar gemacht und identifiziert werden. Die Ultrastruktur der Blutzellen kann aufgrund des hohen Auflösungsvermögens mit dem Elektronenmikroskop untersucht werden.

Das Immunsystem spielt eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen. Die einzelnen funktionellen Gruppen des Immunsystems tragen bestimmte Antigene auf ihrer Zelloberfläche. Diese können mit Hilfe der Immunzytochemie, bei welcher Antikörper zur Erkennung dieser Antigene eingesetzt werden, identifiziert werden. Auf diese Weise bekommt man einen Einblick in die Rolle der verschiedenen Blutzellen während eines infektiösen Geschehens.

Neben den Antigenen tragen die Blutzellen auch Kohlehydratstrukturen auf ihrer Zellmembran, welche eine Vielzahl an Funktionen ausführen. Sie stellen vor allem ein wichtiges Kommunikationsmittel zwischen den Zellen dar, dienen aber auch bestimmten Mikroorganismen als Eintrittspforte in die Zelle. Derartige Kohlehydratstrukturen können mit Hilfe von Lektinen charakterisiert werden, da jedes Lektin spezifisch eine bestimmte Zuckerstruktur bindet. Eine Bindung der Lektine an bestimmte Bestandteile der Zelle weist somit auf das Vorkommen dieser Zuckerstruktur an dieser Stelle hin.

---

Die Blutgruppenmerkmale, also bestimmte antigene Substanzen auf den roten Blutzellen, sind ein weiteres Forschungsgebiet im Bereich des Rinderblutes. Wie beim Menschen auch, können sie zum Vaterschaftstest herangezogen werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die gemeinsame Vererbung bestimmter Blutgruppen zusammen mit wirtschaftlich bedeutsamen Merkmalen, wie zum Beispiel der Milchleistung.

Das Ziel dieser Arbeit ist die ultrastrukturelle, glykohistochemische und immunzytochemische Charakterisierung der einzelnen Blutzellen des Rindes. Dabei wird zunächst die Morphologie und die Ultrastruktur der Zellen unter dem Licht- und dem Elektronenmikroskop näher beschrieben. Bei den glykohistochemischen Untersuchungen mittels pflanzlicher Lektine sollen deren verschiedene Bindungsstellen an den einzelnen Blutzellen identifiziert werden. Letztendlich wird auch die Bindung einzelner Antikörper untersucht. In der Literaturübersicht wird außerdem noch auf das Blutgruppensystem des Rindes eingegangen.

# Kapitel 2

## Literaturübersicht

### 2.1 Allgemeines zum Blut des Rindes

#### 2.1.1 Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes

Die Gesamtblutmenge eines erwachsenen Haussäugetieres beträgt ca. 6 - 8% seiner Körpermasse ([67, Kraft et al., 1997]). Beim Rind beträgt das Plasmavolumen 35 - 45 ml/kg Körpermasse ([126, Stöber und Gründer, 1990]).

Das Blut kann in einen flüssigen Bestandteil, das Blutplasma, und in geformte Bestandteile, die Blutzellen, unterteilt werden ([122, Sinowatz, 2000]). Das Plasma besteht zu einem großen Teil aus Wasser. Daneben enthält es Plasmaproteine (Albumine, Globuline und Fibrinogen), sowie anorganische Salze (z.B. Natrium, Kalium, Kalzium und andere Elektrolyte). Weiterhin befinden sich im Plasma die verschiedenste Stoffe, wie z.B. Kohlehydrate, Fette, Enzyme und Hormone ([67, Kraft et al., 1997]). Als Serum wird das Blutplasma ohne die Gerinnungsfaktoren bezeichnet ([78, Lösch et al., 2000]).

Bei den Blutzellen werden die roten Blutzellen, die Erythrozyten, von den weißen Blutzellen, den Leukozyten, und den Blutplättchen, den Thrombozyten, unterschieden. Die Leukozyten können weiterhin in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten unterteilt werden ([122, Sinowatz, 2000]).

In Abbildung 2.1 ist die Zusammensetzung des Blutes noch einmal graphisch dargestellt.

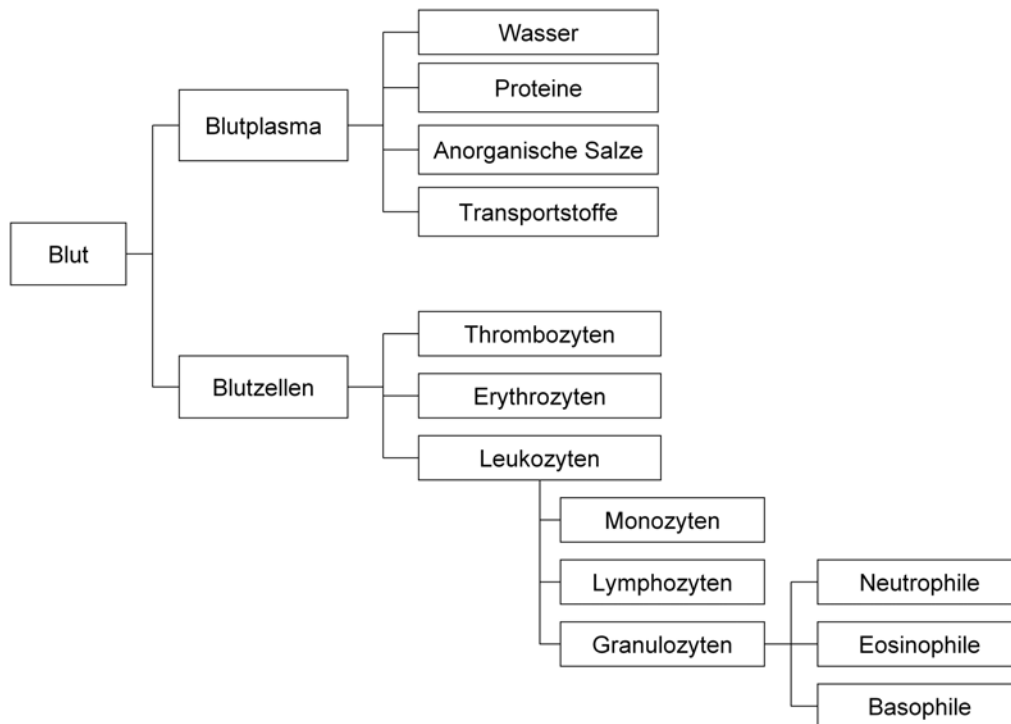


Abbildung 2.1: Zusammensetzung des Blutes

Die Aufgaben des Blutes sind sehr vielseitig. Zum einen dient es dem Transport von lebenswichtigen Substanzen wie Nahrungsstoffen, Gasen, Stoffwechselprodukten, Wasser, Proteinen, Fetten und der Blutzellen ([67, Kraft et al., 1997]). Weiterhin sorgt es für die Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur und hält durch die Regulation des Ionenhaushaltes das Säure-Basen-Gleichgewicht aufrecht. Da das Blut auch Antikörper und Zellen des Immunsystems enthält, stellt es einen wichtigen Bestandteil der körpereigenen Abwehr dar ([122, Sinowatz, 2000]).

### 2.1.2 Hämatopoese

Während der intrauterinen Entwicklung können drei Phasen der Blutbildung (Hämatopoese) unterschieden werden ([58, Jain, 1993];[117, Rüsse, 2008]). Beim Rind kann ab der 4. Woche eine hämatopoetische Aktivität nachgewiesen werden ([58, Jain, 1993]). Während der mesoblastischen Blutbildung, welche im Dottersack stattfindet, werden kernhaltige Erythrozyten gebildet.

Der Rinderembryo hat dabei eine Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 4 mm. Mit einer SSL von 8 mm beginnt die hepato-lienale Blutbildung, welche bis zur Geburt andauert. Während dieser Zeit ist zunächst die Leber, später auch die Milz für die Hämatopoese zuständig. Im 4. Trächtigkeitsmonat, in welchem der Embryo eine SSL von 18 cm besitzt, setzt die medulläre Blutbildung ein ([117, Rüsse, 2008]). Das Knochenmark ist nach der Geburt das einzige Organ der Blutbildung, Leber und Milz behalten jedoch ihr hämatopoetisches Potential, so dass sie bei einer Schädigung des Knochenmarks diese Aufgabe wieder übernehmen können ([58, Jain, 1993]). Die Erythrozyten, welche in der Leber, der Milz und dem Knochenmark gebildet werden, sind immer kernlos ([117, Rüsse, 2008]). Um den Zeitraum der Geburt und im frühen Alter besitzen alle Knochen die Fähigkeit zur Hämatopoese, später findet sie nur noch in den flachen Knochen wie dem Sternum, den Rippen, der Hüfte und den Wirbeln statt ([58, Jain, 1993]). Im Knochenmark können drei Kompartimente unterschieden werden, nämlich das der Stammzellen, das der Progenitor-Zellen (Vorläuferzellen), und das der Precursor-Zellen ([41, Gasper, 2000]). Der Ursprung aller Blutzellen ist die pluripotente Stammzelle, die auch als Hämocytoblast bezeichnet wird. Unter pluripotent wird die Fähigkeit verstanden, sämtliche Zelltypen des lymphohämatopoetischen Systems hervorzubringen ([122, Sinowatz, 2000]). Aus pluripotenten Stammzellen gehen die Progenitoren (Vorläuferzellen) hervor. Bei diesen unterscheidet man myeloische Vorläuferzellen, aus denen die erythrozytären, granulocytyären, monozytären und thrombozytären Zellreihen entstehen, und lymphatische Vorläuferzellen, welche zur Bildung der B- und T-Lymphozyten führen ([58, Jain, 1993];[67, Kraft et al., 1997]). Die pluripotenten Stammzellen sind in der Lage, in der Milz hämatopoetische Zellkolonien zu bilden. Daher werden sie auch als „colony-forming-units in the spleen“ (CFU-S) bezeichnet. Auch die Vorläuferzellen können Kolonien bilden, und werden daher „colony-forming-unit“ (CFU) genannt ([74, Liebich, 2004]). Das Kompartiment der Precursor-Zellen besteht aus den verschiedenen Zellreihen, aus welchen dann die fertigen Blutzellen gebildet werden. Es nimmt den größten Raum im Knochenmark ein und kann seinerseits in einen Teilungs-, Reifungs- und Speicher-Pool unterteilt werden ([41, Gasper, 2000]). Auf die Vorgängerzellen der einzelnen Blutzellen wird im Kapitel „Charakterisierung der einzelnen Blutzellen“ näher eingegangen. Im Blut sind üblicherweise nur die Endstadien dieser Zellreihen, die Effektorzellen, zu finden. Sie haben dort eine unterschiedliche Überlebensdauer, zum Teil wandern sie auch ins Gewebe aus, um dort spezifische Aufgaben zu erfüllen ([67, Kraft et al., 1997]).

Der Ablauf der Hämatopoese ist in Abbildung 2.2 noch einmal graphisch dargestellt.

## 2.1. ALLGEMEINES ZUM BLUT DES RINDES

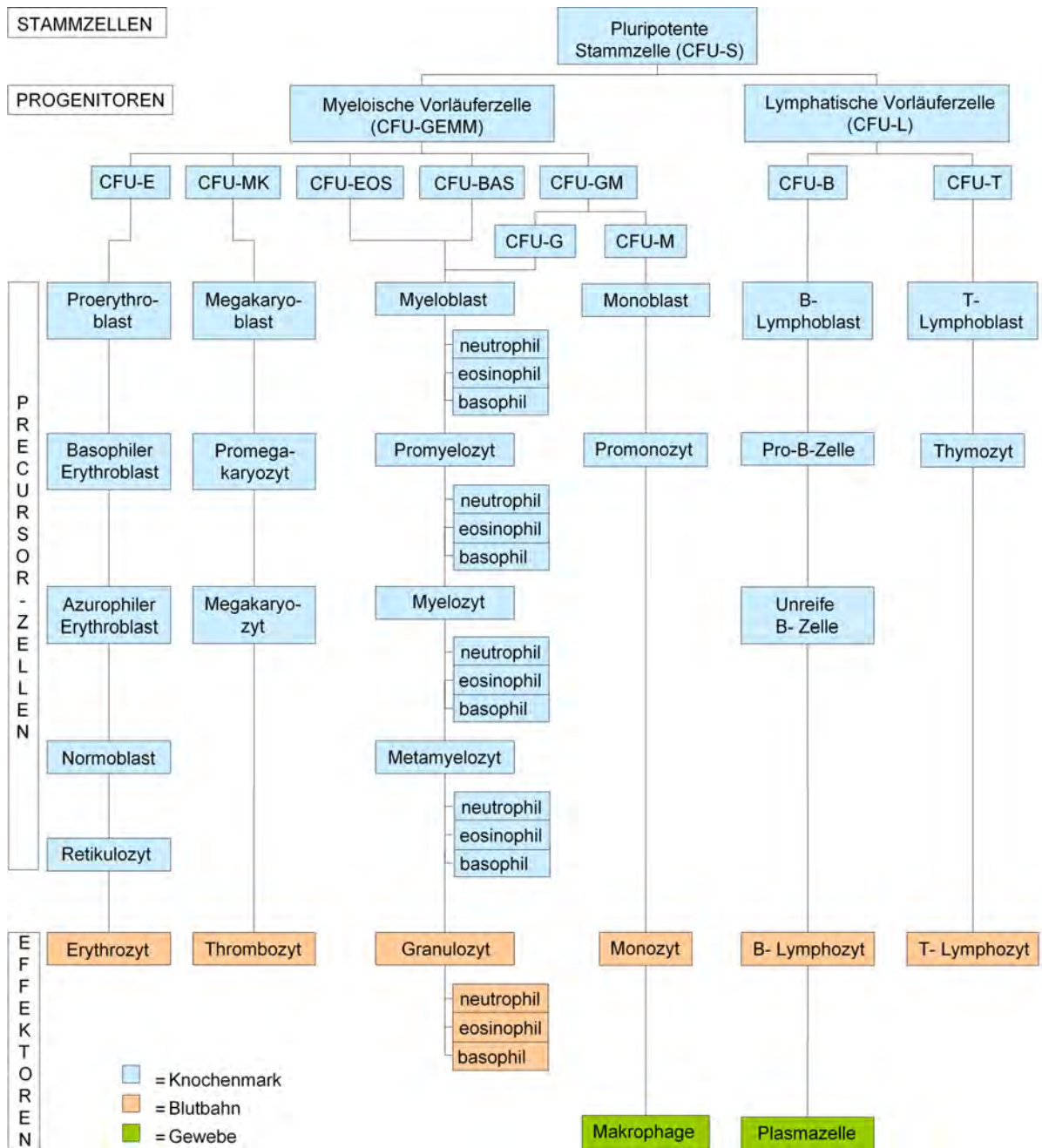


Abbildung 2.2: Ablauf der Hämatopoese

### 2.1.3 Spezielle Hämatologie des Rindes

Wiederkäuer besitzen ebenso wie Schweine, Ratten, Mäuse, Kaninchen und Hühner ein lymphozytäres Blutbild. Das bedeutet, dass mehr als 50% der Leukozyten aus Lymphozyten bestehen. Dem gegenüber steht das granulozytäre Blutbild der Menschen, Pferde, Hunde und Katzen, bei dem die Granulozyten mehr als 50% der Leukozyten ausmachen ([78, Lösch et al., 2000]).

Die Zusammensetzung des Blutes ist einem ständigen Wechsel unterworfen ([67, Kraft et al., 1997]). Eine wichtige Rolle spielt dabei das Alter der Rinder. Während der intrauterinen Entwicklung steigt die Anzahl der Erythrozyten, sowie der Hämoglobingehalt und der Hämatokrit stetig an ([117, Rüsse, 2008]). Nach der Geburt nimmt die Anzahl der Erythrozyten wieder ab ([58, Jain, 1993]). Die Zahl der Leukozyten verdoppelt sich im letzten Drittel der Gravidität ([117, Rüsse, 2008]). Die Leukozytenwerte sind bei der Geburt oftmals höher als bei adulten Tieren ([58, Jain, 1993]). Dabei überwiegen zunächst die neutrophilen Granulozyten gegenüber den Lymphozyten. Dieses Verhältnis ändert sich aber dann in den ersten Lebenswochen ([58, Jain, 1993]). Die Anzahl der eosinophilen und basophilen Granulozyten ist bei Kälbern geringer als bei adulten Rindern ([58, Jain, 1993]).

Weiterhin bestehen auch Unterschiede bezüglich der Rasse und des Geschlechts der Tiere. Die Werte des roten Blutbildes sind bei Fleischrassen generell höher als bei Milchrassen. Ebenso weisen männliche Rinder höhere Erythrozyten-Werte auf als weibliche ([68, Kramer, 2000]).

Auch individuelle Faktoren beeinflussen die Höhe verschiedener Werte. So führen beispielsweise Aufregung und Streß zu einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten bzw. der Gesamtzahl an Leukozyten. Während der Laktation kommt es zu einer Reduzierung der Werte des roten Blutbildes ([58, Jain, 1993]).

Die Blutwerte sind aber auch saisonalen und umweltbedingten Einflüssen, wie z.B. der O<sub>2</sub>-Spannung unterworfen ([68, Kramer, 2000]). So zeigen Rinder in höheren Lagen eine Erhöhung der Werte des roten Blutbildes. Die Erythrozyten-Parameter des Rindes sind in den kälteren Monaten am höchsten, in den wärmeren Monaten hingegen am niedrigsten ([58, Jain, 1993]).

Weitere Parameter, die das Blutbild beeinflussen, sind der Gesundheitszustand, die Fütterung, sowie die Technik der Blutentnahme und der Bestimmung der Blutparameter ([58, Jain, 1993]).

In der Literatur werden je nach Autor unterschiedliche Referenzwerte für das Rind angegeben. Diese weichen aber nur geringfügig voneinander ab. Tab. 2.1 zeigt eine Zusammenfassung der in der Literatur von verschiedenen Autoren beschriebenen physiologischen Blutwerte des Rindes ([126, Stöber und Gründer, 1990];[58, Jain, 1993];[51, Hofmann, 2005]). Die angegebenen Zahlen sind daher nur als richtungweisend zu verstehen.

## 2.1. ALLGEMEINES ZUM BLUT DES RINDES

Tabelle 2.1: Physiologische Blutwerte des Rindes

|                                 |                           | <b>Kälber</b> |      | <b>Adulte Tiere</b> |      |
|---------------------------------|---------------------------|---------------|------|---------------------|------|
|                                 |                           | Spannbreite   | Ø    | Spannbreite         | Ø    |
| <b>Rotes Blutbild</b>           |                           |               |      |                     |      |
| Erythrozyten                    | $\times 10^6/\mu\text{l}$ | 5 – 10        | 8    | 5 - 8               | 7    |
| Hämatokrit                      | %                         | 30 – 40       | 36   | 30 – 40             | 36   |
| Hämoglobin                      | g/l                       | 80 – 140      | 110  | 80 - 120            | 100  |
| MCV                             | fl                        | 40 – 60       | 50   | 40 – 60             | 50   |
| MCH                             | Pg                        | 14 - 24       | 19   | 14 - 24             | 19   |
| MCHC                            | %                         | 26 - 34       | 30   | 26 - 34             | 30   |
| <b>Weißes Blutbild</b>          |                           |               |      |                     |      |
| <b>Leukozyten gesamt</b>        | $\times 10^3/\mu\text{l}$ | 5 - 12        | 8    | 5 - 10              | 7,5  |
| <b>Lymphozyten</b>              |                           |               |      |                     |      |
| Gesamtzahl                      | $\times 10^3/\mu\text{l}$ | 4 - 10        | 6    | 2,5 - 5,5           | 4    |
| Prozentualer Anteil             | %                         | 45 – 65       | 55   | 45 – 65             | 55   |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                           |               |      |                     |      |
| Stabkernige                     |                           |               |      |                     |      |
| Gesamtzahl                      | $\times 10^3/\mu\text{l}$ | 0 – 0,12      | 0,02 | 0 – 0,12            | 0,02 |
| Prozentualer Anteil             | %                         | 0 – 2         | 0,5  | 0 – 2               | 0,5  |
| Segmentkernige                  |                           |               |      |                     |      |
| Gesamtzahl                      | $\times 10^3/\mu\text{l}$ | 0,6 - 4       | 2    | 0,6 - 4             | 2    |
| Prozentualer Anteil             | %                         | 15 – 45       | 28   | 15 – 45             | 28   |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                           |               |      |                     |      |
| Gesamtzahl                      | $\times 10^3/\mu\text{l}$ | 0 - 2,4       | 0,7  | 0 - 2,4             | 0,7  |
| Prozentualer Anteil             | %                         | 0 – 20        | 9,0  | 0 – 20              |      |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                           |               |      |                     |      |
| Gesamtzahl                      | $\times 10^3/\mu\text{l}$ | 0 – 0,2       | 0,05 | 0 - 0,2             | 0,05 |
| Prozentualer Anteil             | %                         | 0 – 2         | 0,5  | 0 – 2               | 0,5  |
| <b>Monozyten</b>                |                           |               |      |                     |      |
| Gesamtzahl                      | $\times 10^3/\mu\text{l}$ | 0,025 – 0,84  | 0,4  | 0,025 – 0,84        | 0,4  |
| Prozentualer Anteil             | %                         | 2 – 7         | 4    | 2 – 7               | 4    |
| <b>Thrombozyten</b>             | $\times 10^3/\mu\text{l}$ | 200 – 800     | 500  | 200 – 800           | 500  |



## 2.2 Charakterisierung der einzelnen Blutzellen

### 2.2.1 Erythrozyten

#### 2.2.1.1 Allgemeines

Die Anzahl an Erythrozyten im Blut des Rindes beträgt  $5 - 10 \times 10^6/\mu\text{l}$  Blut. Wie aber bereits im Kapitel 2.1.3 angesprochen wurde, ist die Anzahl an roten Blutzellen abhängig von Alter, Rasse und Geschlecht der Tiere. Weiterhin existieren auch individuelle und saisonale Unterschiede. Das Verhältnis von Erythrozyten zu Leukozyten im Blut beträgt ca. 1000:1 ([78, Lösch et al., 2000]).

#### 2.2.1.2 Bildung

Die Erythropoese nimmt ihren Ausgang bei der pluripotenten Stammzelle. Aus dieser geht die myeloische Vorläuferzelle (CFU-GEMM) hervor, aus welcher sich zunächst die CFU-E und dann der Proerythroblast bildet ([67, Kraft et al., 1997]). Aus diesem entsteht zunächst ein basophiler, später ein eosinophiler bzw. polychromatischer ([58, Jain, 1993]) Erythroblast. Über die Stadien des Normoblasten und Retikulozyten wird schließlich der Erythrozyt gebildet ([122, Sinowatz, 2000]). Im Gegensatz zu den Leukozyten besitzen alle Zellen dieser Zellreihe keine Granula ([58, Jain, 1993]).

Der Proerythroblast wird im Englischen auch als Rubriblast bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine relativ große Zelle mit rundem Kern, welcher einen deutlichen Nukleolus besitzt. Das Zytoplasma ist stark basophil und daher tiefblau ([58, Jain, 1993]; [78, Lösch et al., 2000]). Der Erythroblast wird im basophilen Stadium auch als Prorubrizyt, im polychromatischen Stadium als Metarubrizyt bezeichnet ([58, Jain, 1993]). Die Erythroblasten sind kleine runde Zellen mit kleinerem Zellkern, welcher keine Nukleoli besitzt ([78, Lösch et al., 2000]). Ihr Chromatin ist stark geklumpt. Bei einem Normoblasten handelt es sich um eine noch kleinere Zelle, bei der bereits eine vollständige Hämoglobinbildung stattgefunden hat. Der Retikulozyt besitzt keinen Kern mehr. Es kann zwischen aggregierten Retikulozyten mit geklumpten retikulären Material und punktierten Retikulozyten, bei welchen das retikuläre Material als kleine Granula sichtbar ist, unterschieden werden ([58, Jain, 1993]). In seinem Zytoplasma finden sich netzförmig angeordnete Reste von RNS, welche dem Retikulozyten seinen Namen geben ([122, Sinowatz, 2000]). Weiterhin enthält sein Zytoplasma Ribosomen, Polyribosomen und Mitochondrien. Die Zellmembran des Retikulozyten weist viele Einstülpungen auf. Die Retikulozyten reifen innerhalb 24 bis 48 Stunden zum fertigen Erythrozyten aus. Im Blut der Wiederkäuer sind Retiku-

lozyten nur sehr selten anzutreffen. Dies hängt unter anderem auch damit zusammen, dass das Auftreten von Retikulozyten im Blut negativ mit der Dauer der Überlebenszeit der Erythrozyten korreliert. Tiere, deren Erythrozyten eine Überlebenszeit von weniger als 100 Tagen besitzen, haben gewöhnlich Retikulozyten im Blut ([58, Jain, 1993]). Die Erythropoese wird durch das in der Niere gebildete Hormon Erythropoetin reguliert, welches bei einer Abnahme der Sauerstoff-Spannung im Gewebe von dieser ausgeschüttet wird ([58, Jain, 1993]; [78, Lösch et al., 2000]). Die Überlebenszeit der Erythrozyten beim adulten Rind beträgt durchschnittlich 160 Tage ([78, Lösch et al., 2000]; [67, Kraft et al., 1997]). Bei Kälbern liegt die Überlebenszeit der Erythrozyten im Blut bei etwa 48 - 63 Tagen ([58, Jain, 1993]). Alte Erythrozyten werden in der Milz abgebaut, wo sie von Zellen des mononuklearen Phagozytensystems (MPS) phagozytiert werden ([67, Lösch et al., 2000]). Fetale Erythrozyten sind größer als postnatale Erythrozyten. Sie werden von diesen in einem Alter von etwa 3 - 4 Monaten ersetzt ([58, Jain, 1993]).

### 2.2.1.3 Morphologie

Die Erythrozyten des Rindes besitzen einen Durchmesser von etwa 5 – 6  $\mu\text{m}$  ([68, Kramer, 2000]; [78, Lösch et al., 2000]). Es handelt sich um kernlose Scheiben, die eine bikonkave Form aufweisen ([78, Lösch et al., 2000]). Beim Rind können sie zum Teil auch unikav sein ([58, Jain, 1993]). Durch diese bikonkave Form sind die Erythrozyten leicht verformbar und daher in der Lage, in die kleinsten Kapillaren zu gelangen ([66, Banks, 1986]). Die Erythrozyten besitzen im Gegensatz zu den Retikulozyten eine glatte Zellmembran. Diese besteht aus zwei elektronendichten Schichten, welche eine elektronendurchlässige Schicht umschließen ([58, Jain, 1993]). An der Innenseite der Zellmembran befindet sich ein Netzwerk aus Proteinen, das sogenannte Membranskelett. Dieses besteht aus den Strukturproteinen Spektrin und Aktin. Mikrofilamente oder Mikrotubuli sind nicht vorhanden ([93, Hees und Tschudi, 1990]). Das Membranskelett ist für die starke Verformbarkeit der Erythrozyten verantwortlich. Der visköse Zellinhalt besteht aus Wasser, dem Blutfarbstoff Hämoglobin und verschiedenen Enzymen. Zellorganellen sind nicht vorhanden ([122, Sinowatz, 2000]). Bei den jungen Erythrozyten des Rindes können im Zytoplasma kleine blaue Punkte auftreten. Dies wird als „basophile Tüpfelung“ bezeichnet und tritt verstärkt bei vermehrter Bildung von Erythrozyten als Reaktion auf eine Anämie auf ([58, Jain, 1993]). Im Gegensatz zu den Erythrozyten von anderen Haustierspezies neigen die Erythrozyten des Rindes nicht zur Geldrollenbildung ([58, Jain, 1993]; [68, Kramer, 2000]).

#### **2.2.1.4 Aufgaben**

Die wichtigste Aufgabe der Erythrozyten besteht im Transport von Sauerstoff. Dieser ist im Zytoplasma der roten Blutzellen an den Blutfarbstoff Hämoglobin gebunden ([78, Lösch et al., 2000]). Es können mehrere Arten von Hämoglobin unterschieden werden, nämlich embryonales, fetales und adultes. Zum Zeitpunkt der Geburt besteht das Hämoglobin noch zu 90 - 95% aus fetalem Hämoglobin. Dieses wird erst in einem Alter von acht bis zwölf Wochen durch das adulte Hämoglobin ersetzt. Die Erythrozyten sind gegenüber osmotischen Einflüssen weniger empfindlich, solange sie das fetale Hämoglobin besitzen ([58, Jain, 1993]). Durch die bikonkave Form der Erythrozyten vergrößert sich deren Zelloberfläche, wodurch die Diffusion der Atemgase erleichtert wird ([78, Lösch et al., 2000]).

Die roten Blutzellen sind außerdem Träger der Blutgruppenmerkmale. Auf ihrer Zellmembran tragen sie Kohlehydratreste, welche die verschiedenen Blutgruppenmerkmale darstellen ([122, Sinowatz, 2000]). Auf die Blutgruppen des Rindes wird im Kapitel 2.5. noch näher eingegangen.

### **2.2.2 Thrombozyten**

#### **2.2.2.1 Allgemeines**

Die Anzahl der Thrombozyten im Blut des Rindes beträgt 100.000 – 800.000 / $\mu$ l Blut; der Durchschnitt liegt bei 500.000 / $\mu$ l Blut. Damit besitzt das Rind die höchste Anzahl an Blutplättchen unter den Haussäugetieren. Während des Geschlechtszyklus der Kuh sind Schwankungen der Thrombozytenzahl möglich ([58, Jain, 1993]).

Die Überlebenszeit im Blut beträgt normalerweise 10 Tage ([68, Kramer, 2000]). Das durch den Alterungsprozess veränderte Kohlehydratmuster der Zellmembran wird von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) erkannt, welche daraufhin die alten Thrombozyten vor allem in der Leber und der Milz abbauen ([78, Lösch et al., 2000]).

#### **2.2.2.2 Bildung**

Bei den Säugetieren entstehen die Thrombozyten durch den Zerfall von Megakaryozyten (Knochenmarkriesenzellen). Die Bildung der Megakaryozyten erfolgt im Knochenmark, wobei aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle über die Stadien des Megakaryoblasten und Promegakaryozyten der Megakaryozyt heranreift. Im Gegensatz dazu werden bei niederen Wirbeltieren die Thrombozyten durch Teilung einer Vorläuferzelle, des Thromboblasten, gebildet ([58, Jain, 1993]).

Der Megakaryoblast ist ca. 15 – 50  $\mu\text{m}$  groß ([, Leven, 2000]) und besitzt einen runden Kern, welcher fast die ganze Zelle einnimmt. In diesem befinden sich ein oder mehrere Nukleoli. Das basophile Zytoplasma besitzt keine Granula ([58, Jain, 1993]). Die Basophilie beruht auf dem zahlreichen Vorkommen von Ribosomen ([, Leven, 2000]). Im Megakaryoblasten finden Endoreduplikationen, also Kernteilungen ohne gleichzeitige Teilung des Zytoplasmas statt ([58, Jain, 1993]).

Die ca. 75  $\mu\text{m}$  großen Promegakaryozyten ([73, Leven, 2000]) besitzen mehrfach gelappte Kerne und mehr als vier Nukleoli. Das basophile Zytoplasma ist reichlicher vorhanden als bei den Megakaryoblasten ([58, Jain, 1993]).

Der Megakaryozyt ist mit einer Größe von bis zu 160  $\mu\text{m}$  die größte hämatopoetische Zelle im Knochenmark ([58, Jain, 1993]). Er besitzt nur einen mehrfach gelappten Kern ([58, Jain, 1993]). Das eosinophile Zytoplasma kann in eine periphere Zone mit wenig Organellen, eine intermediäre Zone, welche die meisten Organelle enthält, und eine perinukleäre Zone mit dem Golgi-Apparat unterteilt werden ([, Leven, 2000]). Im Zytoplasma finden sich zahlreiche kleine azurophile Granula, sowie Mitochondrien, Ribosomen, Glykogen-Granula und  $\alpha$ -Granula. Die für die Thrombozyten charakteristischen elektronendichten Granula fehlen bei den Megakaryozyten ([58, Jain, 1993]).

In 3 – 12 Stunden produziert ein Megakaryozyt ca. 2000 – 8000 Thrombozyten ([58, Jain, 1993]), wobei der genaue Mechanismus noch unbekannt ist. Verschiedene Studien weisen auf drei unterschiedliche Hypothesen hin. Zum einen auf die Fragmentation des Zytoplasmas der Megakaryozyten. Eine andere Möglichkeit ist die Bildung von größeren Prothrombozyten aus Pseudopodien-ähnlichen Verlängerungen des Zytoplasmas. Die dritte Theorie postuliert eine Bildung der Thrombozyten durch Bläschenbildung („blebbing“) der Zellmembran ([58, Jain, 1993]).

### 2.2.2.3 Morphologie

Zur Größe der Blutplättchen des Rindes gibt es unterschiedliche Angaben. In einer Studie von Meyers et al. bemisst sich deren Größe auf 6,08 (+/- 1,03) bis 1,78 (+/- 0,34)  $\mu\text{m}$  ([82, Meyers et al., 1982]). Bei Du Plessis hingegen finden sich die Werte 0,804 (+/- 0,133) bis 2,185 (+/- 0,279)  $\mu\text{m}$  ([29, Du Plessis et al., 1996]).

Ruhende Thrombozyten stellen sich im Blutaustriech als scheibenförmige, runde bis ovale Strukturen dar, die keinen Kern besitzen ([58, Jain, 1993]; [122, Sinowatz, 2000]). Ihre linsenförmige Gestalt wird durch Mikrotubuli bestimmt ([138, White, 1987]).

Das klare Zytoplasma wird von einer glatten Membran umgeben, welche manchmal fadenförmig

ge Oberflächenprojektionen besitzt ([58, Jain, 1993]), die einen Durchmesser von ca.  $0,2 \mu\text{m}$  aufweisen ([138, White, 1987]). Der Aufbau der Zellmembran ist zweischichtig ([, Morimoto et al., 1990]). Die Zellmembran der Thrombozyten ist von einer ca. 150 - 200 nm dicken Glykokalix bedeckt ([58, Jain, 1993]). Als Glykokalix bezeichnet man die dichte Besetzung der Außenseite der Zellmembran mit Zuckermolekülen. Diese sind die Zuckerreste von Glykoproteinen, welche als periphere oder integrale Membranproteine Bestandteil der Zellmembran sind. Die Glykoproteine der Zellmembran spielen unter anderem eine Rolle bei der Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Beim Rind wurden 3 – 4 Hauptglykoproteine gefunden ([58, Jain, 1993]). Histochemisch lässt sich die Glykokalix mittels Lektinen oder Rutheniumrot darstellen ([122, Sinowatz, 2000]).

Im Zytoplasma der Blutplättchen sind zwei Arten an Granula enthalten, die  $\alpha$ -Granula und die elektronendichten Granula, die so genannten „dense bodies“. Daneben finden sich gelegentlich große membranumgrenzte Granula mit einer Größe von  $1,25 (+/- 0,2) \mu\text{m}$  ([82, Meyers et al., 1982]). Die meisten Granula befinden sich eher in der Nähe der Zellmembran als im Zentrum der Zelle ([138, White, 1987]).

Die zumeist runden  $\alpha$ -Granula sind ca.  $0,69 +/- 0,30 \mu\text{m}$  groß ([, Meyers et al., 1982]), jedoch kann ihre Größe und Gestalt auch unterschiedlich sein. Sie sind meistens von einer klar definierten Membran umgeben und ihr Inhalt stellt sich homogen dar ([82, Meyers et al., 1982]; [29, Du Plessis et al., 1996]). Ihre Bildung erfolgt durch den Golgi-Apparat ([58, Jain, 1993]). Die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten des Rindes sind größer und elektronendichter als die des Menschen, jedoch dafür im Vergleich in einer geringeren Anzahl pro Zelle vorhanden ([143, Zucker-Franklin et al., 1985]; [29, Du Plessis, 1996]). Du Plessis gibt eine Anzahl von 5,9  $\alpha$ -Granula pro Zelle an, Meyers et al. eine Anzahl von 6,5 ([82, Meyers et al., 1982]; [29, Du Plessis et al., 1996]). Die  $\alpha$ -Granula enthalten unterschiedliche Proteine, wie z.B. von-Willebrand-Faktor, Plättchenfaktor 1 und 4,  $\beta$ -Thromboglobulin, Fibrinogen und Fibronektin, welche für die Plättchenfunktion eine wichtige Rolle spielen ([58, Jain, 1993]; [78, Lösch et al., 2000]).

Neben den  $\alpha$ -Granula können elektronendichte Granula, sogenannte „dense bodies“, beobachtet werden. Ihr Durchmesser beträgt ca.  $0,75 +/- 0,25 \mu\text{m}$  ([82, Meyers et al., 1982]). Diese Granula besitzen einen extrem elektronendichten Kern, der meist exzentrisch in einem von einer elektronendichten Membran umgebenen elektronenhellen Areal liegt ([85, Morimoto et al., 1990]; [82, Meyers et al., 1982]). Aufgrund ihres Aussehens werden diese Granula auch als „bull's eye“ bezeichnet ([85, Morimoto et al., 1990]). Sie sind überwiegend in der Nähe der Zellmembran lokalisiert ([138, White, 1987]; [85, Morimoto et al., 1990]). An diesen Stellen besitzt die Zellmembran vermehrt Protusionen, welche Zuckerketten von Glykoproteinen darstellen ([, Morimoto et

---

## 2.2. CHARAKTERISIERUNG DER EINZELNEN BLUTZELLEN

---

al., 1990]). Ihre Anzahl pro Zelle ist weitaus geringer als die Anzahl an  $\alpha$ -Granula ([82, Meyers et al., 1982];[29, Du Plessis, 1996]). Nach Morimoto et al. finden sich pro Zelle ca. 2 – 5 solcher Granula ([, Morimoto et al., 1990]). Du Plessis gibt eine Anzahl von 0,8 pro Zelle, Meyers et al. von 0,5 pro Zelle an ([82, Meyers et al., 1982];[29, Du Plessis et al., 1996]). Ihr Inhalt besteht aus Adenonukleotiden und Histamin, welches die Permeabilität der Gefäße steigert, sowie aus Kalzium und Serotonin, das wichtig für die Vasokonstriktion und Plättchenaggregation ist ([58, Jain, 1993]; [78, Lösch, 2000]). Die elektronendichten Granula fehlen bei den Thrombozyten des Menschen ([29, Du Plessis, 1996]).

Das Zytoskelett besteht aus Mikrotubuli, welche an den beiden Längsseiten, sowie unterhalb der Membran als Netz angeordnet sind ([85, Morimoto et al., 1990]). Wie oben bereits erwähnt wurde, sind sie verantwortlich für die Form der Thrombozyten ([29, Du Plessis, 1996]). Die Granula sind von Mikrofilamenten umgeben ([85, Morimoto et al., 1990]). In den Plättchen des Rindes sind nahezu 25% mehr Mikrotubuli vorhanden als in denen des Menschen. Aus diesem Grund bilden die bovinen Thrombozyten weniger Pseudopodien aus, was ihnen den Anschein einer geringeren Aktivität verleiht ([29, Du Plessis, 1996]).

Die bei Thrombozyten des Menschen sichtbaren Einbuchtungen der Oberfläche, welche Öffnungen des „offenen kanalikulären Systems“ (OCS) darstellen, fehlen beim Rind ([29, Du Plessis et al., 1996]). Das offene oder oberflächenverbundene kanalikuläre System besteht aus vielen Kanälchen und kommuniziert mittels Öffnungen in der Zellmembran direkt mit dem die Plättchen umgebenden Medium. Ein OCS findet sich u.a. bei den Blutplättchen der Menschen, der Schweine, der Ratten, der Wale, der Pferde und der Hasen ([138, White, 1987]). Neben dem offenen kanalikulären System besteht ein zweites Tunnelsystem, das sogenannte „dense tubular system“ (DTS). Dieses liegt unterhalb der Mikrotubuli und hat keine Öffnung an die Zelloberfläche. Es enthält ein Isoenzym der Peroxidase, das wahrscheinlich spezifisch für die Thrombozyten ist ([58, Jain, 1993]).

Wie bereits erwähnt wurde, fehlt dem Rind das offene kanalikuläre System, welches den Sekretionsweg der menschlichen Thrombozyten darstellt ([143, Zucker–Franklin et al., 1985];[29, Du Plessis, 1996]). Beim Rind werden Stoffe durch Fusion der Granula mit der Zellmembran sezerniert. Während der Aktivierung der Thrombozyten bilden sich zwar auch primitive Kanälchen aus, die zum Teil auch der Sekretion dienen, sie stellen jedoch nicht den bevorzugten Sekretionsweg dar ([138, White, 1987]).

Weiterhin im Zytoplasma vorhanden sind wenige Mitochondrien, Glykogenpartikel und Lysosomen, die proteolytische saure Hydrolasen enthalten. Der Golgi-Apparat ist meist nur sehr schwach entwickelt. Ein endoplasmatisches Retikulum und Ribosomen sind nur sehr selten zu

finden ([82, Meyers et al., 1982];[58, Jain, 1993]).

Aktivierte Thrombozyten ändern ihre Form ([138, White, 1987]) und sind an Ausstülpungen ihrer Oberfläche, so genannter Pseudopodien, zu erkennen ([58, Jain, 1993]; [29, Du Plessis et al., 1996]). Diese Pseudopodien enthalten meistens Mikrotubuli und sind dünner und gerader als die des Menschen ([138, White, 1987]).

Die Thrombozyten des Rindes und des Menschen sind sich sehr ähnlich und weisen einige Gemeinsamkeiten auf. So besitzen beide eine linsenförmige Gestalt, die durch ein System aus Mikrotubuli unterstützt wird. In ihrem Zytoplasma befinden sich sekretorische Granula, sowie Mitochondrien und Glykogen-Partikel ([138, White, 1987]). Die Thrombozyten des Menschen sind jedoch generell größer, besitzen keine elektronendichten Granula, haben ein offenes kanalikuläres System und weisen weniger Mikrotubuli auf. Letzteres ist wahrscheinlich der Grund, weshalb eine Pseudopodien-Bildung als Zeichen aktivierter Thrombozyten beim Rind seltener anzutreffen ist ([29, Du Plessis, 1996]). Die Granula des Rindes sind generell größer als die des Menschen ([138, White, 1987]).

#### **2.2.2.4 Zytochemische Eigenschaften**

Die elektronendichten Granula enthalten Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat ([143, Zucker–Franklin et al., 1985]), sowie Serotonin und zweiwertige Kationen ([82, Meyers et al., 1982]). In den  $\alpha$ -Granula befinden sich Gerinnungsproteine wie z.B. Fibrinogen, Fibronektin und  $\beta$ -Thromboglobulin ([122, Sinowatz, 2000]). Im DTS befindet sich eine thrombozytenspezifische Peroxidase ([58, Jain, 1993]). Die Lysosomen enthalten saure Hydrolasen ([78, Lösch et al., 2000]), wie z.B. saure Phosphatase und Arylsulfatase ([58, Jain, 1993]).

#### **2.2.2.5 Aufgaben**

Die Thrombozyten übernehmen eine wichtige Rolle im Rahmen der Blutstillung (Hämostase). Durch Anlagerung an die verletzte Gefäßwand und Bildung von Thrombozytenaggregaten werden kleine Gefäßläsionen verschlossen. Dieser Schritt im Ablauf der Hämostase wird als primäre Blutstillung bezeichnet. Er wird durch den von–Willebrandt–Faktor vermittelt, der an Verletzungen des Endothels bindet. Daraufhin kommt es dann zur Bindung der Blutplättchen, sowie zu deren Aktivierung, welche mit einer Formveränderung und Degranulation einhergeht. Die elektronendichten Granula enthalten auch Wachstumsfaktoren, welche nach ihrer Freisetzung Endothelzellen zur Proliferation anregen und so die Reparatur von Endothelschäden begünstigen ([78, Lösch et al., 2000]).

### 2.2.3 Lymphozyten

#### 2.2.3.1 Allgemeines

Wie im Kapitel 2.1.3 bereits erwähnt wurde, besitzt das Rind ein lymphozytäres Blutbild, bei dem die Lymphozyten mehr als 50% der Gesamtleukozyten ausmachen ([78, Lösch et al., 2000]). Die Anzahl der Lymphozyten ist abhängig vom Alter der Tiere. Jüngere Tiere besitzen generell mehr Lymphozyten als ältere. Die Gesamtleukozytenzahl im Blut des adulten Rindes beträgt im Durchschnitt 8.000 Leukozyten /  $\mu\text{l}$  Blut. Davon sind durchschnittlich 58% ( 45 - 75%) Lymphozyten. Die Gesamtlymphozytenzahl beträgt somit im Durchschnitt 4.500 /  $\mu\text{l}$  Blut ([58, Jain, 1993]). Bei neugeborenen Kälbern ist die Anzahl der Lymphozyten geringer als die der Granulozyten. Dies ändert sich aber im Verlauf der ersten Monate und im Alter von drei Monaten kann die Lymphozytenanzahl bis zu 70 - 80% der Gesamtleukozytenzahl ausmachen. Innerhalb der ersten Lebensjahre geht die Anzahl der Lymphozyten dann auf den oben erwähnten Wert zurück ([58, Jain 1993];[68, Kramer, 2000]). Kampen et al. konnten zeigen, dass die Anzahl der T-Lymphozyten von neugeborenen Kälbern derjenigen von adulten Tieren entspricht. In den ersten Lebenswochen kommt es dann zu einem Anstieg der B-Lymphozyten. In einem Alter von etwa sechs Wochen sind dann stabile Werte erreicht ([61, Kampen et al., 2006]). Weiterhin besteht eine Abhängigkeit von der Konzentration an Glukokortikoiden im Blut. Steigt diese an, so fällt die Anzahl der Lymphozyten ab ([58, Jain, 1993]).

Die Einteilung der Lymphozyten kann auf unterschiedliche Art erfolgen: Anhand der Größe können kleine von großen Lymphozyten unterschieden werden. Betrachtet man ihre Rolle im Hinblick auf die Immunantwort, unterteilt man sie in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. Außerdem besteht die Möglichkeit, kurzlebige (B-Lymphozyten) von langlebigen Lymphozyten (T-Lymphozyten, Gedächtniszellen) zu unterscheiden ([58, Jain, 1993]).

Die Anzahl an B- und T-Lymphozyten ist identisch. Im Blut, in dem sich nur etwa ein Prozent der Lymphozyten befinden, beträgt der Anteil an T-Lymphozyten ca. 80% ([78, Lösch et al., 2000]).

#### 2.2.3.2 Bildung

Wie bei den anderen Zelllinien auch, beginnt die Lymphopoese bei der pluripotenten Stammzelle. Aus dieser gehen die lymphatischen Vorläuferzellen hervor (CFU-L) ([67, Kraft et al., 1997];[41, Gasper, 2000]). Diese besiedeln dann die primären lymphatischen Organe. Dazu gehört zum einen der Thymus, in dem die Vorläufer der T-Lymphozyten entstehen und zum anderen die Bursa fabricii bei den Vögeln, beziehungsweise die Bursa-Äquivalente bei den Säugetieren (Knochenmark), in denen die Vorläufer der B-Lymphozyten entstehen. Diese Vorläufer-



zellen werden als Lymphoblasten bezeichnet. Ihr charakteristisches Merkmal sind ein oder mehrere prominente Nukleoli. Die Lymphoblasten wandern dann in die sekundären lymphatischen Organe wie die Milz, die Lymphknoten und lymphatische Gewebe, z.B. die Tonsillen und Peyer-Platten aus. Dort kommt es zum Kontakt mit Antigenen und zur Reifung der Zellen zu B- und T-Lymphozyten ([58, Jain, 1993]).

### **2.2.3.3 Morphologie**

Die B- und die T-Lymphozyten sind mit konventionellen histologischen Färbungen nicht voneinander zu unterscheiden. Eine Differenzierung ist nur mittels immunzytochemischer Methoden möglich, mit welchen verschiedene Antigene auf der Zellmembran bestimmt werden können ([78, Lösch et al., 2000]; [122, Sinowatz, 2000]; [125, Steffens, 2000]). Auf diese wird im Kapitel 2.4.3 noch genauer eingegangen.

Anhand ihrer Größe können beim Rind kleine, mittlere und große Lymphozyten unterschieden werden. Die kleinen Lymphozyten sind ca. 6  $\mu\text{m}$  groß ([49, Steffens, 2000]). Sie besitzen einen großen runden Kern, der die Zelle fast vollständig ausfüllt ([58, Jain, 1993]; [68, Kramer, 2000]; [125, Steffens, 2000]). Der Zellkern besitzt keine Nukleoli, im Randbereich befindet sich dicht gepacktes, dunkles Heterochromatin. Das nur spärlich vorhandene Zytoplasma enthält vor allem freie Ribosomen ([125, Steffens, 2000]). Mittlere Lymphozyten besitzen eine Größe von etwa 8 – 9  $\mu\text{m}$  ([125, Steffens, 2000]). Ihr Kern kann rund oder leicht eingebuchtet sein und befindet sich exzentrisch in der Zelle ([58, Jain, 1993]; [68, Kramer, 2000]; [125, Steffens, 2000]). Der Gehalt an Heterochromatin ist geringer und es finden sich meist ein bis zwei Nukleoli ([125, Steffens, 2000]). Mittlere Lymphozyten besitzen mehr Zytoplasma als kleine ([68, Kramer, 2000]). Die großen Lymphozyten sind durchschnittlich 14  $\mu\text{m}$  groß, ihr großer runder Kern weist mehrere Einbuchtungen auf und enthält vor allem Euchromatin. Außerdem besitzt er einen großen Nukleolus ([125, Steffens, 2000]). Sie besitzen noch mehr Zytoplasma, welches teilweise auch Vakuolen enthalten kann. Große Lymphozyten können leicht mit Monozyten verwechselt werden und können oftmals von diesen nur mittels zytochemischer Methoden unterschieden werden ([58, Jain, 1993]). Obwohl es sich bei den Lymphozyten um Agranulozyten handelt, sind unter dem Elektronenmikroskop des öfteren im Zytoplasma kleine azurophile Granula erkennbar. Diese sind etwa 0.25 - 0,5  $\mu\text{m}$  groß ([125, Steffens, 2000]).

### **2.2.3.4 Zytochemische Eigenschaften**

Lymphozyten weisen keine Peroxidase-Aktivität auf und lassen sich nicht mit Sudanschwarz anfärben ([58, Jain, 1993]; [104, Raskin und Valenciano, 2000]). Sie besitzen auch keine Chlo-

razetatesterase oder alkalische Phosphatase. In den meisten Lymphozyten ist eine unspezifische Esterase vorhanden. Im Gegensatz zu der unspezifischen Esterase der Monozyten, lässt sich die unspezifische Esterase der Lymphozyten nicht durch Natrium-Fluorid hemmen. Weiterhin besitzen die Lymphozyten noch saure hydrolytische Enzyme, wie z.B. eine saure Phosphatase ([58, Jain, 1993]). Bergroth et al. konnten zeigen, dass die saure  $\alpha$ -Naphthylacetat-Esterase ein Marker für die menschlichen T-Lymphozyten ist ([10, Bergroth et al., 1983]).

### 2.2.3.5 Aufgaben

Die Lymphozyten stellen die Zellen der spezifischen Abwehr dar. Ihre Aufgabe besteht unter anderem darin, Infektionserreger zu bekämpfen, welche die Mechanismen der unspezifischen Abwehr durchbrochen haben ([78, Lösch et al., 2000]). Dabei kann zwischen einer humoralen Immunreaktion, welche durch die B-Lymphozyten ausgelöst wird, und einer durch die T-Lymphozyten vermittelten zellulären Immunreaktion unterschieden werden ([58, Johansson, 1983]; [58, Jain, 1993]; [78, Lösch, 2000]). Bei der humoralen Immunreaktion wird das Antigen zunächst von Makrophagen gebunden, welche dieses den T-Helferzellen präsentieren. Diese stimulieren wiederum die B-Lymphozyten, die sich daraufhin zu Plasmazellen transformieren und Antikörper produzieren ([58, Jain, 1993]; [122, Sinowatz, 2000]). Bei den T-Lymphozyten können verschiedene funktionelle Populationen unterschieden werden. Die T-Helferzellen sind für die gerade beschriebene Interaktion mit den B-Lymphozyten verantwortlich. Die zytotoxischen T-Zellen stellen Effektorzellen dar, welche in der Lage sind, bestimmte Zielzellen zu zerstören. T-Suppressorzellen verhindern eine überschießende Immunreaktion, während T-Gedächtniszellen die Fähigkeit besitzen, ein Antigen auch nach längerer Zeit wiederzuerkennen ([122, Sinowatz, 2000]).

## 2.2.4 Neutrophile Granulozyten

### 2.2.4.1 Allgemeines

Wie unter 2.1.1 bereits dargestellt wurde, werden bei den Granulozyten neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten unterschieden. Diese Unterteilung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Anfärbbarkeit ihrer Granula ([122, Sinowatz, 2000]). Neutrophile Granula werden durch Farbstoffe nicht angefärbt, eosinophile haben dagegen eine Affinität zu sauren Farbstoffen und basophile Granula färben sich vor allem mit basischen Farbstoffen an ([103, Pschyrembel, 2004]). So lassen sich z.B. die Granula der eosinophilen Granulozyten mit dem sauren Farbstoff Eosin stark anfärben ([122, Sinowatz, 2000]).

In der ersten Zeit nach der Geburt sind die neutrophilen Granulozyten die dominierende Gruppe unter den Leukozyten. Erst ab einem Alter von etwa zwei Wochen bilden dann die Lymphozyten die größte Gruppe der weißen Blutzellen ([68, Kramer, 2000]). Bei adulten Tieren liegt die Anzahl an reifen neutrophilen Granulozyten bei 600 - 4.000 /  $\mu\text{l}$  Blut; damit machen sie im Durchschnitt 28% der Gesamtleukozyten aus. Sie stellen damit auch die größte Gruppe unter den drei Arten an Granulozyten dar. Unreife neutrophile Granulozyten kommen dagegen nur sehr selten vor. Ihre Anzahl beträgt durchschnittlich nur 20 /  $\mu\text{l}$  Blut, was einem Anteil von 0,5% entspricht ([58, Jain, 1993]).

#### 2.2.4.2 Bildung

Alle drei Arten an Granulozyten entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle im Knochenmark, dem Myeloblasten. Dieser differenziert sich weiter zum Promyelozyt, aus welchem dann der Myelozyt hervorgeht. In diesem bilden sich die für die jeweilige Art von Granulozyten charakteristischen Granula aus, so dass neutrophile, eosinophile und basophile Myelozyten unterschieden werden. Über die Stufe des Metamyelozyten entstehen schließlich die fertigen Granulozyten ([122, Sinowatz, 2000]).

Der Myeloblast ist etwa 12 - 16  $\mu\text{m}$  groß ([67, Kraft et al., 1997]). Er besitzt einen großen, runden Kern mit einem oder mehreren Nukleoli, statt derer manchmal auch nur nukleolare Ringe sichtbar sind. Sein Zytoplasma färbt sich hellblau an ([58, Jain, 1993]) und enthält keine Granula ([67, Kraft et al., 1997]). Der Promyelozyt ist ca. 14 - 20  $\mu\text{m}$  groß ([67, Kraft et al., 1997]) und damit meist etwas größer als der Myeloblast, sein großer Kern enthält deutliche Nukleoli ([8, Baggiolini et al., 1985]). Er besitzt mehr Zytoplasma, in welchem sich viele kleine, peroxidase-positive, rötliche, azurophile Granula befinden ([8, Baggiolini et al., 1985];[58, Jain, 1993]). Der Myelozyt hat eine Größe von ca. 12 - 16  $\mu\text{m}$  ([67, Kraft et al., 1997]). Sein Kern ist oftmals nierenförmig ([8, Baggiolini et al., 1985]) und besitzt keinen Nukleolus ([58, Jain, 1993]). Das Zytoplasma enthält neben einem prominenten rauhen endoplasmatischen Retikulum viele Mitochondrien ([8, Baggiolini et al., 1985]), sowie zahlreiche helle Granula ([58, Jain, 1993]). Der Metamyelozyt besitzt eine Größe von 10 - 15  $\mu\text{m}$  ([67, Kraft et al., 1997]). Er ähnelt im Aussehen dem Myelozyt. Sein Kern hat oftmals eine noch stärker nierenförmige Gestalt ([58, Jain, 1993]; [94, Paape et al., 2003]).

Im Knochenmark können drei verschiedene Gruppen an Granulozyten unterschieden werden. Im Proliferationspool befinden sich die Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten. Die Metamyelozyten und unreifen Granulozyten befinden sich im Teilungspool. Im sogenannten Speicherungspool befinden sich die reifen neutrophilen Granulozyten ([58, Jain, 1993];[94, Paape et

al., 2003]). Von dort werden sie ins Blut entlassen, wo ihre Überlebensdauer etwa acht bis neun Stunden beträgt ([94, Paape et al., 2003]). Im Blut kann ein marginaler Pool von einem zirkulierenden Pool an neutrophilen Granulozyten unterschieden werden. Die Zellen im marginalen Pool rollen an der Gefäßwand entlang und können unter bestimmten Einflüssen (z.B. Ausschüttung von Kortikosteroiden) in den zirkulierenden Pool eintreten. Das Verhältnis der neutrophilen Granulozyten in den beiden Pools beträgt beim Rind ca. 1:1 ([58, Jain, 1993]).

### 2.2.4.3 Morphologie

Reife neutrophile Granulozyten sind ca. 7 – 15  $\mu\text{m}$  groß ([78, Lösch et al., 2000]). Ihr auffälligstes Merkmal ist ihr mehrfach gelappter Kern, der in 3 – 5 Segmente unterteilt ist ([78, Lösch et al., 2000]). Der Kern der neutrophilen Granulozyten der Haussäugetiere ist nicht so stark gelappt wie bei denen des Menschen ([58, Jain, 1993]). Zum Teil sind dünne Filamente erkennbar, welche die einzelnen Segmente miteinander verbinden. Im Kern ist das Heterochromatin als große, stark gefärbte Klumpen erkennbar, die von einer helleren Grundsubstanz umgeben sind. Die Segmentierung des Kerns ist wichtig für die Funktion der Granulozyten als Bestandteil der unspezifischen Abwehr. Indem sie die Segmente in einer Linie anordnen, ist eine schnelle Migration zwischen den Endothelzellen möglich. Im Vergleich dazu ist bei den Makrophagen, die einen hufeisenförmig gebogenen Kern besitzen, diese Migration schwieriger. Daher zählen die neutrophilen Granulozyten zu den ersten Zellen, die in Entzündungsgebieten zu finden sind ([94, Paape et al., 2003]).

Die Oberfläche der meisten neutrophilen Granulozyten weist sehr viele Einstülpungen und Taschen auf, die zur Bildung von sogenannten Pseudopodien führt. Die dadurch erreichte Vergrößerung der Gesamtfläche der Zellmembran ist notwendig für ihre Funktion als Phagozyten, da bei jeder Phagozytose ein Teil der Membran abgeschnürt wird und neutrophile Granulozyten nicht in der Lage sind, ihre Plasmamembran zu regenerieren. Deutlich wird dies bei Betrachtung der neutrophilen Granulozyten in der Milchdrüse des Rindes. Durch Phagozytose von Milchfettmolekülen und Kasein weist nur noch ein geringer Prozentsatz der Granulozyten derartige Pseudopodien auf. Dadurch ist natürlich auch ihre phagozytische Aktivität vermindert ([94, Paape et al., 2003]).

Das Zytoplasma enthält neben großen Glykogenaggregaten zahlreiche Granula ([94, Paape et al., 2003]). Beim Rind können drei verschiedene Arten an Granula unterschieden werden, nämlich primäre oder azurophile Granula, große Granula und sekundäre oder spezifische Granula. Die primären oder azurophilen Granula sind etwa 0,15 - 0,30  $\mu\text{m}$  groß und kommen nur in geringer Anzahl vor. Ihre Form kann rund oder länglich sein ([42, Gennaro et al., 1983]; [8, Baggiolini

et al., 1985]). Primäre Granula werden sie genannt, da sie als erste der drei Arten an Granula gebildet werden. Sie treten erstmals im Stadium des Promyelozyten auf ([8, Baggiolini et al., 1985]). Als einzige Granula sind die primären Granula reich an Peroxidase ([110, Roth und Kaeberle, 1981];[42, Gennaro et al., 1983];[8, Baggiolini et al., 1985];[58, Jain, 1993];[94, Paape et al., 2003]). Teilweise ist in den Granula ein peroxidasenegativer Kern vorhanden ([8, Baggiolini, 1985]). Im Vergleich mit den neutrophilen Granulozyten des Menschen ist die Aktivität der Peroxidase um 80 – 85% geringer ([42, Gennaro, 1983]). Weiterhin enthalten die primären Granula unter anderem saure Hydrolasen und neutrale Proteinasen ([42, Gennaro et al., 1983]).

Die großen Granula sind etwa 0,4 - 0,5  $\mu\text{m}$  groß. Sie sind spezifisch für die neutrophilen Granulozyten der Rinder, Schafe und Ziegen, da sie unter den Haussäugetieren nur bei diesen Tierarten vorkommen ([42, Gennaro, 1983]; [8, Baggiolini, 1985]). Gennaro et al. gelang es erstmals, diese „neuen“ Granula zu isolieren und näher zu charakterisieren. Dabei zeigte sich, dass diese Granula deutlich größer als die beiden anderen sind und auch in einer höherer Anzahl pro Zelle vorhanden sind ([42, Gennaro, 1983]). Sie treten ab dem Myelozyten-Stadium auf, wenn die Produktion der primären Granula abgeschlossen ist. Anfangs sind sie nur teilweise mit Matrix ausgefüllt und von einer irregulären, gewellten Membran umgeben. Später besitzen sie eine glatte, scharf gezeichnete Membran und eine einheitliche, blasse Matrix ([8, Baggiolini, 1985]). Die großen Granula sind peroxidase-negativ, enthalten aber dafür andere antibakteriell wirksame Bestandteile ([42, Gennaro, 1983]; [8, Baggiolini, 1985]; [94, Paape, 2003]). Dazu gehört Laktoferrin, welches auch in den spezifischen Granula enthalten ist, eine hohe Anzahl kationischer Proteine, sowie  $\beta$ -Defensine. Laktoferrin bindet Eisen, welches die Bakterien für Ihr Wachstum brauchen ([94, Paape, 2003]). Die kationischen Proteine werden auch als Bactenecine bezeichnet, was sich von den lateinischen Wörtern „bacterium“ und „necare“ (töten) ableitet. Es sind zwei Bactenecine bekannt, nämlich Bac7 und Bac5. Zanetti et al. fanden heraus, dass diese als Vorstufen mit höherem Molekulargewicht in den großen Granula gespeichert werden. Zur Aktivierung benötigen sie neutrale Proteasen, welche auch in azurophilen Granula vorkommen. Daher wird angenommen, dass in aktivierten Granulozyten ein Zusammenspiel zwischen azurophilen und großen Granula stattfindet. Ihre bakterizide Wirkung beruht auf einer Hemmung des Elektronentransport und der Energieproduktion in der Bakterienzelle ([142, Zanetti et al., 1990]). Die kationischen Proteine sowie die Defensine stellen im Gegensatz zur Peroxidase der primären Granula eine sauerstoffunabhängige Bekämpfung der Bakterien dar ([42, Gennaro, 1983]; [94, Paape, 2003]).

Die sekundären Granula sind etwa so groß wie die primären Granula. Ihren Namen als sekundäre Granula erhielten sie, da sie erst nach den primären Granula auftreten. Beim Rind konnte jedoch

## 2.2. CHARAKTERISIERUNG DER EINZELNEN BLUTZELLEN

---

gezeigt werden, dass sie erst in Zellen auftreten, die bereits die fertigen großen Granula enthalten. Ihre Größe entspricht in etwa der der azurophilen Granula ([8, Baggiolini, 1985]). Azurophile und spezifische Granula treten in einem Verhältnis von 1:2 auf, jedoch kommen sie, wie bereits oben erwähnt wurde, in geringerer Anzahl als die großen Granula vor ([58, Jain, 1993]). Die spezifischen Granula sind ebenso wie die großen Granula Peroxidase-negativ ([42, Gennaro et al., 1983]; [8, Baggiolini et al., 1985]; [58, Jain, 1993]; [94, Paape et al., 2003]). Als spezifische Inhaltsstoffe enthalten sie Laktoferrin und alkalische Phosphatase ([58, Jain, 1993]; [94, Paape et al., 2003]). Weiterhin enthalten sie Vitamin-B12-bindendes Protein ([42, Gennaro, 1983]), welches auch als Cobalophilin bezeichnet wird. Cobalophilin entzieht den Bakterien das für ihre DNA-Replikation benötigte Vitamin B12 ([122, Sinowatz, 2000]).

In Tab. 2.2 sind die wichtigsten Merkmale der einzelnen Granula nochmals gegenübergestellt.

Tabelle 2.2: Verschiedene Granula der neutrophilen Granulozyten

| <b>Granula</b>                  | <b>Größe</b>           | <b>Form</b>        | <b>Auftreten</b> | <b>Charakteristische Inhaltsstoffe</b>            |
|---------------------------------|------------------------|--------------------|------------------|---|
| Primäre / azurophile Granula    | 0,15-0,3 $\mu\text{m}$ | Rund oder länglich | Promyelozyt      | Peroxidase, saure Hydrolasen, neutrale Proteasen  |
| Große Granula                   | 0,4-0,5 $\mu\text{m}$  | Rund               | Myelozyt         | Laktofferin, kationische Proteine                 |
| Sekundäre / spezifische Granula | 0,15–0,3 $\mu\text{m}$ | Rund               | Myelozyt         | Laktoferrin, alkalische Phosphatase, Cobalophilin |

Die unreifen Granulozyten unterscheiden sich in ihrer Größe nicht von den reifen ([94, Paape, 2003]). Sie besitzen einen hufeisenförmigen Kern, dessen Chromatin weniger dicht kondensiert ist und von einer glatten Kernmembran umgeben wird ([58, Jain, 1993]). Damit ein neutrophiler Granulozyt als unreifer neutrophiler Granulozyt bezeichnet werden kann, müssen mindestens 60% der Seiten der Kernwand parallel zueinander sein ([94, Paape, 2003]). Frühere Reifungsstadien der neutrophilen Granulozyten können im Blut nicht gefunden werden ([58, Jain, 1993]).

#### **2.2.4.4 Zytochemische Eigenschaften**

Die neutrophilen Granula sind positiv für folgende Färbungen: Peroxidase, Sudanschwarz, Chlorazetatesterase, alkalische Phosphatase und Perjodsäure-Schiff-Reaktion ([104, Raskin und Valenciano, 2000]). Die Peroxidase ist nur in den primären Granula vorhanden. Diese bildet bei Inkubation mit Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid ein elektronendichtes Produkt ([94, Paape, 2003]). Kälber im Alter von 1 - 3 Monaten weisen eine geringere Peroxidase-Aktivität auf ([61, Kampen et al., 2006]). Weiterhin enthalten die primären Granula auch saure Phosphatase, saure Hydrolasen sowie saure und neutrale Proteasen ([58, Jain, 1993]; [104, Raskin und Valenciano, 2000]). Zu letztern gehören Cathepsin B, D und G, sowie Elastase und Kollagenase ([58, Jain, 1993]; [102, Prin-Mathieu et al., 2002]). Die Chlorazetatesterase ist sowohl in den primären als auch in den sekundären Granula enthalten. Lipide, welche sich mit Sudanschwarz anfärben lassen, sind vor allem in den spezifischen Granula vertreten, zu einem kleinen Teil aber auch in den primären ([104, Raskin und Valenciano, 2000]). Eine Aktivität der alkalischen Phosphatase ist nur in den sekundären Granula zu finden ([58, Jain, 1993]; [104, Raskin und Valenciano, 2000]). Lysozym ist in den neutrophilen Granulozyten des Rindes nur sehr wenig ([58, Jain, 1993]), beziehungsweise gar nicht vorhanden ([42, Gennaro et al., 1983]; [1, Kramer, 2000]).

#### **2.2.4.5 Aufgaben**

Die Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht darin, den Organismus vor mikrobiellen Infektionen zu schützen. Dies geschieht durch Phagozytose und anschließende Vernichtung aufgenommener Mikroorganismen. Ein einzelner neutrophiler Granulozyt kann bis zu 40 - 45 Bakterien aufnehmen ([110, Roth und Keaberle, 1981]). Um diese Aufgabe auszuführen, müssen die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in das Gewebe auswandern. Dies geschieht mittels verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Integrine. Anschließend wandert der Granulozyt mit Hilfe seines Zytoskeletts aktiv zu den Zielzellen. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet und wird durch chemotaktische Substanzen, wie z.B. Komplementfaktoren, Prostaglandine, Leukotriene etc., vermittelt ([58, Jain, 1993]). Die Phagozytose ist abhängig von einer vorherigen Opsonierung der zu phagozytierenden Partikel. Das bedeutet, dass an diese vorher Immunglobuline oder Komplementfaktoren gebunden haben müssen ([58, Jain, 1993]; [67, Lösch et al., 2000]). Nach der Phagozytose kommt es zur Degranulation bzw. Verschmelzung der Phagosomen mit den Granula, wodurch die verschiedenen Inhaltsstoffe ihre bakterizide Wirkung entfalten können ([110, Roth und Keaberle, 1981]; [58, Jain, 1993]). Ein weiterer Mechanismus der neutrophilen Granulozyten ist der sogenannte „respiratory burst“. Dabei produziert eine

sich in der Zellmembran befindende NADPH-Oxidase verschiedene Sauerstoff-Metaboliten wie z.B.  $O_2^-$ ,  $OH^-$  und  $H_2O_2$ . Die Peroxidase der primären Granula katalysiert die Bildung von Hypochlorit ( $OCl^-$ ) aus  $H_2O_2$  und  $Cl^-$ . Alle diese Verbinden sind sehr reaktiv und töten die Mikroorganismen durch Oxidation ([110, Roth und Keaberle, 1981]; [58, Jain, 1993]; [78, Lösch et al., 2000]; [94, Paape et al., 2003]). Der „respiratory burst“ kann durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden ([110, Roth und Keaberle, 1981]; [58, Jain, 1993]) und ist in der ersten Lebenswoche am stärksten ([61, Kampen et al., 2006]).

### 2.2.5 Eosinophile Granulozyten

#### 2.2.5.1 Allgemeines

Die eosinophilen Granulozyten wurden erstmals 1879 von Paul Ehrlich beschrieben ([58, Jain, 1993]). Sie sind die zweithäufigste Art an Granulozyten ([125, Steffens, 2000]). Ihre Anzahl im Blut des Rindes beträgt durchschnittlich  $700/\mu l$  (0 -  $2400/\mu l$ ), was einen Anteil von 9% der Gesamtleukozyten ausmacht ([58, Jain, 1993]). Ab einem Alter von sechs Monaten verdoppeln Kälber ihre Anzahl an eosinophilen Granulozyten, bis sie ausgewachsen sind ([61, Kramer, 2000]).

#### 2.2.5.2 Bildung

Wie alle Granulozyten werden die eosinophilen Granulozyten aus der gemeinsamen Vorläuferzelle im Knochenmark, dem Myeloblasten, gebildet. Über die Stufen des Promyelozyten, eosinophilen Myelozyten und des eosinophilen Metamyelozyten entwickelt sich schließlich der eosinophile Granulozyt ([122, Sinowatz, 2000]). Diese Vorläuferzellen wurden bereits im Kapitel 2.2.4.2 näher beschrieben. Jain unterscheidet einen eosinophilen Promyelozyten mit großen, azurophilen Granula von einem neutrophilen Promyelozyten, welcher feine Granula besitzt ([58, Jain, 1993]). Die Produktion eines eosinophilen Granulozyten dauert etwa 2 - 6 Tage. Im Knochenmark des Rindes und des Meerschweinchens befindet sich im Gegensatz zum Menschen und den anderen Haussäugetieren eine große Reserve an diesen Zellen ([58, Jain, 2000]). Nach einem nur sehr kurzen intravaskulären Aufenthalt wandern sie in die verschiedenen Gewebe aus, wo sie etwa 12 Tage überleben ([78, Lösch et al., 2000]). Die Produktion der eosinophilen Granulozyten wird von verschiedenen Faktoren reguliert, welche von aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen ausgeschüttet werden. Dazu gehören z.B. GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), verschiedene Interleukine und EO-CSF (eosinophil-colony-stimulating factor) ([58, Jain, 1993]).



### 2.2.5.3 Morphologie

Die eosinophilen Granulozyten sind ca. 10-15  $\mu\text{m}$  groß und damit zumeist größer als die neutrophilen und basophilen Granulozyten ([125, Steffens, 2000]). Der Kern der eosinophilen Granulozyten ist weniger stark segmentiert als der reifer neutrophiler Granulozyten ([58, Jain, 1993]). Meistens ist er zweigelappt und enthält deutliche Nukleoli ([125, Steffens, 2000]). Das Zytoplasma färbt sich basophil ([68, Kramer, 2000]) und enthält größere und klarer umgrenzte Mitochondrien als die neutrophilen und basophilen Granulozyten ([125, Steffens, 2000]). Die Gestalt der Granula ist stark speziesabhängig. So besitzen z.B. die eosinophilen Granulozyten des Pferdes die größten Granula unter den Haussäugetieren. Bei den eosinophilen Granulozyten des Rindes finden sich zahlreiche gleichmäßige, kleine, runde, intensiv rot gefärbte Granula ([58, Jain, 1993]). Diese sind ca. 0,55 - 0,8  $\mu\text{m}$  groß und stets Peroxidase-positiv ([42, Gennaro et al., 1983]). Es können zwei Arten von Granula unterschieden werden, nämlich homogene und kristalline Granula, deren Vorkommen je nach Spezies unterschiedlich ist. So besitzt das Rind sowie das Pferd ausschließlich homogene Granula, während z.B. bei der Katze ausschließlich kristalline Granula zu finden sind ([58, Jain, 1993]). Freiburghaus und Jörg stellen fest, dass das Rind auch eine geringe Anzahl kristalliner Granula besitzt ([36, Freiburghaus und Jörg, 1990]). Die kristallinen Granula besitzen einen elektronendichter Kern von lamellärer Struktur, welcher von elektronenhellem Material umgeben ist ([58, Jain, 1993]).

Die spezielle Färbung der Granula der eosinophilen Granulozyten beruht auf dem Gehalt an stark kationischen (basischen) Proteinen, welche reich an der Aminosäure Arginin sind ([58, Jain, 1993]; [30, Eguchi, 1988]; [122, Sinowatz, 2000]). Die beiden wichtigsten sind das „major basic protein“ (MBP) und das „eosinophil cationic protein“ (ECP). Beide werden vor allem bei der Bekämpfung von Endoparasiten eingesetzt. Im Kern enthalten die Granula weiterhin Phospholipase C und in ihrer Matrix saure Phosphatase, Peroxidase und hydrolytische lysosomale Enzyme. Im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten ist eine unspezifische Esterase vorhanden ([58, Jain, 1993]).

### 2.2.5.4 Zytochemische Eigenschaften

Die eosinophilen Granulozyten weisen eine positive Peroxidase-Reaktion auf. Diese Peroxidase unterscheidet sich aber strukturell und biochemisch von der Peroxidase der neutrophilen Granulozyten. Ebenfalls positiv verläuft die Färbung mit Sudanschwarz und die Färbung für die alkalische Phosphatase, welche sich intrazellulär zwischen den Granula befindet. Eosinophile Granulozyten besitzen keine Chlorazetatesterase ([104, Raskin und Valenciano, 2000]).

### 2.2.5.5 Aufgaben

Die eosinophilen Granulozyten übernehmen unterschiedliche Aufgaben. Dazu gehört zum einen die Phagozytose von fremden Partikeln und Bakterien, zum anderen die Bekämpfung von Endoparasiten, welche aufgrund ihrer Größe nicht phagozytiert werden, sondern durch Degranulation nach außen abgetötet werden ([58, Jain, 1985]). Ihre zytotoxische Aktivität ist jedoch geringer als die der neutrophilen Granulozyten ([58, Jain, 1993]; [18, Chambers, 1985]). Die Migration ins Gewebe erfolgt aufgrund chemotaktischer Substanzen, wie z.B. IgE, Histamin aus den Mastzellen und spezifische Lymphokine ([58, Jain, 1993]). Eosinophile Granulozyten sind in der Lage, die Inhaltsstoffe ihrer Granula auch nach außen abzugeben. Dadurch können sie auch extrazelluläre Parasiten, wie z.B. Würmer abtöten ([78, Lösch et al., 2000]). Wie bei den neutrophilen Granulozyten bildet auch hier die Peroxidase mit  $H_2O_2$  und Chlorid-Ionen einen Komplex, welcher vor allem wichtig für die Bekämpfung von Endoparasiten ist, jedoch auch eine gewisse bakterizide Wirkung aufweist ([58, Jain, 1993]).

Die eosinophilen Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von allergischen Prozessen, in dem sie die Immunantwort auf allergische Reize z.B. durch Phagozytose von Immunkomplexen und Mastzell-Granula abschwächen. Weiterhin sind sie auch bei fast allen entzündlichen Prozessen mitbeteiligt, bei denen sie zytotoxische Proteine sezernieren ([58, Jain, 1993]).

Freiburghaus und Jörg stellten fest, dass die eosinophilen Granulozyten des Rindes keine spasmogenen Leukotriene bilden. Dies könnte der Grund dafür sein, dass das Rind keine derartigen asthmatischen Reaktionen aufweist, wie sie beispielsweise bei den Menschen oder den Pferden auftreten ([36, Freiburghaus und Jörg, 1990]).

## 2.2.6 Basophile Granulozyten

### 2.2.6.1 Allgemeines

Außer bei den Vögeln und Reptilien stellen die basophilen Granulozyten die am wenigsten vorkommende Art der Granulozyten dar ([78, Lösch et al., 2000]; [125, Steffens, 2000]). Sie sind daher auch die am wenigsten erforschte Gruppe. Mit einer durchschnittlichen Anzahl von nur  $50/\mu l$  ( $0-200/\mu l$ ) machen sie lediglich 0,5% der Gesamtzahl der Leukozyten aus ([58, Jain, 1993]). Dennoch sind sie im Blut der Wiederkäuer und Pferde häufiger anzutreffen als z.B. bei Hund und Katze ([58, Jain, 1993]).

### 2.2.6.2 Bildung

Die Entwicklung der basophilen Granulozyten folgt dem Schema der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Aus der pluripotenten Stammzelle leitet sich die myeloische Vorläuferzelle ab, aus welcher sich dann der Myeloblast und der Promyelozyt entwickeln ([67, Kraft et al., 1997]). Im Stadium des Myelozyten ist dieser durch Bildung der für die basophilen Granulozyten charakteristischen Granula als basophiler Myelozyt identifizierbar. Über das Stadium des basophilen Metamyelozyten entsteht schließlich der basophile Granulozyt ([122, Sinowatz, 2000]). Wie bei den eosinophilen Granulozyten wird auch die Produktion der basophilen Granulozyten durch spezielle Faktoren der T-Lymphozyten reguliert ([58, Jain, 1993]).

Aufgrund ihrer ähnlichen Aufgaben werden basophile Granulozyten oftmals mit Mastzellen verglichen und teilweise sogar als Blutmastzellen bezeichnet ([122, Sinowatz, 2000]).

### 2.2.6.3 Morphologie

Die basophilen Granulozyten sind etwa 8 – 10  $\mu\text{m}$  groß ([125, Steffens, 2000]). Kramer beschreibt sie beim Rind als gleich groß wie die eosinophilen Granulozyten ([68, Kramer, 2000]). Ihr Kern kann mehrfach gelappt oder bohnenförmig gebogen sein ([125, Steffens, 2000]). Auch hier variiert die Gestalt und Anzahl der Granula je nach Spezies. Beim Rind liegen die zahlreichen kleinen, intensiv blauen Granula dicht gepackt in der Zelle vor, so dass diese oftmals auch den Kern verdecken ([58, Jain, 1993]; [68, Kramer, 2000]). Im Gegensatz dazu füllen die Granula der basophilen Granulozyten des Hundes die Zelle nur teilweise aus ([58, Jain, 1993]). Die Granula sind durchschnittlich 1  $\mu\text{m}$  groß ([125, Steffens, 2000]). Elektronenmikroskopisch stellen sie sich bei den meisten Haussäugetieren sowohl bei den jugendlichen als auch bei den reifen basophilen Granulozyten als homogene Strukturen dar. Im Gegensatz dazu weisen die reifen Formen des Menschen kurvige und gitterartige Strukturen auf ([58, Jain, 1993]). Die Granula können aufgrund ihres wasserlöslichen Inhaltes vakuolisiert erscheinen ([125, Steffens, 2000]). Sie beinhalten unter anderem Heparin, Chondroitinsulfat und speziesabhängig auch Serotonin ([58, Jain, 1993]). Das Zytoplasma enthält neben den zahlreichen basophilen Granula viele Ribosomen und Glykogen-Granula ([125, Steffens, 2000]). Charakteristisch für basophile Granulozyten und Mastzellen ist die Metachromasie ([58, Jain, 1993]), worunter man die Fähigkeit versteht, durch basische Farbstoffe in einem anderen Farbton angefärbt zu werden, als in der angebotenen Farblösung enthalten ist. Ursache dafür ist der hohe Gehalt an Mukopolysacchariden ([103, Pschyrembel, 2004]).

### 2.2.6.4 Zytochemische Eigenschaften

Die basophilen Granulozyten färben sich mit Peroxidase und Sudanschwarz nicht an. Sie besitzen auch keine unspezifische Esterase. Die basophilen Granulozyten des Rindes besitzen eine schwache Chlorazetatesterase-Aktivität ([104, Raskin und Valenciano, 2000]).

### 2.2.6.5 Aufgaben

Eine der Hauptaufgaben der basophilen Granulozyten ist die Auslösung einer sofortigen Hypersensitivitätsreaktion, welche vor allem bei allergischen Reaktionen eine Rolle spielt. Durch Bindung von IgE an ihrer Zelloberfläche kommt es zu einer Degranulation und Freisetzung von Histamin und Serotonin. Diese üben einen entscheidenden Einfluß auf den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität aus ([78, Lösch et al., 2000]). Die basophilen Granulozyten spielen auch eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen durch die Freisetzung von so genannten Leukotrienen, welche als Mediatoren der Entzündung fungieren ([122, Sinowatz, 2000]). Weiterhin sind sie bei der Antikoagulation und Koagulation, der Fibrinolyse und dem Fettstoffwechsel beteiligt. Durch Freisetzung bestimmter chemotaktischer Stoffe sind sie ausserdem in der Lage, eosinophile Granulozyten anzulocken ([58, Jain, 1993]).

## 2.2.7 Monozyten

### 2.2.7.1 Allgemeines

Die Monozyten sind die größten Zellen unter den Leukozyten. Ihr Durchmesser beträgt beim Rind ca. 13 – 19  $\mu\text{m}$  ([68, Kramer, 2000]). Im Blut beträgt ihre physiologische Anzahl 25 – 840 (Durchschnitt 400)/ $\mu\text{l}$ , so dass sie zahlenmäßig unter den eosinophilen Granulozyten liegen ([58, Jain, 1993]).

### 2.2.7.2 Bildung

Die Monozyten entwickeln sich im Knochenmark aus den Monoblasten und Promonozyten ([5, Al-Izzy et al., 1982]). Diese entstehen zusammen mit den neutrophilen Granulozyten aus der gemeinsamen Vorläuferzelle CFU-GM ([41, Gasper, 2000]). Bei den Monoblasten handelt es sich um runde Zellen mit einem runden Kern, die nur einen schmalen Saum an basophilem Zytoplasma besitzen. Das Verhältnis Kern zu Zytoplasma ist größer als 1. Im Kern befinden sich mehrere Nukleoli, das Chromatin ist aggregiert. Die Promonozyten haben einen an einer Seite eingedellten Kern, der gewöhnlich nur einen Nukleolus besitzt. Das Chromatin ist stärker zu

Klumpen geformt, dazwischen ist es diffus verteilt. Um den Kern herum befindet sich eine klare Zone. Das Verhältnis von Kern zu Zytoplasma ist auch hier größer als 1, jedoch kleiner als bei den Monoblasten ([4, Al-Izzy et al., 1982]). Bei den Monoblasten und Promonozyten handelt es sich um Zellen, die sich noch teilen können. Die Monozyten sind nicht mehr in der Lage sich zu teilen ([5, Al-Izzy et al., 1982]). So entstehen aus einem Monoblasten durch Teilung zwei Promonozyten, von denen jeder wieder zwei Monozyten hervorbringt. Verdeutlicht wird dies auch durch das Verhältnis, in welchem diese Zellen im Knochenmark vorkommen; dieses beträgt 1:2,31:4,96 ([4, Al-Izzy et al., 1982]). Die Monozyten gelangen aus dem Knochenmark in die Blutbahn. Die intravaskuläre Aufenthaltsdauer beträgt beim Kalb ca. 21 Stunden ([58, Jain, 1993]). Danach wandern sie in verschiedene Gewebe aus, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Diese Differenzierung geht mit einer Vergrößerung der Zelle, Bildung von Granula und Vakuolisierung des Zytoplasmas einher ([11, Birmingham und Jeska, 1980]).

Die Entwicklungszeit der Monozyten beträgt durchschnittlich 36,4 Stunden. Dabei werden aber nicht immer alle Monozyten gleichzeitig, sondern einige früher bzw. später als andere ins Blut entlassen ([5, Al-Izzy et al., 1982]).

Die Bildung der Monozyten aus den Vorläuferzellen im Knochenmark wird durch den Monozyten-spezifischen-Kolonie-Stimulations-Faktor (M-CSF) reguliert. Dieses Glykoprotein wird von verschiedenen Zellen wie z.B. aktivierten Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Endothelzellen produziert ([58, Jain, 1993]).

### 2.2.7.3 Morphologie

Die Monozyten des Rindes sind runde Zellen mit einer durchschnittlichen Größe von 13 – 19  $\mu\text{m}$ . Der Kern der Monozyten kann sehr vielgestaltig (pleomorph) sein ([58, Jain, 1993]). Typischerweise ist er hufeisenförmig gebogen oder nur leicht eingebuchtet ([4, Al-Izzy et al., 1982]; [58, Jain, 1993]), und liegt exzentrisch in der Zelle ([125, Steffens, 2000]). Das Chromatin ist an einigen Stellen kondensiert ([58, Jain, 1993]), der größte Teil liegt diffus verteilt vor ([4, Al-Izzy et al., 1982]). Das Verhältnis Kern zu Zytoplasma ist kleiner oder gleich 1 ([4, Al-Izzy et al., 1982]). Im Zytoplasma finden sich Vakuolen, welche eine variable Form und Größe aufweisen; daneben besitzt es eine unterschiedliche Anzahl an kleinen, pinken, azurophilen Granula ([58, Jain, 1993]). Dabei handelt es sich um lysosomale Granula, welche vom Golgi-Apparat gebildet werden ([125, Steffens, 2000]) und hydrolytische Enzyme wie z.B. saure Phosphatase enthalten ([58, Jain, 1993]). Die Granula sind zahlenmäßig weniger vertreten und kleiner als bei den neutrophilen Granulozyten ([58, Jain, 1993]).

Unter dem Elektronenmikroskop lassen sich an der Zelloberfläche zahlreiche Mikrovilli-artige

Ausstülpungen erkennen. Weiterhin sind Mikrofilamente in Kernnähe zu erkennen ([58, Jain, 1993]). Im Zytoplasma befinden sich zahlreiche, kleine, runde Mitochondrien, ein prominent ausgebildeter Golgi-Apparat sowie eine größere Menge an Zentriolen. Die Anzahl an freien Ribosomen ist geringer als bei anderen Leukozyten ([125, Steffens, 2000]). Die Basophilie des Zytoplasmas ist auf die verstreut liegenden Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums und die diffus verteilten Polyribosomen zurückzuführen ([58, Jain, 1993]).

### 2.2.7.4 Zytochemische Eigenschaften

In den Granula der Monozyten befinden sich verschiedene Enzyme, welche für die Funktion der Monozyten wichtig sind. Als Unterscheidungsmerkmal zu den neutrophilen Granulozyten dient die diffus im Zytoplasma vorkommende unspezifische Esterase ([58, Jain, 1993]; [4, Al-Izzy et al., 1982]). Diese kann durch Natrium-Fluorid gehemmt werden. Bei der unspezifische Esterase der Lymphozyten ist dies nicht möglich ([58, Jain, 1993]). Auch beim Monoblasten und Promonozyten verläuft die unspezifische Esterase-Reaktion positiv, beim Monozyten ist sie jedoch am stärksten. Die Peroxidase-Aktivität ist bei den Monozyten sowie bei den Monoblasten eher schwach, bei den Promonozyten hingegen ist sie stark ausgeprägt ([4, Al-Izzy et al., 1982]). Die Reifung zum Makrophagen geht mit einem Verlust der Granula-assoziierten Peroxidase-Aktivität einher ([11, Birmingham und Jeska, 1980]).

Im Gegensatz zu vielen anderen Säugetieren und dem Menschen konnte in den Monozyten des Rindes das Enzym Lysozym nicht nachgewiesen werden ([95, Padgett, 1967]). Auch in einer anderen Studie wurde festgestellt, dass bovine Monozyten weder Lysozym enthalten noch dieses sezernieren, was zu der Feststellung führte, dass das Rind nicht in der Lage ist, Lysozym zu produzieren. Es ist jedoch unklar, welche Substanzen die wichtige Funktion des Lysozyms in den Monozyten des Rindes ersetzen ([11, Birmingham und Jeska, 1980]).

### 2.2.7.5 Aufgaben

Die Monozyten zählen zum sogenannten mononukleären Phagozytensystem (MPS), zu welchem auch die Monozytenvorstufen im Knochenmark, Gewebsmakrophagen, sowie sich von Monozyten ableitende Zelltypen, wie z.B. Kupffer-Sternzellen, gehören ([122, Sinowatz, 2000]). Sie sind Zellen der unspezifischen Abwehr ([78, Lösch et al., 2000]), zu deren wichtigsten Aufgabe die Phagozytose gehört, wobei vor allem solche Pathogene vernichtet werden, mit welchen die neutrophilen Granulozyten nicht zurecht kommen, wie z.B. intrazelluläre Parasiten ([58, Jain, 1993]). Dafür besitzen sie an ihrer Oberfläche bestimmte Rezeptoren, nämlich Rezeptoren für Komplementfaktoren und Fc IgG Rezeptoren, welche der Anheftung und Aufnahme von Parti-

keln dienen ([11, Birmingham und Jeska, 1980]). Die Monozyten im Blut dienen dabei als Quelle für die Makrophagen im Gewebe ([58, Jain, 1993]). Wenn durch eine Infektion ein höherer Bedarf an Gewebemakrophagen besteht, geht dies mit einer Erhöhung der Anzahl an Monozyten im Blut einher ([4, Al-Izzy et al., 1982]). Die von den Monozyten phagozytierten Antigene werden gespalten und die daraus resultierenden Spaltprodukte wieder an die Zelloberfläche gebracht, wo sie von T-Helferzellen erkannt werden. Als antigenpräsentierende Zellen dienen die Monozyten so auch der Aktivierung und Regulierung der spezifischen Abwehr ([78, Lösch et al., 2000]). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Makrophagen Effektorzellen gegen Tumorzellen darstellen ([11, Birmingham und Jeska, 1980]) und eine akzessorische Rolle bei der proliferativen Antwort von T-Lymphozyten auf Mitogene wie z.B. ConA spielen ([31, Ellis, 1989]). Die Makrophagen des Menschen dienen bei einer Infektion mit dem HIV-Virus als Erregerreservoir, da sie länger leben als T-Lymphozyten und auch mehr virale RNA und damit Viren produzieren ([60, Kalter, 1991]).

## 2.3 Glykohistochemie

### 2.3.1 Entstehung und Definition des Begriffs „Lektin“

Der Begriff Lektin entstammt dem lateinischen Wort „legere“ für auswählen und wurde 1954 erstmals von William C. Boyd eingeführt. Dieser schlug vor, den Begriff Lektin für Substanzen zu verwenden, die aus Samen und anderen Teilen bestimmter Pflanzen stammen und welche in der Lage sind, Erythrozyten zu agglutinieren und sich damit wie Antikörper verhalten. Er stellte ebenfalls fest, dass Lektine blutgruppenspezifische Präzipitine sind ([15, Boyd et al., 1954]). Als Lektin wurden daher ursprünglich kohlehydratbindende Proteine aus Pflanzensamen bezeichnet ([46, Goldstein et al., 1980])

Aufgrund des wachsenden Interesses an diesen Substanzen und der damit verbundenen Ausweitung des Begriffs Lektin auf sich ähnlich verhaltende Substanzgruppen nicht pflanzlichen Ursprungs, sah Irwin J. Goldstein 1980 die Notwendigkeit, den Begriff Lektin genauer zu definieren: „Ein Lektin (von dem lateinischen legere, auswählen) ist ein zuckerbindendes Protein oder Glykoprotein von nicht immunogenem Ursprung, welches Zellen agglutiniert und/oder Glykokonjugate präzipitiert“ ([46, Goldstein et al., 1980]). Nach dieser Definition ergeben sich für die Lektine bestimmte Eigenschaften. Sie besitzen mindestens zwei Bindungsstellen für Zucker und ihre Zucker-Spezifität definiert sich durch dieses Monosaccharid, welches die Agglutination oder Präzipitation hemmt. Lektine kommen sowohl in Pflanzen als auch in anderen Organismen

bis hin zu den Säugetieren vor und liegen dort entweder membrangebunden oder in biologischen Flüssigkeiten gelöst vor. Anhand dieser Eigenschaften sollen die Lektine auch von anderen zuckerbindenden Proteinen wie zuckerspezifische Enzyme, Transportproteine, Hormone und Toxine abgegrenzt werden ([46, Goldstein et al., 1980]).

Die von Goldstein entworfene Definition eines Lektins fand nicht überall Zustimmung. Jan Kokošek war der Meinung, dass es nicht sinnvoll sei, Lektine nach ihren *in vitro* Eigenschaften zu definieren, da die Agglutination von Zellen in den meisten Fällen wohl eher ein zufälliges Ereignis sei ([64, Kokošek et al., 1981]). Mit dieser Definition würden auch Lektine ausgeschlossen werden, welche nur eine Bindungsstelle für Zucker besitzen und welche toxische oder hormon-ähnliche Aktivität aufweisen. Im März 1981 schlug er daher folgende Definition eines Lektins vor: „Lektine sind zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nichtimmunogenen 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“ ([64, Kokošek et al., 1981]).

Beide Definition wurden im Juli 1981 vom Nomenklatur Komitee der internationalen Gemeinschaft für Biochemie gegenübergestellt, welches mit beiden Wissenschaftlern übereinstimmte, dass ein Lektin ein zuckerbindendes Protein von nicht immunogenem Ursprung sei. Das Komitee war jedoch der Meinung, dass die Agglutination von Zellen leichter zu überprüfen ist als das Fehlen einer enzymatischen Aktivität. Es beschloss daher, solange die Rolle der Lektine noch nicht sicher ist, die von Goldstein vorgeschlagene Definition zu übernehmen ([26, Dixon, 1981]).

### 2.3.2 Geschichte der Lektine

Die erste Beschreibung der Lektine erfolgte 1888 durch Peter H. Stillmark, der Ricin aus dem Samen der Rizinusbohne *Ricinus communis* isolierte und dessen Fähigkeit zur Agglutination von Erythrozyten feststellte ([65, Kokošek, 1986];[35, Franz, 1990];[121, Sharon and Lis, 2004]). Einige Jahre später isolierte H. Hellin das Lektin Abrin aus der Paternostererbse *Abrus precatorius* ([65, Kokošek, 1986];[121, Sharon and Lis, 2004]). Paul Ehrlich benutzte diese beiden Lektine für seine immunologischen Studien ([114, Rüdiger, 1981];[121, Sharon and Lis, 2004]). Als Karl Landsteiner um 1900 die menschlichen ABO Blutgruppen entdeckte, beschrieb er als erster nichttoxische Lektine in Pflanzensamen und konnte diese als Proteine identifizieren ([65, Kokošek, 1986]). Daraufhin wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um mehr über die Blutgruppenspezifität der Lektine zu erfahren. 1919 isolierte Sumner das Lektin Concanavalin A aus der Schwert- oder Riesenbohne *Canavalia ensiformis* ([121, Sharon and Lis, 2004]). Er konnte nachweisen, dass dieses Lektin in der Lage ist, Erythrozyten zu agglutinieren. Diese



Agglutination konnte aber durch Glukose gehemmt werden. Damit wurde zum ersten Mal die Zuckerspezifität der Lektine demonstriert ([129, Sumner und Howell, 1936]). Weitere Forschungen über die Blutgruppenspezifität der Lektine ergaben, dass Typ A Erythrozyten von Lektinen der Limabohne *Phaseolus limensis* und der Vogelwicke *Vicia cracca* agglutiniert werden. Das Lektin der roten Spargelerbse *Lotus tetragonolobus* agglutiniert Typ 0 Erythrozyten, während rote Blutzellen vom Typ B von dem Lektin der afrikanischen Schwarzbohne *Griffonia simplicifolia* agglutiniert werden. 1952 wurde erstmals ein Lektin aus einem Tier isoliert. Bei diesem handelte es sich um ein für L-Fukose spezifisches Lektin aus dem Aal *Angiulla anguilla* ([121, Sharon und Lis, 2004]). 1947 gelang es Ashwell und Morell, auch aus Säugetieren ein Lektin zu isolieren ([55, Hudkin und Stockert, 1974]). Dabei handelte es sich um ein für Galaktose spezifisches Lektin in der Leber, welches die Aufgabe hat, gealterte Glykoproteine zu eliminieren ([35, Franz, 1990]). Heutzutage können fünf unterschiedliche Gruppen an endogenen tierischen Lektinen unterschieden werden, zu denen unter anderem die Galektine zählen ([40, Gabius, 2001]). Ein Meilenstein in der Lektinforschung stellte die von Agrawal und Goldstein eingeführte Affinitätschromatographie dar, mit welcher seitdem viele Lektine gewonnen wurden ([2, Agrawal und Goldstein, 1965]; [121, Sharon und Lis, 2004]). Bei Verfügbarkeit des passenden Zuckers lagern sich die Lektine an kohlehydrathaltige Gele an. Nach Waschen des Gels in einer Zuckerlösung werden die Lektine frei ([40, Gabius et al., 1988]).

### 2.3.3 Struktur und Einteilung der Lektine

Bei den Lektinen handelt es sich in den meisten Fällen um Glykoproteine mit einem Kohlenhydratanteil von etwa 2 - 50%. Eine Ausnahme bilden ConA und WGA, welche keine Zucker enthalten ([115, Rüdiger, 1982]). Strukturell können Einketten- und Zweikettenlektine unterschieden werden. Zu den Einkettenlektinen gehören unter anderem die Lektine ConA und LBA, welche meistens aus vier Untereinheiten aufgebaut sind. Zweikettenlektine bestehen aus unterschiedlichen Ketten, nämlich einer leichten  $\alpha$ -Kette und einer schwereren  $\beta$ -Kette, die dann zu tetrameren Molekülen zusammengebaut sind ( $\alpha_2 \beta_2$ ). Dazu gehören z.B. die Lektine PSA und LCA ([114, Rüdiger, 1981]). Lektine von verschiedenen Pflanzen mit der gleichen Zuckerspezifität sind enger miteinander verwandt als Lektine von der gleichen Pflanze mit unterschiedlicher Zuckerspezifität ([115, Rüdiger, 1982]).

Für die Bindung des jeweiligen spezifischen Zuckers ist die Stellung der Hydroxylgruppe an dessen C3- und C4-Atom wichtig. Veränderungen am C2-Atom werden von vielen Lektinen toleriert. Aus diesem Grund werden Mannose und Glukose von den gleichen Lektinen gebunden. Nach Goldstein und Poretz können die Lektine sieben verschiedenen Gruppen zugeordnet

werden: Die Mannose und Glukose bindenden Lektine stellen die am besten untersuchte Gruppe dar, nicht zuletzt weil sie das bekannteste Lektin, nämlich Concanavalin A, enthalten. Zum größten Teil stammen sie aus Hülsenfrüchtlern (*Leguminosae*). Gemeinsam ist allen, dass sie für ihre Aktivität Metallionen ( $Mn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) benötigen und mitogen auf Lymphozyten wirken. Die N-Acetyl-glukosamin bindenden Lektine stammen unter anderem von den Getreiden (*Gramineae*), wie z.B. WGA, von den Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*), wie z.B. die Lektine aus der Tomate und der Kartoffel, und zum Teil auch von Leguminosen.

Lektine, die Galaktose oder N-Acetyl-galaktosamin binden, werden oftmals in einer Gruppe zusammengefasst. Unter ihnen befinden sich auch einige toxische Lektine, wie z.B. das Lektin aus der Rizinusbohne (*Ricinus communis*) und der Paternostererbse (*Abrus precatorius*). Anhand einiger Lektine aus dieser Gruppe wurde erstmals die Blutgruppenspezifität mancher Lektine entdeckt und näher erforscht.

Die für Fukose spezifischen Lektine haben eine sehr unterschiedliche Herkunft und weisen daher strukturell nur sehr wenige Gemeinsamkeiten auf.

Sialinsäurespezifische Lektine können sehr häufig in Wirbellosen gefunden werden und besitzen oftmals eine komplexe Struktur mit vielen Untereinheiten.

Schließlich gibt es Lektine, die nicht in diese Gruppen eingeordnet werden können, da sie komplexe Kohlehydratgruppen binden. Dazu gehört das Lektin aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) und aus *Vicia graminea* ([45, Goldstein und Poretz, 1986]).

In nachfolgender Tabelle sind für jede Gruppe einige Beispiele aufgeführt. Dabei wurde nicht berücksichtigt, dass einige Lektine auch in der Lage sind, zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomeren und zwischen Mono- und Oligosacchariden zu unterscheiden. Einige Lektine, wie z.B. WGA und WGAs, besitzen mehrere Bindungsspezifitäten ([137, Wearne et al., 2006]).

Tabelle 2.3: Einteilung der Lektine

| Zuckerspezifität | Herkunft                                    | Abk. |
|------------------|---|------|
| Glukose/Mannose  | <i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)  | ConA |
|                  | <i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)         | LCA  |
|                  | <i>Pisum sativum</i> (Erbse)                | PSA  |
|                  | <i>Vicia cracca</i> (Vogelwicke)            | VCA  |
|                  | <i>Vicia sativa</i> (Futterwicke)           | VSA  |
| Galaktose        | <i>Abrus precatorius</i> (Paternostererbse) | APA  |
|                  | <i>Arachis hypogea</i> (Erdnuß)             | PNA  |

|                                |   |                                     |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|
|                                | <i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrik. Schwarzbohne)<br><i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)<br><i>Viscum album</i> (Mistel)  | GSL-1<br>RCA<br>VAA                 |
| N-Acetyl-glukosamin            | <i>Datura stramonium</i> (Gemeiner Stechapfel)<br><i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)<br><i>Oryza sativa</i> (Reis)<br><i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)<br><i>Triticum vulgare</i> (Weizen)   | DSA<br>LEA<br>OSA<br>STA<br>WGA     |
| N-Acetyl-galaktosamin          | <i>Dolichos biflorus</i> (Afrik. Pferdebohne)<br><i>Glycine max</i> (Sojabohne)<br><i>Helix pomatia</i> (Weinbergschnecke)<br><i>Phaseolus limensis</i> (Limabohne)<br><i>Sophora japonica</i> (Chin. Schnurbaum)   | DBA<br>SBA<br>HPA<br>LBA<br>SJA     |
| L-Fukose                       | <i>Aleuria aurantia</i> (Orangeroter Becherling)<br><i>Anguilla anguilla</i> (Aal)<br><i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrik. Schwarzbohne)<br><i>Lotus tetragonolobus</i> (Rote Spargelerbse)<br><i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)                       | AAA<br>AAA<br>GSL-4<br>LTA<br>UEA-1 |
| Sialinsäure                    | <i>Carcinoscorpius rotunda cauda</i> (Ind. Pfeilschwanzkrebs)<br><i>Limax flavus</i> (Gelbe Egelschnecke)<br><i>Limulus polyphemus</i> (Pfeilschwanzkrebs)<br><i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)<br><i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder) | CRCA<br>LFA<br>LPA<br>MAA<br>SNA    |
| Komplexe Kohlehydratstrukturen | <i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)<br><br><i>Vicia graminea</i>  | PHA-E/-L<br><br>VGA                 |

### 2.3.4 Funktion und Anwendung von Lektinen

Lektine sind sehr weit verbreitet und kommen in fast jedem lebenden Organismus vor ([113, Rüdiger, 1998]). Sie konnten bisher sowohl aus Pflanzen als auch aus niederen Tieren und sogar

aus Säugetieren isoliert werden. Über die Funktion, die sie dort erfüllen, ist jedoch noch sehr wenig bekannt. Man geht davon aus, dass die Lektine in vivo vor allem als Adhäsions- und Erkennungsmoleküle fungieren ([114, Rüdiger, 1981]; [35, Franz, 1990]). Viele Proteine und Lipide tragen Zuckerketten, welche die Rolle als biologische Informationsträger übernehmen können ([40, Gabius et al., 1988]). Durch unterschiedliche Verknüpfungsmöglichkeiten, verschiedene anomerische Positionen, unterschiedliche Ringgrößen und Ausbildung von Verzweigungen besitzt die Struktur der Kohlehydrate eine große Kodierungskapazität. Dies wird auch als Zuckerkode bezeichnet ([38, Gabius, 2001]; [39, Gabius, 2008]). Bei den Pflanzen wird eine Rolle der Bakterien bei Keimungs- und Wachstumsprozessen sowie der Abwehr von Mikroorganismen und Insekten vermutet ([35, Franz, 1990]; [121, Sharon und Lis, 2004]). Da viele der bisher bekannten pflanzlichen Lektine vor allem aus den Leguminosen isoliert wurden, wird ihnen auch eine Rolle bei der Symbiose der Leguminosen mit Stickstoff-fixierenden Bakterien zugesprochen. Diese fixieren für die Pflanze atmosphärischen Stickstoff zu Ammoniak. Dafür versorgt die Pflanze sie mit organischen Verbindungen ([114, Rüdiger, 1981]). Jedoch stammen die hierbei beteiligten Lektine nicht aus dem Samen der Pflanze, sondern werden direkt in der Wurzel gebildet ([40, Gabius et al., 1988]). Für Mikroorganismen stellen die Lektine wichtige Adhäsionsmoleküle zur Anheftung an die Zielzelle dar ([35, Franz, 1990]). Alfred Gottschalk konnte um 1950 demonstrieren, dass das Hämagglutinin der Influenzaviren für das Andocken des Virus an die Zelle verantwortlich ist. Dieses Anheften ist die Voraussetzung für die Infektion. Aronson et al. zeigten 1979, dass eine durch *E. coli* verursachte Infektion des Urogenitaltraktes durch Mannose gehemmt werden kann ([121, Sharon und Lis, 2004]). Bakterien besitzen auch blutgruppenspezifische Lektine, was dazu führt, dass das Auftreten bestimmter Infektionen an das Vorkommen bestimmter Blutgruppen gekoppelt ist ([40, Gabius et al., 1988]). Bei den Säugetieren sind verschiedene endogene Lektine bekannt, welche unterschiedliche Aufgaben wie Zellerkennung, Zell-Zellinteraktionen, Transporte etc. steuern ([121, Sharon und Lis, 2004]). Lektine in Leberzell-Membranen erkennen z.B. Moleküle mit  $\beta$ -glykosidisch gebundener Galaktose, die dann gebunden und abgebaut werden. So werden gealterte Plasmaproteine und Blutzellen aus dem Blut entfernt, da frische Glykoproteine noch durch Sialinsäure vor diesem Abbau geschützt sind ([114, Rüdiger, 1981]; [40, Gabius et al., 1988]). Lektine spielen auch bei der Phagozytose eine wichtige Rolle. Unter Lektinophagozytose wird die lektinvermittelte Bindung von mikrobiellen Krankheitserregern und von Tumorzellen an Phagozyten mit anschließender Phagozytose bezeichnet ([119, Sharon, 1984]; [35, Franz, 1990]). Dabei kann eine aktive Phagozytose, bei der die Mikroorganismen an Lektine von Makrophagen binden, von einer passiven Phagozytose unterschieden werden, bei der bakterielle Lektine an Zuckerstrukturen der phagozytierenden Zellen

binden ([40, Gabius et al., 1988]).

Da Lektine leicht erhältlich sind, eine große Stabilität aufweisen und ihre Zuckerspezifität in den meisten Fällen bekannt ist, sind sie ein wichtiges Hilfsmittel in der Forschung geworden ([113, Rüdiger, 1998]). Die Anwendungsgebiete für die Lektine sind sehr vielseitig. In der Frühphase der Lektinforschung war die Blutgruppenspezifität der Lektine von großem Interesse ([35, Franz, 1990]; [62, Khan et al., 2002]). Lektine dienen weiterhin der Erkennung, Isolation und Untersuchung der Struktur von Glykoproteinen ([121, Sharon und Lis, 2004]). Mittels der Lektinoaffinitätschromatographie können Glykokonjugate auf Proteinen charakterisiert werden ([12, Bog-Hansen und Takeo, 1980]). Die Kohlehydratstrukturen auf den verschiedenen Zellen sind daher von großer Bedeutung, da sich diese während maligner Prozesse ändern können ([22, Cooper, 1984]; [121, Sharon and Lis, 2004]). Der Einsatz von Lektinen ist daher auch in der Tumorforschung weit verbreitet ([35, Franz, 1990]). Näher untersucht wurde das Bindungsverhalten von PNA bei Menschen mit Leukämie ([105, Reisner et al., 1979]). Von manchen Lektinen wird vermutet, dass sie speziell an maligne entartete Zellen binden; für WGA konnte dies jedoch nicht bestätigt werden ([116, Rüdiger, 2000]). Lektine, welche bevorzugt mit Tumorzellen reagieren, stammen z.B. aus der Mördermuschel (*Tridacna gigas*) oder dem Schwamm (*Geodica cydonicum*). Die Tumorzellen selbst besitzen auch Lektine. Diese spielen eine Rolle bei der Ansiedlung von Tochtergeschwüren ([40, Gabius et al., 1988]).

Lektine können im Rahmen der Lektin histochemie auch zur Identifizierung bestimmter Zellen eingesetzt werden. Lektine können wie Antikörper mit den gängigen Markern (z.B. FITC, Peroxidase) versehen werden ([22, Cooper, 1984]). Von einigen Lektinen ist bekannt, dass sie Lymphozyten zur Teilung anregen, also eine mitogene Wirkung aufweisen. Beispiele dafür sind ConA und PNA ([114, Rüdiger 1981]; [35, Franz, 1990]). Nowell entdeckte diese Fähigkeit 1960 zum ersten Mal bei dem Lektin von *Phaseolus vulgaris* ([90, Nowell, 1960]). Diese Fähigkeit macht man sich zu Nutze, um das Immunsystem von Mensch und Tier näher untersuchen zu können ([115, Rüdiger 1982]).

### **2.3.5 Zuckerstrukturen auf den bovinen Blutzellen**

Die Grundstruktur der Zellmembran ist eine Lipiddoppelschicht aus Phosphoglyceriden und Sphingolipiden, wobei sich die hydrophoben Anteile der Lipide zueinander ausrichten und die hydrophilen Anteile nach außen in die wässrige Umgebung ragen ([58, Jain, 1993]; [77, Löffler, 2003]). Die Zellmembran besitzt Membranproteine, welche der Membran angelagert sind oder sie durchziehen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Glykoproteine, deren Kohlehydratreste auch in die wässrige Umgebung ragen ([77, Löffler, 2003]).

Die verschiedenen Kohlehydrate der Zellmembran sind vor allem bei den Erythrozyten des Rindes besonders gut untersucht und mit denen des Menschen verglichen worden ([37, Furthmayr und Timpl, 1970]; [56, Hudson et al., 1975]; [32, Emerson und Kornfeld, 1976]; [47, Hamazaki et al., 1976]; [19, Chien et al., 1978]; [119, Howard et al., 1980]; [33, Fletcher et al., 1982]). Glykoproteine machen einen Großteil der Erythrozyten-Membran aus ([56, Hudson et al., 1975]). Die Zellmembranen der menschlichen und bovinen Erythrozyten besitzen ungefähr die gleiche Menge an Sialinsäure, Galaktose, Glukose und N-Acetyl-galaktosamin ([32, Emerson und Kornfeld, 1976]). Das Rind besitzt jedoch weniger Mannose und Fukose, dafür mehr N-Acetylglukosamin und Galaktose ([56, Hudson et al., 1975]; [32, Emerson und Kornfeld, 1976]; [89, Newman und Uhlenbruck, 1977]). Auch bei einem Vergleich mit Pferd und Schaf stellte sich heraus, dass qualitativ alle die gleichen Monosaccharide aufweisen, jedoch in unterschiedlicher Menge. Beim Rind und beim Menschen macht die Galaktose ca. 77 - 93% der Gesamt-Monosaccharide aus ([56, Hudson et al., 1975]).

Bei der Untersuchung der Thrombozyten stellten Woodside und Kocholaty 1960 fest, dass die Thrombozyten von Rind und Mensch beträchtliche Mengen an Glykogen besitzen. Desweiteren kommen Glukuronsäure, Galaktosamine, Glukosamine, Galaktose, Glukose, Mannose, Ribose, Fukose und Sialinsäure vor ([139, Woodside und Kocholaty, 1960]).

Die Lymphozytenmembranen von Rind und Mensch erscheinen sehr ähnlich. Das Rind besitzt im Gegensatz zum Menschen auch in der Lymphozytenmembran viel Galaktose, dafür aber weniger Sialinsäure ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977]).

### 2.3.6 Lektinbindungsstellen der bovinen Blutzellen

In der Vergangenheit wurde vor allem das Lektinbindungsverhalten der Erythrozyten und der Lymphozyten des Rindes untersucht und teilweise auch den Untersuchungsergebnissen an den Blutzellen des Menschen gegenübergestellt. Bei einem Vergleich mit den Erythrozyten des Menschen stellten Emmerson und Kornfeld fest, dass die Bindung der Lektine PHA-E und LCA bei den bovinen Erythrozyten um mehr als 10% geringer ist. Für RCA und das Lektin von *Agaricus bisporus* besitzen beide ungefähr gleich viele Bindungsstellen. Für WGA hingegen besitzen die Erythrozyten des Menschen 50% mehr Bindungsstellen. Die Erythrozyten des Rindes wiesen dabei für PHA-E und LCA nur sehr wenige Bindungsstellen auf, am meisten für das Lektin von *Agaricus bisporus* ([32, Emerson und Kornfeld, 1976]). Abweichend davon besaßen bei einer Studie von Newman und Uhlenbruck die bovinen Erythrozyten keine Rezeptoren für PHA-E, LCA und RCA, jedoch ebenfalls für WGA und das Lektin von *Agaricus bisporus*. Bei der Untersuchung weiterer Lektine zeigte sich, dass auch das Lektin von *Soya hispida* an die Erythro-

zyten des Rindes bindet, diese jedoch keine Rezeptoren für die Lektine PNA, HPA, ConA, UEA und die Lektine von *Vicia graminea*, *Salvia sclarea* und *Robinia pseudoacacia* aufweisen ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977]). Sumner und Howell konnten keine Bindung von ConA an die Erythrozyten von Rind und Mensch feststellen ([129, Sumner und Howell, 1936]).

Häufiger als die der Erythrozyten wurde die Bindung von Lektinen an die Lymphozyten des Rindes untersucht. Pearson et al. testeten eine Reihe von Lektinen zum einen auf ihre Bindung an die Lymphozyten, als auch auf ihre Fähigkeit, die DNA-Synthese in den Lymphozyten zu stimulieren. Mehr als 95% der Lymphozyten banden ConA. Ebenfalls positiv waren PNA, SBA und WGA, wobei bei den Untersuchungen mit SBA und WGA auch ein hoher Prozentsatz der Zellen negativ war. Bei UEA war keine Bindung an die Lymphozyten feststellbar ([99, Pearson et al., 1978]). Diese Ergebnisse widersprechen zum Teil den Ergebnissen von Newman und Uhlenbruck, die keine Bindung der Lektine WGA und ConA an die Lymphozyten feststellen konnten (Newman und Uhlenbruck, 1977). Die folgenden Lektine waren in der Lage, die DNA-Synthese in den Lymphozyten zu stimulieren: ConA, PHA-M, PWM (Pokeweed mitogen aus *Phytolacca americana*), S-ConA (Succinyl-Concanavalin A) und PNA. Sowohl die Bindung als auch die Stimulierung der Lymphozyten ist beim Rind nicht rasseabhängig ([99, Pearson et al., 1978]).

Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich verstärkt auf die Bindung der Lektine an die T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten sind aufgrund ihrer Immunglobuline, welche auf der Oberfläche ihrer Zellmembran verankert sind, leicht mittels Antikörper zu identifizieren. Für die T-Lymphozyten hingegen fehlten zuverlässige spezifische Marker ([59, Johansson und Morein, 1983]). Bereits in der Studie von Pearson et al. konnte gezeigt werden, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz der für PNA positiven Lymphozyten Immunglobuline auf ihrer Oberfläche tragen und dass die Mehrheit der Immunglobulin-negativen Zellen das Lektin PNA binden. Somit gilt PNA als spezifisch für die T-Lymphozyten des Rindes ([99, Pearson et al., 1987]). Durch weitere Untersuchungen konnte PNA als spezifischer Marker für die T-Lymphozyten bestätigt werden ([59, Johansson und Morein, 1983]; [34, Gershwin et al., 1983; Fossum et al., 1987]). Als weiterer T-Zell-Marker wurde das Lektin von *Helix pomatia* (HPA) identifiziert, welches jedoch nur nach vorheriger Behandlung der Lymphozyten mit Neuraminidase an diese bindet ([59, Johansson und Morein, 1983]). Die Anzahl der Lymphozyten im Blut des Rindes, welche positiv für PNA sind, beträgt ca. 70% ([43, Gershwin et al., 1983]; [27, Djilali et al., 1987]). Für HPA ist die Anzahl der positiven Lymphozyten geringer ([59, Johansson und Morein, 1983]). Die Bindung der Lektine basiert auf deren Zuckerspezifität; jedoch kann sich die Expression von Zuckerresten auf den Lymphozyten während ihrer Reifung und Aktivierung sowie während einer Infektion verändern. Fossum et al. stellten fest, dass die Lymphozyten bei Rindern, welche mit dem bo-

vinen Leukämie Virus (BLV) infiziert sind, ein anderes Lektin-Bindungsmuster gegenüber PNA und HPA aufwiesen. So waren unter anderem auch die B-Lymphozyten in der Lage, diese Lektine zu binden. Die Anwendung von bestimmten Lektinen als T-Lymphozyten-Marker ist somit nur bei gesunden Tieren möglich ([34, Fossum et al., 1987]).

Nachdem PNA und HPA als spezifische Marker für die T-Lymphozyten bekannt waren, wurde mit WGA ein weiteres Lektin für die T-Lymphozyten identifiziert. Djilali et al. wiesen nach, dass ca. 43% der Lymphozyten im Blut des Rindes WGA binden. Diese Lymphozyten sind ebenfalls positiv für PNA und tragen keine Immunglobuline auf ihrer Oberfläche. Somit muss es sich um T-Lymphozyten handeln ([27, Djilali et al., 1987]).

Bei den Blutzellen des Menschen stellen die Lektine SBA, HPA, DBA und GSL-1 spezifische Marker für die eosinophilen Granulozyten dar, wobei sie nur an deren zytoplasmatische Granula binden ([30, Eguchi et al., 1988]; [72, Lee et al., 1987]). Das für D-Galactose spezifische Lektin GSL-1 weist dabei eine schwächere Reaktion auf als die anderen drei Lektine, welche spezifisch für N-Acetyl-D-galaktosamin sind. Ursache dafür ist das Vorherrschen von N-Acetyl-D-galaktosamin in den zytoplasmatischen Granula der eosinophilen Granulozyten des Menschen ([30, Eguchi et al., 1988]).

In Tabelle 2.4 sind die in der Literatur angegebenen Bindungsstellen der Lektine noch einmal zusammengefasst.



Tabelle 2.4: Bindungsstellen der Lektine an den Blutzellen (NM = Neuraminidase)

| Lektin      | +/- | Zelle                   | Quelle                            |
|-------------|-----|-------------------------|-----------------------------------|
| A. bisporus | +   | Erythrozyten            | [32, Emerson und Kornfeld, 1976]  |
|             | +   | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | +   | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
| ConA        | -   | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | -   | Erythrozyten            | [129, Sumner und Howell, 1936]    |
|             | -   | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | +   | Lymphozyten             | [99, Pearson et al., 1987]        |
|             | +   | Lymphozyten-Stimulation | [99, Pearson et al., 1987]        |
| HPA         | -   | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | -   | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | +   | T-Lymphozyten           | [34, Fossum et al., 1987]         |
|             | +   | T-Lymphozyten (nach NM) | [59, Johansson und Morein, 1983]  |
| LCA         | +   | Erythrozyten            | [32, Emerson und Kornfeld, 1976]  |
|             | -   | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | -   | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
| PHA-E       | +   | Erythrozyten            | [32, Emerson und Kornfeld, 1976]  |
|             | -   | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | +   | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
| PHA-M       | +   | Lymphozyten-Stimulation | [99, Pearson et al., 1987]        |
| PNA         | -   | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | +   | Lymphozyten (nach NM)   | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | +   | T-Lymphozyten           | [99, Pearson et al., 1987]        |
|             | +   | Lymphozyten-Stimulation | [99, Pearson et al., 1987]        |
|             | +   | T-Lymphozyten           | [43, Gershwin et al., 1983]       |
|             | +   | T-Lymphozyten           | [34, Fossum et al., 1987]         |
|             | +   | T-Lymphozyten           | [59, Johansson und Morein, 1983]  |
| PWM         | +   | Lymphozyten-Stimulation | [99, Pearson et al., 1987]        |
| RCA         | +   | Erythrozyten            | [32, Emerson und Kornfeld, 1976]  |
|             | -   | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|             | +   | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |

|                 |   |                         |                                   |
|-----------------|---|-------------------------|-----------------------------------|
| R. pseudoacacia | - | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|                 | - | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
| SBA             | + | Lymphozyten             | [99, Pearson et al., 1987]        |
| S-ConA          | + | Lymphozyten-Stimulation | [99, Pearson et al., 1987]        |
| Soya hispida    | + | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|                 | + | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
| S. sclarea      | - | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
| UEA             | - | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|                 | - | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|                 | - | Lymphozyten             | [99, Pearson et al., 1987]        |
| V. graminea     | - | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|                 | - | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
| WGA             | + | Erythrozyten            | [32, Emerson und Kornfeld, 1976]  |
|                 | + | Erythrozyten            | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|                 | - | Lymphozyten             | [89, Newman und Uhlenbruck, 1977] |
|                 | + | Lymphozyten             | [99, Pearson et al., 1987]        |
|                 | + | T-Lymphozyten           | [27, Djilali et al., 1987]        |

## 2.4 Immunzytochemie

### 2.4.1 Definition und Anwendung

Unter Immunzytochemie versteht man die Darstellung antigener Strukturen auf oder in Zellen und Geweben mittels daran bindender Antikörper in histologischen Präparaten ([103, Pschyrembel, 2004]). Die Antikörper können dann durch Kopplung an unterschiedliche Markersubstanzen sichtbar gemacht werden, auf die im nächsten Punkt näher eingegangen wird ([123, Sinowatz, 2000]). 1941 wurde erstmals ein an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper verwendet. Seitdem wurden die immunzytochemischen Methoden immer weiter verbessert und spielen heute eine wichtige Rolle in der Forschung und in der Diagnostik ([25, Denk, 1989]).

### 2.4.2 Technik

Grundsätzlich kann zwischen der direkten und der indirekten Methode unterschieden werden. Bei der direkten Methode wird der Antikörper direkt auf das Präparat aufgebracht und bindet dort an das Antigen. Bei der indirekten Methode wird zunächst der gegen das Antigen gerichtete Antikörper aufgebracht. Dann wird ein zweiter markierter Antikörper dazu gegeben, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Bei letzterer Methode wird eine erhöhte Empfindlichkeit des Nachweises erreicht ([123, Sinowatz, 2000]).

Die Antikörper können auf unterschiedliche Weise markiert werden. Eine Möglichkeit bieten die Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. FITC (Fluoreszeinisothiocyanat), welche bei Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoreszieren ([25, Denk, 1989]). Die Methode wird als Immunfluoreszenz bezeichnet ([97, Pearse, 1980];[25, Denk, 1989]). Bei den immunenzymatischen Methoden werden bestimmte Enzyme als Marker verwendet. Dazu gehören die alkalische Phosphatase aus *E. coli*, die Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* und die Meerrettich-Peroxidase ([97, Pearse, 1980]). Diese Enzyme bilden bei Zugabe entsprechender Substrate farbige Produkte. Das Substrat für die Peroxidase ist z.B. Diaminobenzidin. Eine Modifikation dieser Technik ist die sogenannte Enzym-Anti-Enzym-Komplex-Methode, bei der das Enzym bereits an einen gegen das Enzym gerichteten Antikörper gebunden ist. Der primäre Antikörper wird dabei durch einen Brückenantikörper mit dem Enzym-Antikörper verbunden. Beispiele dafür sind der Peroxidase-Anti-Peroxidase-(PAP)-Komplex, sowie der alkalische-Phosphatase-Anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Komplex ([25, Denk, 1989]). Eine weitere Möglichkeit für die Markierung der Antikörper stellen kolloidale Goldpartikel dar, welche anhand der roten Färbung im Lichtmikroskop gut erkannt werden können. Sie eignen sich aber auch für elektronenmikroskopische Untersu-

chungen ([25, Denk, 1989]). De Waele et al. beschrieben die Immunogold- bzw. Immunogold-Silber-Färbung als eine gute Methode, um T-Zell-Subpopulationen in Blutaussstrichen des Menschen zu identifizieren ([134, De Waele et al., 1983]; [135, De Weale et al., 1986]; [136, De Waele et al., 1989]).

Eine weitere, häufig angewendete Methode ist die Avidin-Biotin-Methode. Grundlage dieser Methode ist die hohe Affinität des Hühnereiweiß-Glykoproteins Avidin zu Biotin. Avidin verbindet den biotinylierten Antikörper mit dem biotinylierten Marker (z.B. Peroxidase, FITC). Bei der so genannten ABC-Methode wird ein fertiger Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex verwendet ([25, Denk, 1989]).

### **2.4.3 Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten**

Die Immunhämatologie beschäftigt sich mit den antigenen Strukturen auf den Blutzellen. Diese sind wichtig für Blut- und Organtransplantationen, aber auch um die Rolle des Immunsystems bei verschiedenen Krankheiten zu untersuchen. Auf allen Zellen befinden sich Antigene, die in Histokompatibilitäts-Antigene, welche bei Transplantationen eine Rolle spielen, Blutgruppenantigene und Leukozyten-spezifische Antigene unterteilt werden ([58, Jain, 1993]). Auf die verschiedenen Blutgruppen-Antigene des Rindes wird im nächsten Kapitel eingegangen. Hier soll nur auf diese Antigene eingegangen werden, welche für die Unterscheidung der einzelnen Lymphozyten wichtig sind.

Alle B-Lymphozyten tragen auf ihrer Zelloberfläche Immunglobuline ([58, Jain, 1993]). Naessens fand heraus, dass es sich dabei im Gegensatz zu den B-Lymphozyten des Menschen und anderer Spezies ausschließlich um IgM handelt ([86, Naessens, 1997]). Zur Unterscheidung von B- und T-Lymphozyten und Lymphozyten-Subpopulationen werden so genannte CD-Antigene („cluster of differentiation“) herangezogen. Darunter versteht man für bestimmte Zellpopulationen charakteristische Moleküle der Zelloberfläche ([58, Jain, 1993]; [78, Lösch et al., 2000]). Beim Menschen sind für die B-Lymphozyten unter anderem die CD-Antigene CD9, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD37, CD38, CD39 und für die T-Lymphozyten die CD-Antigene CD2, CD3, CD4, CD7, CD8 bekannt ([58, Jain, 1993]). Beim Rind sind die CD2- und CD3-Antigene Pan-T-Zell-Marker ([130, Teale et al., 1987]). Davis et al. zeigten, dass CD2 ausschließlich auf T-Lymphozyten vorkommt ([23, Davis et al., 1988]). Die CD4-Antigene sind spezifisch für die T-Helferzellen, die CD8-Antigene für die zytotoxischen T-Zellen ([130, Teale et al., 1987]; [58, Jain, 1993]; [24, Davis und Hamilton, 1998]; [44, Glass und Spooner, 1990]). CD4 kommt außerdem auch auf den Monozyten vor ([58, Jain, 1993]; [24, Davis und Hamilton, 1998]). Alle T-Lymphozyten besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TCR). Nur beim Rind

und beim Schwein kann dabei ein  $\alpha\beta$ TCR oder ein  $\gamma\delta$ TCR unterschieden werden ([24, Davis und Hamilton, 1998]). Jedoch überwiegt beim Rind der  $\gamma\delta$ TCR ([78, Lösch et al., 2000]). Zellen, welche den  $\gamma\delta$ TCR tragen, können noch weiter in  $WC1^+/CD2^-/CD4^-/CD8^-$ -Zellen und  $WC1^-/CD2^+/CD8^{+/-}$ -Zellen unterteilt werden ([79, Machugh et al., 1997]). WC steht dabei für „workshop cluster“. Wyatt et al. stellten fest, dass im Blut vor allem die  $WC1^+$ -Zellen vorkommen und die  $CD2^+$ -Zellen vor allem in der Milz. Außerdem haben neugeborene Kälber die höchste Anzahl an  $\gamma\delta$ TCR, während er bei adulten Tieren am niedrigsten ist. Desweiteren haben Kälber eine geringere Anzahl an B-Lymphozyten, erreichen aber mit ca. 6 Monaten die Werte adulter Tiere ([141, Wyatt et al., 1994]). Dies deckt sich mit der Feststellung von Kampen et al., dass Kälber anfangs hohe Werte an T-Lymphozyten besitzen und die Zahl an B-Lymphozyten erst später ansteigt ([61, Kampen et al., 2006]). Wu et al. stellten ebenfalls fest, dass jüngere Tiere mehr T-Lymphozyten besitzen als ältere ([140, Wu et al., 1999]). Ayoub et al. zeichneten in einer Langzeitstudie die Veränderungen innerhalb der Lymphozyten-Subpopulation während des Alterwerdens von Kälbern auf ([7, Ayoub und Yang, 1996]). Neben den bereits genannten gibt es noch zahlreiche weitere Antigene und damit Untergruppen von Lymphozyten. Viele Studien beschäftigten sich mit der Entwicklung neuer Antikörper, mit der Anwendung von Antikörpern zur Identifizierung bekannter Lymphozyten-Subpopulationen und der Entdeckung neuer Subpopulationen ([130, Teale et al., 1987]; [48, Davis et al., 1988]; [70, Kunita et al., 1988]; [80, Mackay und Hein, 1989]; [20, Clevers et al., 1990]; [28, Djilali et al., 1991]; [53, Howard et al., 1991]; [48, Harbo et al., 2004;]).

## **2.5 Blutgruppen beim Rind**

### **2.5.1 Die Blutgruppensysteme und deren Bestimmung**

Das Wissen um die verschiedenen Blutgruppen begann 1900 mit der Entdeckung des menschlichen ABO-Blutgruppensystems durch Landsteiner ([58, Jain, 1993]). Heute können neben dem bekannten ABO-System fast 20 verschiedene Blutgruppensysteme beim Menschen unterschieden werden, z.B. Rhesus-Blutgruppen, Lewis-Blutgruppen, MNS-Blutgruppen und die Duffy-Blutgruppen ([103, Pschyrembel, 2004]). Die Blutgruppen des Rindes wurden in den letzten 60 - 70 Jahren intensiv erforscht ([112, Royal et al., 1952]; [57, Humble, 1954]; [127, Stormont, 1962]; [14, Bouw et al., 1964]; [84, Miller, 1966]; [13, Bouw, 1977]; [133, Tucker et al., 1986]; [52, Honberg und Larsen, 1992]).

Beim Rind können 11 verschiedenen Blutgruppensysteme unterschieden werden. Jedes System

enthält eine unterschiedliche Anzahl an Blutgruppenfaktoren ([127, Stormont, 1962]; [84, Miller, 1966]; [100, Penedo, 2000]). Unter Blutgruppen beziehungsweise Blutgruppenantigenen versteht man erbliche, strukturelle Eigenschaften von Blutbestandteilen, die aufgrund genetischer Vielgestaltigkeit unterschieden werden können ([103, Pschyrembel, 2000]). Dabei werden diese Blutgruppen, die von den Allelen eines einzelnen Genes bzw. von eng verknüpften Genen kodiert werden, zu einem System zusammengefasst ([127, Stormont, 1962]; [58, Jain, 1993]). Die Blutgruppenantigene sind auf allen Erythrozyten vorhanden, finden sich jedoch auch auf den Thrombozyten, den Leukozyten und in Geweben. Dort sind sie jedoch in geringerer Konzentration vorhanden ([58, Jain, 1993]).

Bezüglich des Blutgruppenfaktors N<sup>+</sup> herrscht noch Uneinigkeit darüber, ob dieser dem F-System zugeordnet werden soll oder ein eigenes N<sup>+</sup>-System bildet. Je nachdem, ob dieser Faktor von den Autoren in das F-System eingegliedert wird oder nicht, ergeben sich für das Rind 11 bzw. 12 verschiedene Blutgruppensysteme ([127, Stormont, 1962]; [100, Penedo, 2000]; [132, Thomsen et al, 2002]; [131, Thomsen, 2000]). Von manchen Autoren wird das F-System auch als F-V-System bezeichnet ([127, Stormont, 1962]). Aufgrund der vielen verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten sind ca. zwei Milliarden Bluttypen möglich ([127, Stormont, 1962]).

Die Blutgruppenfaktoren werden mit den Buchstaben des Alphabets benannt. Die tiefer gestellten Zahlen beschreiben Subtypen, die Hochkommata ' und '' bezeichnen zweite bzw. dritte Verwendungen der Buchstaben ([100, Penedo, 2000]). Die verschiedenen Blutgruppensysteme sind mit den dazugehörigen Blutgruppenfaktoren und dem Jahr ihrer Entdeckung in Tab. 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5: Blutgruppensysteme des Rindes (modifiziert nach [100, Penedo, 2000] und [127, Stormont, 1962])

| System | Entdeckung   | Blutgruppenfaktoren   |
|--------|--------------|---|
| A      | 1944         | A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , H, D, Z'  |
| B      | 1940         | B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , G <sub>3</sub> , K, I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> , O <sub>1</sub> , O <sub>2</sub> , O <sub>3</sub> , O <sub>4</sub> , P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> , Q, T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , Y <sub>1</sub> , Y <sub>2</sub> , A', B', D', E <sub>1</sub> ', E <sub>2</sub> ', E <sub>3</sub> ', F', G', I <sub>1</sub> ', I <sub>2</sub> ', J <sub>1</sub> ', J <sub>2</sub> ', K', O', P', Q', Y', A'', B'', G'', I'' |
| C      | 1941         | C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , E, R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , W, X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , C', L', X', C''   |
| F      | 1943         | F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> , V <sub>1</sub> , V <sub>2</sub> , N   |
| J      | 1942         | J   |
| L      | 1947         | L   |
| M      | 1958         | M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M'  |
| S      | 1943         | S, H', U <sub>1</sub> , U <sub>2</sub> , U <sub>1</sub> ', U <sub>2</sub> ', S'', H'', U''  |
| Z      | 1941         | Z   |
| R'     | 1960         | R', S'  |
| T'     | Keine Angabe | T'  |
| N      | 1960         | N ([127, Stormont, 1962]; [84, Miller, 1966])   |

Wie beim Menschen existieren auch beim Rind so genannte Duffy-Blutgruppenantigene (Fy<sup>a</sup> und Fy<sup>b</sup>). Menschliche Erythrozyten, die dieses Antigen nicht besitzen (Fy<sup>(a-b-)</sup>), werden nicht von *Plasmodium vivax*, dem Erreger der *Malaria tertiana*, befallen. Beim Rind wurde diese Resistenz gegenüber den Erregern der Babesiose, *Babesia bovis* und *Babesia bigemina* festgestellt. Tiere der Gattung *Bos indicus*, welche häufig resistent gegenüber der Babesiose sind, besitzen zumeist den Phänotyp Fy<sup>(a-b-)</sup>, wohingegen Tiere der Gattung *Bos taurus*, in deren Verbreitungsgebiet die Babesiose nicht endemisch ist, den Phänotyp Fy<sup>(a+b+)</sup> aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Babesien die Duffy-Blutgruppenantigene auf den Erythrozyten benötigen, um diese befallen zu können ([88, Nakamoto, 1998]).

Blutgruppen können auf verschiedene Weise bestimmt werden, wie z.B. durch Hämolysen, Agglutination oder Coombs-Test ([100, Penedo, 2000]). Beim Rind wird der Hämolysen-Test angewendet ([58, Jain, 1993]; [100, Penedo, 2000]). Dies liegt unter anderem daran, dass bovine Erythrozyten nur sehr schwer agglutinieren ([127, Stormont, 1962]). Für die Bestimmung der Blutgruppen beim Rind sind mittlerweile viele kommerziell hergestellte Antiseren erhältlich ([127, Stormont, 1962]; [13, Bouw, 1977]). Diese werden mit den Erythrozyten und Komple-

mentfaktoren vom Kaninchen zusammengebracht, woraufhin dann nach einiger Zeit der Grad der Hämolyse (0 - 4) abgelesen werden kann ([100, Penedo, 2000]).

### 2.5.2 Beschreibung einzelner Blutgruppensysteme

Wie aus Tab. 2.5 ersichtlich ist, war das B-System 1940 das erste erforschte Blutgruppensystem des Rindes ([127, Stormont, 1962]). Für den Nachweis dieses Blutgruppensystems stehen zahlreiche Reagentien zur Verfügung. Es stellt das komplexeste Blutgruppensystem dar, welches je bei einer Spezies gefunden wurde ([127, Stormont, 1962]; [14, Bouw, 1964]). Mehr als 1000 Allele sind für dieses System verantwortlich ([58, Jain, 1993]).

Bis 1958 wurden dann die weiteren Blutgruppensysteme C, Z, J, F-V, S, A, L und M entdeckt. Die Systeme J, L und Z enthalten jeweils nur einen Blutgruppenfaktor ([127, Stormont, 1962]). Das Besondere an dem J-System besteht darin, dass J ein löslicher Blutgruppenfaktor ist, der sowohl im Plasma, als auch im Speichel, in der Milch, im Magensaft und in der Samenflüssigkeit zu finden ist. Er wird im Gewebe produziert, ins Blut sezerniert und kann sich dann an die Erythrozyten anheften ([58, Jain, 1993]). Diese Anheftung erfolgt erst ab einem Alter von ca. vier bis zwölf Wochen, besteht dann aber lebenslang. Erwachsene Tiere können demnach den J-Faktor nur im Serum, im Serum und auf den Erythrozyten oder überhaupt nicht besitzen ([118, Schröffel et al., 1971]). Der J-Faktor bindet nur bei hohen Serumkonzentrationen an die Blutzellen ([100, Penedo, 2000]). Tiere, bei denen er nur im Serum vorhanden ist, besitzen dort zumeist nur sehr geringe Mengen ([118, Schröffel et al., 1971]). Schröffel et al. fanden heraus, dass der J-Faktor im Serum sowohl als Glykosphingolipid als auch als Mukoprotein vorkommt, jedoch nur das Glykosphingolipid in der Lage ist, an die Erythrozyten zu binden. Tiere, bei denen dieser Faktor nur im Serum vorhanden ist, sind demnach aufgrund eines genetischen Defektes nicht in der Lage, dieses Glykosphingolipid zu bilden ([118, Schröffel et al., 1971]).

1960 kamen noch zwei weitere Blutgruppensysteme dazu, nämlich das N-System mit seinem einzigen Blutgruppenfaktor N, sowie das R'-S'-System ([84, Miller, 1966]).

Die verschiedenen Blutgruppen des Rindes bzw. die daraus resultierenden Phänotypen sind sehr rassespezifisch ([127, Stormont, 1962]; [84, Miller, 1966]). So ist die Blutgruppe R'-S' sehr spezifisch für das Bison ([84, Miller, 1966]), die Blutgruppe Z kommt bei deutschen Rinderrassen nicht vor ([127, Stormont, 1962]).



### 2.5.3 Bedeutung der Blutgruppenbestimmung beim Rind

Beim Menschen sind Kenntnisse über die Blutgruppen essentiell für die Durchführung von Bluttransfusionen. Bei den Tieren spielt der Effekt der Blutgruppen bei einer Bluttransfusion keine so große Rolle ([13, Bouw, 1977]). Aufgrund der Vielfalt an Blutgruppen beim Rind kann eine erstmalige Bluttransfusion problemlos ohne vorherigen Test durchgeführt werden. Erst bei einer zweiten Transfusion sollte ein Kreuztest durchgeführt werden. Bei diesem wird das Serum des Empfängers auf Antikörper gegen die Erythrozyten des Spenders getestet, sowie auch das Serum des Spenders auf Antikörper gegen die Erythrozyten des Empfängers ([100, Penedo, 2000]).

Eine sehr wichtige Rolle spielt die Blutgruppenbestimmung des Rindes bei Vaterschaftstests. Diese haben durch die weite Verbreitung der künstlichen Besamung an Bedeutung gewonnen, da die Kühe innerhalb eines kurzen Zeitintervalls mit dem Samen verschiedener Bullen belegt werden können ([57, Humble, 1954]; [13, Bouw, 1977]). Die Blutgruppe des Kalbes wird von zwei Allelen bestimmt, von denen das eine von der Mutter und das andere vom Vater stammt (Penedo, 2000). Die Blutgruppenfaktoren, welche im Blut des Kalbes vorkommen, müssen zum Teil auch im Blut der Mutter vorkommen; die noch fehlenden Faktoren sind dann im Blut des Bullen, welcher der Vater ist, zu suchen ([57, Humble, 1954]). Sind beim Kalb Faktoren vorhanden, die weder bei der Kuh noch bei dem Bullen zu finden sind, kann dieser Bulle als Vater ausgeschlossen werden ([13, Bouw, 1977]). Es hat sich gezeigt, dass nur bestimmte Blutgruppenfaktoren zur Vaterschaftsbestimmung herangezogen werden können. Dies ist abhängig von der Häufigkeit ihres Auftretens. Faktoren, welche häufiger als 90% oder weniger als 10% auftraten, sind unbrauchbar ([13, Bouw, 1977]). Diese Art von Vaterschaftstest ist ein reines Ausschlussverfahren ([57, Humble, 1954]; [100, Penedo, 2000]).

Die Bestimmung der Blutgruppen kann auch zum Erkennen des sogenannten Freemartin-Syndroms herangezogen werden. Durch die häufig vorkommende Vereinigung der Blutgefäße des fetalen Blutkreislaufs bei zweigeschlechtigen Zwillingen können männliche Geschlechtshormone in den Blutkreislauf des weiblichen Zwillinges übertreten und verhindern dort die Ausbildung der inneren Geschlechtsorgane. Da das weibliche Kalb anatomisch und klinisch meist unauffällig erscheint, wird die daraus resultierende Infertilität erst beim Eintritt in die Geschlechtsreife bemerkt. Beim Rind ist es sehr unwahrscheinlich, dass zwei Tiere die gleiche Blutgruppe besitzen. Eine Ausnahme bilden eineiige Zwillinge sowie Freemartin-Zwillinge, da es durch den gemeinsamen Blutkreislauf auch zum Austausch von embryonalen Blutzellen kommt. Wird bei zweigeschlechtigen Zwillingen nun dieselbe Blutgruppe festgestellt, kann davon ausgegangen werden, dass neben den Blutzellen auch Hormone über den gemeinsamen Blutkreislauf ausgetauscht worden sind und dass es sich bei dem weiblichen Tier um einen Freemartin-Zwilling handelt ([57,

Humble, 1954]).

Ihre wohl bedeutendste Rolle haben die Blutgruppen in der letzten Zeit aber als Marker für die Vererbung bestimmter physiologischer Charakteristika erlangt ([58, Jain, 1993]). Es stellte sich heraus, dass das Vorkommen bestimmter Blutgruppen an das Auftreten einiger wirtschaftlich bedeutsamer Zuchtmerkmale gekoppelt ist, da die Gene für diese auf dem gleichen Segment des Chromosoms vorkommen wie die der Blutgruppen. Viele Untersuchungen konzentrierten sich daher darauf, mittels der bovinen Blutgruppen die genetischen Loci für diese Merkmale im Rindengenom zu identifizieren. Diese werden als „quantitative trait loci“ (QTL) bezeichnet und sollen mittels spezifischer Marker aufgespürt werden ([106, Rocha et al., 1998];[107, Rocha et al., 1998];[131, Thomsen, 2000];[132, Thomsen et al., 2002]). Rocha et al. konnten bisher einen Zusammenhang zwischen der L-Blutgruppe und der Milchproduktion, sowie der Milchzusammensetzung feststellen. Weiterhin hat die Blutgruppe C einen Einfluß auf den Rumpfwinkel, sowie die Blutgruppen S und B auf den Milchfettgehalt. Bei der Blutgruppe M stellten sie einen direkten negativen Einfluß des Phänotyps M2M' auf die Milch- und Protein-Menge fest ([106, Rocha et al., 1998]).

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Untersuchungsmaterial

Für die lichtmikroskopischen, ultrastrukturellen, glykohistochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen wurden Blutproben von insgesamt 46 Rindern der Rasse Fleckvieh entnommen. Dabei wurde auf eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Alters- bzw. Geschlechtsgruppen Kälber, Bullen und Kühe geachtet. So stammen die Blutproben von 18 Kälbern, 12 Bullen und 16 Kühen. Bei den Kälbern handelte es sich um 8 männliche und 10 weibliche Tiere. Die Probenentnahme bei den Bullen fand im Schlachthof Buchloe während des Blutenzuges nach der Betäubung der Tiere statt. Die Blutproben der Kühe und Kälber wurden in der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim im Rahmen diagnostischer Blutentnahmen aus der Hals- bzw. Schwanzvene entnommen. Das Blut wurde hierfür jeweils in EDTA-Röhrchen gesammelt.

Die Tabellen 3.1 bis 3.3 zeigen eine Aufstellung der für diese Doktorarbeit herangezogenen Rinder mit Angaben zu Geschlecht und Alter, sowie deren Verwendung bei den einzelnen Untersuchungen.

Von den Rindern, deren Blutproben für die glykohistochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen herangezogen wurden, wurde im Labor der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim ein Blutbild erstellt.

### 3.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten Kälber (EM = Elektronenmikroskopie; LM = Lichtmikroskopie; GHC = Glykohiostochmie; IHC = Immunhistochemie)

| Kälber  | Geschlecht | Alter      | EM | LM | GHC | IHC |
|---------|------------|------------|----|----|-----|-----|
| Kalb 1  | m          | 6,6 Wochen | X  |    |     |     |
| Kalb 2  | w          | 1 Tag      | X  |    |     |     |
| Kalb 3  | w          | 3 Wochen   | X  |    |     |     |
| Kalb 4  | m          | 4,9 Wochen | X  |    |     |     |
| Kalb 5  | w          | 6 Tage     | X  |    |     |     |
| Kalb 6  | m          | 15 Tage    |    | X  |     |     |
| Kalb 7  | m          | 12 Tage    |    | X  |     |     |
| Kalb 8  | w          | 18 Tage    |    | X  | X   |     |
| Kalb 9  | m          | 6,6 Wochen |    | X  | X   |     |
| Kalb 10 | m          | 6,6 Wochen |    | X  | X   |     |
| Kalb 11 | w          | 4,6 Monate |    |    | X   |     |
| Kalb 12 | w          | 4,9 Wochen |    |    | X   |     |
| Kalb 13 | w          | 3,4 Monate |    |    | X   |     |
| Kalb 14 | w          | 2 Tage     |    |    | X   |     |
| Kalb 15 | w          | 2 Tage     |    |    | X   |     |
| Kalb 16 | w          | 14 Tage    |    |    |     | X   |
| Kalb 17 | m          | 6 Tage     |    |    |     | X   |
| Kalb 18 | m          | 25 Tage    |    |    |     | X   |

Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendeten Kühe (EM = Elektronenmikroskopie; LM = Lichtmikroskopie; GHC = Glykohiostochmie; IHC = Immunhistochemie)

| Kühe   | Geschlecht | Alter     | EM | LM | GHC | IHC |
|--------|------------|-----------|----|----|-----|-----|
| Kuh 1  | w          | 2,6 Jahre | X  |    |     |     |
| Kuh 2  | w          | 4,8 Jahre | X  | X  |     |     |
| Kuh 3  | w          | 5,4 Jahre | X  | X  |     |     |
| Kuh 4  | w          | 6,9 Jahre |    | X  |     |     |
| Kuh 5  | w          | 5,4 Jahre |    | X  |     |     |
| Kuh 6  | w          | 6,1 Jahre |    | X  |     |     |
| Kuh 7  | w          | 4,5 Jahre |    | X  | X   |     |
| Kuh 8  | w          | 4,1 Jahre |    | X  | X   |     |
| Kuh 9  | w          | 3,1 Jahre |    | X  | X   |     |
| Kuh 10 | w          | 4,3 Jahre |    | X  | X   |     |
| Kuh 11 | w          | 8,5 Jahre |    | X  | X   |     |
| Kuh 12 | w          | 2,3 Jahre |    |    | X   |     |
| Kuh 13 | w          | 7 Jahre   |    |    | X   |     |
| Kuh 14 | w          | 4 Jahre   |    |    |     | X   |
| Kuh 15 | w          | 6,5 Jahre |    |    |     | X   |
| Kuh 16 | w          | 4,5 Jahre |    |    |     | X   |

Tabelle 3.3: Übersicht über die verwendeten Bullen (EM = Elektronenmikroskopie; LM = Lichtmikroskopie; GHC = Glykohiostochmie; IHC = Immunhistochemie)

| Bullen   | Geschlecht | Alter         | EM | LM | GHC | IHC |
|----------|------------|---------------|----|----|-----|-----|
| Bulle 1  | m          | 5 Jahre       | X  | X  |     |     |
| Bulle 2  | m          | ca. 20 Monate |    |    | X   |     |
| Bulle 3  | m          | ca. 20 Monate |    |    | X   |     |
| Bulle 4  | m          | ca. 20 Monate |    |    | X   |     |
| Bulle 5  | m          | ca. 20 Monate |    |    | X   |     |
| Bulle 6  | m          | ca. 20 Monate |    |    | X   |     |
| Bulle 7  | m          | ca. 20 Monate |    |    | X   |     |
| Bulle 8  | m          | ca. 20 Monate |    |    | X   |     |
| Bulle 9  | m          | ca. 20 Monate |    |    |     | X   |
| Bulle 10 | m          | ca. 20 Monate |    |    |     | X   |
| Bulle 11 | m          | ca. 20 Monate |    |    |     | X   |
| Bulle 12 | m          | ca. 20 Monate |    |    |     | X   |

Von den einzelnen Blutproben wurden Blutausstriche auf Super Frost® Objektträgern angefertigt und nach Lufttrocknen bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

## 3.2 Lichtmikroskopie

Die Blutausstriche wurden mit vier unterschiedlichen lichtmikroskopischen Färbemethoden angefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

### 3.2.1 Diff-Quick-Färbung

Dabei handelt es sich um eine Schnellfärbung, bei der die einzelnen Färbelösungen als Kombinationspaket erhältlich sind (LABOR + TECHNIK, Berlin). Sie wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Objektträger in die Fixierlösung eintauchen
2. Nach Abtropfen für wenige Sekunden in Eosin-Lösung tauchen
3. Danach eintauchen des Präparates für wenige Sekunden in Hämalaun-Lösung
4. Waschen in Aqua dest.

## 5. Trocknen des Objektträgers

Die Zellkerne der Granulozyten färben sich dunkelblau, die Granula der eosinophilen Granulozyten rot bis orange, die der basophilen Granulozyten dunkellila bis schwarz und die der neutrophilen Granulozyten hellrosa. Monozyten haben einen violetten Kern und ein hellblaues Zytoplasma, die Thrombozyten stellen sich violett bis lila dar.

### 3.2.2 Giemsa-Färbung

Die Färbelösung enthält Eosin, Methylenblau, Methylenazur und Methylviolett, welche in Methanol und Glycerin gelöst sind. Folgendes Protokoll wurde angewendet:

1. Fixieren der Ausstriche 5 – 10 Minuten in Methanol (MERCK, Darmstadt) und Lufttrocknen
2. Verdünnte Giemsa-Lösung (MERCK, Darmstadt) aufgießen. Verdünnen der Giemsa-Lösung: 0,3 ml der Giemsa-Stammlösung in ein mit Aqua dest. gefülltes Becherglas tropfen lassen und dabei das Becherglas schwenken.
3. 30 – 45 Minuten färben
4. Spülen mit Aqua dest. und trocknen lassen ([108, Romeis, 1989])

Hier werden die Zellkerne durch Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot angefärbt. Dies wird auch als Romanowsky-Effekt bezeichnet. Das Plasma der Lymphozyten und Monozyten stellt sich blau dar und enthält teilweise feine purpurrote Azurkörnchen. Die Granula der eosinophilen Granulozyten färben sich rötlich-braun, die der basophilen Granulozyten blau und die der neutrophilen Granulozyten rotviolett. Die Erythrozyten stellen sich blassrötlich und die Thrombozyten blau mit violetterm Innenkörper dar ([108, Romeis, 1989]).

### 3.2.3 Färbung nach May-Grünwald

Die Färbemethode nach May-Grünwald stellt eine Färbung mit eosinsaurem Methylenblau dar. Die Färbelösung erhält man, indem aus Eosin und Methylenblau ein Farbstoff hergestellt wird, welcher dann in Methanol gelöst wird.

Die Ausstriche wurden nach folgendem Protokoll gefärbt:

1. Mit der unverdünnten Farbstofflösung (MERCK, Darmstadt) die Ausstriche für max. 3 – 5 Minuten durch Auftropfen bedecken

2. Verdünnen der Farbstofflösung durch Zugabe der gleichen Menge an Aqua dest. und für weitere 5 – 10 Minuten färben. Dies ist die eigentliche Anfärbung. Das Präparat nimmt einen rötlichen Ton an.
3. Farbstofflösung abgießen und das Präparat kurz in Aqua dest. eintauchen
4. Abtropfen und Lufttrocknen

Bei dieser Färbung stellen sich die Erythrozyten hellrot, die Thrombozyten blaßblau und die Zellkerne blau dar. Granula der eosinophilen Granulozyten werden leuchtend ziegelrot, die der basophilen Granulozyten tiefblau angefärbt. Die Granula der neutrophilen Granulozyten werden als feine hellrote bis pupurfarbene Körnchen sichtbar ([108, Romeis, 1989]).

### **3.2.4 Panoptische Färbung nach Pappenheim**

Diese Färbung ist eine Kombination der May–Grünwald– und der Giemsa–Färbung. Die Blutausstriche wurden nach folgendem Schema gefärbt:

1. Die unfixierten luftgetrockneten Ausstriche werden mit ca. 30 Tropfen May–Grünwald Färbelösung (MERCK, Darmstadt) für 3 Minuten überschichtet
2. Gleiche Menge an Aqua dest. hinzufügen und eine weitere Minute färben
3. Sofortiges Abgießen der verdünnten Färbelösung
4. Für 15 – 20 Minuten mit verdünnter Giemsa–Lösung überschichten (Verdünnen vgl. oben)
5. Abspülen mit Aqua dest.
6. Abtropfen und Lufttrocknen

Die Zellkerne färben sich rötlich–violett, das Zytoplasma der lymphoiden Zellen hellblau, wobei die Monozyten und Lymphozyten purpurrote und die myeloischen Zellen violette Azurkörnchen enthalten können. Die Granula der eosinophilen Granulozyten stellen sich braun bis rot, die Granula der basophilen Granulozyten blau und die der neutrophilen Granulozyten rotbraun dar. Die Erythrozyten färben sich rosa, wobei deren basophile Punktierung kräftig kobaltblau dargestellt wird ([108, Romeis, 1989]).



### 3.3 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Proben von neun Rindern folgendermaßen bearbeitet. Sie wurden zuerst 15 Minuten lang bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Nach Abpipettieren des überstehenden Plasmas wurde zum Fixieren der Proben das gleiche Volumen an Karnovsky–Gebrauchslösung auf den Leukozytensaum aufgetragen. Dann folgte eine Fixierung bei 4°C für eine Stunde. Anschließend wurde das entstandene Zellpellet in 0,1 M Cacodylat–Puffer (pH 7,7) gespült, um noch anhaftendes Blut zu entfernen. Das Pellet wurde über Nacht nochmals in Karnovsky–Lösung eingebracht. Am nächsten Tag wurde es dann in 1 mm<sup>3</sup> große Blöcke geschnitten und nochmals dreimal in Natrium–Cacodylatpuffer (pH 7,2) gewaschen. Die Proben wurden anschließend mit 1%igem Osmiumtetroxid und 1,5%igem Kaliumferrocyanid für zwei Stunden bei 4°C kontrastiert und danach nochmals dreimal für je 20 Minuten mit Natrium–Cacodylatpuffer gewaschen.

Nach der Fixierung der Proben folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90% je 30 Minuten, 30 Minuten absolutes Ethanol) und die schrittweise Einbettung in Epon (Propylenoxid (MERCK, Darmstadt), 2mal je 15 Min., Propylenoxid–Epon–Gemisch 2:1 1 Stunde, Propylenoxid–Epon–Gemisch 1:1 über Nacht, reines Epon 1 Stunde). Anschließend wurden die Blöcke in Gelatinekapseln (PLANNET, Wetzlar) für 24 Stunden bei 60°C polymerisiert.

An einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert–Jung, Wien) wurden 1 µm dicke Semidünnschnitten für die erste Übersicht geschnitten und mit Richardson gefärbt. Danach wurden Ultradünnschnitte (60 nm) von diesen Blöcken angefertigt, auf denen genug Zellen vorhanden waren. Diese wurden dann auf Kupfer–Grids (200 Mesh) aufgezogen und mit gesättigtem Uranylacetat und einer Bleizitrat–Lösung nach Reynolds nachkontrastiert.

### 3.4 Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden sowohl an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelte als auch biotinylierte Lektine verwendet. Die Proben wurden dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

#### 3.4.1 FITC markierte Lektine

Es wurden insgesamt 14 an FITC gekoppelte Lektine (LINARIS, Wertheim) verwendet, wobei jeweils 22 Blutausrüche auf die Bindungsfähigkeit des jeweiligen Lektins untersucht wurden.

Die hierbei verwendeten Lektine sind in Tabelle 3.4. zusammen mit ihrer Zuckerspezifität aufgelistet.

Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendete FITC–markierte Lektine

|    | <b>Name</b>                           | <b>Abk.</b> | <b>Herkunft</b>                                      | <b>Zucker-spezifität</b>       |
|----|---------------------------------------|-------------|--|--------------------------------|
| 1  | Concanavalin Agglutinin               | ConA        | <i>Canavalia ensiformis</i><br>(Schwertbohne)        | Glukose, Mannose               |
| 2  | Lens culinaris Agglutinin             | LCA         | <i>Lens culinaris</i><br>(Speiselinse)               | Glukose, Mannose               |
| 3  | Pisum sativum Agglutinin              | PSA         | <i>Pisum sativum</i><br>(Erbse)                      | Glukose, Mannose               |
| 4  | Griffonia simplicifolia Agglutinin    | GSL-1       | <i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrik. Schwarzbohne) | Galaktose                      |
| 5  | Peanut Agglutinin                     | PNA         | <i>Arachis hypogea</i><br>(Erdnuß)                   | Galaktose                      |
| 6  | Ricinus communis Agglutinin           | RCA         | <i>Ricinus communis</i><br>(Kastorbohne)             | Galaktose                      |
| 7  | Wheat germ Agglutinin                 | WGA         | <i>Triticum vulgare</i><br>(Weizen)                  | N–Acetyl–glukosamin, Chitin    |
| 8  | Wheat germ Agglutinin succinyliert    | WGA succ.   | <i>Triticum vulgare</i><br>(Weizen)                  | N–Acetyl–glukosamin            |
| 9  | Dolichos biflorus Agglutinin          | DBA         | <i>Dolichos biflorus</i><br>(Afrikan. Pferdebohne)   | N–Acetyl–galaktosamin          |
| 10 | Saphora japonica Agglutinin           | SJA         | <i>Saphora japonica</i><br>(Chin. Schnurbaum)        | N–Acetyl–galaktosamin          |
| 11 | Soybean Agglutinin                    | SBA         | <i>Glycine max</i><br>(Sojabohne)                    | N–Acetyl–galaktosamin          |
| 12 | Ulex europaeus Agglutinin             | UEA-1       | <i>Ulex europaeus</i><br>(Stechginster)              | $\alpha$ -L–Fukose             |
| 13 | Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro | PHA-E       | <i>Phaseolus vulgaris</i><br>(Gartenbohne)           | komplexe Kohlehydratstrukturen |

|    |  |           |  |                                     |
|----|--|-----------|--|-------------------------------------|
| 14 | Phaseolus vulgaris<br>Agglutinin Leuco | PHA-<br>L | <i>Phaseolus vulgaris</i><br>(Gartenbohne) | komplexe Kohlehydrat-<br>strukturen |
|----|--|-----------|--|-------------------------------------|

Die Präparate wurden 10 min. lang in Methanol (MERCK, Darmstadt) fixiert und danach 3x hintereinander je 5 min. in PBS-Puffer (pH 7,4-7,6) gewaschen. Pro Blutausschlag wurden 300  $\mu$ l des in PBS-Puffer gelösten und an FITC gekoppelten Lektins in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml auf den Objektträger pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit befanden sich die Ausstriche zum Schutz vor Austrocknung in einer feuchten Kammer, welche aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs mittels Aluminiumfolie abgedunkelt wurde. Auch bei den darauffolgenden Schritten war es wichtig, die Präparate vor Lichteinwirkung zu schützen. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte wiederum eine dreimalige Spülung je 5 min. in PBS-Puffer. Um auch die Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurden die Ausstriche mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid)-Farbstofflösung (ROCHE, Mannheim) gegengefärbt. Eine Verdünnung von 1:7500 der DAPI-Stammlösung (1 mg/ml) erwies sich nach mehreren Testreihen als am besten geeignet. Die Objektträger wurden für 10 min. bei Raumtemperatur in eine Küvette mit der DAPI-Lösung eingetaucht. Danach folgte ein zweimaliges Waschen für je 5 min. in PBS-Puffer, sowie ein zweimaliges Waschen für je 5 min. in destilliertem Wasser. Zum Eindeckeln der Objektträger wurden Gel-Mount, Fluo-Mount sowie ein selbst hergestelltes PVA Mounting Medium, welchem um ein Ausbleichen vorzubeugen DABCO (DAKO, Hamburg) zugesetzt wurde, verwendet. Die fertigen Blutausschläge mußten dann bei 7°C im Kühlschrank bis zur Auswertung im Dunkeln aufbewahrt werden.

Als Positivkontrolle wurden Präparate von Prostatakarzinomen, deren Lektinbindungseigenschaften bekannt waren, verwendet. Weiterhin wurden einige Präparate ohne Lektinfärbung unter dem Mikroskop untersucht, um den Grad der Eigenfluoreszenz der einzelnen Blutzellen darzustellen. Die Lektine, welche bei der Auswertung negativ waren, das heißt keine Bindung an das Präparat aufwiesen, wurden zur Kontrolle nochmals mit unterschiedlichen Inkubationszeiten getestet. Diese betrug 1,5 Stunden, 2 Stunden sowie 2 Stunden im Kühlschrank.

Abbildung 3.1 zeigt die einzelnen Schritte der Lektinfärbung

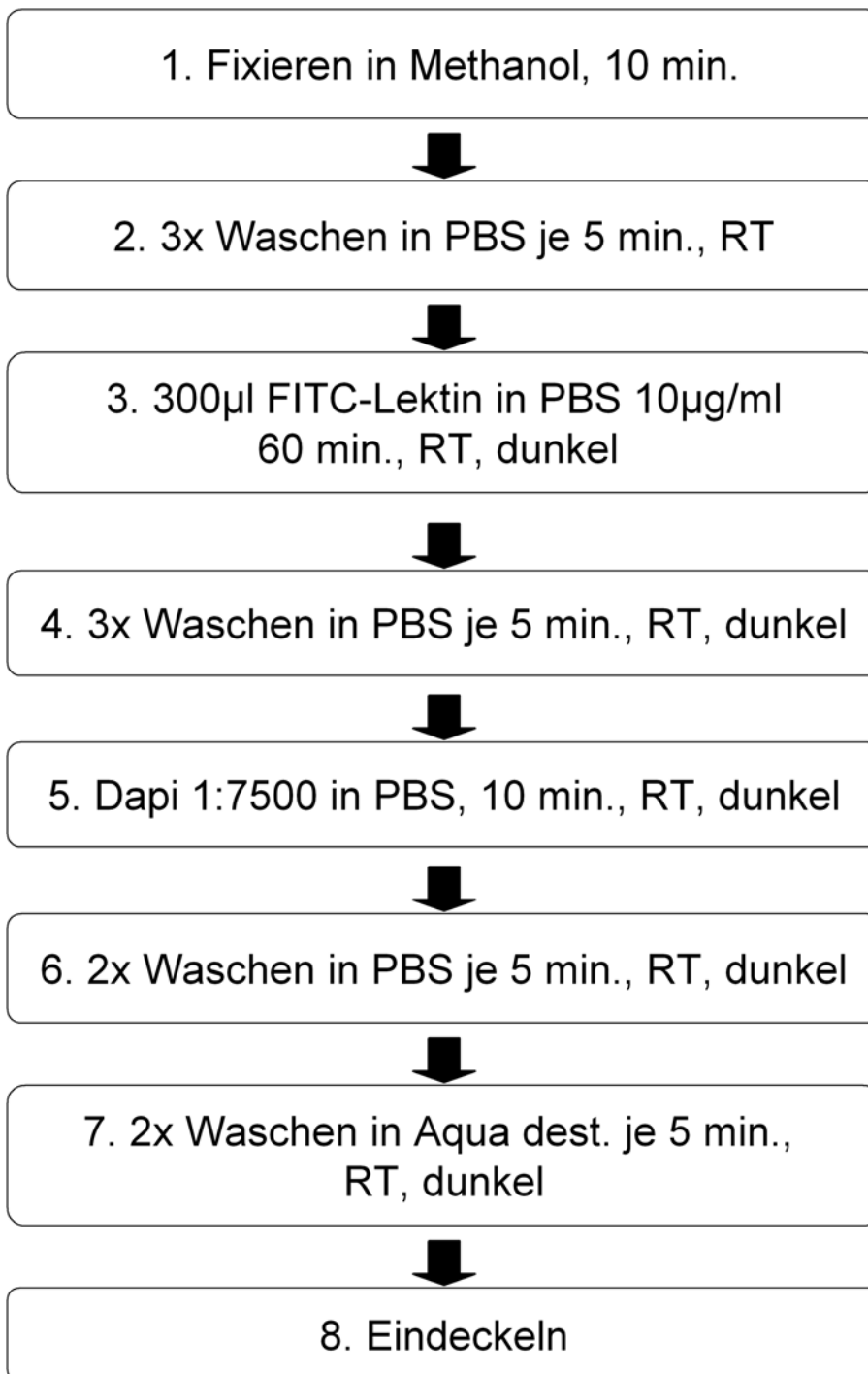


Abbildung 3.1: Ablauf der Färbung mit FITC–markierten Lektinen

### 3.4.2 Hemmzucker

Bei den deutlich positiv reagierenden Lektinen wurde getestet, ob sich die Bindung der Lektine mittels des für sie spezifischen Kohlehydrates deutlich vermindern bzw. hemmen lässt. Hierfür wurde das Lektin vor dem Auftragen auf das Präparat mit dem jeweiligen Hemmzucker 1 Stunde bzw. 30 Minuten lang vorinkubiert. Bei PHA-E hat sich aus Ermangelung eines spezifischen Hemmzuckers die Hemmung mit Essigsäure bewährt. Die Inhibitoren wurden in einer 0,4 molaren Lösung zu den in PBS-Puffer gelösten Lektinen dazugegeben. Das Lektin-Hemmstoff-Gemisch wurde auf je 2 Ausstriche aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde auf je einen Blutausschrieb nur das Lektin aufpipettiert. Ansonsten entsprach die Vorgehensweise derjenigen, welche bereits unter 3.4.1 beschrieben wurde. In Tabelle 3.5 sind die Lektine mit den dazugehörigen Hemmstoffen, sowie deren Konzentration und die Inkubationszeit aufgelistet.

Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Hemmzucker

| <b>Lektin</b> | <b>Hemmstoff</b>   | <b>Konzentration</b> | <b>Inkubationszeit</b> |
|---------------|--|----------------------|------------------------|
| WGA           | Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)                        | 0,4M                 | 30 Minuten             |
| WGAs          | Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)                        | 0,4M                 | 30 Minuten             |
| ConA          | Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)       | 0,4M                 | 1 Stunde               |
| LCA           | Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)       | 0,4M                 | 1 Stunde               |
| PSA           | Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)       | 0,4M                 | 1 Stunde               |
| PNA           | Methyl- $\alpha$ -D-Galaktopyranoside (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen) | 0,4M                 | 1 Stunde               |
| RCA           | Methyl- $\alpha$ -D-Galaktopyranoside (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen) | 0,4M                 | 1 Stunde               |
| SBA           | N-Acetyl-D-Galaktosamin (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen)               | 0,4M                 | 1 Stunde               |
| PHA-E         | Essigsäure (ROTH, Karlsruhe)                                       | 0,4M                 | 1 Stunde               |

### 3.4.3 Vorbehandlung mit Neuraminidase

Mithilfe dieser Methode sollte herausgefunden werden, ob nach vorheriger Behandlung des Blutaussstrichs mit Neuraminidase bestimmte Lektine nun besser binden, beziehungsweise ob Lektine, welche vorher nicht gebunden haben, nach dieser Vorbehandlung in der Lage sind, mit bestimmten Zellstrukturen eine Bindung einzugehen. Das Enzym Neuraminidase spaltet von verschiedenen Glykoproteinen die endständige Sialinsäure ab, so dass deren Zuckermoleküle zugänglich sind.

Die hier verwendete Neuraminidase von *Vibrio cholerae* (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen) spaltet bevorzugt  $\alpha(2 \rightarrow 3)$  Verbindungen der Sialinsäure, aber auch  $\alpha(2 \rightarrow 6)$  und  $\alpha(2 \rightarrow 8)$  Verbindungen. Dabei wird ein pH-Wert von 5,0 und eine Temperatur von 37°C benötigt.

Für die Gebrauchslösung wurde eine Einheit der Neuraminidase mit 3,6 ml Azetat-Puffer (pH 5,0) verdünnt. Die Herstellung des Azetat-Puffers (Walpole) erfolgte durch Mischen einer 0,1 molaren Natriumazetat-Lösung mit einer 0,1 molaren Essigsäure-Lösung im Verhältnis 141:59 ([108, Romeis, 1989]).

Bei den untersuchten Lektinen handelte es sich um die an FITC-gekoppelten Lektine UEA, WGA und RCA. Hierfür wurden pro Lektin 4 Blutausstriche erst 10 Minuten in Methanol fixiert und anschließend 3 mal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Auf 3 der 4 Präparate wurden anschließend in einer feuchten Kammer 200  $\mu$ l der verdünnten Neuraminidase aufpipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ausstriche zunächst wieder 3 mal je 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen, dann wurde auf alle Objektträger je 200  $\mu$ l der jeweiligen Lektinlösung (10  $\mu$ g Lektin / ml PBS-Puffer) aufgetragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur in der abgedunkelten feuchten Kammer inkubiert. Damit ergaben sich pro Lektin drei mit Neuraminidase vorbehandelte Blutausstriche, sowie ein nicht vorbehandelter Ausstrich, der als Positivkontrolle diente.

Die weitere Behandlung der Präparate erfolgte wie bereits unter 3.4.1. beschrieben.

### 3.4.4 Biotinylierte Lektine

Die Lektine MAA-1 (BIOZOL, Eching), SNA (BIOZOL, Eching) und VAA (Institut für physiologische Chemie, München) wurden mittels der Streptavidin-Biotin-Methode nachgewiesen. Die wichtigsten Eigenschaften dieser Lektine sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete biotinylierte Lektine

|   | <b>Name</b>                  | <b>Abk.</b> | <b>Herkunft</b>                                    | <b>Zuckerspezifität</b> |
|---|------------------------------|-------------|--|-------------------------|
| 1 | Maackia amurensis Agglutinin | MAA-1       | <i>Maackia amurensis</i><br>(Asiatisches Gelbholz) | N-Acetylneuraminsäure   |
| 2 | Sambucus nigra Agglutinin    | SNA         | <i>Sambucus nigra</i><br>(Schwarzer Holunder)      | N-Acetylneuraminsäure   |
| 3 | Viscum album Agglutinin      | VAA         | <i>Viscum album</i><br>(Mistel)                    | Galaktose               |

Das Protein Steptavidin stammt von *Streptomyces avidinii* und hat eine hohe Bindungsaffinität zu dem Vitamin Biotin. Bei der hier angewendeten direkten Methode bindet das an Biotin gekoppelte Lektin an seine spezifische Kohlehydratstruktur. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC ist ebenfalls an Biotin gebunden und bildet mit dem Streptavidin einen Komplex. Wenn dann dieser Streptavidin-FITC-Komplex zu dem Lektin gegeben wird, bindet das Streptavidin mit hoher Affinität an dessen Biotin-Molekül. Durch die Markierung mit FITC wird so die Bindungsstelle des Lektins sichtbar gemacht.

Das Prinzip dieser Methode, welche eine Variante der Avidin-Biotin-Methode darstellt, soll durch folgendes Flußdiagramm verdeutlicht werden:

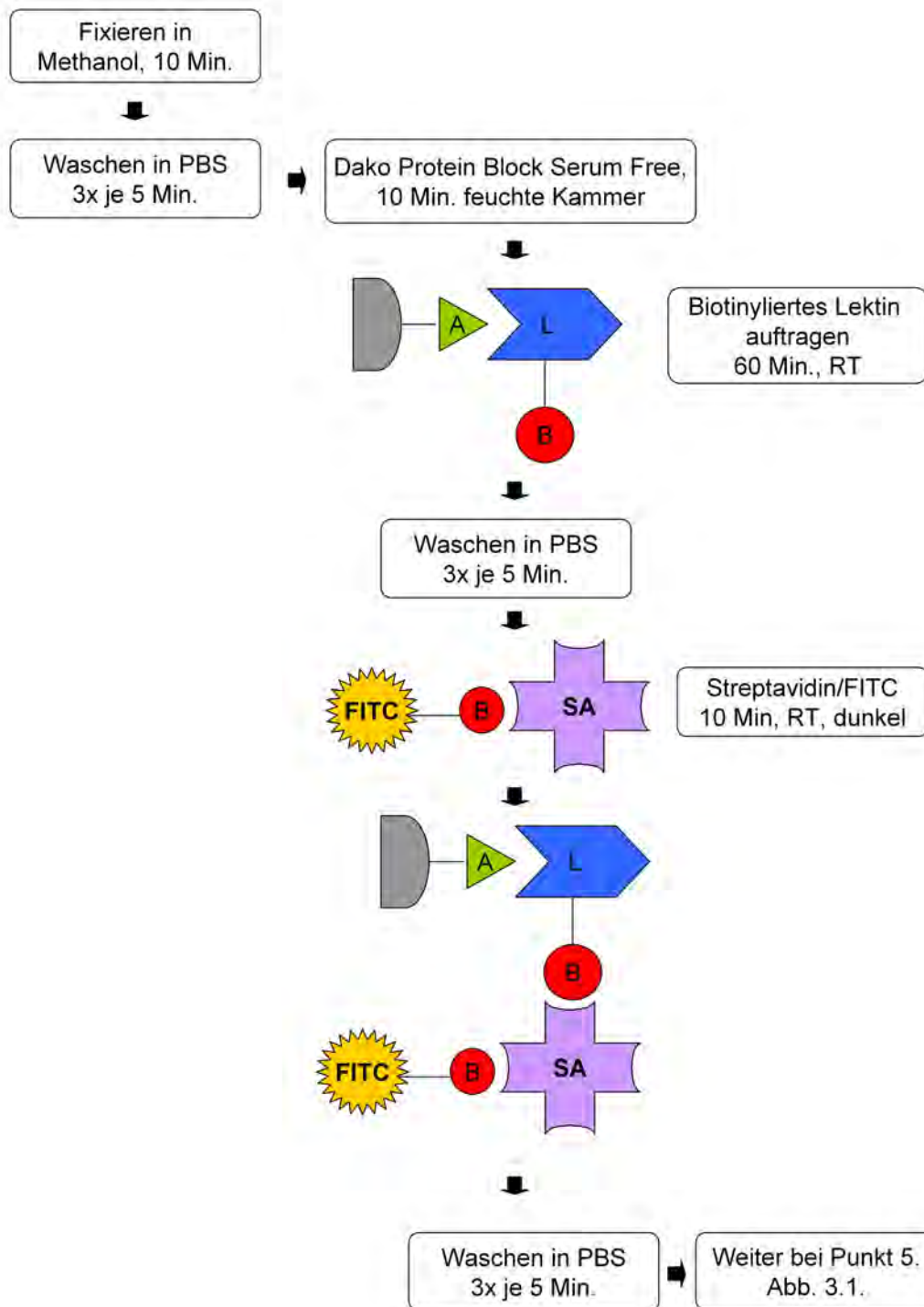


Abbildung 3.2: Flussdiagramm ABC-Methode (A = Antigen; B = Biotin; L = Lektin; FITC = Fluoreszeinisothiocyanat; SA = Streptavidin)



Bei dieser Methode wurden pro Lektin 10 Blutausrichre verwendet, welche zu Beginn wieder 10 Minuten in Methanol (MERCK, Darmstadt) fixiert wurden. Danach folgte ein dreimaliges Waschen für je 5 Minuten in PBS-Puffer. Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren wurden die Präparate mit Dako Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) bedeckt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden wieder 300  $\mu$ l der in PBS-Puffer gelösten biotinylierten Lektine auf die Blutausrichre aufpipettiert. Die Konzentration der Lektine betrug für MAL-1 und SNA 5  $\mu$ g/ml und für VAA 1  $\mu$ g/ml. Während der Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur befanden sich die Präparate wieder in der feuchten Kammer. Danach wurden die Ausrichre nochmals 3x für je 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen.

Anschließend folgte die Inkubation mit Streptavidin/FITC (DAKO, Hamburg) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dieses wurde hierzu im Verhältnis 1:500 verdünnt, wobei je 300  $\mu$ l dieser Lösung auf jeden Ausrich aufgetragen wurde. Ab hier war es wieder wichtig, die Präparate vor Lichteinwirkung zu schützen. Die folgenden Schritte waren dieselben wie bei den FITC markierten Lektinen. Auch hier erfolgte eine Kernfärbung mittels der DAPI-Farbstofflösung.

Um ein stärker positives Ergebnis zu erzielen, wurden anschließend pro Lektin zwei weitere Blutausrichre mit einer höheren Konzentration gefärbt. Diese betrug für MAL-1 und SNA 10  $\mu$ g/ml und für VAA 2  $\mu$ g/ml.

### **3.5 Immunzytochemie**

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden Blutausrichre von 10 verschiedenen Tieren angefertigt und auf die Bindung verschiedener Antikörper hin untersucht.

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper zusammen mit den Zielzellen und den Sekundärantikörpern aufgelistet.

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

| Zielzelle           | Antikörper                          | Konz. | Tierart | Sekundäran-<br>tikörper         | Konz. |
|---------------------|-------------------------------------|-------|---------|---------------------------------|-------|
| CD8-<br>Lymphozyten | CD8 (SEROTEC,<br>Düsseldorf)        | 1:200 | Maus    | Anti-Maus-FITC<br>vom Kaninchen | 1:20  |
| CD4-<br>Lymphozyten | CD4 (SEROTEC,<br>Düsseldorf)        | 1:100 | Maus    | Anti-Maus-FITC<br>vom Kaninchen | 1:20  |
| B-Lymphozyten       | LCT30A<br>(LAB-LEIPZIG,<br>Leipzig) | 1:68  | Maus    | Anti-Maus-FITC<br>vom Kaninchen | 1:20  |

Die Blutausstriche wurden zunächst wieder 10 Minuten in Methanol (MERCK, Darmstadt) fixiert, anschließend 3 mal je 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde das Dako Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg) aufgetragen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abgießen wurden pro Objektträger 200  $\mu$ l der jeweiligen Antikörper-Lösung (in Antikörper-Diluent von DAKO, Hamburg) aufpipettiert. Die Präparate wurden anschließend über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein dreimaliges Waschen für je 5 Minuten in PBS-Puffer, danach wurden pro Objektträger 200  $\mu$ l der verdünnten Sekundäranantikörper-Lösung (Anti-Maus-FITC vom Kaninchen, DAKO, Hamburg) aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte auch hier wieder eine Kernfärbung mit DAPI-Farbstofflösung, die ebenso wie oben beschrieben durchgeführt wurde. In Abb. 3.3 sind die einzelnen Schritte der Antikörper-Färbung nocheinmal dargestellt.

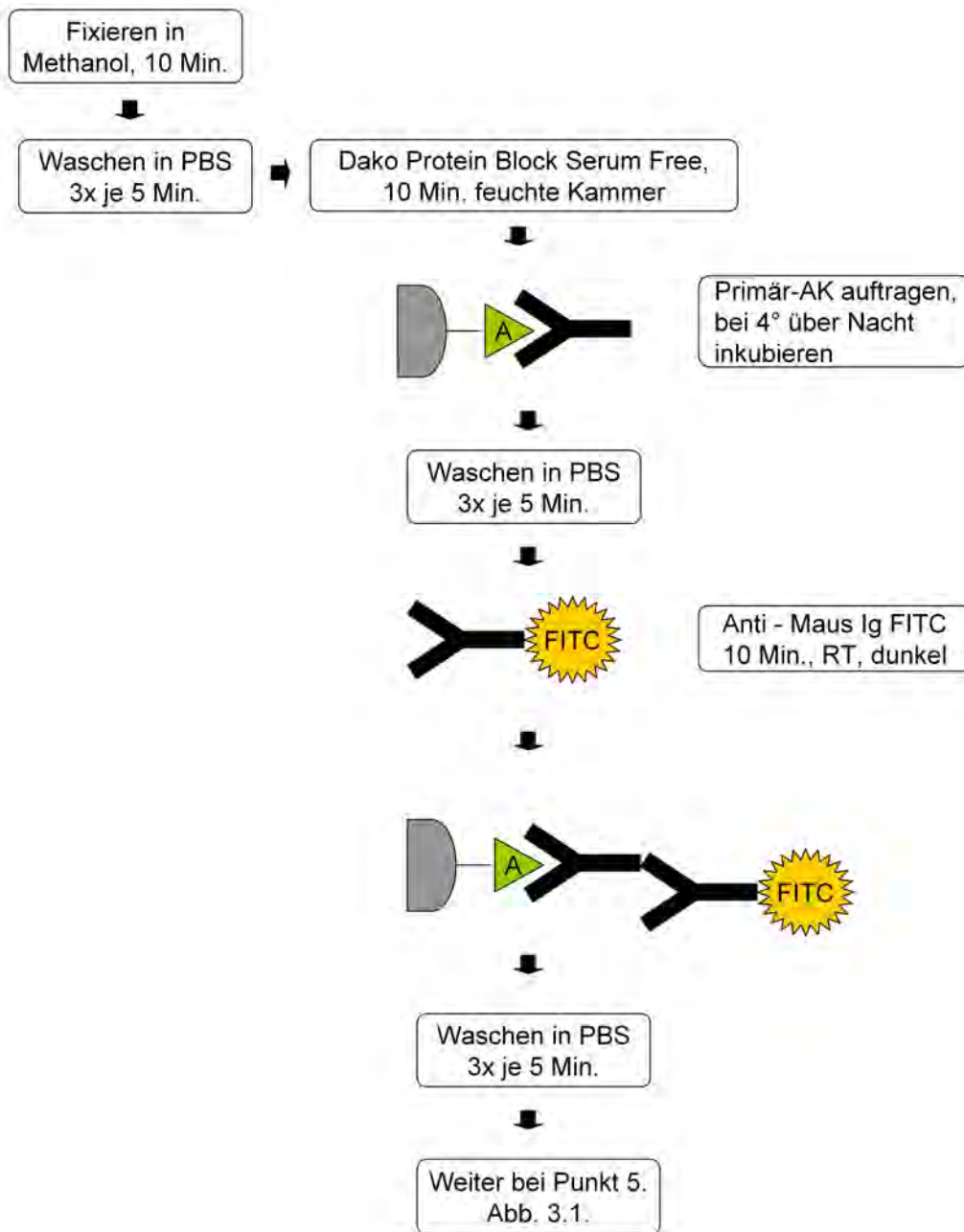


Abbildung 3.3: Flussdiagramm Antikörperfärbung (A = Antigen; FITC = Fluoreszeinisothiocyanat)

## **3.6 Auswertung**

Die Präparate mit den Übersichtsfärbungen wurden unter dem Lichtmikroskop „Aristoplan“ der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar) ausgewertet.

Die Auswertung und photographische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Proben erfolgte an dem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 902 (ZEISS, Oberkochen).

Diejenigen Präparate, welche den Markerstoff FITC enthalten, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop „Dialux 20“ der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar) ausgewertet. Die für die Foto-Aufnahmen verwendete Kamera war die „Progress®CF cool“.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Blutbilder der verwendeten Rinder

Von den meisten Blutproben wurde ein Differentialblutbild erstellt, um Unterschiede in der Anzahl der Blutzellen bei den unterschiedlichen Alters- bzw. Geschlechtsgruppen herauszufinden. Bei den Leukozyten zeigten die Kälber und die Bullen die höchsten Werte und auch die Anzahl der Erythrozyten war bei den Kälbern am höchsten. Die Werte des roten Blutbildes der Bullen lagen über denen der Kühe. Die Anzahl der Lymphozyten war bei den Kühen größer als die der neutrophilen Granulozyten, bei den Bullen war es umgekehrt. Bei den Kälbern war es vom Alter der Tiere abhängig, ob die Lymphozyten oder die neutrophilen Granulozyten überwogen. In Tabelle 4.1 sind die Blutwerte der einzelnen Tiere aufgelistet.

Tabelle 4.1: Übersicht über die Blutbilder der beprobten Rinder (LEU = Leukozyten; ERY = Erythrozyten; HKT = Hämatokrit; THR = Thrombozyten; LYM = Lymphozyten; AND = Andere Leukozyten als Lymphozyten)

|               | <u>LEU</u><br>x10 <sup>3</sup> /μl | <u>ERY</u><br>x10 <sup>6</sup> /μl | <u>HKT</u><br>% | <u>THR</u><br>x10 <sup>3</sup> /μl | <u>LYM</u><br>% | <u>LYM</u><br>x10 <sup>3</sup> /μl | <u>AND</u><br>% | <u>AND</u><br>x10 <sup>3</sup> /μl |
|---------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| <b>Kälber</b> |                                    |                                    |                 |                                    |                 |                                    |                 |                                    |
| Kalb 8        | 5,6                                | 8,89                               | 34,6            | 1310                               | 44,5            | 2,5                                | 55,5            | 3,1                                |
| Kalb 9        | 11,1                               | 9,65                               | 33,2            | 626                                | 64,1            | 7,0                                | 35,9            | 4,0                                |
| Kalb 10       | 11,9                               | 8,91                               | 30,5            | 388                                | 73,4            | 8,7                                | 26,6            | 3,2                                |
| Kalb 11       | 5,1                                | 9,83                               | 33,2            | 899                                | 67,3            | 3,4                                | 32,7            | 1,7                                |
| Kalb 12       | 4,5                                | 8,65                               | 33,7            | 482                                | 60,7            | 2,7                                | 39,3            | 1,8                                |
| Kalb 13       | 6,8                                | 10,71                              | 39,3            | 694                                | 56,0            | 3,8                                | 44,0            | 3,0                                |

#### 4.1. BLUTBILDER DER VERWENDETEN RINDER

|               |      |       |      |      |      |     |      |     |
|---------------|------|-------|------|------|------|-----|------|-----|
| Kalb 14       | 6,4  | 8,17  | 37,5 | 534  | 36,1 | 2,3 | 63,9 | 4,1 |
| Kalb 15       | 7,2  | 7,16  | 31,0 | 340  | 25,3 | 1,8 | 74,7 | 5,4 |
| Kalb 16       | 12,1 | 9,47  | 42,1 | 841  | 39,4 | 4,8 | 60,6 | 7,3 |
| Kalb 17       | 12,1 | 7,13  | 27,7 | 1067 | 25,7 | 3,1 | 74,3 | 9,0 |
| Kalb 18       | 10,7 | 10,46 | 44,7 | 897  | 50,3 | 5,4 | 49,7 | 5,3 |
| <b>Bullen</b> |      |       |      |      |      |     |      |     |
| Bulle 2       | 11,7 | 7,30  | 37,8 | 188  | 26,6 | 3,1 | 73,4 | 8,6 |
| Bulle 3       | 8,4  | 6,25  | 29,6 | 152  | 31,4 | 2,6 | 68,6 | 5,8 |
| Bulle 4       | 8,8  | 7,59  | 35,5 | 136  | 29,3 | 2,6 | 70,7 | 6,2 |
| Bulle 5       | 9,6  | 8,03  | 38,2 | 65   | 29,3 | 2,8 | 70,7 | 6,8 |
| Bulle 6       | 9,0  | 9,23  | 39,8 | 116  | 34,8 | 3,1 | 65,2 | 5,9 |
| Bulle 7       | 10,8 | 8,74  | 38,7 | 84   | 31,4 | 3,4 | 68,6 | 7,4 |
| Bulle 8       | 12,2 | 8,15  | 39,9 | 221  | 26,8 | 3,3 | 73,2 | 8,9 |
| Bulle 9       | 11,0 | 9,61  | 44,8 | 102  | 43,1 | 4,7 | 56,9 | 6,3 |
| Bulle 10      | 6,9  | 8,24  | 37,7 | 461  | 50,0 | 3,5 | 50,0 | 3,4 |
| Bulle 11      | 10,9 | 8,95  | 40,2 | 256  | 60,7 | 6,6 | 39,3 | 4,3 |
| Bulle 12      | 6,0  | 9,44  | 47,4 | 618  | 46,5 | 2,8 | 53,5 | 3,2 |
| <b>Kühe</b>   |      |       |      |      |      |     |      |     |
| Kuh 7         | 4,5  | 5,61  | 30,6 | 589  | 52,4 | 2,4 | 47,6 | 2,1 |
| Kuh 8         | 7,9  | 5,0   | 25,6 | 484  | 30,5 | 2,4 | 69,5 | 5,5 |
| Kuh 9         | 4,1  | 5,80  | 28,3 | 485  | 53,2 | 2,2 | 46,8 | 1,9 |
| Kuh 10        | 6,0  | 6,02  | 30,4 | 688  | 29,7 | 1,8 | 70,3 | 4,2 |
| Kuh 11        | 4,3  | 5,45  | 27,0 | 17   | 64,3 | 2,8 | 35,7 | 1,5 |
| Kuh 12        | 9,5  | 7,39  | 38,1 | 397  | 36,0 | 3,4 | 64,0 | 6,1 |
| Kuh 13        | 4,8  | 4,78  | 27,0 | 580  | 23,0 | 1,1 | 77,0 | 3,7 |
| Kuh 14        | 7,9  | 8,22  | 34,5 | 386  | 44,3 | 3,5 | 55,7 | 4,4 |
| Kuh 15        | 8,3  | 6,05  | 31,2 | 438  | 20,9 | 1,7 | 79,1 | 6,6 |
| Kuh 16        | 8,6  | 6,17  | 31,8 | 593  | 50,6 | 4,4 | 49,4 | 4,2 |

## 4.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Blutausstriche der Rinder unterschiedlichen Alters und Geschlechts wurden mit vier verschiedenen Methoden gefärbt und anschließend die Morphologie der einzelnen Blutzellen unter dem Lichtmikroskop untersucht.

### 4.2.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten des Rindes stellen sich als runde, kernlose Zellen dar. Sie sind von einer glatten Zellmembran umgeben und besitzen einen homogenen Zellinhalt. In einigen Präparaten ist eine zentrale Aufhellung des Zytoplasmas erkennbar. Die Größe der Erythrozyten ist nicht einheitlich, es kommen zum Teil größere und kleinere rote Blutzellen vor. Dies wird als Anisozytose bezeichnet. Auch sind in einigen Ausstrichen Abweichungen von der normalerweise runden Form sichtbar. So besitzen die Erythrozyten teilweise Ausläufer, welche zu der so genannten Stechapfelform führen. Die Erythrozyten werden dann als Echinozyten oder Akanthozyten bezeichnet. Auch treten ab und zu tropfenförmige rote Blutzellen auf, die dann als Dacryozyten bezeichnet werden. Beide Formen stellen Artefakte dar. Die bei einigen Tieren beobachtete Geldrollenbildung der Erythrozyten ist beim Rind nicht physiologisch. Eine basophile Tüpfelung konnte in keinem der Ausstriche beobachtet werden. Die Farbe der Erythrozyten ist abhängig von der jeweiligen Färbung und ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Übersichtsfärbungen Erythrozyten

| <b>Struktur</b> | <b>Diff-Quick</b> | <b>Giemsa</b> | <b>May-Grünwald</b> | <b>Pappenheim</b> |
|-----------------|-------------------|---------------|---------------------|-------------------|
| Zytoplasma      | Braun-rot         | Blasses Rot   | Hellrot             | Rot               |

### 4.2.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten sind kleine runde oder ovale Zellen, die ebenfalls keinen Zellkern besitzen. In ihrem Zytoplasma können kleine granuläre Strukturen erkannt werden. Vor allem in der Diff-Quick-Färbung kann gut zwischen einem dunklerem Granulomer, in welchem sich die Granula und die Zellorganelle befinden, und einem helleren Hyalomer, welches aus Zytoplasma und Mikrotubuli besteht, unterschieden werden (vgl. Abb. 4.5). Die Thrombozyten treten häufig in Gruppen zusammengelagert auf, teilweise sind sie aber auch einzeln zwischen den Erythrozyten verstreut zu finden.

Tabelle 4.3 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Färbungen.

Tabelle 4.3: Übersichtsfärbungen Thrombozyten

| <b>Struktur</b> | <b>Diff-Quick</b> | <b>Giemsa</b>                         | <b>May-Grünwald</b> | <b>Pappenheim</b>              |
|-----------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Zytoplasma      | Kräftiges Lila    | Helles Lila mit dunklerem Innenkörper | Blassblau bis Lila  | Blau mit violetter Innenkörper |

### 4.2.3 Lymphozyten

Die Lymphozyten stellen sich als runde Zellen unterschiedlicher Größe dar. In jedem Präparat waren sie in großer Anzahl vorhanden. Sie besitzen einen großen Kern, der meist eine runde Form aufweist, teilweise aber auch auf einer Seite eingebuchtet sein kann. Der Kern liegt meist exzentrisch in der Zelle und füllt diese fast vollständig aus. In dem schmalen Zytoplasmasaum konnten teilweise kleine Granula gesehen werden, welche sich aber nur sehr schwach darstellten. Die meisten Lymphozyten zeigten ein klares und homogenes Zytoplasma. Die Darstellung der einzelnen Zellstrukturen bei den unterschiedlichen Färbungen sind in Tabelle 4.4 zusammengefaßt.

Tabelle 4.4: Übersichtsfärbungen Lymphozyten

| <b>Struktur</b> | <b>Diff-Quick</b>      | <b>Giemsa</b> | <b>May-Grünwald</b> | <b>Pappenheim</b> |
|-----------------|------------------------|---------------|---------------------|-------------------|
| Zellkern        | Dunkelblau bis violett | Rotviolett    | Blau                | Rotviolett        |
| Zytoplasma      | Helles Lila            | Blau          | Hellblau            | Blau              |



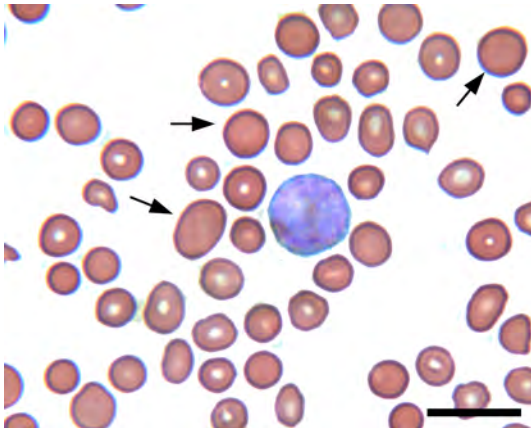


Abbildung 4.1: Lymphozyt,  
May-Grünwald-Färbung (Rind w, 18 Tage)  
Der Zellkern füllt die Zelle fast vollständig aus. Neben den normal großen Erythrozyten finden sich auch vereinzelt sehr große Erythrozyten ohne zentrale Aufhellung (Pfeile)  
SB = 10  $\mu\text{m}$

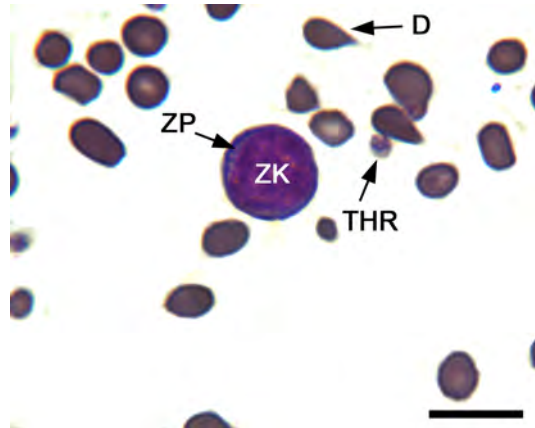


Abbildung 4.2: Lymphozyt,  
Diff-Quick-Färbung (Rind w, 18 Tage)  
Neben dem Zellkern (ZK) ist ein schmaler Saum an Zytoplasma (ZP) zu erkennen.  
D = Dakryozyten; THR = Thrombozyten  
SB = 10  $\mu\text{m}$

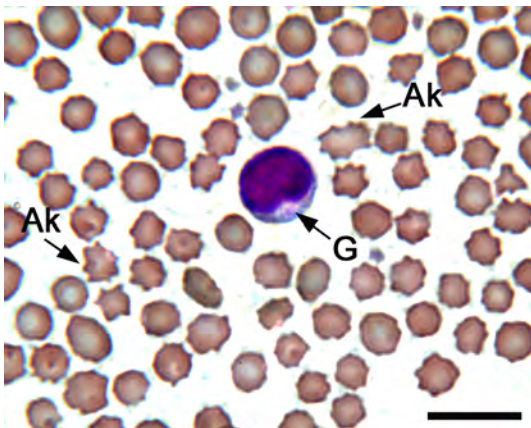


Abbildung 4.3: Lymphozyt,  
Giemsa-Färbung (Rind m, 6,6 Wochen)  
Im Zytoplasma finden sich feine, pinkfarbene Granula.  
Ak = Akanthozyten  
SB = 10  $\mu\text{m}$

#### 4.2.4 Neutrophile Granulozyten

Bei den neutrophilen Granulozyten können jugendliche stabkernige Granulozyten von reifen segmentkernigen Granulozyten unterschieden werden. Bei beiden handelt es sich um mittelgroße runde Zellen, welche in jedem Ausstrich häufig zu finden waren. Im Gegensatz zu den Lymphozyten besitzen die neutrophilen Granulozyten viel Zytoplasma. Die stabkernigen Granulozyten besitzen einen länglichen Kern, der meistens stark gebogen und eher am Zellrand lokalisiert ist. In ihrem Zytoplasma sind keine Granula zu erkennen. Der Kern der segmentkernigen Granulozyten ist meistens in 3 - 4 unterschiedlich große Segmente unterteilt. Teilweise ist ein dünner Faden erkennbar, welcher einzelne Segmente verbindet. Nur in sehr wenigen Präparaten sind im Zytoplasma der segmentkernigen Granulozyten feine Granula erkennbar, die sich aber nur sehr schwach darstellen. Die Ergebnisse der Übersichtsfärbungen sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Tabelle 4.5: Übersichtsfärbungen neutrophile Granulozyten

| <b>Struktur</b> | <b>Diff-Quick</b>      | <b>Giemsa</b> | <b>May-Grünwald</b> | <b>Pappenheim</b> |
|-----------------|------------------------|---------------|---------------------|-------------------|
| Zellkern        | Dunkelblau bis violett | Rotviolett    | Blau                | Rotviolett        |
| Zytoplasma      | Rosa                   | Rötlich       | Hellblau            | Rötlich           |
| Granula         | Dunkles Lila           | Braunrot      | Violett             | Braun-violett     |

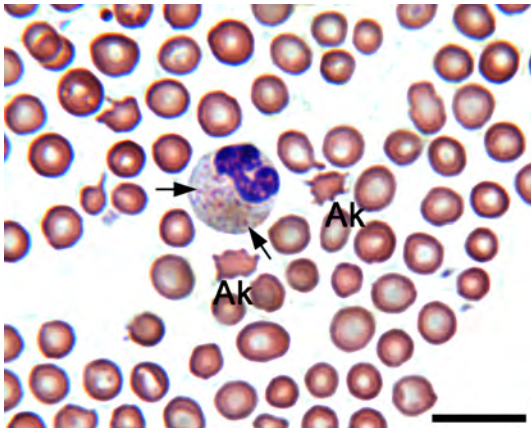


Abbildung 4.4: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung (Rind w, 18 Tage)

Im Zytoplasma sind pinkfarbene Granula erkennbar (Pfeil). In der rechten Bildhälfte kann eine Anisozytose der Erythrozyten beobachtet werden.

Ak = Akanthozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

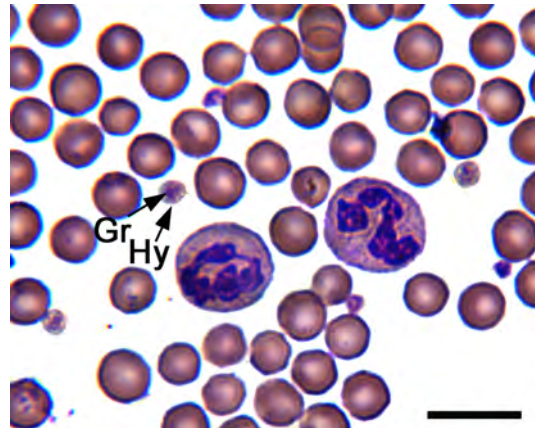


Abbildung 4.5: Zwei segmentkernige neutrophile Granulozyten, Diff-Quick-Färbung (Rind m, 5 Jahre)

Diese Granulozyten besitzen einen charakteristischen segmentierten Kern. Bei den Thrombozyten kann deutlich zwischen einem helleren Hyalomere (Hy) und einem dunkleren Granulomere (Gr) unterschieden werden. SB = 10  $\mu\text{m}$

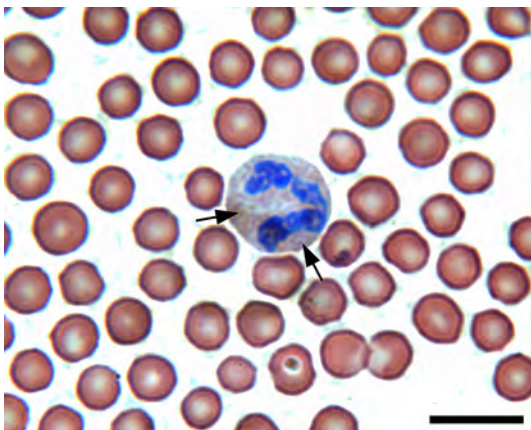


Abbildung 4.6: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung (Rind m, 5 Jahre)

Im Zytoplasma sind feine Granula erkennbar (Pfeile).

SB = 10  $\mu\text{m}$

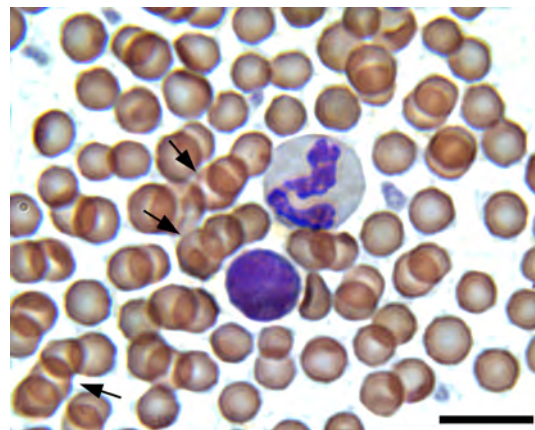


Abbildung 4.7: Neutrophiler Granulozyt und ein Lymphozyt, Giemsa-Färbung (Rind m, 5 Jahre)

Im Zytoplasma sind keine Granula erkennbar. Bei den Erythrozyten kann eine deutliche Geldrollenbildung festgestellt werden (Pfeile).

SB = 10  $\mu\text{m}$



Abbildung 4.8: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (oben) und segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (unten), Pappenheim-Färbung (Rind m 6,6 Wochen)

Die obere Zelle besitzt den typischen stabförmigen Kern, während der Kern der unteren Zelle in mehrere Segmente aufgeteilt ist. Diese sind durch dünne Filamente (F) miteinander verbunden. Im Zytoplasma beider Zellen sind feine Granula (G) erkennbar.

D= Dacryozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

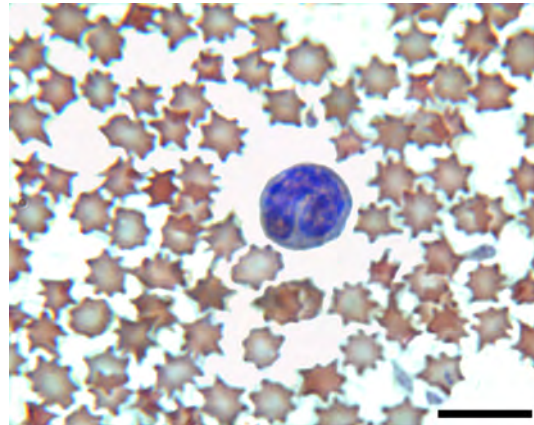


Abbildung 4.9: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung (Rind m, 12 Tage)

Die Zelle besitzt einen hufeisenförmig gebogenen Kern, der im Gegensatz zu der Zelle von Bild 4.8 noch keine Anzeichen einer Segmentierung aufweist. Die Erythrozyten besitzen eine fixationsbedingte Stechapfelform. Sie werden daher auch als Akanthozyten bezeichnet.

SB = 10  $\mu\text{m}$



### 4.2.5 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten stellen sich als runde Zellen dar, die meistens etwas größer als die neutrophilen Granulozyten sind. Sie waren nur sehr selten in den Ausstrichen zu finden. Ihr Kern ist ebenfalls segmentiert, besitzt jedoch meist nur 2 - 3 Segmente. Die einzelnen Kernabschnitte wirken größtenteils rundlicher bzw. kugelig im Vergleich zu den eher länglichen Segmenten der neutrophilen Granulozyten. Im Zytoplasma sind zahlreiche kleine rote Granula sichtbar, welche sich auch auf dem Kern abbilden. Tabelle 4.6 fasst die Ergebnisse der Färbungen zusammen.

Tabelle 4.6: Übersichtsfärbungen eosinophile Granulozyten

| Struktur   | Diff-Quick             | Giemsa     | May-Grünwald  | Pappenheim |
|------------|------------------------|------------|---------------|------------|
| Zellkern   | Dunkelblau bis violett | Rotviolett | Blau          | Rotviolett |
| Zytoplasma | Blau                   | Rötlich    | Hellblau      | Rötlich    |
| Granula    | Rot-orange             | Rot        | Leuchtend rot | Rot        |

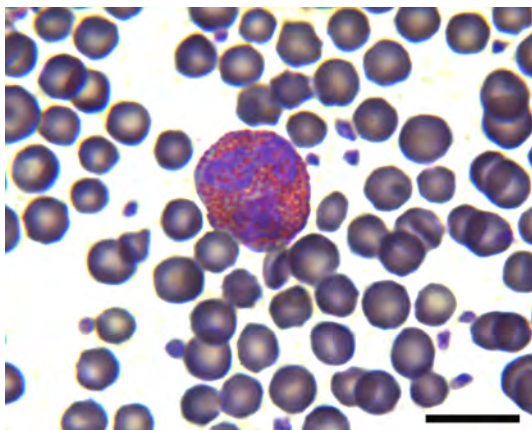


Abbildung 4.10: Eosinophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung (Rind w, 6,1 Jahre)

Die eosinophilen Granulozyten des Rindes sind etwas größer als die neutrophilen Granulozyten. Deutlich können im Zytoplasma die auffällig roten Granula erkannt werden.

SB = 10  $\mu\text{m}$

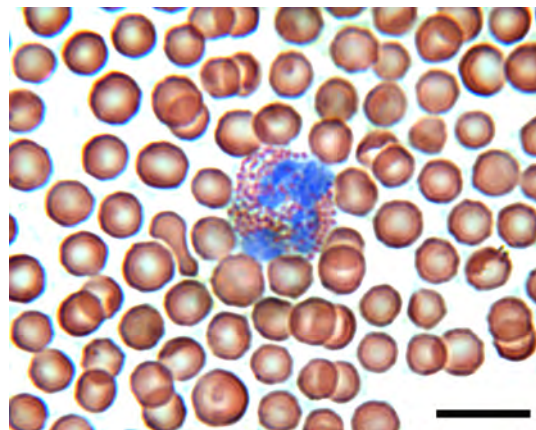


Abbildung 4.11: Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung (Rind m, 5 Jahre)

Auch hier stellen sich die Granula als kräftige rote Punkte dar.

SB = 10  $\mu\text{m}$

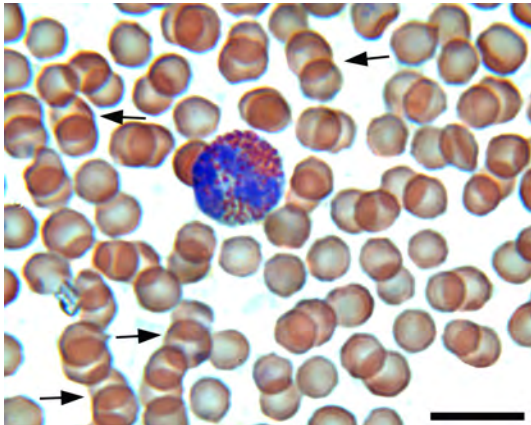


Abbildung 4.12: Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung (Rind m, 5 Jahre)

Bei den Erythrozyten ist eine deutliche Geldrollenbildung zu erkennen (Pfeile).  
SB = 10  $\mu\text{m}$

#### 4.2.6 Basophile Granulozyten

In keinem der Ausstriche konnten basophile Granulozyten sicher identifiziert werden.

#### 4.2.7 Monozyten

Bei den Monozyten handelt es sich um die größten Zellen, die in den Blutausstrichen gefunden wurden. Sie besitzen einen großen Kern, der entweder ganz rund oder bohnenförmig gebogen ist. Wie bei den Lymphozyten liegt er meist exzentrisch in der Zelle und füllt diese weitestgehend aus. Im Zytoplasma waren teilweise feine rötliche Granula zu erkennen, die aber nur sehr schwach sichtbar waren. Teilweise konnten im Zytoplasma Vakuolen gesehen werden (vgl. Abb. 4.13), die ein Zeichen reifer Monozyten sind. Bei unreifen Monozyten fehlen die Vakuolen noch. Die Darstellung der einzelnen Strukturen der Monozyten bei den verschiedenen Färbungen ist in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 4.7: Übersichtsfärbungen Monozyten

| Struktur   | Diff-Quick | Giemsa     | May-Grünwald | Pappenheim |
|------------|------------|------------|--------------|------------|
| Zellkern   | Violett    | Rotviolett | Blau         | Rotviolett |
| Zytoplasma | Hellblau   | Blau       | Hellblau     | Blaugrau   |

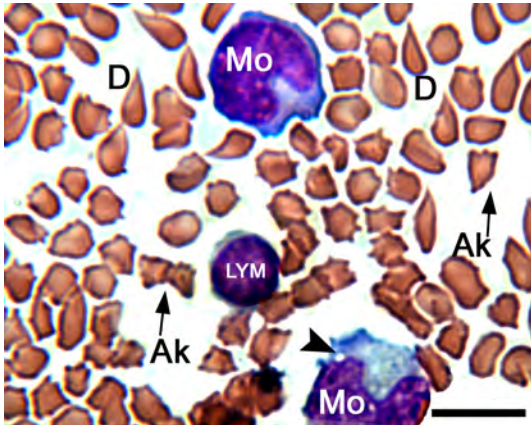


Abbildung 4.13: Zwei Monozyten und ein Lymphozyt, Pappenheim-Färbung (Rind m, 6,6 Wochen)

Die beiden Monozyten (Mo) besitzen einen großen bohnenförmigen Kern; beim unteren Monozyten ist die charakteristische Vakuolisierung des Zytoplasmas gut zu erkennen (kleiner Pfeil); der runde Kern des Lymphozyten (LYM) lässt nur wenig Zytoplasma übrig.

Ak = Akanthozyten; D = Dacryozyten  
SB = 10  $\mu\text{m}$

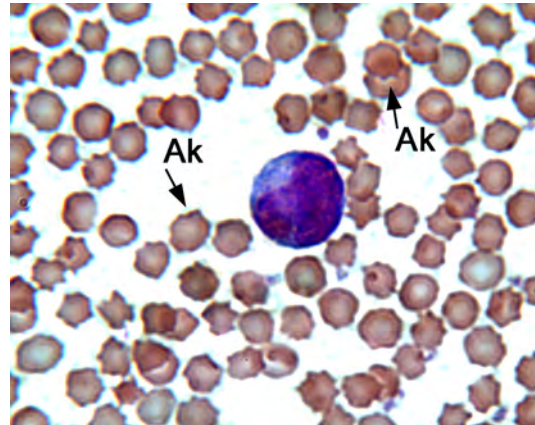


Abbildung 4.14: Junger Monozyt, Giemsa-Färbung (Rind m, 6,6 Wochen)

Bei diesem jungen Monozyten sind im Zytoplasma noch keine Vakuolen erkennbar.

Ak = Akanthozyten  
SB = 10  $\mu\text{m}$

## **4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

### **4.3.1 Erythrozyten**

Die roten Blutzellen weisen im Elektronenmikroskop eine unterschiedliche Form und Größe auf. Vor allem um die anderen Blutzellen herum haben sie häufig eine napfförmige Gestalt (vgl. Abb. 4.21). Die Erythrozyten besitzen eine glatte Zellmembran, die keine Ausstülpungen oder Mikrovilli ausbildet. Sie umschließt einen homogenen, feingranulierten Zellinhalt, in welchem sämtliche Zellorganelle, sowie ein Zellkern fehlen.

### **4.3.2 Thrombozyten**

Die Thrombozyten sind ca.  $1,5 - 2 \mu\text{m}$  groß. Ihre Form ist in den meisten Fällen oval, teilweise aber auch rund. Sie besitzen eine glatte Zellmembran. In ihrem Zytoplasma befinden sich große runde  $\alpha$ -Granula, die sich elektronendicht darstellen. Die ebenfalls häufig vorkommenden größeren „dense bodies“ kennzeichnen sich als runde elektronenhelle Granula, welche einen exzentrisch gelegenen, extrem elektronendichten Kern besitzen. Sie sind von einer deutlich gezeichneten Membran umgeben (vgl. Abb. 4.23). Die  $\alpha$ -Granula sind in einer größeren Anzahl vorhanden als die „dense bodies“. Weiterhin sind wenige Vakuolen im Zytoplasma zu erkennen. In einigen Präparaten war das in den Thrombozyten gespeicherte Glykogen sehr gut sichtbar (vgl. Abb. 4.17).



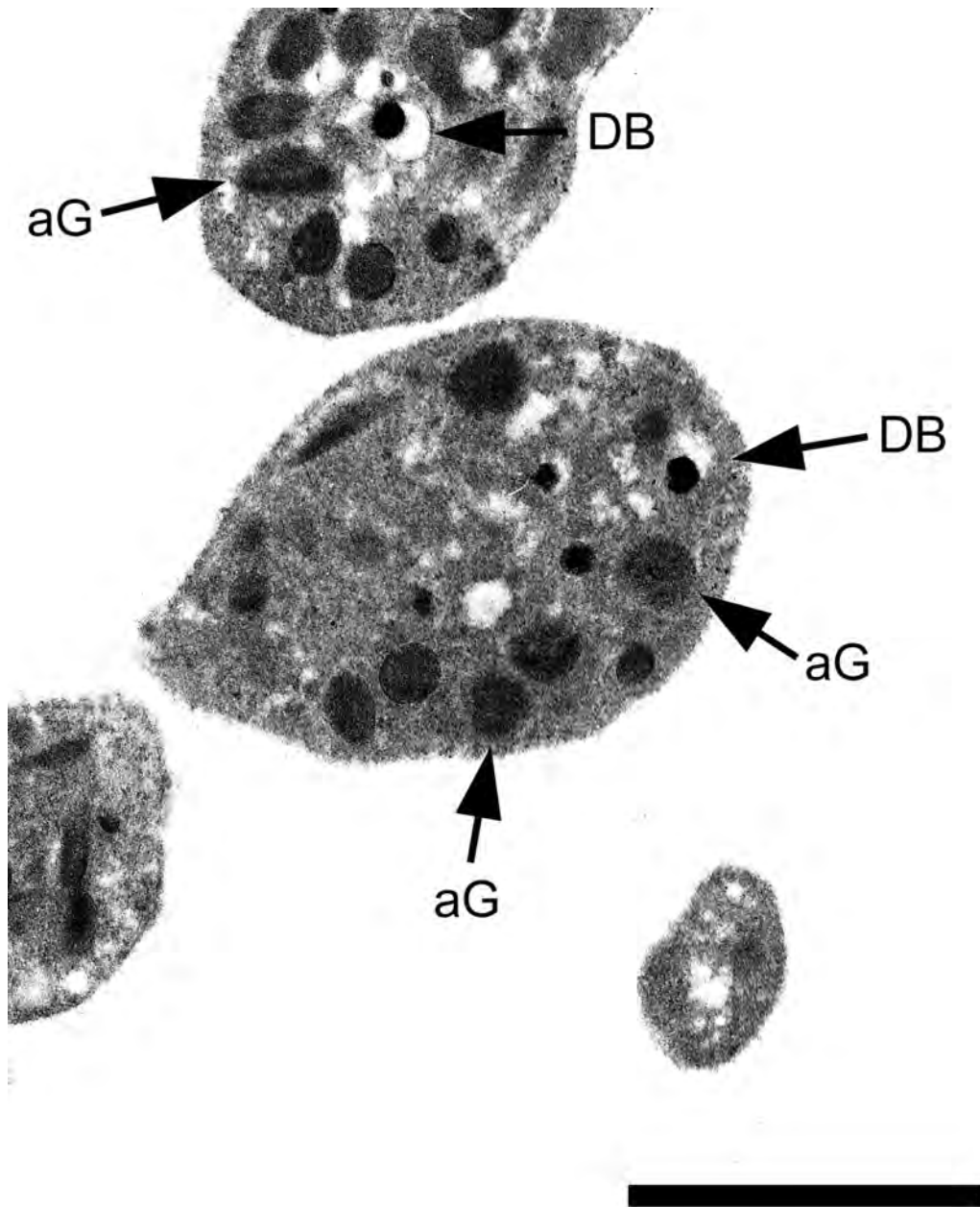


Abbildung 4.15: Thrombozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Im Zytoplasma sind dunkle, homogene  $\alpha$ -Granula (aG) und die „dense bodies“ (DB) mit ihrem charakteristischen elektronendichten Kern, zu unterscheiden.

SB = 1  $\mu\text{m}$

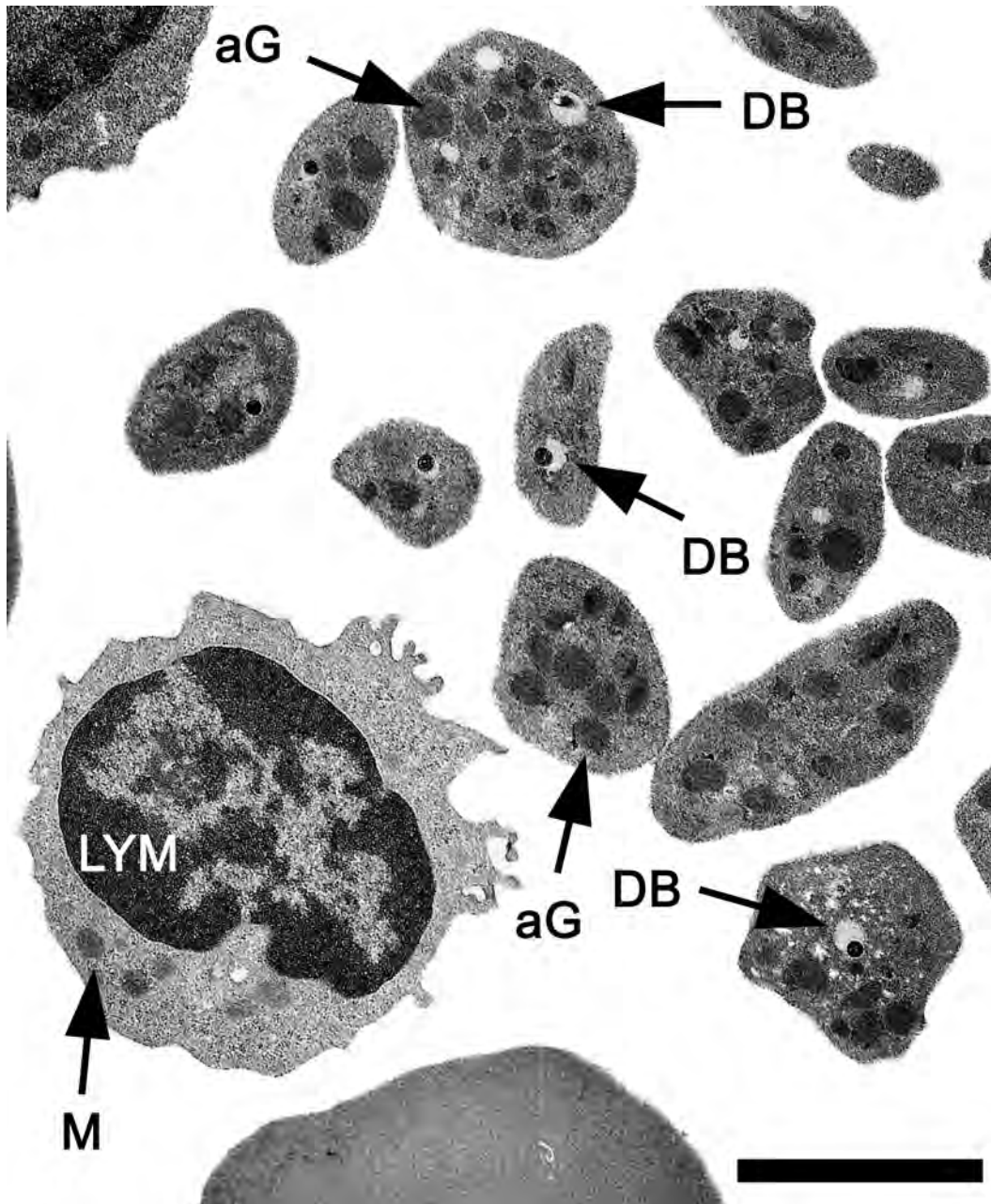


Abbildung 4.16: Thrombozyten und ein Lymphozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Die Thrombozyten besitzen deutliche  $\alpha$ -Granula (aG) und „dense bodies“ (DB).  
Im Lymphozyten (LYM) sind die Mitochondrien (M) gut zu erkennen.

aG =  $\alpha$ -Granula

SB = 2  $\mu\text{m}$

### 4.3.3 Lymphozyten

Die Lymphozyten stellen sich als runde Zellen unterschiedlicher Größe dar. Sie besitzen einen großen runden Kern, in welchem deutlich zwischen lockerem, wenig elektronendichten Euchromatin, sowie dicht gepacktem, elektronendichten Heterochromatin unterschieden werden kann. Der Kern nimmt einen Großteil der Zelle ein, die Menge an Zytoplasma variiert je nach Zelle. Teilweise ist nur ein schmaler Saum an Zytoplasma übrig. Die Lymphozyten weisen eine glatte Zellmembran auf, welche in einigen Präparaten auch Pseudopodien ausbildet (vgl. Abb. 4.18). Im Zytoplasma finden sich zahlreiche, deutlich ausgeprägte Mitochondrien. In den meisten Fällen waren auch wenige runde, elektronendichte Granula vorhanden.

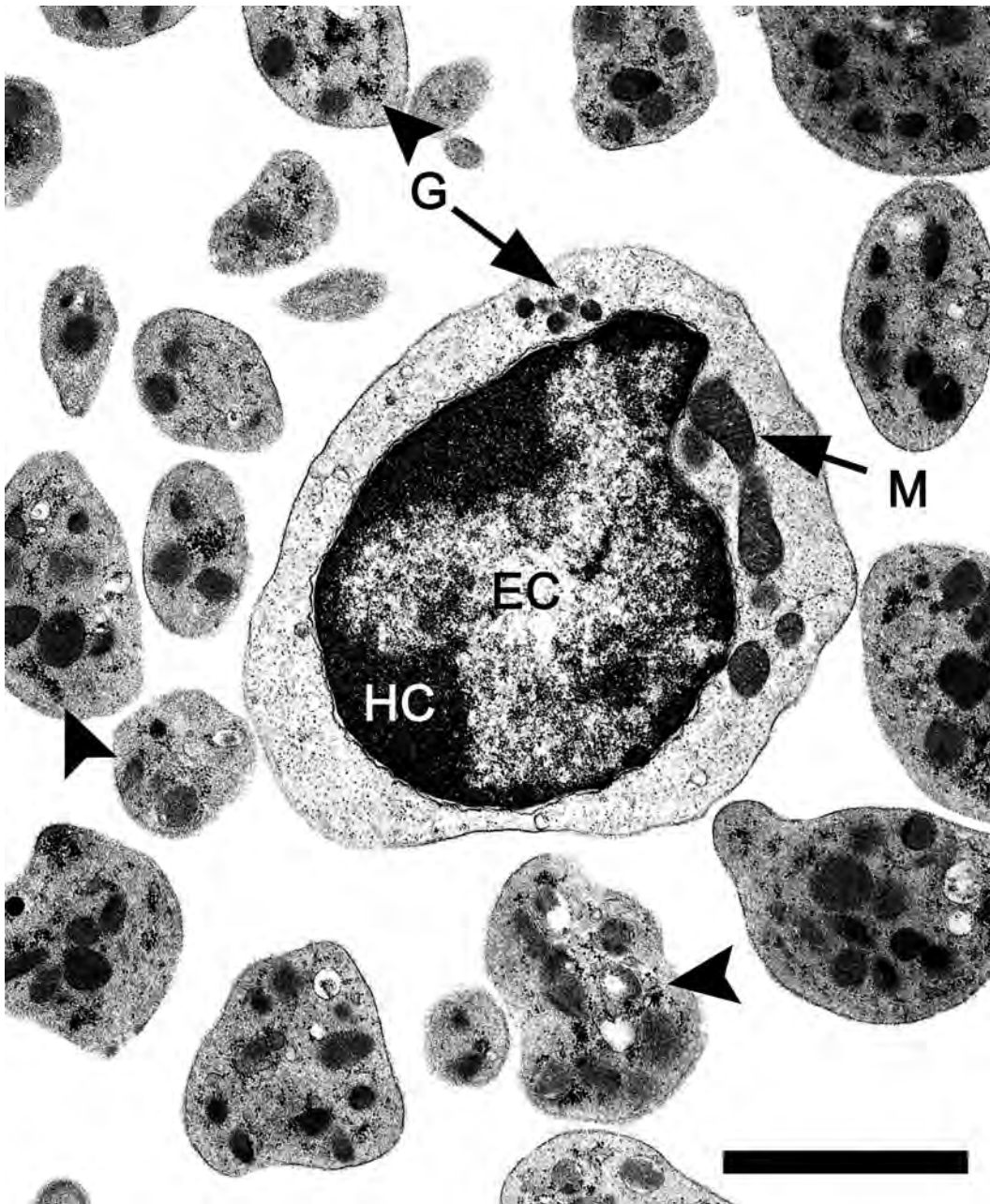


Abbildung 4.17: Lymphozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Im Zellkern kann deutlich wenig elektronendichtes Euchromatin (EC) von elektronendichtem Heterochromatin (HC) unterschieden werden. Im Zytoplasma befinden sich Mitochondrien (M) und Granula (G).  
Kleine Pfeile = Glykogen in den Thrombozyten  
SB = 2  $\mu\text{m}$

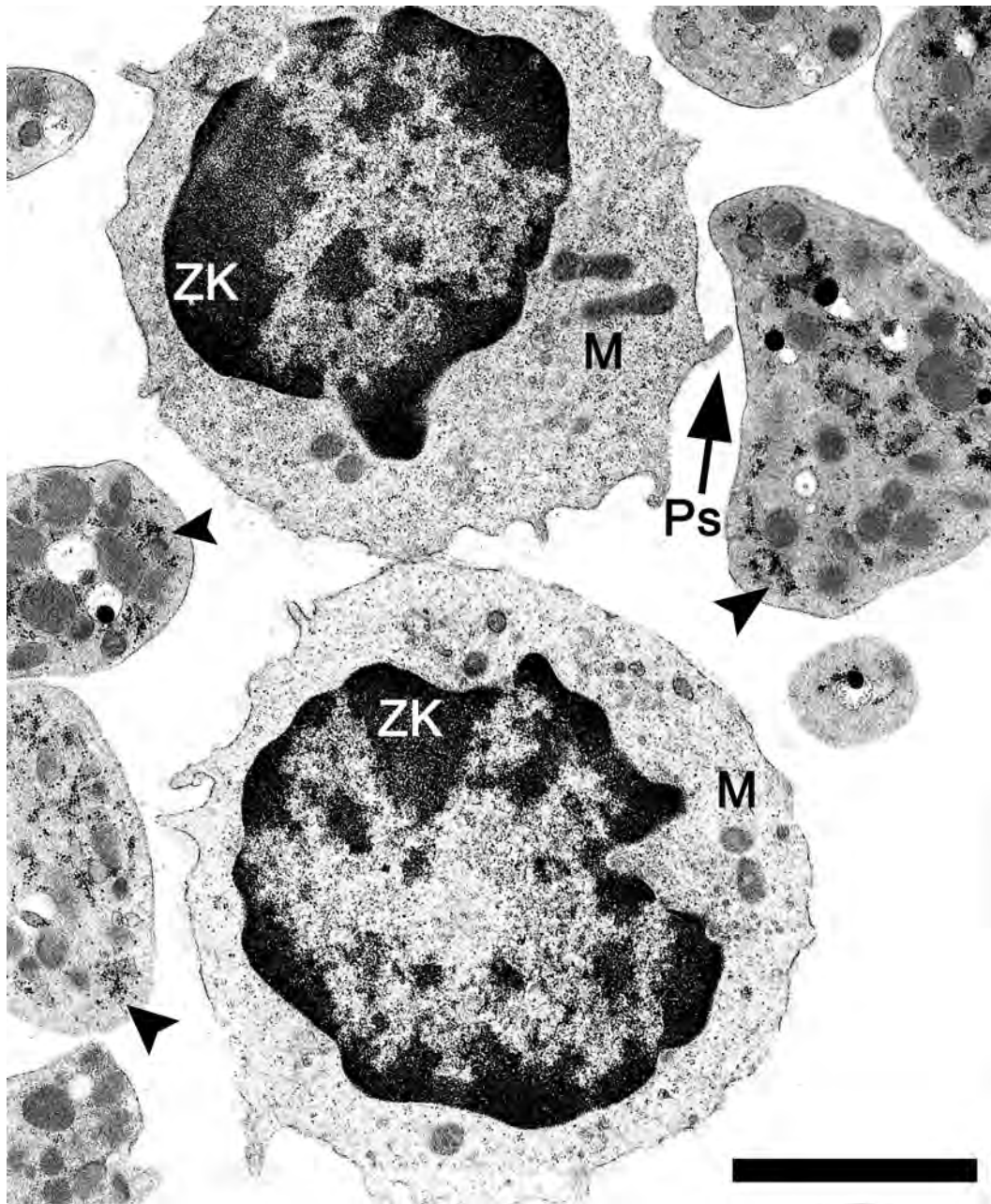


Abbildung 4.18: Lymphozyten (Rind w, 6 Tage)

Im Zytoplasma sind einige Mitochondrien (M) erkennbar. Die Zellmembran bildet einige Pseudopodien (Ps) aus.

ZK = Zellkern; kleine Pfeile = Glykogen in den Thrombozyten

SB = 2  $\mu\text{m}$

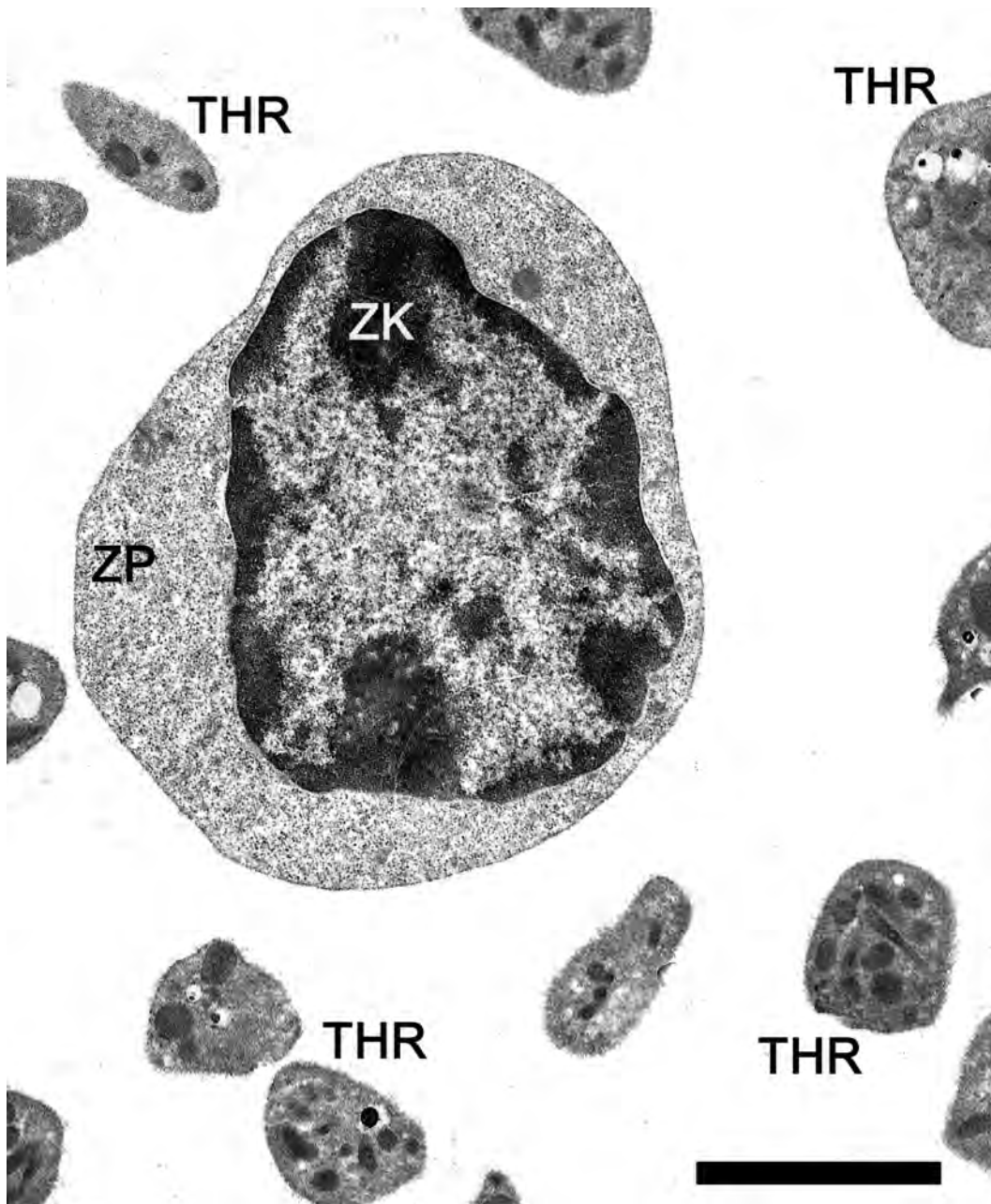


Abbildung 4.19: Lymphozyt (Rind w, 6 Tage)

Dieser große Lymphozyt besitzt einen großen Zellkern (ZK), und ist von einigen Thrombozyten (THR) umgeben.

ZP = Zytoplasma

SB = 2  $\mu\text{m}$

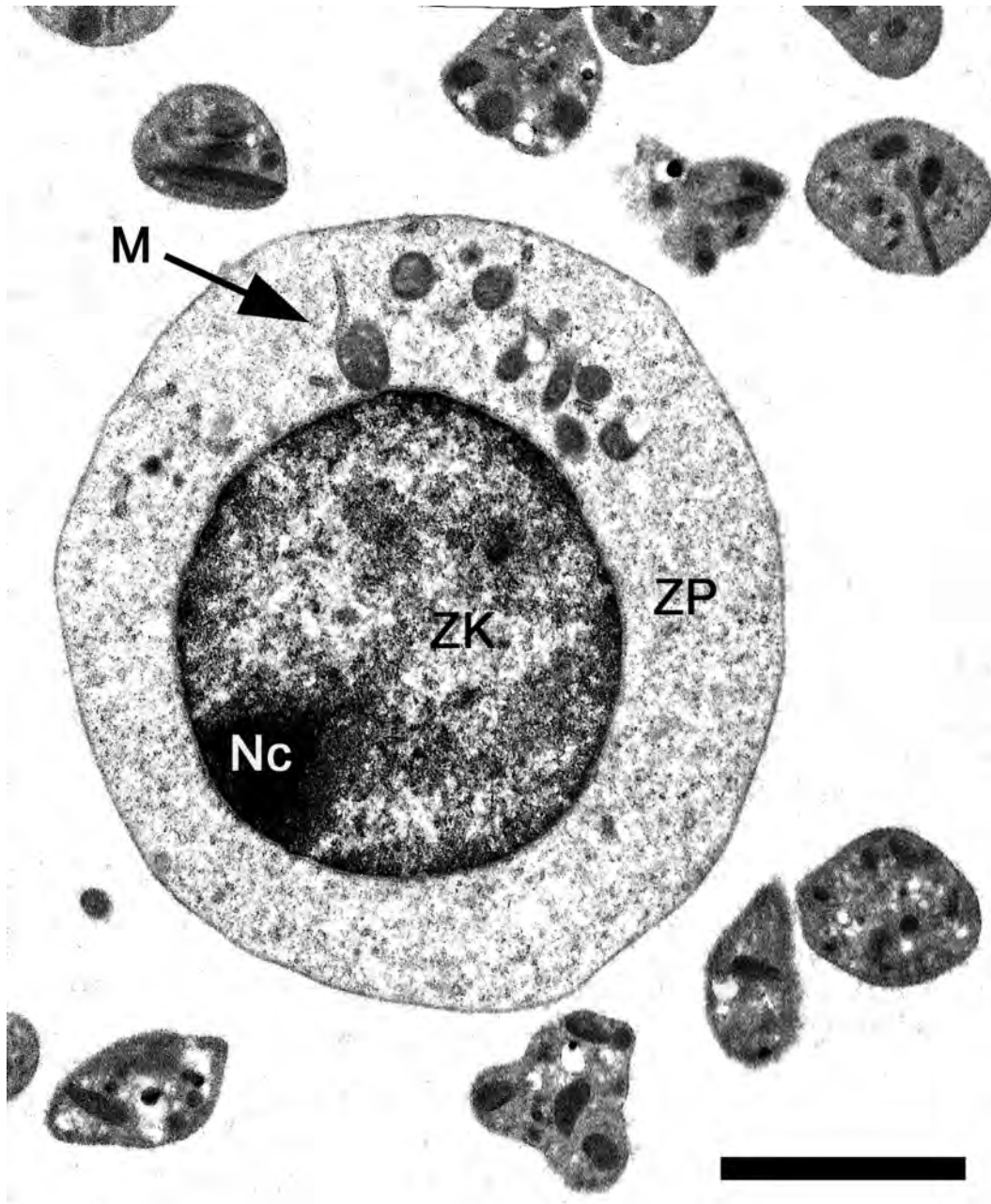


Abbildung 4.20: Lymphozyt (Rind w, 6 Tage)

Der Zellkern (ZK) besitzt einen deutlichen Nukleolus (Nc). Im reichlich vorhandenen Zytoplasma (ZP) sind zahlreiche Mitochondrien (M) erkennbar.  
SB = 2  $\mu$ m

#### **4.3.4 Neutrophile Granulozyten**

Die reifen neutrophilen Granulozyten sind runde Zellen, die einen segmentierten Kern besitzen. Dabei sind zumeist zwei Segmente erkennbar. Ihre Zellemban bildet deutliche Pseudopodien aus. In ihrem Zytoplasma sind unterschiedliche Granula erkennbar. Bei den elektronendichten länglichen Granula handelt es sich um die primären oder azurophilen Granula, die sekundären oder spezifischen Granula sind ebenfalls elektronendicht aber rund. Die großen Granula sind größer als die beiden anderen, elektronenheller und rund (vgl. Abb. 4.23). Die einzelnen Granula sind jedoch ohne enzymhistochemische Untersuchungen fast nicht voneinander zu unterscheiden. Im Zytoplasma sind weiterhin freie Ribosomen, sowie ein endoplasmatisches Retikulum erkennbar.

Der Kern der jugendlichen oder stabkernigen Granulozyten ist bohnenförmig gebogen. Je nach Grad der Reifung weist er keinerlei Einziehungen auf (vgl. Abb. 4.24) oder zeigt schon Anzeichen einer Segmentierung (vgl. Abb. 4.25). Sie besitzen eine glatte Zellmembran, welche bei fortschreitender Reifung aber auch Pseudopodien ausbildet. In ihrem Zytoplasma sind vereinzelt Granula zu finden, welche eine runde Form aufweisen und sich elektronendicht darstellen.



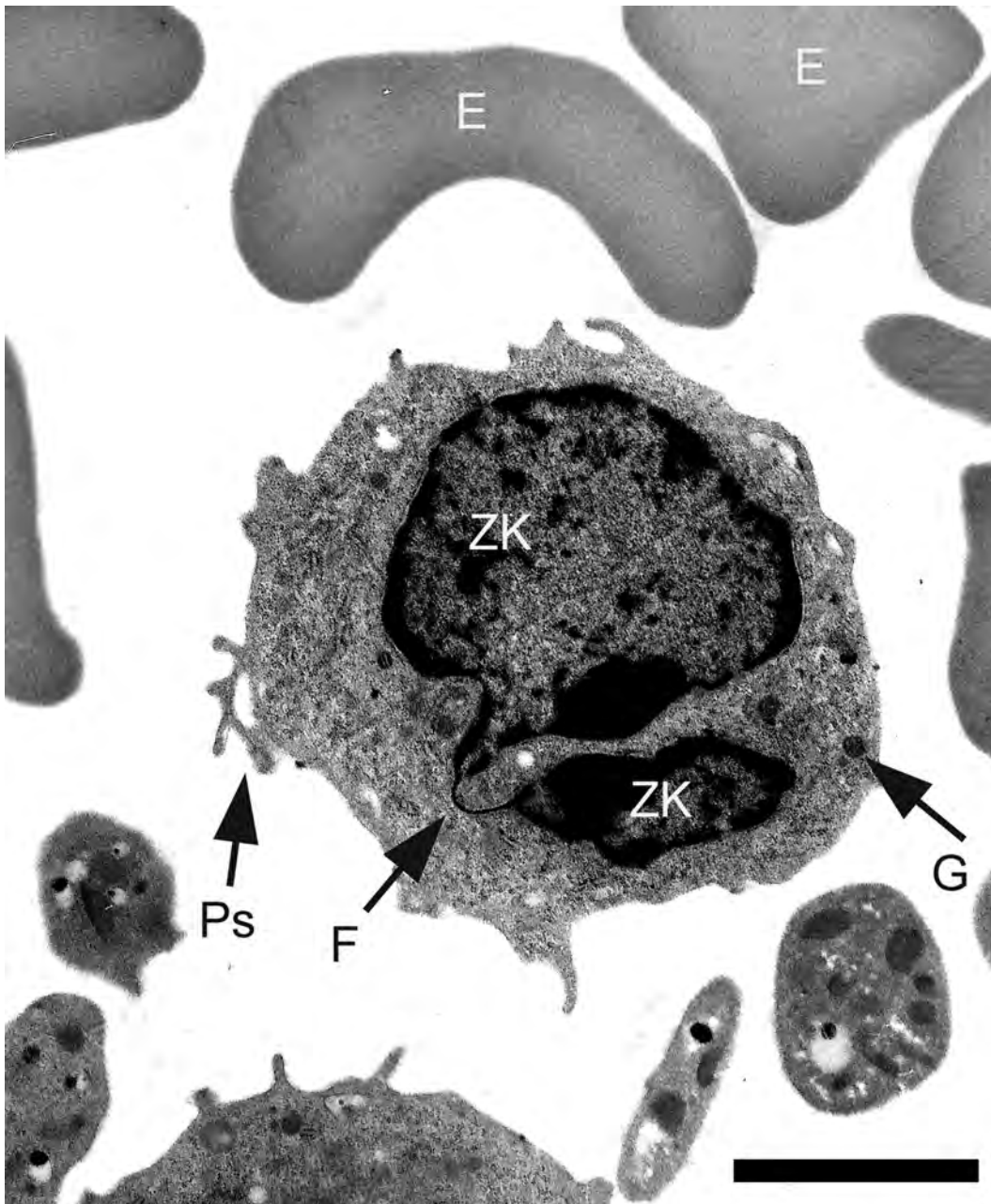


Abbildung 4.21: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Die Segmente des Zellkerns (ZK) sind durch ein gut sichtbares Filament (F) miteinander verbunden.

E = Erythrozyten; G = Granula; Ps = Pseudopodien  
SB = 2  $\mu\text{m}$

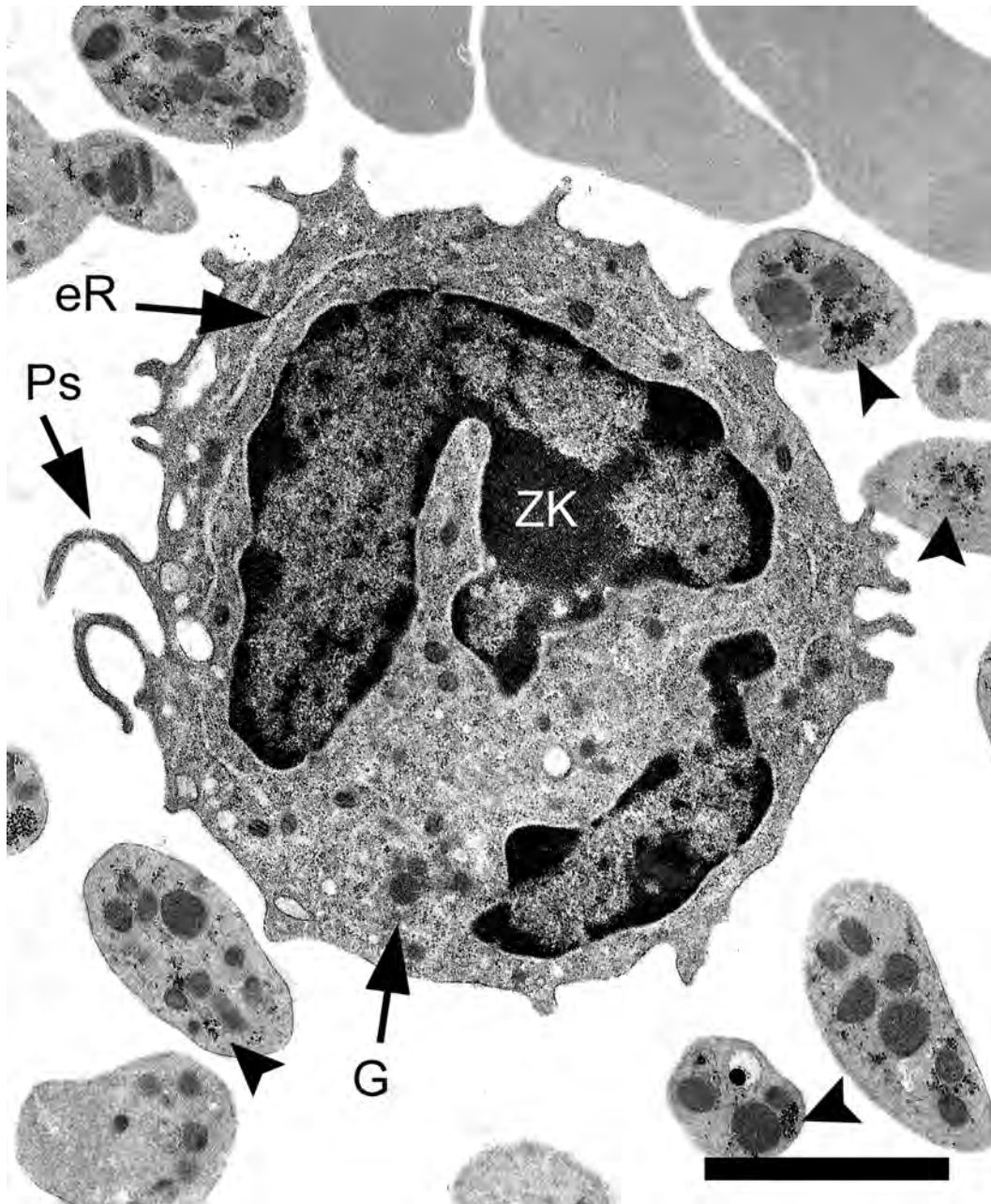


Abbildung 4.22: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Der Zellkern (ZK) ist in 2 Segmente geteilt. Im Zytoplasma sind Granula (G) und ein endoplasmatisches Retikulum (eR) erkennbar. Die Zellmembran bildet deutliche Pseudopodien (PS) aus. In den umgebenen Thrombozyten sind große Mengen Glykogen gespeichert (kleine Pfeile).

SB = 2  $\mu$ m

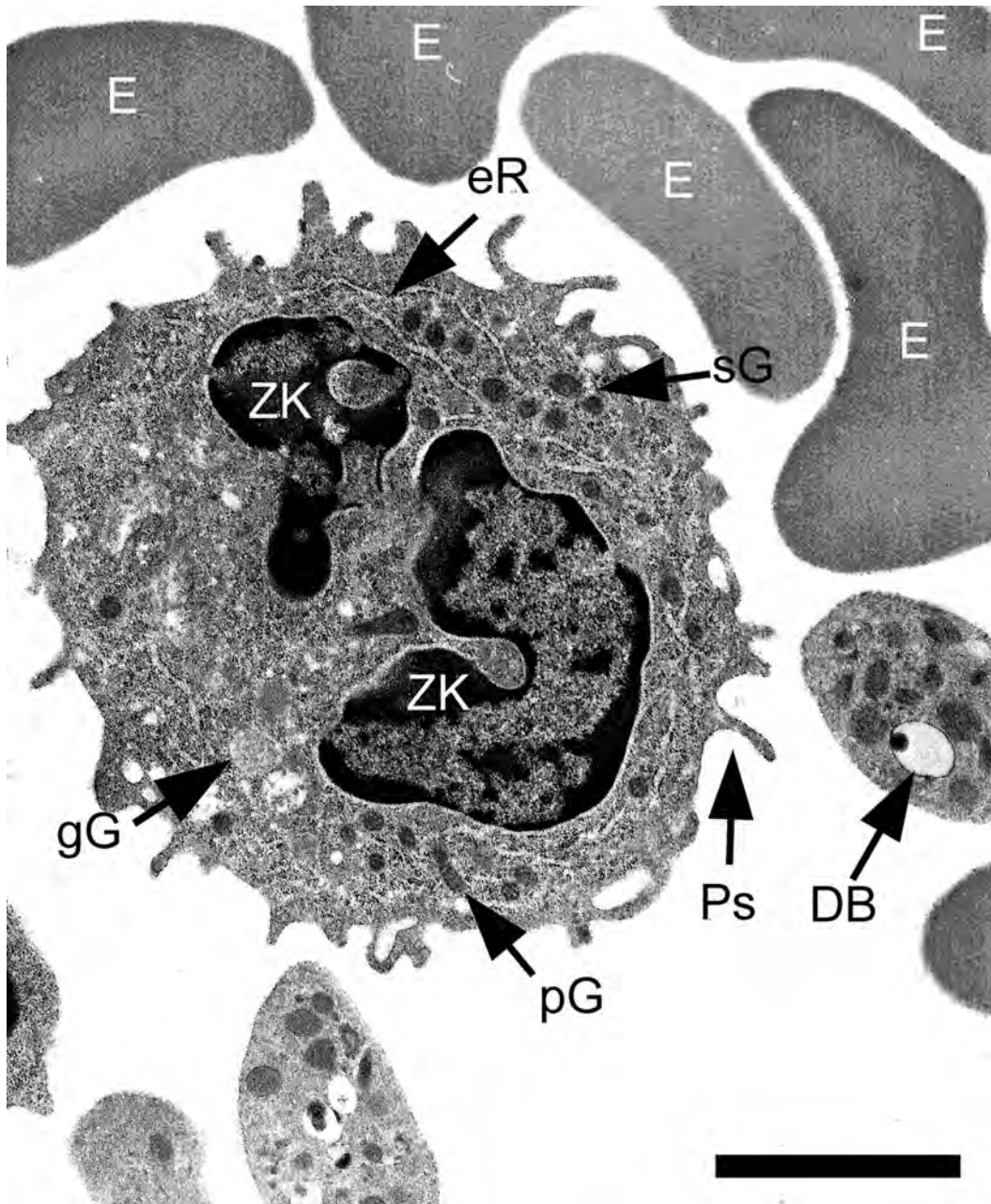


Abbildung 4.23: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Rind m, 5 Jahre)

Im Zytoplasma können längliche primäre Granula (pG), elektronendichte, runde spezifische Granula (sG) und runde, wenig elektronendichte große Granula (gG) unterschieden werden. Der „dense body“ (DB) des Thrombozyten ist von einer klar definierten Membran umgeben.

E = Erythrozyten; ER = endoplasmatisches Retikulum; G = Granula; PS = Pseudopodien  
SB = 2  $\mu\text{m}$

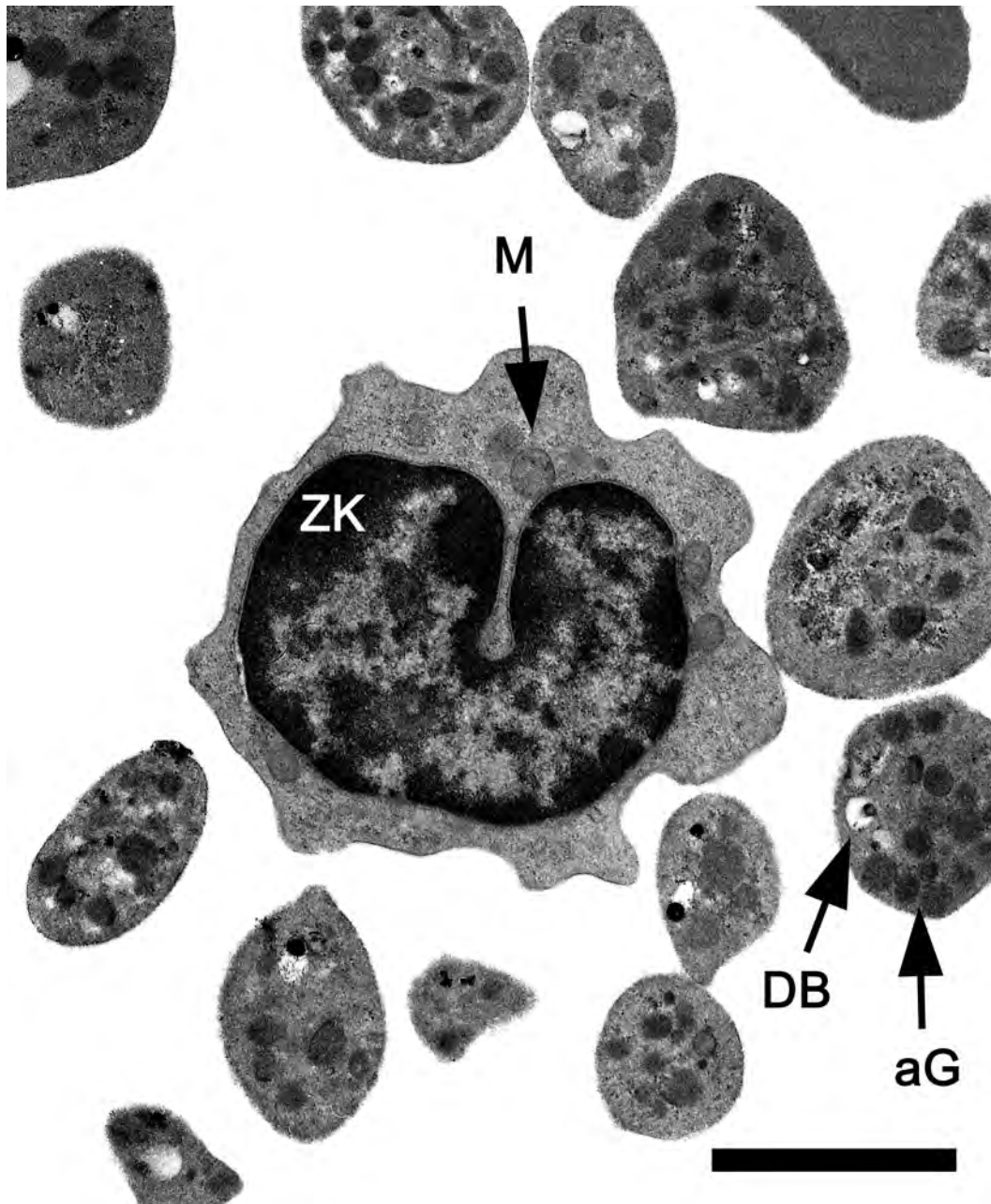


Abbildung 4.24: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Der unreife neutrophile Granulozyt besitzt einen hufeisenförmigen Zellkern (ZK). Im Zytoplasma sind deutlich einige Mitochondrien (M) erkennbar. Bei den Thrombozyten in der Umgebung können „dense bodies“ (DB) von  $\alpha$ -Granula (aG) unterschieden werden. SB = 2  $\mu$ m

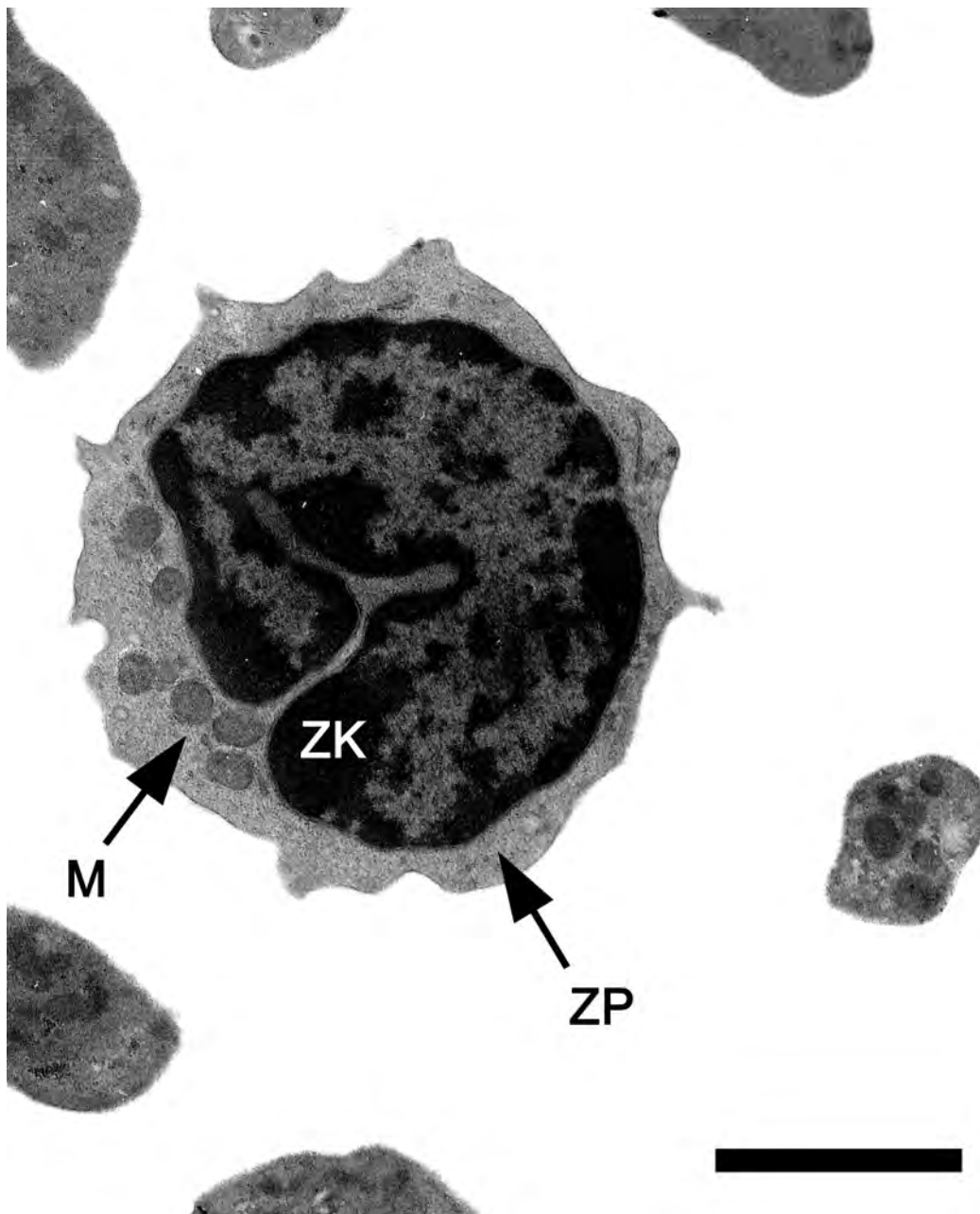


Abbildung 4.25: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Dieser stabkernige Granulozyt ist schon reifer als der in Bild 4.24, da sein Zellkern (ZK) bereits Anzeichen einer Segmentierung andeutet. Auch hier sind im Zytoplasma (ZP) wieder einige Mitochondrien erkennbar.  
SB = 2  $\mu$ m

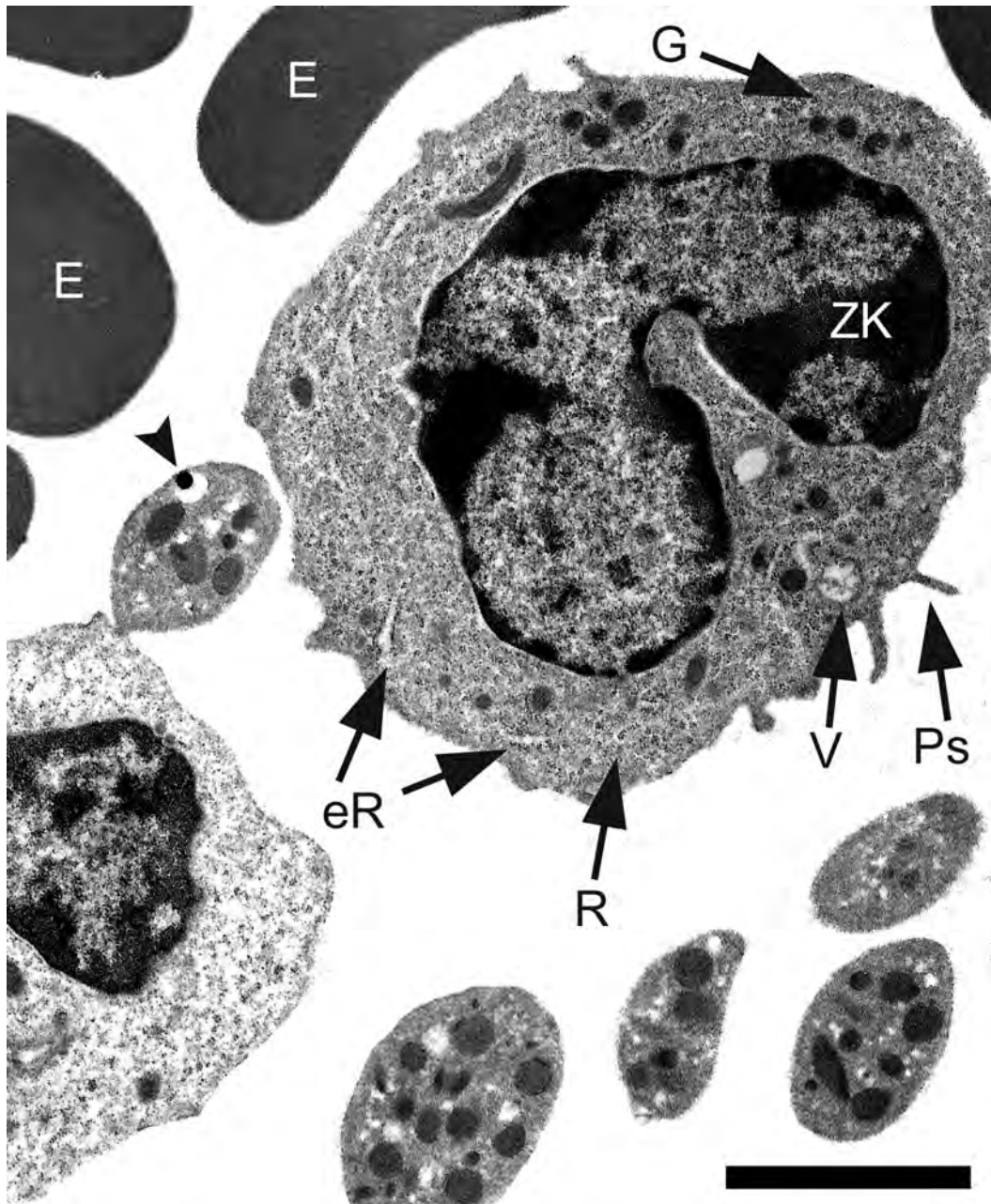


Abbildung 4.26: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Im Zytoplasma sind ein deutliches endoplasmatisches Retikulum (eR), sowie Ribosomen (R), Granula (G) und vereinzelt Vakuolen (V) erkennbar. Bei einem Thrombozyten ist ein „dense body“ sehr gut zu sehen (kleiner Pfeil).

E = Erythrozyten; Ps = Pseudopodien

SB = 2  $\mu$ m

### **4.3.5 Eosinophile Granulozyten**

Die eosinophilen Granulozyten sind große runde Zellen mit einer glatten Zellmembran, welche wenige Pseudopodien ausbildet. Ihr Kern ist meist in zwei Segmente aufgeteilt, welche aber gleichförmiger als die Kernsegmente der neutrophilen Granulozyten sind. In ihrem Zytoplasma besitzen sie zahlreiche große elektronendichte Granula. Dabei können Granula mit homogenen Inhalt von Granula unterschieden werden, in denen eine lamelläre Struktur erkennbar ist. Insgesamt gesehen überwiegen aber die homogenen Granula.



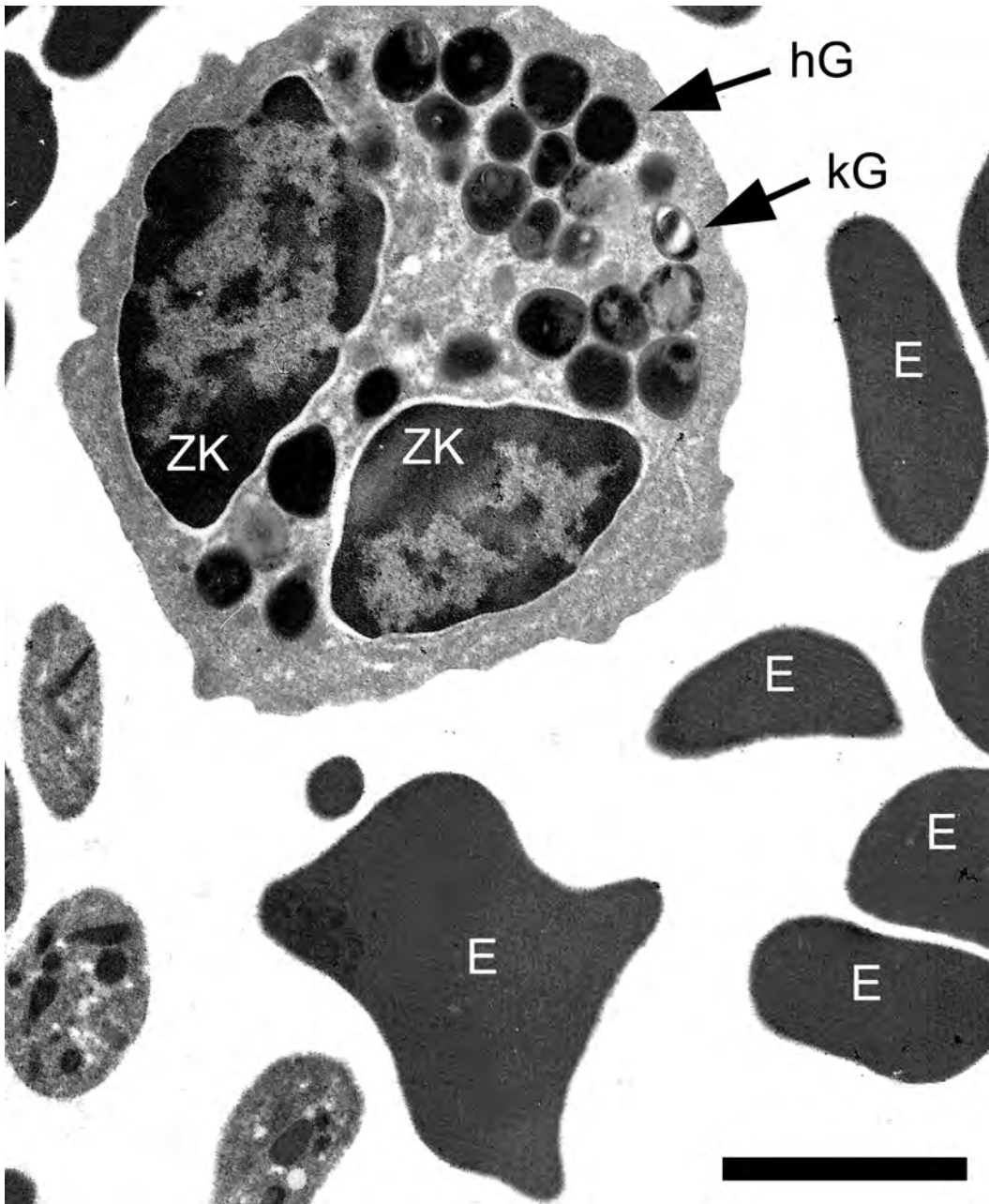


Abbildung 4.27: Eosinophiler Granulozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Vom Zellkern (ZK) sind 2 Segmente angeschnitten. Im Zytoplasma sind sowohl homogene Granula (hG) als auch kristalline Granula (kG) mit einer lamellären Innenstruktur erkennbar.

E = Erythrozyten

SB = 2  $\mu$ m



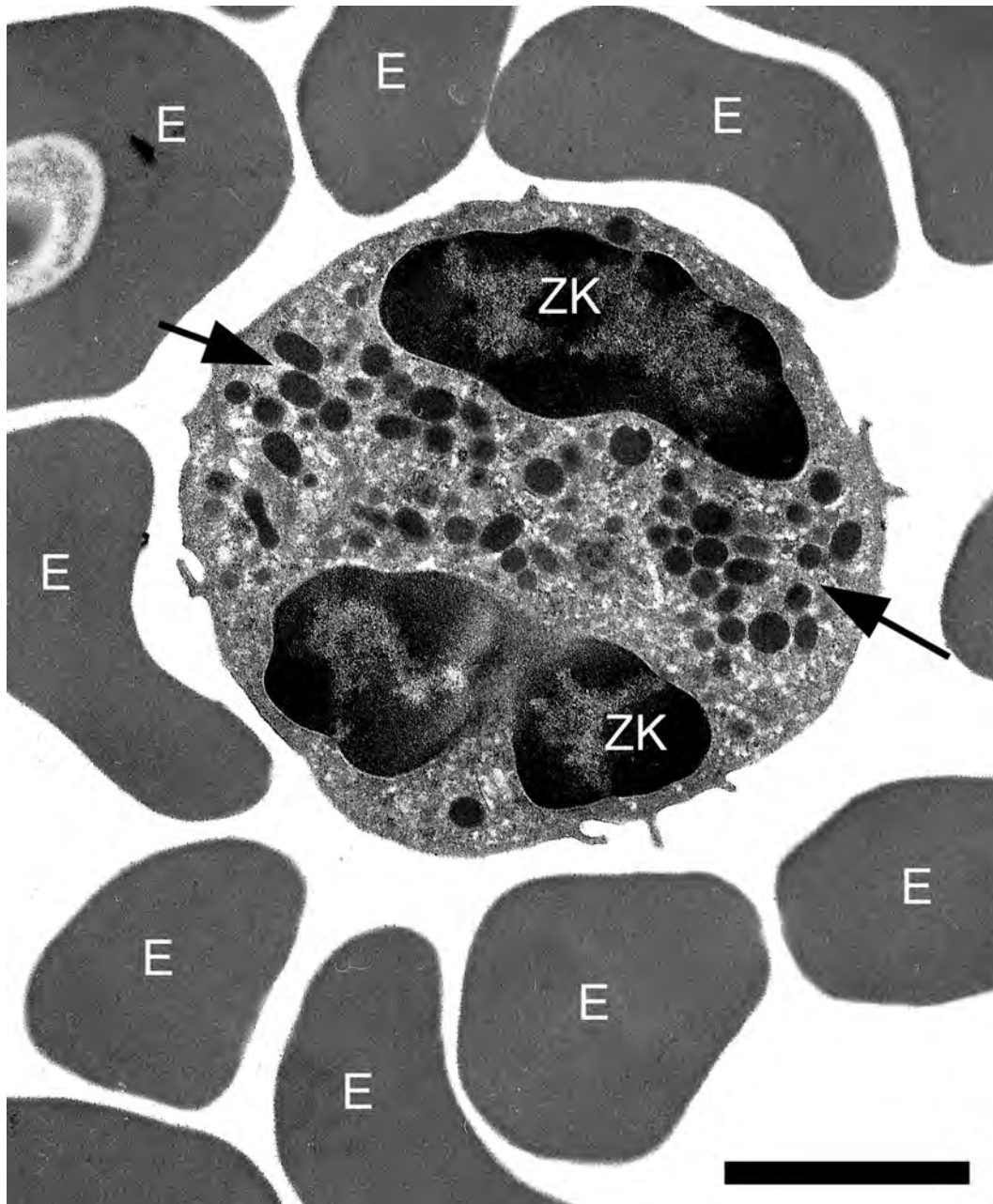


Abbildung 4.28: Eosinophiler Granulozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Im Zytoplasma sind nur homogene Granula (Pfeile) erkennbar, welche aber eine unterschiedliche Größe aufweisen.

E = Erythrozyten

SB = 2  $\mu\text{m}$

### **4.3.6 Basophile Granulozyten**

Es konnten keine basophilen Granulozyten unter dem Elektronenmikroskop sicher identifiziert werden.

### **4.3.7 Monozyten**

Die größten beobachteten Zellen sind die Monozyten. Ihre Zellmembran weist in den meisten Fällen Pseudopodien auf, welche jedoch nicht so ausgeprägt sind wie die der neutrophilen Granulozyten. Ihr großer Kern war von variabler Gestalt. Meistens war er bohnenförmig gebogen, teilweise aber auch eher rund. Im Zytoplasma der Monozyten befinden sich kleine elektronendichte Granula und Vakuolen. Außerdem war ein endoplasmatisches Retikulum sichtbar.

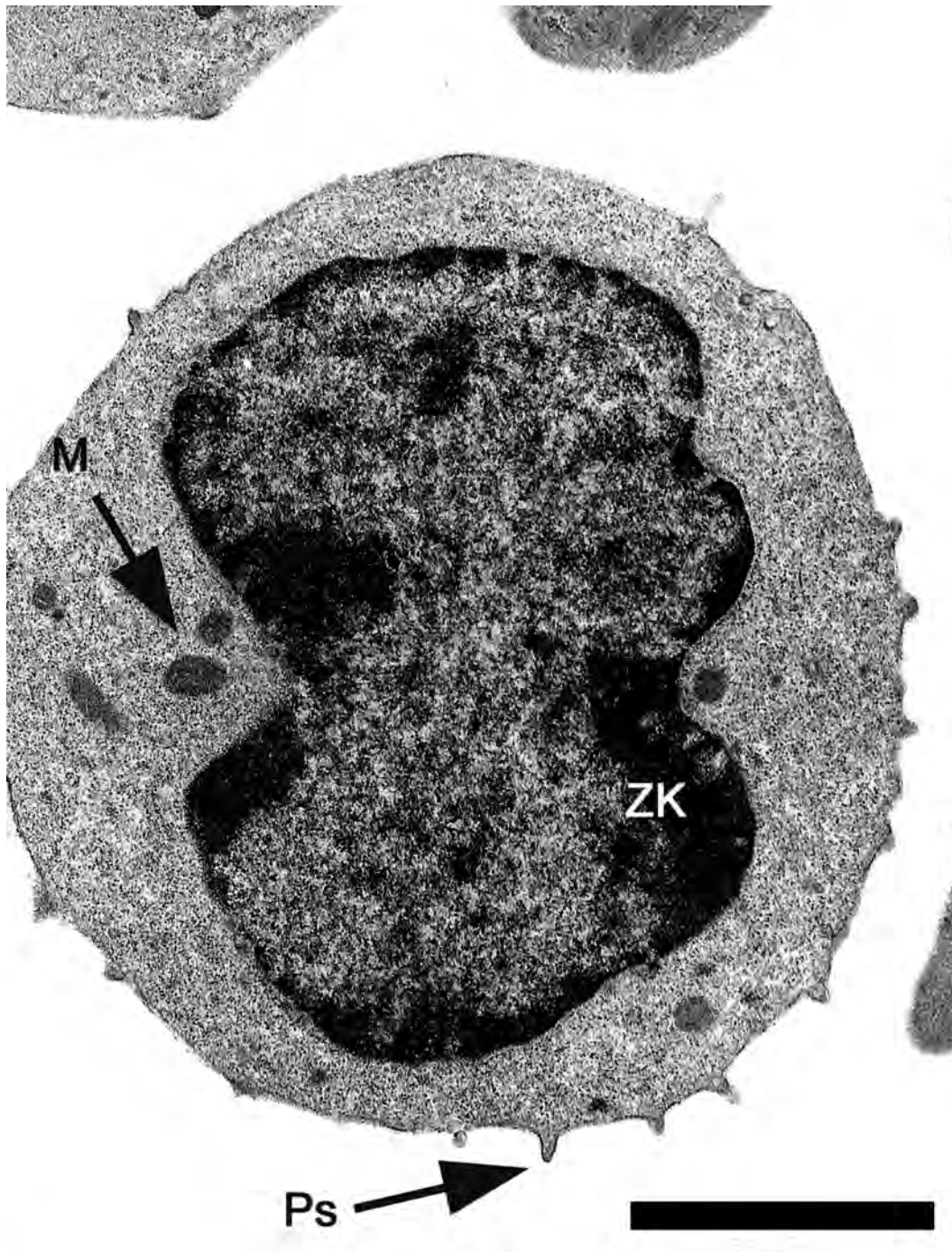


Abbildung 4.29: Monozyt (Rind w, 2,6 Jahre)

Der Monozyt besitzt einen großen eingebuchteten Zellkern (ZK), im Zytoplasma sind einige Mitochondrien (M) erkennbar. Die Zellmembran bildet an einigen Stellen Ausbuchtungen, sogenannte Pseudopodien (Ps), aus.

SB = 2  $\mu\text{m}$

## 4.4 Glykohistochemische Untersuchungen

Bei den FITC-markierten Lektinen wurden je 22 Blutausstriche, bei den biotinylierten Lektinen je 10 Ausstriche von Rindern unterschiedlichen Alters und Geschlechts auf die Bindung der verschiedenen Lektine untersucht. Dabei wurde zwischen keiner Reaktion (0), einer schwach positiven (+), einer deutlich positiven (++) und einer stark positiven Reaktion (+++) unterschieden. Anhand der DAPI-Kernfärbung konnten die Zellen auch bei fehlender Bindung der Lektine identifiziert werden, da sich die Kerne blau anfärben. Die Erythrozyten waren aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz auch bei negativen Reaktionen schwach sichtbar. Die Thrombozyten hingegen waren nur sichtbar, wenn eine Bindung des Lektins stattgefunden hatte.

Für jedes Lektin wurde eine Tabelle erstellt, in der die Bindung des Lektins zusammengefasst ist. Bei der jeweiligen „Stärke der positiven Reaktion“ steht die Anzahl an Tieren, bei denen diese Bindungsstärke aufgetreten ist. Unter „Anzahl der positiven Präparate“ steht die Anzahl an Ausstrichen, auf denen diese Zellen zu finden waren. Dies ist wichtig, da z.B. die eosinophilen Granulozyten und die Monozyten nicht in jedem Präparat zu sehen waren. Die unterschiedliche Anzahl der Gesamtpräparate ergibt sich daraus, dass manche Ausstriche aufgrund mangelhafter Qualität nicht auswertbar waren.

### 4.4.1 Für Glukose/Mannose spezifische Lektine

#### 4.4.1.1 Bindung von *Concanavalin Agglutinin* (ConA-FITC)

In allen Präparaten konnte eine positive Reaktion von ConA-FITC mit der Erythrozyten-Membran festgestellt werden. Bei den meisten Tieren war zentral im Zytoplasma ebenfalls eine Anfärbung erkennbar. Teilweise befand sich zwischen den Erythrozyten angefärbtes grobkörniges Material. Bei einigen Tieren wurde auch eine schwach positive bis deutlich positive Reaktion mit der Zellmembran und den Granula der Thrombozyten beobachtet. In fast allen Ausstrichen band das Lektin an die Zellmembran der Lymphozyten, wobei aber sehr unterschiedliche Reaktionen auftraten. So war bei manchen Präparaten eine stark positive, bei anderen nur eine schwach positive Reaktion zu erkennen. Wie bei den Lymphozyten fand auch bei fast allen neutrophilen Granulozyten eine Anfärbung mit ConA-FITC statt. Sowohl die Zellmembran als auch das Zytoplasma reagierten zum Teil stark mit dem Lektin. Insgesamt zeigten die neutrophilen Granulozyten eine positivere Reaktion als die Lymphozyten. Vereinzelt wurden Monozyten und eosinophile Granulozyten in den Ausstrichen gefunden. Bei diesen konnte eine hohe Affinität von ConA-FITC zu der Zellmembran und dem Zytoplasma festgestellt werden. In Tabelle 4.8 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.8: Einzelauswertung Lektine: ConA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |            |           | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|------------|-----------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)     | 3 (+++)   |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |            |           |                                |
| Membran                         | 0                             | 4 (19,0%) | 12 (57,0%) | 5 (24,0%) | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 4 (19,0%)                     | 8 (38,0%) | 9 (43,0%)  | 0         | 95,5%                          |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |            |           |                                |
| Membran                         | 8 (38,1%)                     | 0         | 5 (23,8%)  | 8 (38,1%) | 95,5%                          |
| Granula                         | 7 (33,3%)                     | 0         | 14 (66,6%) | 0         | 95,5%                          |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |            |           |                                |
| Membran                         | 3 (14,3 %)                    | 9 (43%)   | 8 (38%)    | 1 (4,8%)  | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 20 (95,2%)                    | 1 (4,8%)  | 0          | 0         | 95,5%                          |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |            |           |                                |
| Membran                         | 1 (5,6%)                      | 4 (22,2%) | 6 (28,6%)  | 7 (33,3%) | 95,5%                          |
| Granula                         | 21 (100%)                     | 0         | 0          | 0         | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 4 (22,2%)                     | 3 (16,7%) | 6 (33,3%)  | 5 (27,8%) |                                |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |            |           |                                |
| Membran                         | 0                             | 1 (33,3%) | 1 (33,3%)  | 1 (33,3%) | 13,6%                          |
| Granula                         | 2 (66,7%)                     | 0         | 1 (33,3%)  | 0         | 13,6%                          |
| Zytoplasma                      | 1 (33,3%)                     | 0         | 1 (33,3%)  | 1 (33,3%) | 13,6%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |            |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -          | -         | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -          | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -          | -         | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |            |           |                                |
| Membran                         | 1 (25,0%)                     | 0         | 1 (25,0%)  | 2 (50,0%) | 18,2%                          |
| Zytoplasma                      | 2 (50,0%)                     | 0         | 1 (25,0%)  | 1 (25,0%) | 18,2%                          |

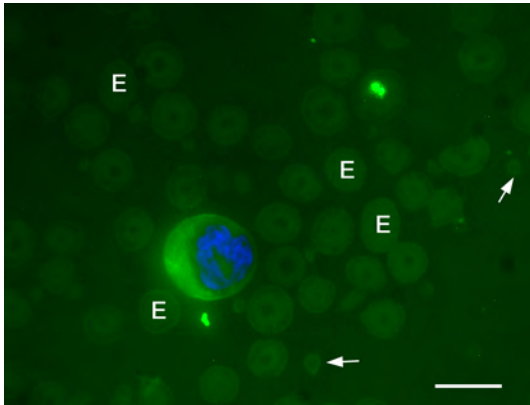


Abbildung 4.30: Neutrophiler Granulozyt, ConA-FITC (Rind w, 18 Tage)

Zellmembran und Zytoplasma sind stark positiv. Die Erythrozyten (E) und die Thrombozyten (Pfeil) weisen eine deutliche Bindung des Lektins auf.

SB = 10  $\mu\text{m}$

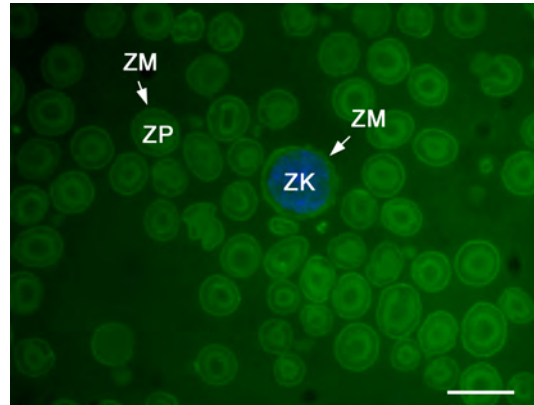


Abbildung 4.31: Lymphozyt, ConA-FITC (Rind w, 18 Tage)

Die Zellmembran (ZM) des Lymphozyten ist stark positiv. Bei den Erythrozyten ist sowohl die Zellmembran (ZM) als auch ein kreisförmiger zentraler Bereich im Zytoplasma (ZP) positiv.

ZK = Zellkern

SB = 10  $\mu\text{m}$

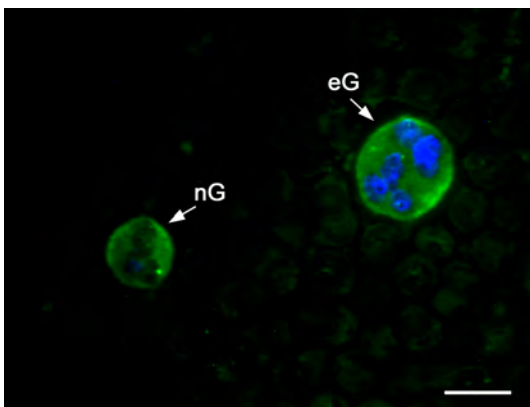


Abbildung 4.32: Eosinophiler und neutrophiler Granulozyt, ConA FITC (Rind m, 20 Monate)

Zellmembran und Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (eG) und des neutrophilen Granulozyten (nG) reagieren stark positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

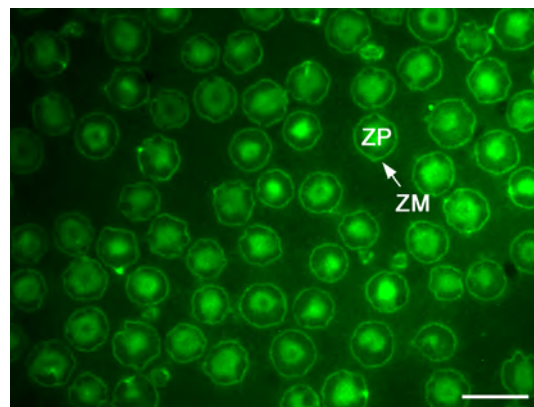


Abbildung 4.33: Erythrozyten, ConA-FITC (Rind w, 3,1 Jahre)

Bei den Erythrozyten reagieren sowohl Zellmembran (ZM) als auch ein kreisförmiger zentraler Bereich im Zytoplasma (ZP) positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

**4.4.1.2 Bindung von *Lens culinaris* Agglutinin (LCA-FITC)**

LCA-FITC hat in nahezu allen Ausstrichen die Zellmembran der Erythrozyten deutlich bis teilweise stark positiv gebunden. In vielen Fällen war zusätzlich das Zytoplasma zentral angefärbt, in einem Fall nur das Zytoplasma ohne die Zellmembran. Bei vielen Tieren konnte eine Bindung des Lektins an die Granula der Thrombozyten festgestellt werden, in einigen Ausstrichen wurde auch eine stark positive Bindung des Lektins an die Zellmembran der Blutplättchen nachgewiesen. In nahezu allen Präparaten wies die Zellmembran der Lymphozyten eine positive Reaktion auf, wobei wieder schwache und auch starke Reaktionen beobachtet wurden. Sowohl die Zellmembran als auch das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten war in allen Ausstrichen positiv bzw. in den meisten Fällen sogar stark positiv gefärbt. In einzelnen Fällen war allein die Zellmembran angefärbt. Bei den Monozyten konnte hingegen nur eine schwache Reaktion festgestellt werden. Die Granula der eosinophilen Granulozyten waren wiederum stark positiv. In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.9: Einzelauswertung Lektine: LCA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |            |            | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|------------|------------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)     | 3 (+++)    |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |            |            |                                |
| Membran                         | 2 (9,5%)                      | 3 (14,3%) | 12 (57,1%) | 4 (19%)    | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 11 (52,4%)                    | 5 (23,8%) | 4 (19,0%)  | 1 (4,8%)   | 95,5%                          |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |            |            |                                |
| Membran                         | 7 (33,3%)                     | 0         | 14 (66,6%) | 0          | 95,5%                          |
| Granula                         | 4 (19,0%)                     | 0         | 8 (38,1%)  | 9 (42,9%)  | 95,5%                          |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |            |            |                                |
| Membran                         | 5 (23,8%)                     | 2 (9,5%)  | 9 (42,9%)  | 5 (23,8%)  | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 19 (90,5%)                    | 1 (4,8%)  | 1 (4,8%)   | 0          | 95,5%                          |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |            |            |                                |
| Membran                         | 0                             | 7 (33,4%) | 4 (19,0%)  | 10 (47,6%) | 95,5%                          |
| Granula                         | 21 (100%)                     | 0         | 0          | 0          | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 0                             | 9 (42,9%) | 2 (9,5%)   | 10 (47,6%) | 95,5%                          |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |            |            |                                |
| Membran                         | 0                             |           | 4 (100%)   | 0          | 18,2%                          |
| Granula                         | 0                             | 0         | 0          | 4 (100%)   | 18,2%                          |
| Zytoplasma                      | 4 (10%)                       | 0         | 0          | 0          | 18,2%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |            |            |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -          | -          | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -          | -          | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -          | -          | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |            |            |                                |
| Membran                         | 0                             | 1 (100%)  | 0          | 0          | 4,5%                           |
| Zytoplasma                      | 1 (100%)                      | 0         | 0          | 0          | 4,5%                           |



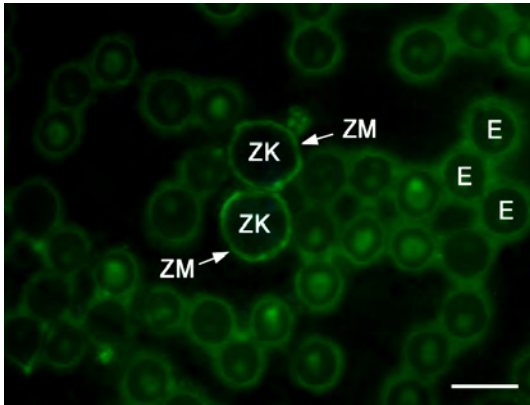


Abbildung 4.34: Lymphozyten, LCA-FITC (Rind w, 4,1 Jahre)

Die Zellmembranen (ZM) der beiden Lymphozyten zeigen eine stark positive Reaktion. Auch die Zellmembranen der Erythrozyten (E) sind positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

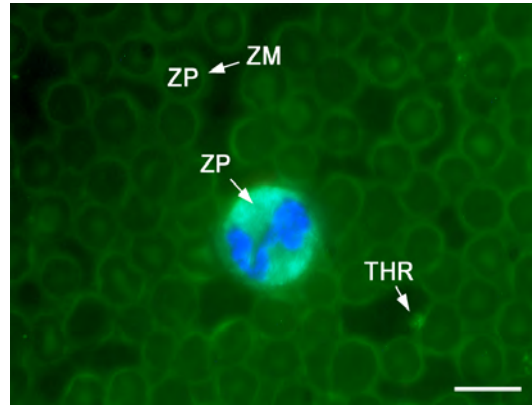


Abbildung 4.35: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC (Rind w, 3,4 Monate)

Das Zytoplasma (ZP) ist stark positiv. Bei den Erythrozyten zeigt sich sowohl an der Zellmembran (ZM) als auch im Zytoplasma (ZP) eine positive Reaktion. Das Lektin bindet auch an die Granula der Thrombozyten (THR).

SB = 10  $\mu\text{m}$

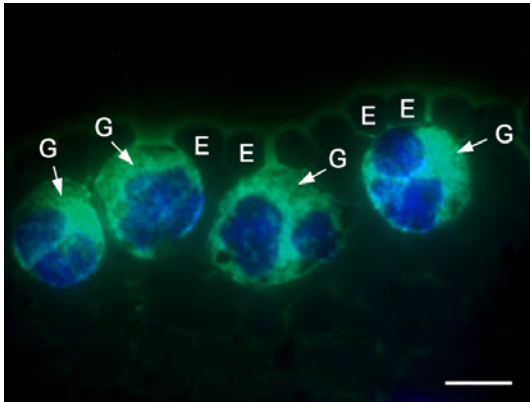


Abbildung 4.36: Eosinophile Granulozyten, LCA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Das Lektin bindet stark an die Granula (G).

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

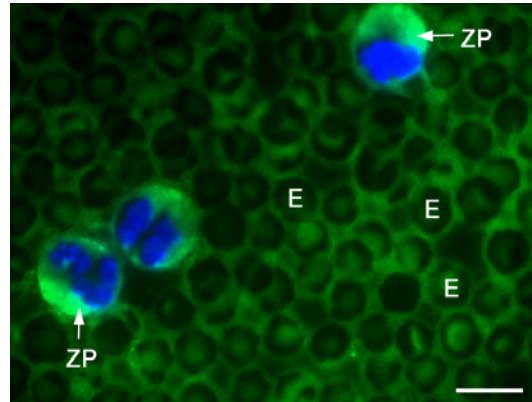


Abbildung 4.37: Segmentkernige neutrophile Granulozyten, LCA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Das Zytoplasma zeigt eine deutlich positive Reaktion.

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

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

Bei der Hälfte der Ausstriche konnte eine positive Bindung von PSA-FITC an die Erythrozytenmembran festgestellt werden. Zum Teil war dabei in den roten Blutzellen körniges Material sichtbar. In vielen Präparaten waren die Granula der Thrombozyten stark positiv. Die Bindung des Lektins an die Membran der Lymphozyten variierte je nach Ausstrich von schwach bis stark positiv. Bei fast allen Tieren zeigt PNA-FITC eine stark positive Reaktion mit dem Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten. Der Zellinhalt stellte sich dabei aber nicht homogen, sondern sehr grobkörnig dar, so dass wahrscheinlich vor allem die Granula mit dem Lektin reagierten. Bei den eosinophilen Granulozyten war die positive Reaktion teilweise auf die Zellmembran und teilweise auf die Granula beschränkt. Die wenigen Monozyten zeigten eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma. In Tabelle 4.10 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.10: Einzelauswertung Lektine: PSA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |           | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)    | 3 (+++)   |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 10 (50,0%)                    | 5 (25,0%) | 5 (25,0%) | 0         | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 14 (70,0%)                    | 6 (30,0%) | 0         | 0         | 91,0%                          |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 18 (90,0%)                    | 0         | 2 (10,0%) | 0         | 91,0%                          |
| Granula                         | 8 (40,0%)                     | 0         | 6 (30,0%) | 6 (30,0%) | 91,0%                          |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 3 (15,0%)                     | 10 (50%)  | 5 (25,0%) | 2 (10,0%) | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 21 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 91,0%                          |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 10 (50,0%)                    | 0         | 3 (15,0%) | 7 (35,0%) | 91,0%                          |
| Granula                         | 0                             | 0         | 3 (15,0%) | 17 (35%)  | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 21 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 91,0%                          |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 1 (50,0%)                     | 0         | 0         | 1 (50,0%) | 9,1%                           |
| Granula                         | 1 (50,0%)                     | 0         | 0         | 1 (50,0%) | 9,1%                           |
| Zytoplasma                      | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0         | 9,1%                           |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 1 (100%)                      | 0         | 0         | 0         | 4,5%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 1 (100%)  | 0         | 0         | 4,5%                           |

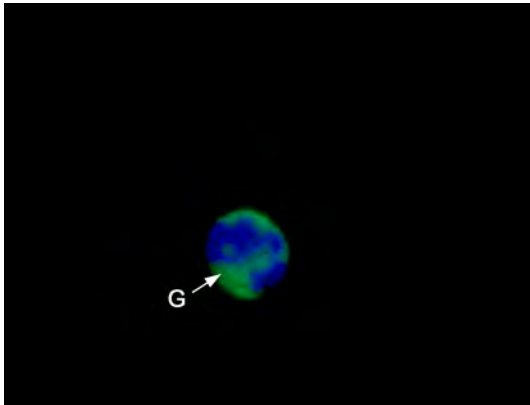


Abbildung 4.38: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC (Rind m, 6,6 Wochen)

Die Granula (G) zeigen eine stark positive Reaktion.

SB = 10  $\mu\text{m}$

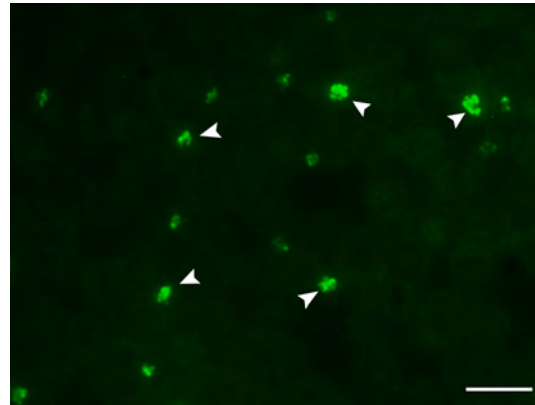


Abbildung 4.39: Thrombozyten, PSA-FITC (Rind w, 2 Tage)

Das Lektin bindet stark positiv an die Granula der Thrombozyten.

SB = 10  $\mu\text{m}$

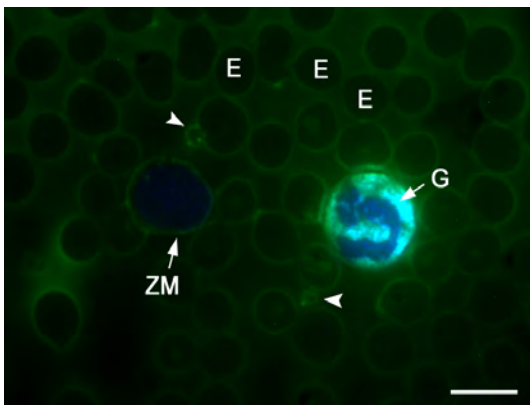


Abbildung 4.40: Lymphozyt und neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Das Lektin zeigt eine positive Reaktion mit der Zellmembran (ZM) der Lymphozyten und Erythrozyten (E), sowie mit den Granula des neutrophilen Granulozyten.

SB = 10  $\mu\text{m}$

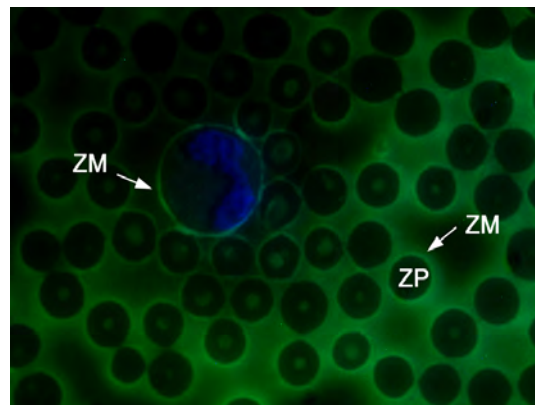


Abbildung 4.41: Eosinophiler Granulozyt, PSA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Nur die Zellmembran (ZM) zeigt eine stark positive Reaktion des Lektins.

ZP = Zytoplasma; ZM = Zellmembran

SB = 10  $\mu\text{m}$

## 4.4.2 Für Galaktose spezifische Lektine

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

In allen Ausstrichen war das Zytoplasma der Erythrozyten deutlich hell gefärbt. Im Gegensatz dazu wiesen sowohl viele Lymphozyten als auch viele neutrophilen Granulozyten nur eine schwach positive Reaktion von Zellmembran und Zytoplasma auf. Bei vielen Tieren verlief die Reaktion auch negativ. Thrombozyten konnten nicht nachgewiesen werden. Die Bindung von GSL-1-FITC an die Monozyten verlief ebenfalls negativ. Die wenigen eosinophilen Granulozyten wiesen eine sehr schwache Bindung des Lektins an Zellmembran und Granula auf. In Tabelle 4.11 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.11: Einzelauswertung Lektine: GSL-1-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |            |          |        | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|------------|----------|--------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)       | 2(++)    | 3(+++) |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |            |          |        |                                |
| Membran                         | 1 (4,8%)                      | 18 (85,7%) | 2 (9,5%) | 0      | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 1 (4,8%)                      | 18 (85,7%) | 2 (9,5%) | 95,5%  |                                |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |            |          |        |                                |
| Membran                         | 21 (100%)                     | 0          | 0        | 0      | 95,5%                          |
| Granula                         | 21 (100%)                     | 0          | 0        | 0      | 95,5%                          |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |            |          |        |                                |
| Membran                         | 7 (33,3%)                     | 14 (66,7%) | 0        | 0      | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 7 (33,3%)                     | 14 (66,7%) | 0        | 0      | 95,5%                          |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |            |          |        |                                |
| Membran                         | 6 (28,6%)                     | 15 (71,4%) | 0        | 0      | 95,5%                          |
| Granula                         | 21 (100%)                     | 0          | 0        | 0      | 95,5%                          |
| Zytoplasma                      | 6 (28,6%)                     | 15 (71,4%) | 0        | 0      | 95,5%                          |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |            |          |        |                                |
| Membran                         | 0                             | 1 (100%)   | 0        | 0      | 4,5%                           |
| Granula                         | 1 (100%)                      | 0          | 0        | 0      | 4,5%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 1 (100%)   | 0        | 0      | 4,5%                           |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |            |          |        |                                |
| Membran                         | -                             | -          | -        | -      | -                              |
| Granula                         | -                             | -          | -        | -      | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -          | -        | -      | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |            |          |        |                                |
| Membran                         | 3 (75,0%)                     | 1 (25,0%)  | 0        | 0      | 18,2%                          |
| Zytoplasma                      | 3 (75,0%)                     | 1 (25,0%)  | 0        | 0      | 18,2%                          |

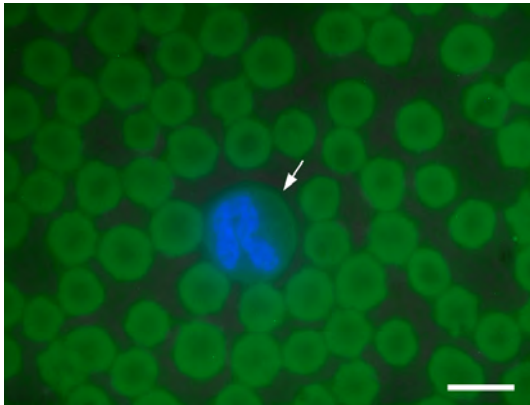


Abbildung 4.42: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, GSL-1-FITC (Rind m, 20 Monate)

Es ist eine nur sehr schwache Reaktion mit der Zellmembran (Pfeil) erkennbar. Das Innere der Erythrozyten erscheint aufgehellert.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

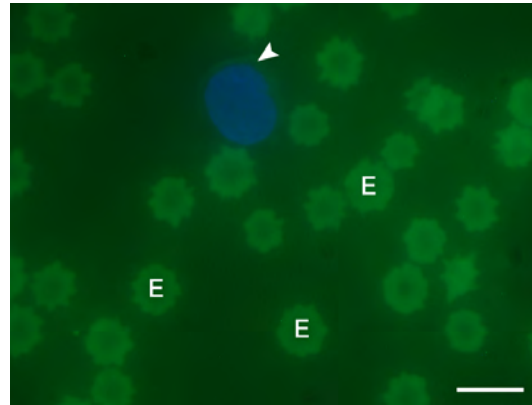


Abbildung 4.43: Lymphozyt, GSL-1-FITC (Rind w, 4,3 Jahre)

Nur sehr undeutlich ist das Zytoplasma (kleiner Pfeil) dieses Lymphozyten zu erkennen.  
E = Erythrozyten  
SB = 10  $\mu\text{m}$

#### 4.4.2.2 Bindung von *Peanut Agglutinin* (PNA-FITC)

In keinem der 22 Ausstriche war eine Bindung von PNA an die Erythrozyten zu erkennen. Bei einigen Tieren zeigten Zytoplasma und Granula der Thrombozyten eine schwach bis deutlich positive Reaktion. Sowohl Zellembrenn als auch Zytoplasma der Lymphozyten waren bis auf wenige Fälle, in denen eine sehr schwache Reaktion sichtbar war, negativ. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten hingegen war in allen Fällen stark positiv. Dabei stellte sich das Zytoplasma nicht homogen dar, sondern es war ein deutlich granulärer Inhalt zu erkennen. Die wenigen Monozyten wiesen eine negative Reaktion auf. Die Granula der eosinophilen Granulozyten wiesen eine deutliche bis starke Bindung des Lektins auf. Die basophilen Granulozyten zeigten eine stark positive Bindung des Lektins an die Granula. In Tabelle 4.12 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.12: Einzelauswertung Lektine: PNA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |            | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|------------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)    | 3 (+++)    |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 100,%                          |
| Zytoplasma                      | 22 (100%)                     |           | 0         | 0          | 100%                           |
| <b>0 Thrombozyten</b>           |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 100,%                          |
| Granula                         | 11 (50,0%)                    | 6 (27,3%) | 5 (22,7%) | 0          | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 19 (86,4%)                    | 3 (13,6%) | 0         | 0          | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 19 (86,4%)                    | 3 (13,6%) | 0         | 0          | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 100%                           |
| Granula                         | 0                             | 0         | 5 (22,7%) | 17 (77,3%) | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 22 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 9,1%                           |
| Granula                         | 0                             | 0         | 1 (50,0%) | 1 (50,0%)  | 9,1%                           |
| Zytoplasma                      | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 9,1%                           |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 1 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 4,5%                           |
| Granula                         | 0                             | 0         | 0         | 1 (100%)   | 4,5%                           |
| Zytoplasma                      | 1 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 4,5%                           |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 1 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 4,5%                           |
| Zytoplasma                      | 1 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 4,5%                           |



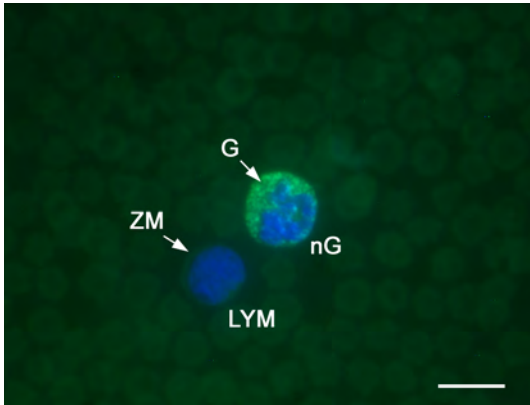


Abbildung 4.44: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, PNA-FITC (Rind m, 6,6 Wochen)

Das Lektin zeigt eine stark positive Reaktion mit den Granula (G) des neutrophilen Granulozyten (nG). An der Zellmembran (ZM) des Lymphozyten (LYM) ist hingegen kaum eine Reaktion feststellbar.

SB = 10  $\mu\text{m}$

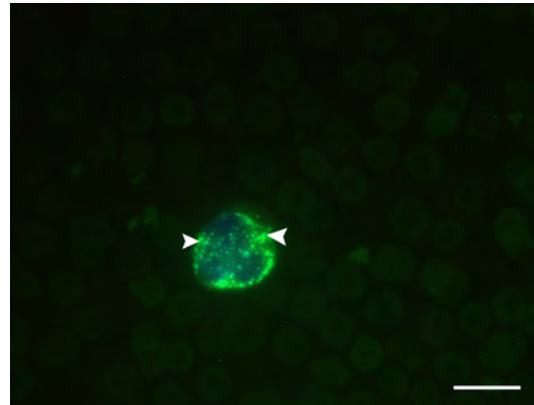


Abbildung 4.45: Basophiler Granulozyt, PNA-FITC (Rind w, 4,9 Wochen)

Die Granula (kleine Pfeile) zeigen eine stark positive Reaktion mit dem Lektin.

SB = 10  $\mu\text{m}$

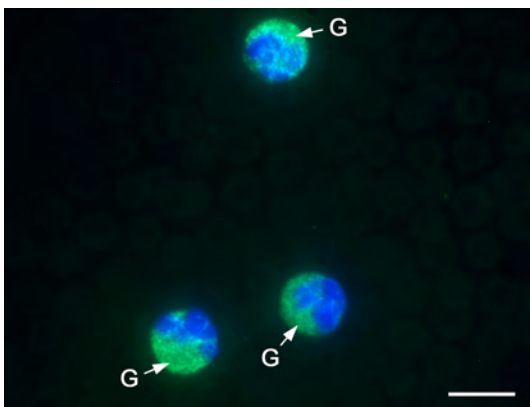


Abbildung 4.46: Neutrophile Granulozyten, PNA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Die Granula (G) sind stark positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

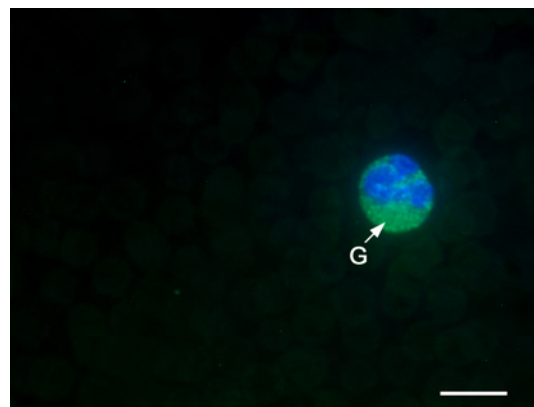


Abbildung 4.47: Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Im Zytoplasma ist deutlich die positive Reaktion mit den Granula (G) erkennbar.

G = Granula

SB = 10  $\mu\text{m}$

##### **4.4.2.3 Bindung von *Ricinus communis* Agglutinin (RCA–FITC)**

Bei fast allen Präparaten konnte eine Bindung von RCA–FITC an die Erythrozytenmembran nachgewiesen werden. Die Intensität der Bindung war in den meisten Fällen deutlich positiv, nur bei wenigen Tieren zeigte sich eine schwache Reaktion. Um und zwischen den roten Blutzellen war teilweise angefärbtes grobkörniges Material sichtbar. In einigen Präparaten konnten stark positive Granula der Thrombozyten festgestellt werden. Die Lymphozyten wiesen in den meisten Fällen lediglich eine schwache positive Reaktion auf, teilweise verlief sie aber auch deutlich positiv. Die Granula der neutrophilen Granulozyten hingegen waren in fast allen Ausstrichen stark positiv. Ebenso waren die Granula der wenigen eosinophilen Granulozyten deutlich positiv. Monozyten konnten nicht sicher identifiziert werden. In Tabelle 4.13 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.13: Einzelauswertung Lektine: RCA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |            | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|------------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2(++)     | 3(+++)     |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 3 (15,0%)                     | 3 (15,0%) | 5 (25,0%) | 9 (45,0%)  | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 3 (15,0%)                     | 3 (15,0%) | 5 (25,0%) | 9 (45,0%)  | 91,0%                          |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 20 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 91,0%                          |
| Granula                         | 9 (45,0%)                     | 0         | 5 (25,0%) | 6 (30,0%)  | 91,0%                          |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 2 (10%)                       | 10 (50%)  | 8 (40%)   | 0          | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 20 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 91,0%                          |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 0                             | 0         | 8 (40,0%) | 12 (60,0%) | 91,0%                          |
| Granula                         | 0                             | 0         | 8 (40,0%) | 12 (60,0%) | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 20 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 91,0%                          |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 1 (50,0%)                     | 0         | 1 (50,0%) | 0          | 9,1%                           |
| Granula                         | 0                             | 0         | 2 (100%)  | 0          | 9,1%                           |
| Zytoplasma                      | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 9,1%                           |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -          | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -          | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -          | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -          | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -          | -                              |

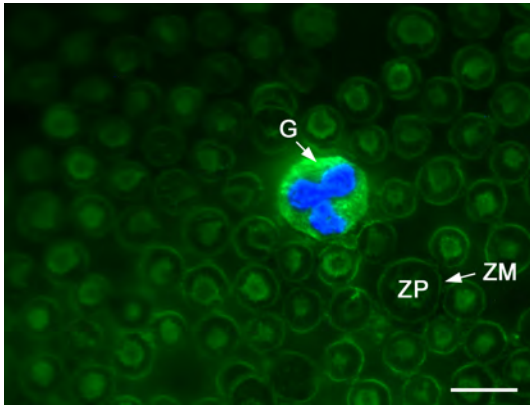


Abbildung 4.48: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Die Granula (G) zeigen eine stark positive Reaktion, ebenso wie Zellmembran (ZM) und Zytoplasma (ZP) der Erythrozyten.  
SB = 10  $\mu$ m

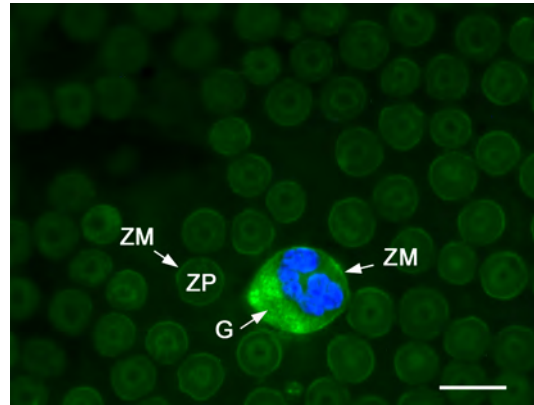


Abbildung 4.49: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Auch bei diesem neutrophilen Granulozyten ist eine stark positive Reaktion mit den Granula (G) erkennbar.  
ZP = Zytoplasma; ZM = Zellmembran  
SB = 10  $\mu$ m

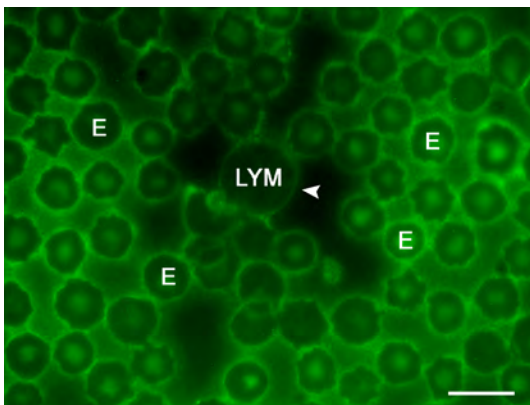


Abbildung 4.50: Lymphozyt, RCA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Die Zellmembran (kleiner Pfeil) des Lymphozyten (LYM) zeigt eine starke positive Reaktion.  
E = Erythrozyten  
SB = 10  $\mu$ m

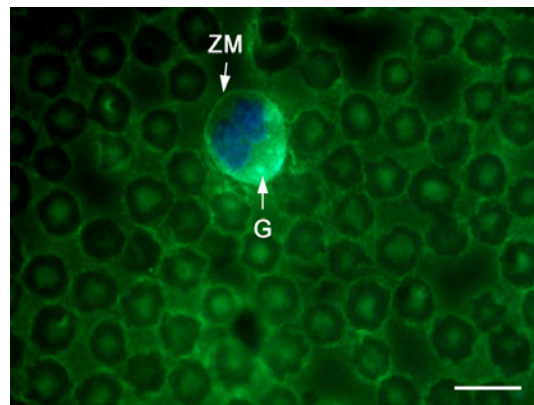


Abbildung 4.51: Eosinophiler Granulozyt, RCA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Granula (G) und Zellmembran (ZM) des eosinophilen Granulozyten sind stark positiv.  
SB = 10  $\mu$ m

**4.4.2.4 Bindung von *Viscum album* Agglutinin (VAA–Biotin)**

In den meisten Präparaten war keine Bindung von VAA–Biotin an die Erythrozyten zu erkennen. Lediglich in drei Ausstrichen war das Zytoplasma der roten Blutzellen geringfügig heller angefärbt. Thrombozyten waren in allen Fällen nicht zu finden. Bei den neutrophilen Granulozyten und den Lymphozyten konnte bei allen Tieren eine negative Reaktion festgestellt werden. Die Granula der eosinophilen Granulozyten reagierten schwach positiv.

Bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$  war in allen Präparaten eine Aufhellung des Zytoplasmas der Erythrozyten nachweisbar. An Thrombozyten, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten erfolgte weiterhin keine Bindung von VAA–Biotin. Die Granula der eosinophilen Granulozyten reagierten ebenfalls wieder schwach positiv. In Tabelle 4.14 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.14: Einzelauswertung Lektine: VAA-Biotin

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |        |         | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|--------|---------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++) | 3 (+++) |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 10 (100%) | 0      | 0       | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 1 (100%)                      | 0         | 0      | 0       | 10%                            |
| Granula                         | 0                             | 1 (100%)  | 0      | 0       | 10%                            |
| Zytoplasma                      | 1 (100%)                      | 0         | 0      | 0       | 10%                            |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -      | -       | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -      | -       | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -      | -       | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -      | -       | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -      | -       | -                              |

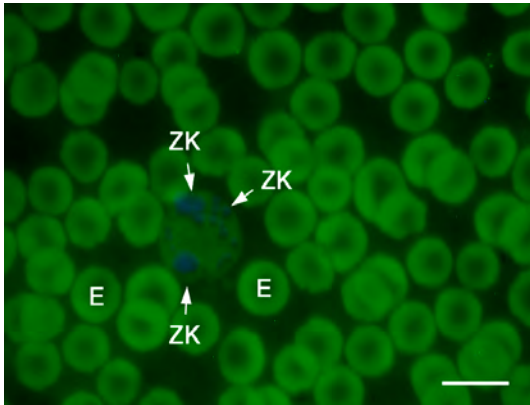


Abbildung 4.52: Neutrophiler Granulozyt, VAA-Biotin (Rind w, 7 Jahre)

Der Zellkern (ZK) dieser Zelle weist eine Hypersegmentierung auf. Das Zytoplasma der Erythrozyten (E) ist schwach positiv.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

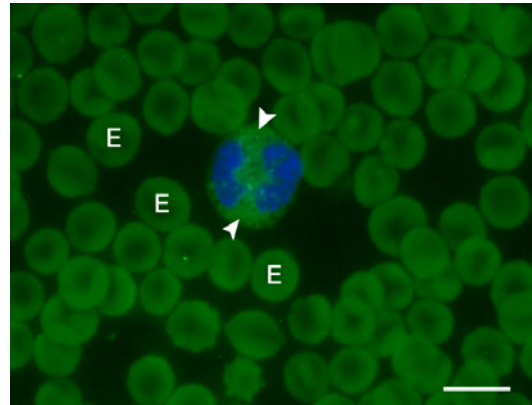


Abbildung 4.53: Eosinophiler Granulozyt, VAA-Biotin (Rind w, 2,3 Jahre)

Die Granula (kleine Pfeile) dieser Zelle sind deutlich positiv.  
E = Erythrozyten  
SB = 10  $\mu\text{m}$

### 4.4.3 Für N-Acetylglukosamin spezifische Lektine

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

Die Zellmembran der Erythrozyten wies in allen Präparaten eine deutlich positive Reaktion auf. In über der Hälfte der Präparate konnten stark positive Granula der Thrombozyten nachgewiesen werden. Die Zellmembran und das Zytoplasma der Lymphozyten waren nur schwach positiv gefärbt. Bei den neutrophilen Granulozyten konnte hingegen in allen Ausstrichen eine meistens stark positive Bindung von WGA-FITC festgestellt werden. Auch die Granula der wenigen eosinophilen Granulozyten waren stark positiv. Das Zytoplasma der Monozyten färbte sich deutlich positiv. In Tabelle 4.15 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.15: Einzelauswertung Lektine: WGA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |            |           |            | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|------------|-----------|------------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)       | 2(++)     | 3(+++)     |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |            |           |            |                                |
| Membran                         | 0                             | 2 (10,0%)  | 18 (90%)  | 0          | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 17 (85%)                      | 3 (15,0%)  | 0         | 0          | 91,0%                          |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |            |           |            |                                |
| Membran                         | 20 (100%)                     | 0          | 0         | 0          | 91,0%                          |
| Granula                         | 5 (25,0%)                     | 0          | 4 (20,0%) | 11 (55,0%) | 91,0%                          |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |            |           |            |                                |
| Membran                         | 5 (25,0%)                     | 13 (75%)   | 2 (10,0%) | 0          | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 5 (25,0%)                     | 13 (75,0%) | 2 (10,0%) | 0          | 91,0%                          |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |            |           |            |                                |
| Membran                         | 20 (100%)                     |            |           |            | 91,0%                          |
| Granula                         | 0                             | 0          | 2 (10%)   | 18 (90%)   | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 0                             | 0          | 20 (100%) | 0          | 91,0%                          |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |            |           |            |                                |
| Membran                         | 1 (100%)                      | 0          | 0         | 0          | 4,5%                           |
| Granula                         | 0                             | 0          | 0         | 1 (100%)   | 4,5%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 0          | 1 (100%)  | 0          | 4,5%                           |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |            |           |            |                                |
| Membran                         | -                             | -          | -         | -          | -                              |
| Granula                         | -                             | -          | -         | -          | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -          | -         | -          | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |            |           |            |                                |
| Membran                         | 2 (100%)                      | 0          | 0         | 0          | 9,1%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 0          | 2 (100%)  | 0          | 9,1%                           |



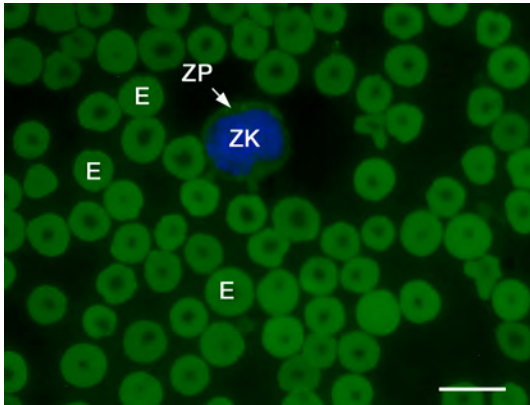


Abbildung 4.54: Lymphozyt, WGA-FITC (Rind m, 6,6 Wochen)

Das Zytoplasma (ZP) des Lymphozyten und der Erythrozyten weisen eine deutlich positive Reaktion auf.

ZK = Zellkern

SB = 10  $\mu\text{m}$

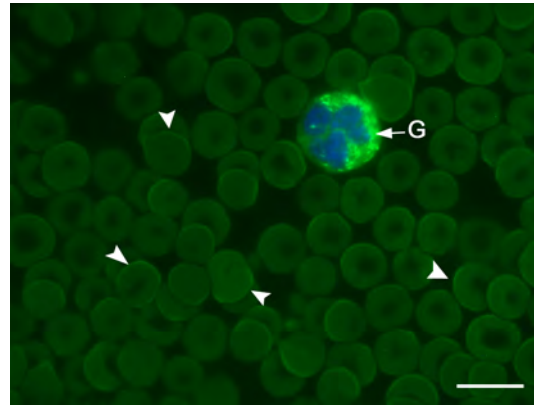


Abbildung 4.55: Neutrophiler Granulozyt, WGA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Die Granula (G) des Granulozyten sind stark positiv. Das Lektin bindet ebenfalls an die Zellmembran der Erythrozyten (kleine Pfeile).

SB = 10  $\mu\text{m}$

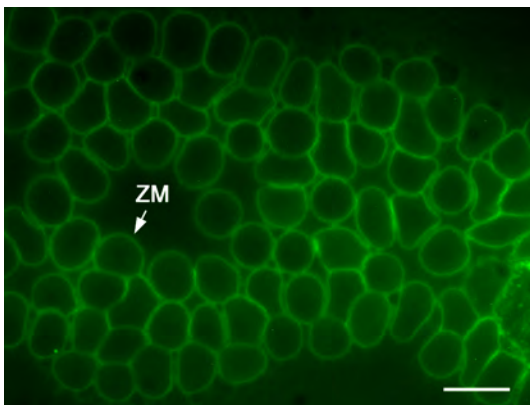


Abbildung 4.56: Erythrozyten, WGA-FITC (Rind m, 20 Monate)

An der Zellmembran (ZM) der Erythrozyten ist eine stark positive Reaktion zu beobachten.

SB = 10  $\mu\text{m}$

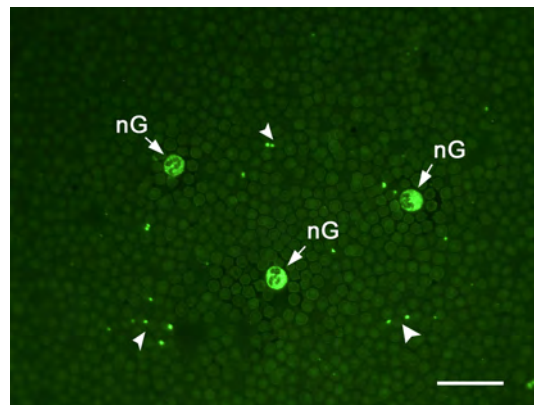


Abbildung 4.57: Übersicht, WGA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Sowohl das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten (nG) und die Thrombozyten (kleine Pfeile) zeigen eine stark positive Reaktion mit dem Lektin. Die Erythrozyten im Hintergrund sind dagegen nur schwach positiv.

SB = 40  $\mu\text{m}$

##### **4.4.3.2 Bindung von *Wheat germ Agglutinin succinyliert* (WGAs–FITC)**

WGAs–FITC zeigte bei allen Tieren keine Bindung an die Erythrozyten. Auch die Thrombozyten wurden nicht gebunden. Alle Lymphozyten wiesen eine negative Reaktion auf. Das Lektin zeigt eine unterschiedliche Affinität zu den Granula der neutrophilen Granulozyten. In den meisten Fällen war eine deutlich positive Reaktion der Granula erkennbar, teilweise war sie aber auch stark positiv oder lediglich schwach positiv. Die Granula der eosinophilen Granulozyten waren deutlich positiv gefärbt, das Zytoplasma der Monozyten hingegen meist nur schwach positiv. In Tabelle 4.16 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.16: Einzelauswertung Lektine: WGAs–FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |            |           |           | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|------------|-----------|-----------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)       | 2(++)     | 3(+++)    |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |            |           |           |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0         | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |            |           |           |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0         | 100%                           |
| Granula                         | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |            |           |           |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0         | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |            |           |           |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0         | 100%                           |
| Granula                         | 0                             | 3 (13,6%)  | 8 (36,4%) | 11(50.0%) | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 14 (63,6%) | 8 (36,4%) | 0         | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |            |           |           |                                |
| Membran                         | 3 (100%)                      | 0          | 0         | 0         | 13,6%                          |
| Granula                         | 0                             | 0          | 3 (100%)  | 0         | 13,6%                          |
| Zytoplasma                      | 3 (100%)                      | 0          | 0         | 0         | 13,6%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |            |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -          | -         | -         | -                              |
| Granula                         | -                             | -          | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -          | -         | -         | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |            |           |           |                                |
| Membran                         | 6 (100%)                      | 0          | 0         | 0         | 27,3%                          |
| Zytoplasma                      | 2 (33,3%)                     | 3 (50,0%)  | 1 (16,7%) | 0         | 27,3%                          |

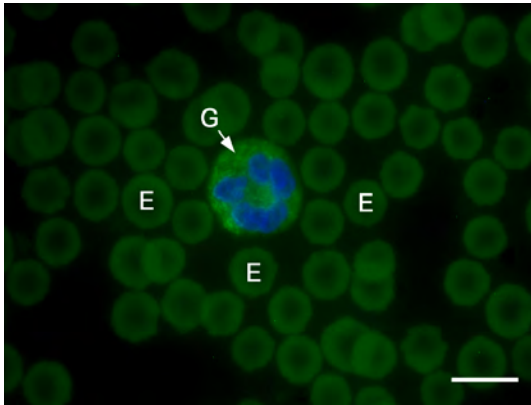


Abbildung 4.58: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC (Rind w, 4,1 Jahre)

Die Granula (G) sind deutlich positiv, während bei den Erythrozyten (E) keine Reaktion zu beobachten ist.

SB = 10  $\mu\text{m}$

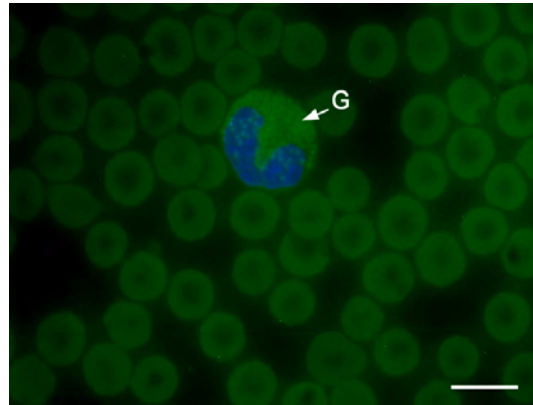


Abbildung 4.59: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC (Rind m, 20 Monate)

Das Lektin bindet an die Granula (G) des stabkernigen Granulozyten.

SB = 10  $\mu\text{m}$

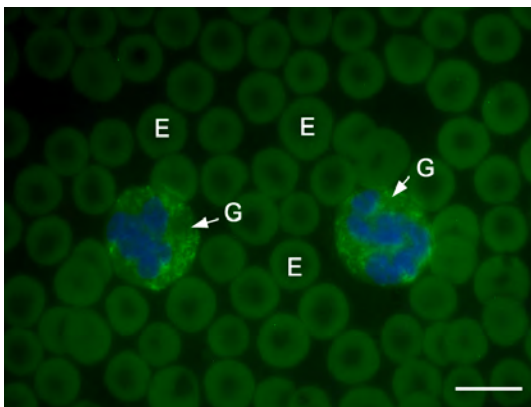


Abbildung 4.60: Neutrophile Granulozyten, WGAs-FITC (Rind m, 20 Monate)

Bei beiden Granulozyten ist eine Reaktion des Lektins mit den Granula (G) zu erkennen.

SB = 10  $\mu\text{m}$

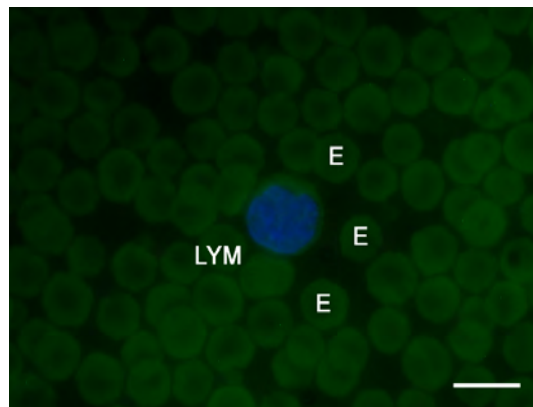


Abbildung 4.61: Lymphozyt, WGAs-FITC (Rind m 20 Monate)

Es ist keine Bindung des Lektins an den Lymphozyten (LYM) zu sehen.

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

#### 4.4.4 Für N-Acetylgalaktosamin spezifische Lektine

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

Die Erythrozyten wiesen bei den meisten Tieren keine oder nur eine schwach positive Reaktion auf. Dabei konnte aber keine spezielle Bindung des Lektins an die Zellmembran festgestellt werden, sondern die ganze Zelle erschien heller im Vergleich zu der Eigenfluoreszenz der Erythrozyten. Die Bindung an Zellmembran und Zytoplasma der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten fiel ebenfalls sehr schwach bis negativ aus. Lediglich bei einem Ausstrich konnte eine mittelgradig positive Reaktion von DBA-FITC mit den neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. Es wurden keine mit dem Lektin angefärbten Thrombozyten gefunden. Bei den vereinzelt auftretenden Monozyten konnte auch nur eine sehr schwache bis negative Bindung des Lektins beobachtet werden. Bei den eosinophilen Granulozyten konnte eine positive Reaktion von DBA-FITC an der Zellmembran und an den Granula nachgewiesen werden. In Tabelle 4.17 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.17: Einzelauswertung Lektine: DBA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |            |          |         | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|------------|----------|---------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)       | 2 (++)   | 3 (+++) |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |            |          |         |                                |
| Membran                         | 10 (45,5%)                    | 12 (54,5%) | 0        | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (45,5%)                    | 12 (54,5%) | 0        | 0       | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |            |          |         |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0          | 0        | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 22 (100%)                     | 0          | 0        | 0       | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |            |          |         |                                |
| Membran                         | 9 (40,9%)                     | 13 (59,1%) | 0        | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 9 (40,9%)                     | 13 (59,1%) | 0        | 0       | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |            |          |         |                                |
| Membran                         | 8 (36,4%)                     | 13 (59,1%) | 1 (4,5%) | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 22 (100%)                     | 0          | 0        | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 8 (36,4%)                     | 13 (59,1%) | 1 (4,5%) | 0       | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |            |          |         |                                |
| Membran                         | 0                             | 1 (100%)   | 0        | 0       | 4,5%                           |
| Granula                         | 0                             | 1 (100%)   | 0        | 0       | 4,5%                           |
| Zytoplasma                      | 1 (100%)                      | 0          | 0        | 0       | 4,5%                           |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |            |          |         |                                |
| Membran                         | -                             | -          | -        | -       | -                              |
| Granula                         | -                             | -          | -        | -       | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -          | -        | -       | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |            |          |         |                                |
| Membran                         | 4 (80,0%)                     | 1 (20,0%)  | 0        | 0       | 22,7%                          |
| Zytoplasma                      | 1 (20,0%)                     | 4 (80,0%)  | 0        | 0       | 22,7%                          |

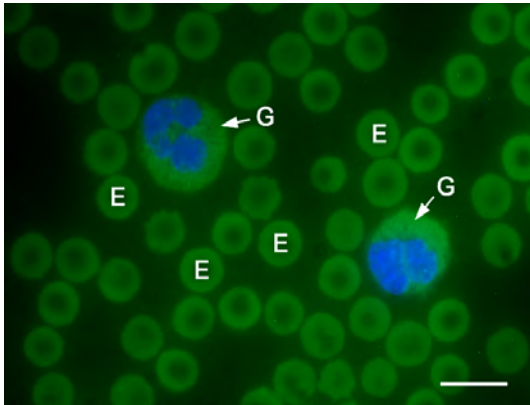


Abbildung 4.62: Neutrophile Granulozyten, DBA-FITC (Rind w, 8,5 Jahre)

Die Granula (G) zeigen eine positive Reaktion.

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

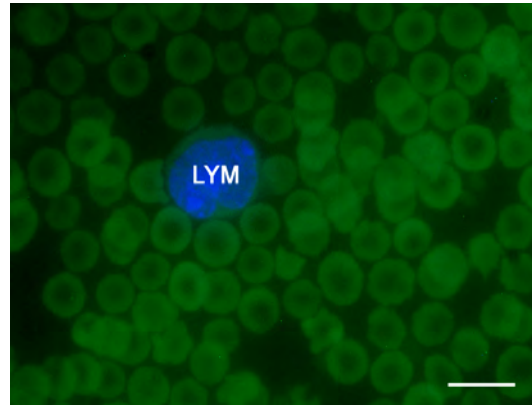


Abbildung 4.63: Lymphozyt, DBA-FITC (Rind w, 4,9 Wochen)

Es ist keine Reaktion des Lymphozyten (LYM) mit dem Lektin erkennbar.

SB = 10  $\mu\text{m}$

#### 4.4.4.2 Bindung von *Soybean Agglutinin* (SBA-FITC)

Die Erythrozyten waren stets negativ. Lediglich in einem Ausstrich war eine positive Reaktion von SBA-FITC mit der Zellmembran und dem Zytoplasma der Erythrozyten erkennbar (vgl. Abb 4.65). Throbozyten wurden in keinem der Präparate gefunden. Auch bei den Lymphozyten konnten bis auf eine Ausnahme, bei der eine schwache Reaktion vorlag, nur negative Reaktionen festgestellt werden. Bei allen Tieren war eine positive bis stark positive Reaktion des Lektins mit den Granula der neutrophilen Granulozyten zu sehen, auch die Granula der eosinophilen Granulozyten waren deutlich angefärbt. Das Zytoplasma der Monozyten wies nur eine schwache Reaktion auf. In Tabelle 4.18 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.18: Einzelauswertung Lektine: SBA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |            | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|------------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)    | 3 (+++)    |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 21 (95,5%)                    | 0         | 1 (4,5%)  | 0          | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 21 (95,5%)                    | 0         | 1 (4,5%)  | 0          | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 100%                           |
| Granula                         | 22 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 21 (95,5%)                    | 1 (4,5%)  | 0         | 0          | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 21 (95,5%)                    | 1 (4,5%)  | 0         | 0          | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 100%                           |
| Granula                         | 3 (13,6%)                     | 1 (4,5%)  | 5 (22,7%) | 14 (63,6%) | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 22 (100%)                     | 0         | 0         | 0          | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 9,1%                           |
| Granula                         | 0                             | 0         | 1 (50,0%) | 1 (50,0%)  | 9,1%                           |
| Zytoplasma                      | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 9,1%                           |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -          | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -          | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -          | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |           |            |                                |
| Membran                         | 3 (100%)                      | 0         | 0         | 0          | 13,6%                          |
| Zytoplasma                      | 1 (33,3%)                     | 2 (66,7%) | 0         | 0          | 13,6%                          |



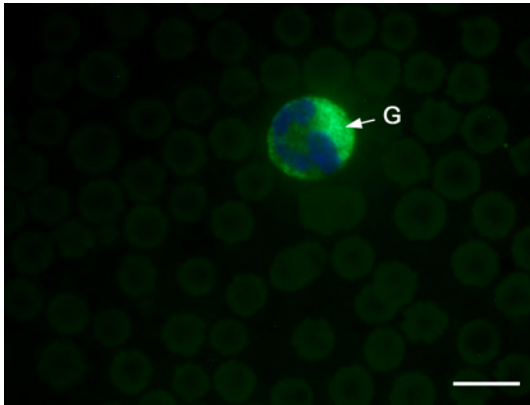


Abbildung 4.64: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC (Rind w, 4,3 Jahre)

Die Granula (G) zeigen eine deutlich positive Reaktion.

SB = 10  $\mu\text{m}$

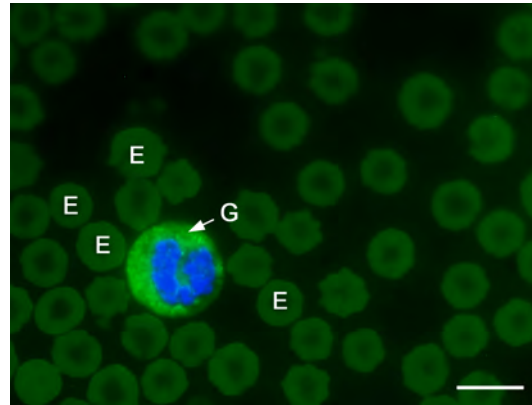


Abbildung 4.65: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC (Rind w, 4,5 Jahre)

Auch an die Granula (G) dieses neutrophilen Granulozyten bindet das Lektin stark.

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

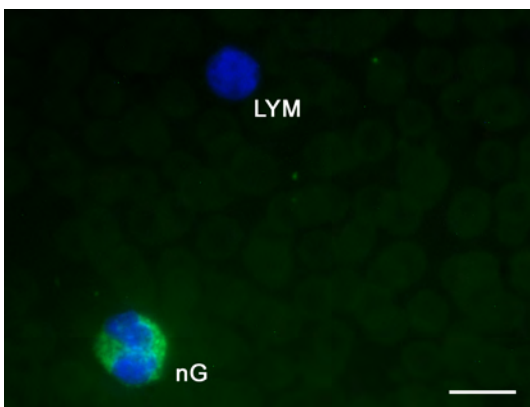


Abbildung 4.66: Lymphozyt und neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC (Rind w, 2,9 Jahre)

Während der neutrophile Granulozyt (nG) deutlich positive Reaktionen aufweist, stellt sich beim Lymphozyten (LYM) keine Bindung des Lektins dar.

SB = 10  $\mu\text{m}$

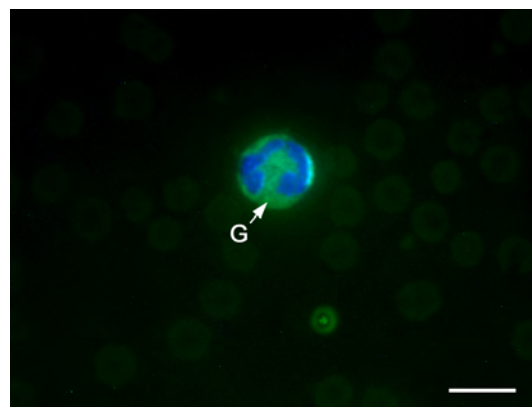


Abbildung 4.67: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Auch an die Granula (G) des stabkernigen neutrophilen Granulozyten bindet das Lektin stark.

SB = 10  $\mu\text{m}$

##### **4.4.4.3 Bindung von *Sophora japonica* Agglutinin (SJA–FITC)**

In den vielen Präparaten konnte ein leichte Aufhellung des Zytoplasmas der Erythrozyten beobachtet werden. Thrombozyten waren in keinem Ausstrich positiv. SJA–FITC zeigte bei keinem Tier eine Bindung an die Lymphozyten. Bei den neutrophilen Granulozyten waren nur die Granula der stabkernigen Granulozyten positiv. Auch die Monozyten zeigten eine negative Reaktion. Nur bei wenigen eosinophilen Granulozyten konnte eine Bindung von SJA–FITC an deren Granula festgestellt werden. In Tabelle 4.19 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.19: Einzelauswertung Lektine: SJA-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |          |         | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|----------|---------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)   | 3 (+++) |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |          |         |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0        | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 11 (50,0%)                    | 9 (40,9%) | 2 (9,1%) | 0       | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |          |         |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0        | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 22 (100%)                     | 0         | 0        | 0       | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |          |         |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0        | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 22 (100%)                     | 0         | 0        | 0       | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |          |         |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0         | 0        | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 21 (95,5%)                    | 1 (4,5%)  | 0        | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 21 (95,5%)                    | 1 (4,5%)  | 0        | 0       | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |          |         |                                |
| Membran                         | 3 (100%)                      | 0         | 0        | 0       | 13,6%                          |
| Granula                         | 0                             | 0         | 3 (100%) | 0       | 13,6%                          |
| Zytoplasma                      | 3 (100%)                      | 0         | 0        | 0       | 13,6%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |          |         |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -        | -       | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -        | -       | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -        | -       | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |          |         |                                |
| Membran                         | 5 (100%)                      | 0         | 0        | 0       | 22,7%                          |
| Zytoplasma                      | 5 (100%)                      | 0         | 0        |         | 22,7%                          |

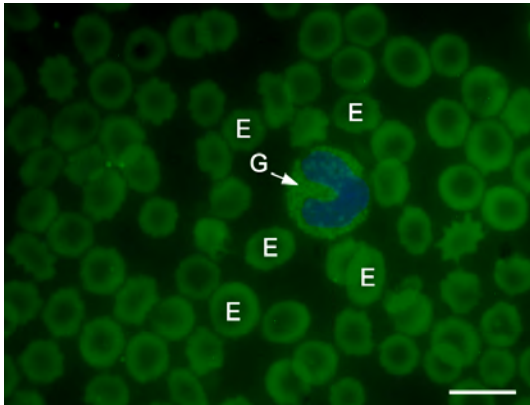


Abbildung 4.68: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC (Rind w, 6 Tage)

Das Lektin bindet stark an die Granula (G).  
E = Erythrozyten  
SB = 10  $\mu\text{m}$

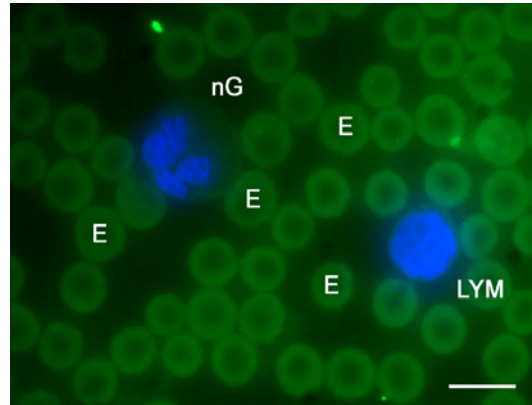


Abbildung 4.69: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, SJA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Es kann keine Bindung des Lektins an den neutrophilen Granulozyten (nG) oder den Lymphozyten (LYM) beobachtet werden.  
E = Erythrozyten  
SB = 10  $\mu\text{m}$

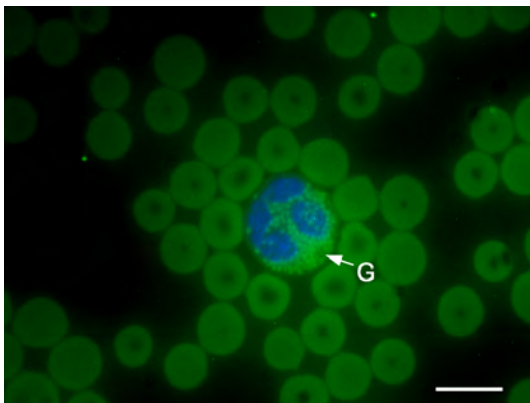


Abbildung 4.70: Eosinophiler Granulozyt, SJA-FITC (Rind m, 20 Monate)

Die Granula (G) des eosinophilen Granulozyten sind deutlich positiv.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

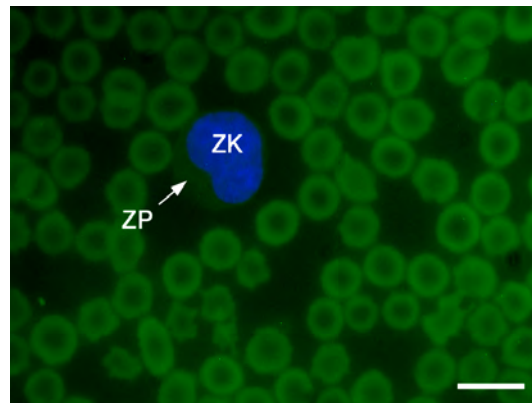


Abbildung 4.71: Monozyt, SJA-FITC (Rind w, 4,9 Wochen)

Bei dem Monozyten ist keine Reaktion erkennbar.  
ZK = Zellkern; ZP = Zytoplasma  
SB = 10  $\mu\text{m}$

#### **4.4.5 Für Fukose spezifische Lektine**

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

UEA-1-FITC zeigte bei einigen Tieren eine schwach positive Bindung an die Erythrozyten, was an einer Aufhellung des Zytoplasmas erkennbar war. Bei vielen Präparaten verlief die Reaktion aber auch negativ. Die Reaktion mit den Thrombozyten und den Lymphozyten verlief ebenfalls negativ. Bei den meisten neutrophilen Granulozyten wies deren Zytoplasma eine schwache bis deutliche Reaktion mit dem Lektin auf, teilweise verlief jedoch auch hier die Reaktion negativ. Monozyten und eosinophile Granulozyten konnten in keinem der Ausstriche identifiziert werden. In Tabelle 4.20 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.20: Einzelauswertung Lektine: UEA-1-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |            |           |        | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|------------|-----------|--------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)       | 2(++)     | 3(+++) |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |            |           |        |                                |
| Membran                         | 20 (100%)                     | 0          | 0         | 0      | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 9 (45,0%)                     | 11 (55,5%) | 0         | 0      | 91,0%                          |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |            |           |        |                                |
| Membran                         | 20 (100%)                     | 0          | 0         | 0      | 91,0%                          |
| Granula                         | 20 (100%)                     | 0          | 0         | 0      | 91,0%                          |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |            |           |        |                                |
| Membran                         | 20 (100%)                     | 0          | 0         | 0      | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 20 (100%)                     | 0          | 0         | 0      | 91,0%                          |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |            |           |        |                                |
| Membran                         | 4 (20,0%)                     | 14 (70,0%) | 2 (10,0%) | 0      | 91,0%                          |
| Granula                         | 20 (100%)                     | 0          | 0         | 0      | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 4 (20,0%)                     | 14 (70,0%) | 2 (10,0%) | 0      | 91,0%                          |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |            |           |        |                                |
| Membran                         | -                             | -          | -         | -      | -                              |
| Granula                         | -                             | -          | -         | -      | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -          | -         | -      | -                              |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |            |           |        |                                |
| Membran                         | -                             | -          | -         | -      | -                              |
| Granula                         | -                             | -          | -         | -      | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -          | -         | -      | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |            |           |        |                                |
| Membran                         | -                             | -          | -         | -      | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -          | -         | -      | -                              |

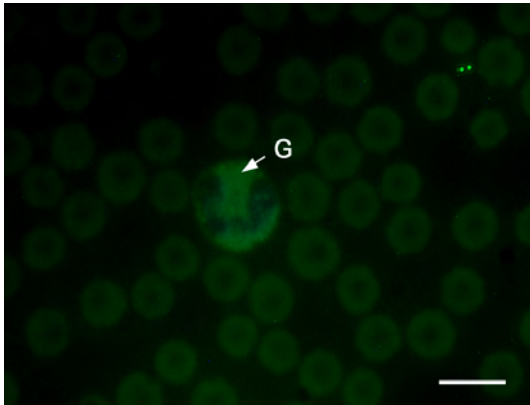


Abbildung 4.72: Neutrophiler Granulozyt, UEA-1-FITC (Rind w, 4,1 Jahre)

Die Granula (G) sind schwach positiv.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

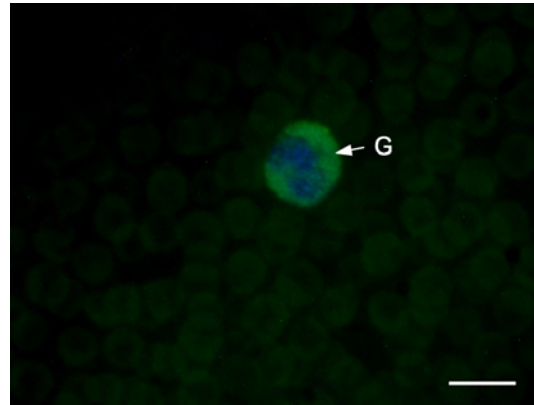


Abbildung 4.73: Neutrophiler Granulozyt, UEA-1-FITC (Rind m, 20 Monate)

Das Lektin zeigt eine schwache Bindung an die Granula (G).  
SB = 10  $\mu\text{m}$

#### 4.4.6 Für Sialinsäure spezifische Lektine

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

Die Reaktion von MAA-Biotin verlief in allen Präparaten negativ. Es konnte auch in keinem der Ausstriche eine Bindung des Lektins an die Thrombozyten, Lymphozyten oder neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Lediglich in einem Fall war eine positive Reaktion mit den Granula der neutrophilen Granulozyten erkennbar (vgl. Abb 4.74). Einige eosinophile Granulozyten zeigten eine schwach positive Reaktion der Granula.

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  war auch hier wieder in allen Ausstrichen eine Aufhellung des Zytoplasmas der Erythrozyten zu erkennen. Sonstige positive Reaktionen blieben auch weiterhin aus. Die Granula der eosinophilen Granulozyten stellten sich jetzt etwas deutlicher dar. In Tabelle 4.21 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.21: Einzelauswertung Lektine: MAA–Biotin

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |         | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|---------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)    | 3 (+++) |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 0                             | 10 (100%) | 0         | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 10 (100%) | 0         | 0       | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 9 (90%)                       | 1 (10,0%) | 0         | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 8 (80,0%)                     | 1 (10,0%) | 1 (10,0%) | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 1 (100%)                      | 0         | 0         | 0       | 10,0%                          |
| Granula                         | 0                             | 0         | 1 (100%)  | 0       | 10,0%                          |
| Zytoplasma                      | 1 (100%)                      | 0         | 0         | 0       | 10,0%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -       | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -       | -                              |
| - Zytoplasma                    | -                             | -         | -         | -       | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -       | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -       | -                              |



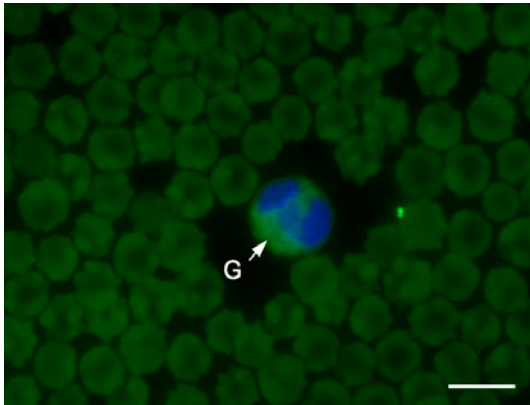


Abbildung 4.74: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, MAA-Biotin (Rind m, 20 Jahre)

Die Granula (G) zeigen eine deutlich positive Reaktion. Auch das Zytoplasma der Erythrozyten ist schwach positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

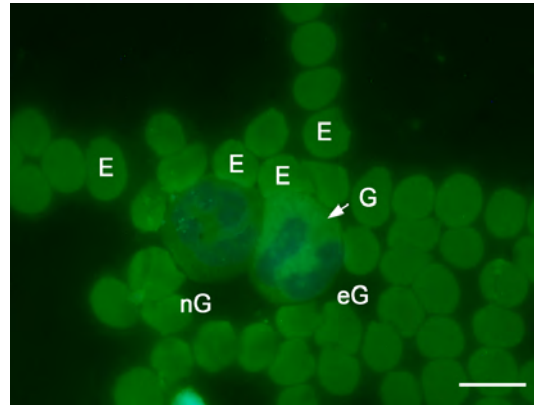


Abbildung 4.75: Neutrophiler und eosinophiler Granulozyt, MAA-Biotin (Rind m, 20 Monate)

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (eG) färben sich deutlich positiv, das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten (nG) nur schwach positiv.

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

#### 4.4.6.2 Bindung von *Sambucus niger* Agglutinin (SNA-Biotin)

Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  wurden wie bei den anderen beiden sialinsäurespezifischen Lektinen auch, keinerlei deutlich positive Reaktionen festgestellt. In drei Präparaten war das Zytoplasma der Erythrozyten leicht aufgehellt, in zwei weiteren Präparaten konnte eine sehr schwach positive Reaktion an der Zellmembran der Lymphozyten nachgewiesen werden. In einem Ausstrich war eine schwache bis deutliche Reaktion von SNA-Biotin im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten und den Granula der eosinophilen Granulozyten zu sehen.

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  hingegen wurden einige Veränderungen sichtbar. Das Lektin reagierte deutlich positiv mit der Zellmembran der Erythrozyten. In einem Präparat war die Zellmembran der Thrombozyten deutlich angefärbt (vgl. Abb 4.78). Die Zellmembran und das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten zeigten ebenso wie die Lymphozyten eine deutlich positive Bindung von SNA-Biotin. In Tabelle 4.22 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.22: Einzelauswertung Lektine: SNA–Biotin

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |           | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)    | 3 (+++)   |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 0                             | 0         | 10 (100%) | 0         | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 10 (100%) | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 9 (90,0%)                     | 0         | 1 (10,0%) | 0         | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 0                             | 10 (100%) | 0         | 0         | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 0                             | 0         | 8 (80,0%) | 2 (20,0%) | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 0                             | 3 (30,0%) | 5 (50,0%) | 2 (20,0%) | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 0                             | 1 (50,0%) | 1 (50,0%) | 0         | 20,0%                          |
| Granula                         | 0                             | 1 (50,0%) | 1 (50,0%) | 0         | 20,0%                          |
| Zytoplasma                      | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0         | 20,0%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -         | -                              |

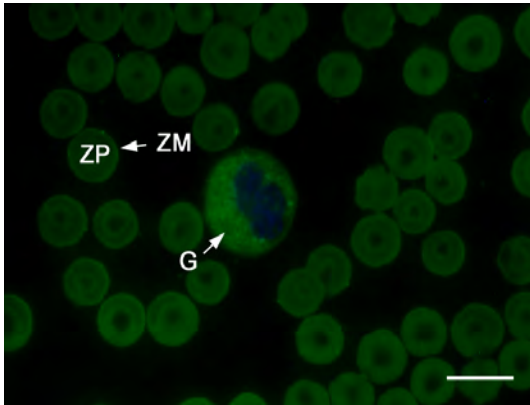


Abbildung 4.76: Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin (Rind w, 8,5 Jahre)

Das Lektin bindet deutlich positiv an die Granula (G) der Zelle, sowie an Zellmembran (ZM) und Zytoplasma (ZP) der Erythrozyten.

SB = 10  $\mu\text{m}$

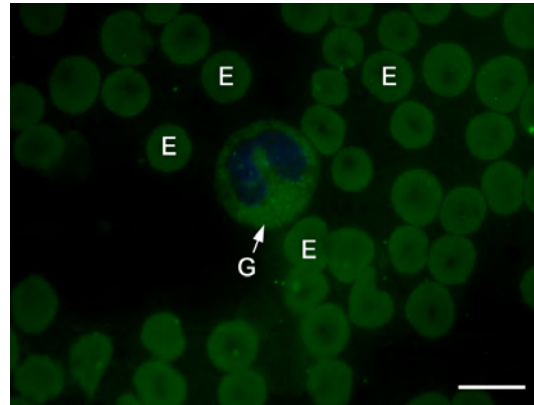


Abbildung 4.77: Eosinophiler Granulozyt, SNA-Biotin (Rind w, 4,5 Jahre)

Die Granula (G) zeigen eine deutlich positive Reaktion.

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

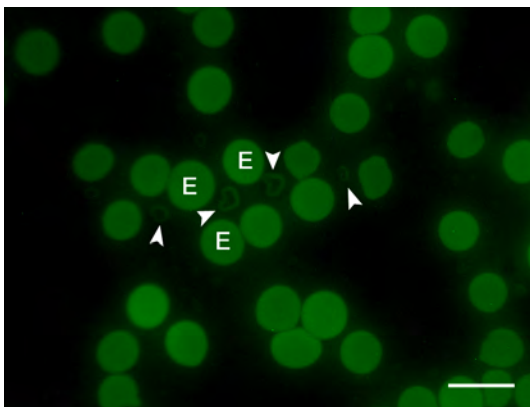


Abbildung 4.78: Thrombozyten, SNA-Biotin (Rind w, 4,9 Wochen)

Es ist eine deutlich positive Bindung des Lektins an die Zellmembran der Thrombozyten zu erkennen (kleine Pfeile).

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

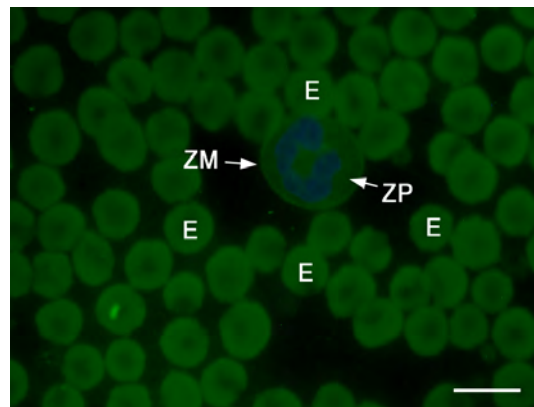


Abbildung 4.79: Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin (Rind w, 20 Monate)

Die Zellmembran (ZM) zeigt eine stärker positive Reaktion als das Zytoplasma (ZP).

E = Erythrozyten

SB = 10  $\mu\text{m}$

#### **4.4.7 Für komplexe Kohlehydratstrukturen spezifische Lektine**

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

Bei den Erythrozyten traten sehr unterschiedliche Reaktionen auf. In den meisten Fällen war eine schwache bis deutlich starke Reaktion an der Zellmembran zu erkennen, teilweise wurde jedoch allein das Zytoplasma angefärbt, in manchen Ausstrichen war keine Bindung an den Erythrozyten sichtbar. In einigen Präparaten waren die Zellmembran und die Granula der Thrombozyten deutlich positiv. PHA-E-FITC band bei allen Tieren an die Zellmembran der Lymphozyten, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Es kamen sowohl schwache, deutliche und starke Reaktionen vor. Bei den neutrophilen Granulozyten wies vor allem die Zellmembran eine deutliche bis starke Reaktion auf, im Zytoplasma war die Reaktion um einiges schwächer bzw. in einigen Fällen auch negativ. Monozyten konnten keine gefunden werden. Einige eosinophile Granulozyten zeigten eine deutliche bis stark positive Reaktion in den Granula und an der Zellmembran. In Tabelle 4.23 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.23: Einzelauswertung Lektine: PHA-E-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |           | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)    | 3 (+++)   |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 5 (25%)                       | 7 (35,0%) | 8 (40,0%) | 0         | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 12 (60%)                      | 5 (25,0%) | 3 (15%)   | 0         | 91,0%                          |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 9 (45,0%)                     | 0         | 7 (35,0%) | 4 (20,0%) | 91,0%                          |
| Granula                         | 16 (80,0%)                    | 0         | 4 (20,0%) | 0         | 91,0%                          |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 5 (25,0%)                     | 6 (30,0%) | 8 (40,0%) | 1 (5,0%)  | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 18 (90,0%)                    | 1 (5,0%)  | 1 (5,0%)  | 0         | 91,0%                          |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 2 (10%)                       | 2 (10,0%) | 8 (40,0%) | 9 (45,0%) | 91,0%                          |
| Granula                         | 20 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 91,0%                          |
| Zytoplasma                      | 9 (45,0%)                     | 3 (15,0%) | 5 (25,0%) | 3 (15,0%) | 91,0%                          |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 0                             | 0         | 1 (50,0%) | 1 (50,0%) | 9,1%                           |
| Granula                         | 1 (50,0%)                     | 0         | 0         | 1 (50,0%) | 9,1%                           |
| Zytoplasma                      | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0         | 9,1%                           |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -         | -                              |

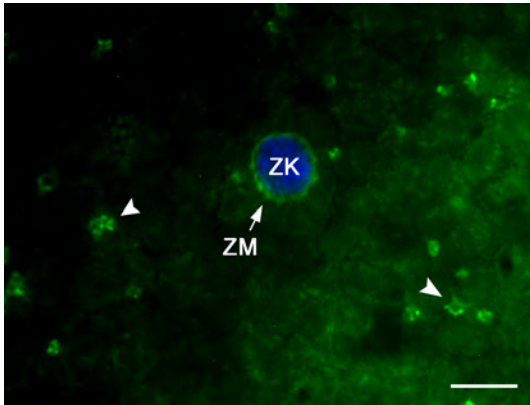


Abbildung 4.80: Lymphozyt, PHA-E-FITC ( Rind w, 6 Tage)

Die Zellmembran (ZM) des Lymphozyten zeigt eine deutlich positive Reaktion. Auch an die Granula der Thrombozyten bindet das Lektin stark (kleine Pfeile).

ZK = Zellkern

SB = 10  $\mu\text{m}$

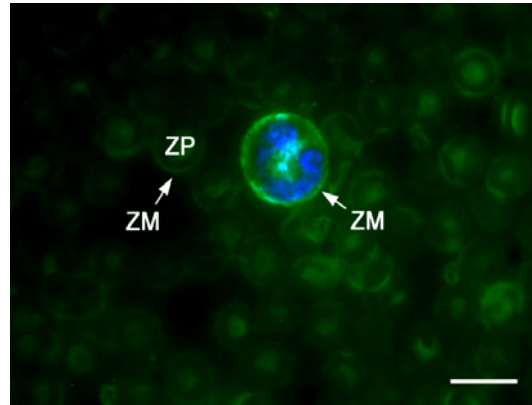


Abbildung 4.81: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC (Rind w, 4,1 Jahre)

Vor allem die Zellmembran (ZM) zeigt eine stark positive Reaktion mit dem Lektin. Bei den Erythrozyten sind sowohl die Zellmembran (ZM) als auch das Zytoplasma (ZP) positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

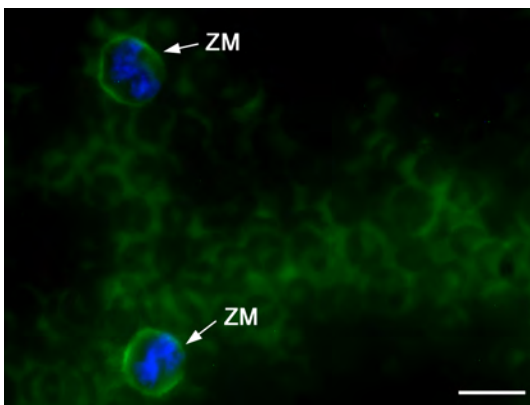


Abbildung 4.82: Segmentkernige neutrophile Granulozyten, PHA-E-FITC (Rind m, 20 Monate)

Die positive Reaktion ist auf die Zellmembran (ZM) beschränkt.

SB = 10  $\mu\text{m}$

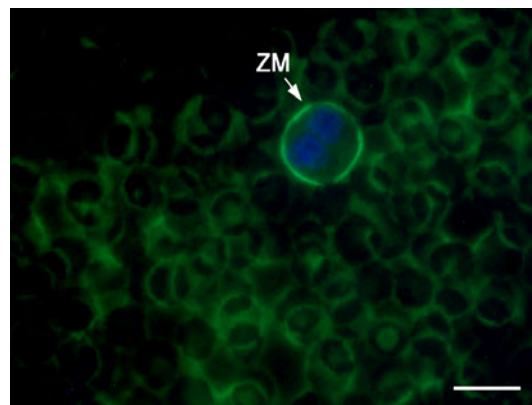


Abbildung 4.83: Eosinophiler Granulozyt, PHA-E-FITC (Rind m, 20 Monate)

Auch bei diesem eosinophilen Granulozyten zeigt nur die Zellmembran (ZM) eine stark positive Reaktion mit dem Lektin.

SB = 10  $\mu\text{m}$

#### **4.4.7.2 Bindung von *Phaseolus vulgaris* L Agglutinin (PHA–L–FITC)**

Eine Bindung von PHA–L–FITC an die Erythrozytenmembran konnte nur in einem Ausstrich festgestellt werden, ansonsten war entweder keine Reaktion sichtbar, oder das Zytoplasma stellte sich geringgradig aufgehellt dar. Es waren keine Thrombozyten zu erkennen. An der Zellmembran der Lymphozyten konnte häufig keine oder eine schwach positive Reaktion festgestellt werden. Lediglich in einem Fall reagierten die Lymphozyten deutlich positiv. Dabei handelte es sich um den gleichen Ausstrich, in dem auch die positive Erythrozytenmembran gefunden wurde. Bei den neutrophilen Granulozyten war die Bindung des Lektins an das Zytoplasma häufig schwach positiv, in einigen Ausstrichen war auch eine deutliche Bindung des Lektins zu beobachten. Bei den Monozyten war eine schwache Bindung des Lektins im Zytoplasma zu sehen. Die Granula der eosinophilen Granulozyten wiesen dagegen eine etwas stärkere Reaktion auf. In Tabelle 4.24 sind die Ergebnisse der Lektinbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.4. GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.24: Einzelauswertung Lektine: PHA-L-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |            |           |          | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|------------|-----------|----------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)       | 2 (++)    | 3 (+++)  |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |            |           |          |                                |
| Membran                         | 21 (95,9%)                    | 0          | 1 (4,5%)  | 0        | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 7 (31,8%)                     | 14 (63,6%) | 1 (4,5%)  | 0        | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |            |           |          |                                |
| Membran                         | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0        | 100%                           |
| Granula                         | 22 (100%)                     | 0          | 0         | 0        | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |            |           |          |                                |
| Membran                         | 9 (40,9%)                     | 12 (54,5%) | 0         | 1 (4,5%) | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 14 (63,6%)                    | 8 (36,4%)  | 0         | 0        | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |            |           |          |                                |
| Membran                         | 19 (86,4%)                    | 2 (9,1%)   | 1 (4,5%)  | 0        | 100%                           |
| Granula                         | 1 (4,5%)                      | 8 (36,4%)  | 11 (50,%) | 2 (9,1%) | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 1 (4,5%)                      | 13 (59,1%) | 8 (36,4%) | 0        | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |            |           |          |                                |
| Membran                         | 7 (100%)                      | 0          | 0         | 0        | 31,8%                          |
| Granula                         | 1 (14,3%)                     | 2 (28,6%)  | 4 (57,1%) | 0        | 31,8%                          |
| Zytoplasma                      | 5 (71,4%)                     | 2 (28,6%)  | 0         | 0        | 31,8%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |            |           |          |                                |
| Membran                         | -                             | -          | -         | -        | -                              |
| Granula                         | -                             | -          | -         | -        | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -          | -         | -        | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |            |           |          |                                |
| Membran                         | 2 (100%)                      | 0          | 0         | 0        | 9,1%                           |
| Zytoplasma                      | 1 (50,0%)                     | 1 (50,0%)  | 0         | 0        | 9,1%                           |



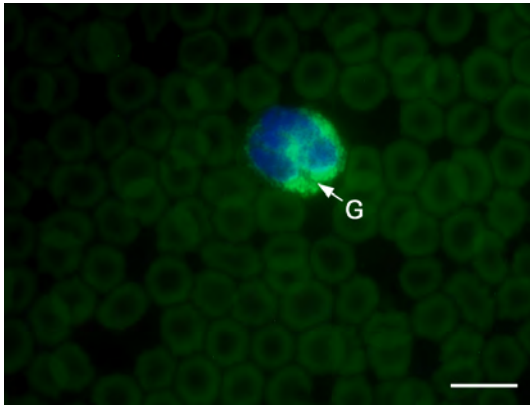


Abbildung 4.84: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA-L-FITC (Rind w, 2 Tage)

Die Granula (G) dieses neutrophilen Granulozyten reagieren stark positiv.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

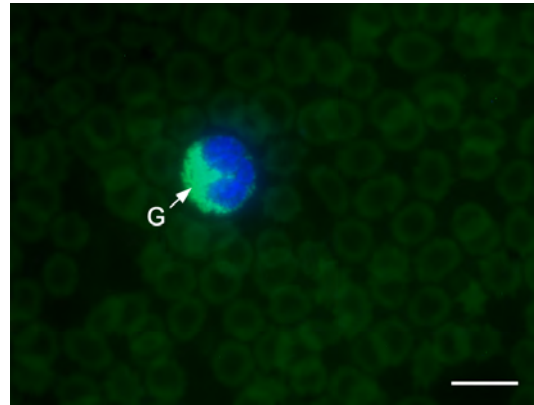


Abbildung 4.85: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA-L-FITC (Rind w, 2 Tage)

Das Lektin bindet deutlich an die Granula (G) im Zytoplasma.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

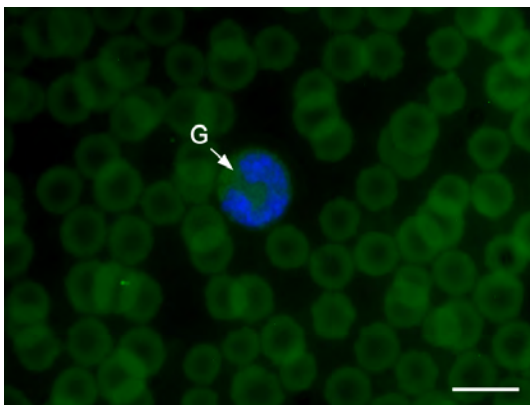


Abbildung 4.86: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA-L-FITC (Rind w, 4,1 Jahre)

Die Granula (G) des unreifen Granulozyten zeigen nur eine schwach positive Reaktion.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

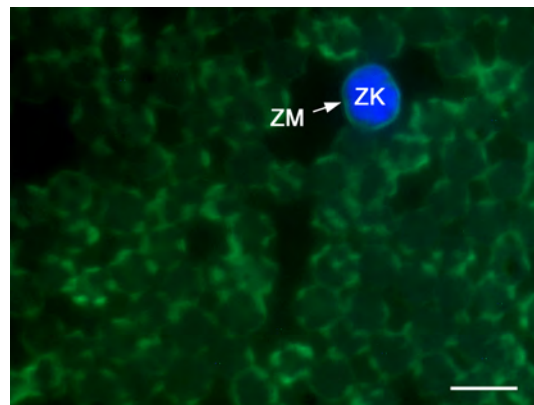


Abbildung 4.87: Lymphozyt, PHA-L-FITC (Rind m, 20 Monate)

Das Lektin bindet schwach an die Zellmembran (ZM) des Lymphozyten.  
ZK = Zellkern  
SB = 10  $\mu\text{m}$

Die schwach positiv reagierenden Lektine wurden nochmals mit einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden, 2 Stunden und 2 Stunden im Kühlschrank getestet. Bei der Auswertung waren keine Unterschiede zu den bereits vorliegenden Ergebnissen feststellbar.

#### **4.4.8 Ergebnisse der Zuckerhemmung**

Die Lektine WGA, WGAs, ConA, LCA PSA, PNA, RCA, SBA, PHA–E wurden vor dem Auftragen auf das Präparat mit ihrem entsprechenden Hemmzucker bzw. bei PHA–E mit Essigsäure inkubiert und dann nochmals auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht. In allen Ausstrichen konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Lektins durch den entsprechenden Zucker gehemmt werden konnte, da in allen Fällen eine Bindung der Lektine an verschiedene Strukturen der Blutzellen unterblieb.

#### **4.4.9 Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase**

Beim Vergleich der vorbehandelten Präparate mit den nach dem normalen Protokoll gefärbten Ausstrichen konnte keine verstärkte Bindung der Lektine UEA, WGA oder RCA festgestellt werden. Zellen, welche vorher nur schwach positiv waren, waren auch jetzt noch schwach positiv. Es konnten auch keine neuen Lektin-Bindungsstellen ausgemacht werden.

### **4.5 Immunzytochemische Untersuchungen**

Es wurden drei Antikörper auf ihre Bindung an die einzelnen Blutzellen hin untersucht. Dabei wurde wie bei den Lektinen eine negative (0), schwach positive (+), deutlich positive (++) und stark positive (+++) Reaktion unterschieden. Die Antikörper wurden mit FITC–markierten Anti–Antikörpern sichtbar gemacht. Auch bei den immunzytochemischen Untersuchungen wurde eine Kernfärbung mit der DAPI–Farbstofflösung durchgeführt.

Die für die einzelnen Antikörper erstellten Tabellen sind wie bei den Lektinen aufgebaut.

#### **4.5.1 Bindung der LCT30A–Antikörper**

In keinem Ausstrich konnte eine Bindung dieses Antikörpers an die Lymphozyten festgestellt werden. Vereinzelt reagierten die Zellmembran der Erythrozyten und die der neutrophilen Granulozyten schwach positiv. Auch die Granula der eosinophilen Granulozyten zeigten eine schwach positive Reaktion. In Tabelle 4.25 sind die Ergebnisse der Antikörperbindung noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.25: Einzelauswertung Antikörper: LCT30A-FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |        |         | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|--------|---------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++) | 3 (+++) |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 6 (60,0%)                     | 4 (40,0%) | 0      | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 5 (50,0%)                     | 5 (50,0%) | 0      | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0      | 0       | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 3 (100%)                      | 0         | 0      | 0       | 30,0%                          |
| Granula                         | 0                             | 3 (100%)  | 0      | 0       | 30,0%                          |
| Zytoplasma                      | 3 (100%)                      | 0         | 0      | 0       | 30,0%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -      | -       | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -      | -       | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -      | -       | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |        |         |                                |
| Membran                         | 1 (100%)                      | 0         | 0      | 0       | 10,0%                          |
| Zytoplasma                      | 1 (100%)                      | 0         | 0      | 0       | 10,0%                          |

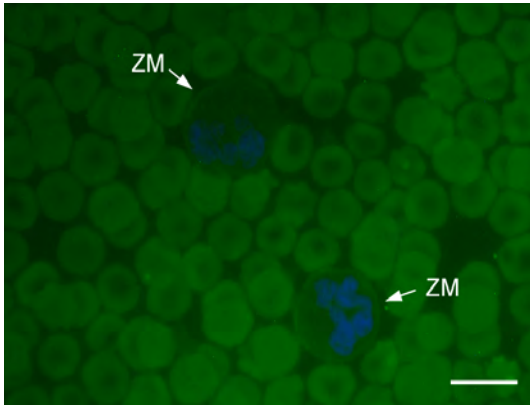


Abbildung 4.88: Segmentkernige neutrophile Granulozyten, LCT30A-FITC (Rind m, 25 Tage)

Lediglich die Zellmembranen (ZM) zeigen eine schwach positive Reaktion.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

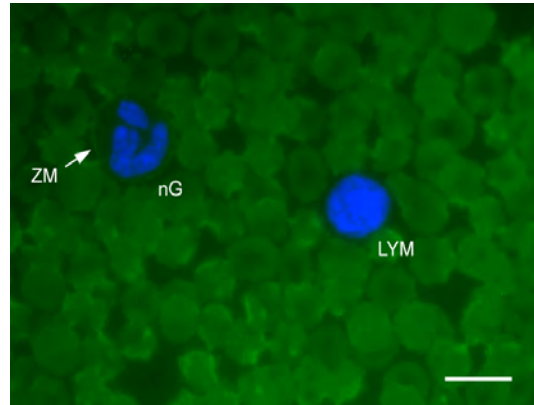


Abbildung 4.89: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, LCT30A-FITC (Rind w, 14 Tage)

Der Lymphozyt (LYM) weist keine Bindung des Lektins auf.  
nG = neutrophiler Granulozyt  
SB = 10  $\mu\text{m}$

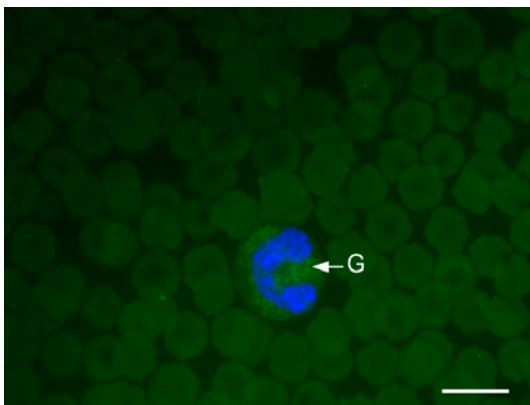


Abbildung 4.90: Eosinophiler Granulozyt, LCT30A-FITC (Rind m, 20 Monate)

Die Granula (G) reagieren schwach positiv.  
SB = 10  $\mu\text{m}$

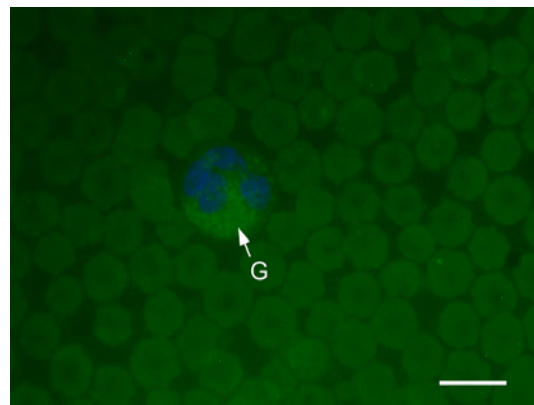


Abbildung 4.91: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, LCT30A-FITC (Rind m, 20 Monate)

Das Lektin bindet schwach positiv an die Granula (G).  
SB = 10  $\mu\text{m}$

### **4.5.2 Bindung der CD4–Antikörper**

In allen Präparaten war eine schwache bis deutlich positive Reaktion der Erythrozytenmembran erkennbar. Die Zellmembran der Lymphozyten hingegen reagierte nur sehr schwach positiv, bei zwei Tieren verlief die Reaktion negativ. Bei den neutrophilen Granulozyten war in allen Fällen die Zellmembran meist deutlich angefärbt, ebenso die Granula der eosinophilen Granulozyten. Bei den Monozyten konnte keine Reaktion festgestellt werden. In Tabelle 4.26 sind die Ergebnisse der Antikörperbindung noch einmal zusammengefasst.

#### 4.5. IMMUNZYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 4.26: Einzelauswertung Antikörper: CD4–FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |         | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|---------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)    | 3 (+++) |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 0                             | 4 (40%)   | 6 (60%)   | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 2 (20,0%)                     | 8 (80,0%) | 0         | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 0                             | 4 (40,0%) | 6 (60,0%) | 0       | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0       | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | 1 (50%)                       | 0         | 1 (50%)   | 0       | 20,0%                          |
| Granula                         | 0                             | 0         | 2 (100%)  | 0       | 20,0%                          |
| Zytoplasma                      | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0       | 20,0%                          |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |         |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -       | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -       | -                              |
| Zytoplasma                      |                               |           |           |         |                                |
| <b>Monozyten</b>                | -                             | -         | -         | -       | -                              |
| Membran                         | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0       | 20,0%                          |
| Zytoplasma                      | 2 (100%)                      | 0         | 0         | 0       | 20,0%                          |

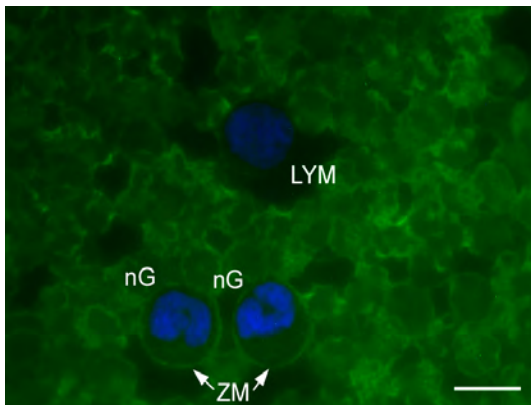


Abbildung 4.92: Lymphozyt und neutrophile Granulozyten, CD4-FITC (Rind w, 14 Tage)

Die Zellmembran des Lymphozyten (LYM) zeigt nur eine sehr schwache Reaktion, während die Zellmembran (ZM) der neutrophilen Granulozyten (nG) eine deutlich positive Reaktion aufweist.

SB = 10  $\mu\text{m}$

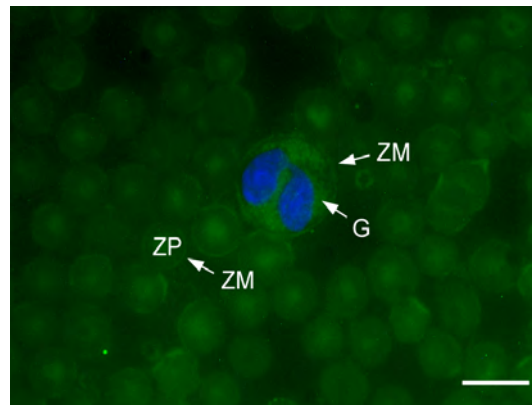


Abbildung 4.93: Eosinophiler Granulozyt, CD4-FITC (Rind w, 4,5 Jahre)

Sowohl die Zellmembran (ZM) als auch die Granula (G) zeigen eine deutlich positive Reaktion. Auch die Zellmembran (ZM) und das Zytoplasma (ZP) der Erythrozyten ist deutlich positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

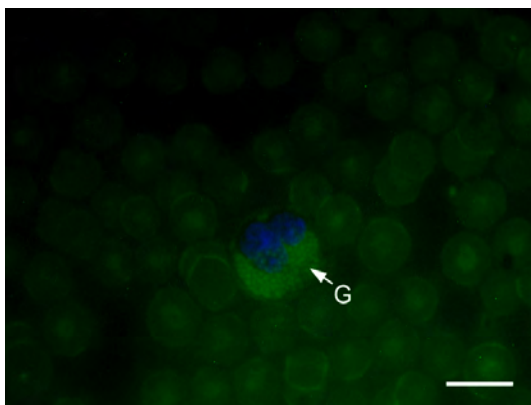


Abbildung 4.94: Eosinophiler Granulozyt, CD4-FITC (Rind m, 20 Monate)

Nur die Granula (G) reagieren positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

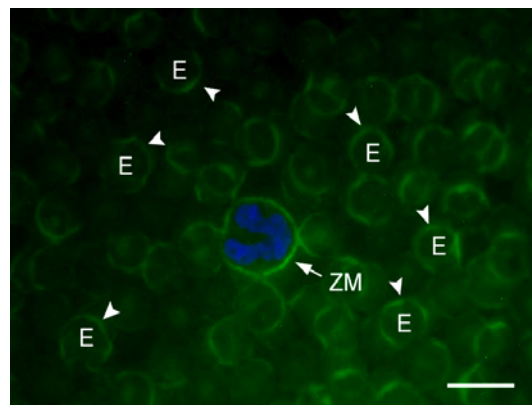


Abbildung 4.95: Neutrophiler Granulozyt, CD4-FITC (Rind m, 20 Monate)

Das Lektin bindet stark an die Zellmembran (ZM) des Granulozyten, sowie an die Zellmembran (kleine Pfeile) der Erythrozyten.

SB = 10  $\mu\text{m}$

### **4.5.3 Bindung der CD8–Antikörper**

Die Bindung dieses Antikörpers an die Lymphozyten verlief stets positiv jedoch je nach Präparat mit unterschiedlicher Intensität. So wurde bei der Hälfte der Tiere eine stark positive Reaktion der Zellmembran beobachtet, bei der anderen Hälfte traten deutlich positive und schwach positive Reaktionen auf. Die Ergebnisse an der Zellmembran der neutrophilen Granulozyten waren meist schwach positiv, teilweise sogar negativ. Bei den Erythrozyten traten sowohl negative, schwach positive und deutlich positive Ergebnisse auf. In Tabelle 4.27 sind die Ergebnisse der Antikörperbindung noch einmal zusammengefasst.



Tabelle 4.27: Einzelauswertung Antikörper: CD8–FITC

|                                 | Stärke der positiven Reaktion |           |           |           | Anzahl der positiven Präparate |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------|
|                                 | 0                             | 1(+)      | 2 (++)    | 3 (+++)   |                                |
| <b>Erythrozyten</b>             |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 2 (20,0%)                     | 2 (20,0%) | 4 (40,0%) | 2 (20,0%) | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 9 (90,0%)                     | 1 (10,0%) | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Thrombozyten</b>             |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Lymphozyten</b>              |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 0                             | 3 (30,0%) | 2 (20,0%) | 5 (50,0%) | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Neutrophile Granulozyten</b> |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | 2 (20,0%)                     | 6 (60,0%) | 2 (20,0%) | 0         | 100%                           |
| Granula                         | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 100%                           |
| Zytoplasma                      | 10 (100%)                     | 0         | 0         | 0         | 100%                           |
| <b>Eosinophile Granulozyten</b> |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| <b>Basophile Granulozyten</b>   |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Granula                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      |                               |           |           |           | -                              |
| <b>Monozyten</b>                |                               |           |           |           |                                |
| Membran                         | -                             | -         | -         | -         | -                              |
| Zytoplasma                      | -                             | -         | -         | -         | -                              |

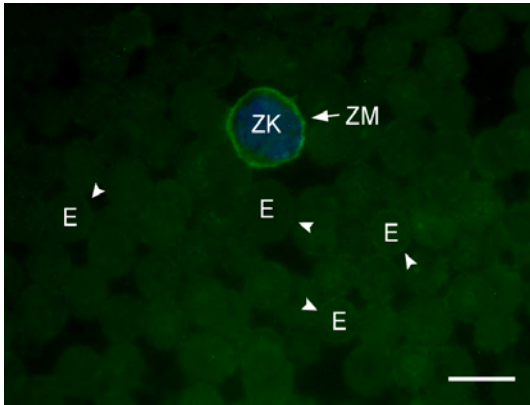


Abbildung 4.96: Lymphozyt, CD8-FITC (Rind m, 25 Tage)

Der Antikörper zeigt eine stark positive Reaktion an der Zellmembran (ZM). Die Zellmembran (kleine Pfeile) der Erythrozyten (E) ist schwach positiv.

ZK = Zellkern

SB = 10  $\mu\text{m}$

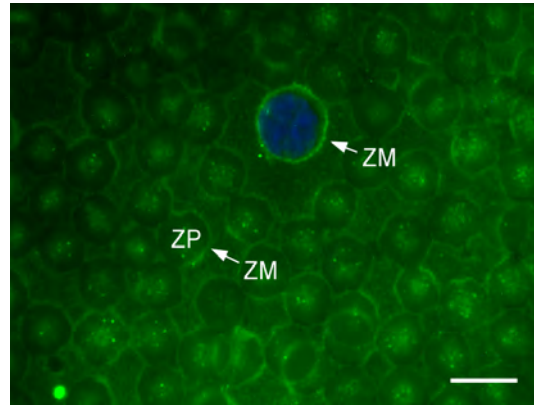


Abbildung 4.97: Lymphozyt, CD8-FITC (Rind w, 4,5 Jahre)

Die Zellmembran des Lymphozyten ist deutlich positiv. Bei den Erythrozyten ist sowohl an der Zellmembran (ZM) als auch im Zytoplasma (ZP) eine deutliche positive Reaktion erkennbar.

SB = 10  $\mu\text{m}$

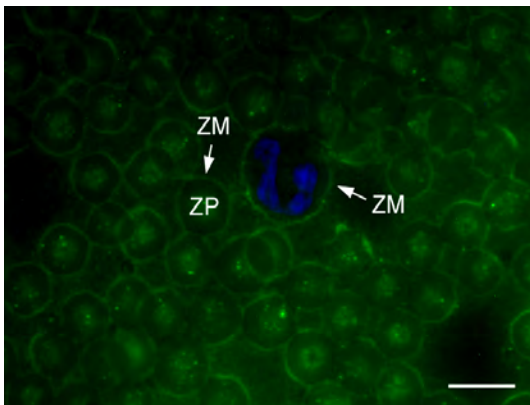


Abbildung 4.98: Neutrophiler Granulozyt, CD8-FITC (Rind w, 4,5 Jahre)

Die Zellmembran (ZM) des Granulozyten zeigt eine deutlich positive Reaktion.

ZP = Zytoplasma

SB = 10  $\mu\text{m}$

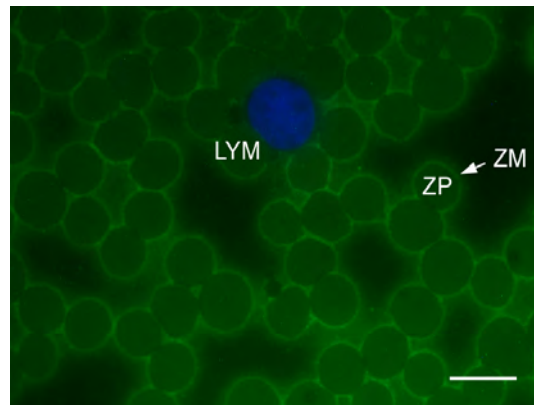


Abbildung 4.99: Lymphozyt, CD8-FITC (Rind m, 20 Monate)

Bei diesem Lymphozyten hat keine Bindung des Lektins stattgefunden. Zellmembran (ZM) und Zytoplasma (ZP) der Erythrozyten sind hingegen stark positiv.

SB = 10  $\mu\text{m}$

# Kapitel 5

## Diskussion

Ziel dieser Arbeit war zum einen, die Morphologie der Blutzellen des Rindes elektronenmikroskopisch und mittels Übersichtsfärbungen auch lichtmikroskopisch näher zu untersuchen. Zum anderen sollten mithilfe verschiedener pflanzlicher Lektine die Zuckerstrukturen der Blutzellen charakterisiert werden. Ausserdem wurden drei verschiedenen Antikörper eingesetzt, mit deren Hilfe die Lymphozyten-Populationen voneinander unterschieden werden sollten.

### 5.1 Blutproben

Für diese Untersuchungen wurde das Blut von insgesamt 46 Tieren der Rasse Fleckvieh verwendet. Dabei wurde zum einen zwischen jungen und adulten Tieren unterschieden, sowie zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Daraus ergaben sich drei Gruppen, nämlich Kälber, Bullen und Kühe. Die Kälber waren 1 Tag bis 4,6 Monate alt, die Bullen 20 Monate. Nur ein Bulle war 5 Jahre alt. Das Alter der Kühe betrug zwischen 2,6 und 7 Jahren. Bei den Kälbern waren 8 Tiere männlich und 10 Tiere weiblich.

Bei der Auswertung der Blutbilder der einzelnen Tiere waren die Werte des roten Blutbildes der Kälber höher als die der Bullen und Kühe. Die Werte der Bullen lagen über denen der Kühe. Diese Feststellung deckt sich mit denen von Jain ([58, Jain, 1993]) und Kramer ([68, Kramer, 2000]), dass Rinder nach der Geburt hohe Erythrozytenzahlen aufweisen, sowie dass diese bei adulten männlichen Tieren höher sind als bei weiblichen. Bei einem Vergleich der Anzahl der Leukozyten war zu erkennen, dass diese bei den Kälbern ebenfalls am höchsten waren. Jedoch wiesen auch die Bullen deutlich höhere Werte auf als die Kühe. Die erhöhten Werte der Bullen können auf eine Streßsituation zurückgeführt werden, da das Blut direkt nach der Betäubung der Tiere am Schlachthof entnommen wurde. Der Transport und auch die Wartezeit am Schlachthof

führen bei den Tieren zu Aufregung und Streß, was sich in einer Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl widerspiegelt. Jungtiere besitzen in der Zeit nach der Geburt oftmals eine höhere Anzahl an Leukozyten als adulte Tiere ([58, Jain, 1993]). Das Blutbild der Kühe spiegelte das lymphozytäre Blutbild der Wiederkäuer wieder, da die Anzahl der Lymphozyten in den meisten Fällen deutlich über der Anzahl der Granulozyten lag. Bei den Bullen lagen die Werte der Lymphozyten unter denen der „anderen Leukozyten“ (AND). Das Kompartiment der „anderen Leukozyten“ besteht zum größten Teil aus neutrophilen Granulozyten. Ihre Anzahl im Blut ist bei Aufregung und Streß erhöht, was dann wiederum zu der oben erwähnten Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl führt ([58, Jain, 1993]). Bei den Kälbern war die Verteilung der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten abhängig vom Alter. Die Tiere zwischen 2 und 18 Tagen besaßen mehr neutrophile Granulozyten als Lymphozyten. Bei den älteren Kälbern war es dann umgekehrt, so dass die Lymphozyten höhere Werte aufwiesen. Jain und Kramer stellten fest, dass bei Rindern nach der Geburt bis zu einem Alter von etwa 2 Wochen die neutrophilen Granulozyten die dominierende Gruppe unter den Leukozyten darstellen und erst danach die Anzahl der Lymphozyten ansteigt ([58, Jain, 1993];[68, Kramer, 2000]).

## 5.2 Lichtmikroskopie

Die Blutausstriche wurden mit den Übersichtsfärbungen Diff–Quick, Giemsa, Pappenheim und May–Grünwald gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop betrachtet. In den meisten Färbelösungen ist unter anderem der saure Farbstoff Eosin oder der basische Farbstoff Hämatoxylin enthalten. Saure Zellkomponenten binden basische Farbstoffe unter Bildung farbiger Niederschläge und werden daher als basophil bezeichnet. Umgekehrt binden basische Zellkomponenten saure Farbstoffe und sind daher azidophil. Im Falle des basischen Hämatoxylins bildet dieses mit sauren Zellkomponenten, wie z.B. dem Chromatin, eine blau–lila Farbe aus. Bei dem sauren Eosin hingegen wird mit den basischen Zellkomponenten, wie z.B. der RNA im Zytoplasma, eine pink–rote Farbe gebildet ([66, Banks, 1986]).

Die Erythrozyten des Rindes stellen sich wie in der Literatur beschrieben als kernlose, scheibenförmige Zellen dar ([68, Kramer, 2000]). Außer bei den Säugetieren sind die Erythrozyten der Wirbeltiere immer oval und kernhaltig, so auch bei den Vögeln, den Fischen und den Reptilien ([49, Hawkey und Denett, 1990];[66, Kolb, 1991]). Eine Ausnahme zu den stets runden Erythrozyten der Säugetiere bilden die ovalen roten Blutkörperchen der Kameliden. Diese werden auch als Elliptozyten bezeichnet ([93, Hees und Tschudi, 1990]). Die Größe der Erythrozyten variiert stark zwischen den einzelnen Wirbeltierklassen und den unterschiedlichen Tierarten. Die

größten Erythrozyten besitzen die Amphibien, bei denen der Aalmolch die größten Zellen besitzt ([49, Hawkey und Denett, 1990]). Die Erythrozyten sind die mit Abstand häufigsten Zellen im Blut, und waren daher in jedem Ausstrich zahlreich vorhanden. Bei einigen Präparaten war eine so genannte Geldrollenbildung der Erythrozyten zu erkennen. Dabei liegen die Erythrozyten mit ihren flachen Seiten aneinander und lassen somit unterschiedlich lange Zellreihen entstehen ([49, Hawkey und Denett, 1990]). Mithilfe dieser Formation gelingt es den Erythrozyten durch die kleinsten Kapillaren zu gelangen ([66, Banks, 1986]). Diese Geldrollenbildung kommt regelmäßig bei den Erythrozyten der Pferde und der Schweine vor, gelegentlich auch bei Hunden und Katzen ([58, Jain, 1993]). Im Blut der Rinder ist die Geldrollenbildung jedoch nicht physiologisch und stellt vor allem eine Antwort auf eine Entzündung dar ([68, Kramer, 2000]). Junge Erythrozyten der Rinder und Schafe besitzen manchmal eine sogenannte „basophile Tüpfelung“ ([58, Jain, 1993]). Diese tritt vor allem bei vermehrter Regeneration z.B. nach einer Anämie auf, jedoch auch bei einer Vergiftung mit Schwermetallen ([66, Banks, 1986]). Eine „basophile Tüpfelung“ konnte ich in keinem meiner Ausstriche erkennen. In einigen Ausstrichen war deutlich zu sehen, dass nicht alle Erythrozyten gleich groß sind, sondern eine unterschiedliche Größe aufweisen. Dies wird als Anisozytose bezeichnet und kommt physiologisch im Blut des Rindes vor ([66, Banks, 1986];[17, Brown, 1987];[49, Hawkey und Denett, 1990]). Als Poikilozytose wird die Vielgestaltigkeit der Erythrozyten bezeichnet, das heißt eine unterschiedliche Form der Erythrozyten ([66, Banks, 1986];[49, Hawkey und Denett, 1990]). In einigen meiner Präparate war eine so genannte Stechapfelform erkennbar, bei welcher die Zellen Ausläufer besitzen. Diese Form tritt auf, wenn dicke Ausstriche zu langsam trocknen ([67, Kraft et al., 1997]), oder wenn beim Abnehmen des Blutes das Blut in hypertonen Lösungen aufgefangen wird ([49, Hawkey und Denett, 1990];[93, Hees und Tschudi, 1990]). Die dabei entstehenden stechapfelförmigen Zellen werden als Akanthozyten oder Echinozyten bezeichnet ([93, Hees und Tschudi, 1990]). Eine weitere beobachtete Formabweichung waren tropfenförmige Erythrozyten. Diese werden als Dacryozyten bezeichnet und kommen sowohl wiederum als Artefakt bei zu langsamen Trocknen vor, sind jedoch auch bei Krankheit und physiologisch im Blut junger Ziegen enthalten ([66, Banks, 1986];[93, Hees und Tschudi, 1990]).

Die Thrombozyten des Rindes sind kleine, ovale Zellen, die ebenfalls keinen Zellkern besitzen. Aus diesem Grund wird von manchen Autoren die Bezeichnung „Thrombozyt“ nur für die kernhaltigen Zellen der Vögel und Reptilien verwendet. Die Thrombozyten der Säuger, welche aus dem Zytoplasma der Megakaryozyten gebildet werden, werden als „Blutplättchen“ bezeichnet ([49, Hawkey und Denett, 1990]). Strukturell kann bei den Thrombozyten ein dunkleres Granulomer und ein helleres Hyalomer unterschieden werden. Im Granulomer befinden sich die

Zellorganelle und die Granula, das Hyalomer besteht aus Zytoplasma und Mikrotubuli ([66, Banks, 1986];[93, Hees und Tschudi, 1990];[122, Sinowatz, 2000]). Diese Einteilung war bei meinen Ausstrichen nur bei der Diff–Quick–Färbung deutlich zu sehen, ansonsten stellten sich die Thrombozyten homogen angefärbt dar. Unter den Haussäugetieren besitzen die Rinder, Schafe und Pferde die kleinsten Thrombozyten, die der Katzen sind am größten. Dazwischen liegen die Thrombozyten von Hunden und Schweinen. Die höchste Anzahl an Thrombozyten unter den Haussäugetieren findet sich im Blut der Rinder, bei den Pferden kommen sie in der geringsten Anzahl vor ([58, Jain, 1993]).

Bei Steffens findet sich eine Einteilung der Lymphozyten des Rindes in drei unterschiedliche Größen, nämlich kleine, mittlere und große Lymphozyten ([125, Steffens, 2000]). Auch in den von mir untersuchten Blutausstrichen besaßen die Lymphozyten eine unterschiedliche Größe, die kleineren Lymphozyten mit einer Größe von etwa 6 – 8  $\mu\text{m}$  waren jedoch am häufigsten vertreten. Die Form des Zellkerns war zumeist rund, teilweise war er aber auch auf einer Seite eingebuchtet. Der Kern füllte die Zelle zumeist fast vollständig aus, so dass nur ein kleiner Zytoplasmasaum zu sehen war. Jedoch variierte der Anteil an Zytoplasma stark von Zelle zu Zelle. Von einigen Autoren werden die Lymphozyten zusammen mit den Monozyten in die Gruppe der Agranulozyten eingeteilt ([66, Kolb, 1991];[9, Liebich, 2004]). Tatsächlich besitzen aber auch die Lymphozyten feine azurophile Granula, die sich meist im Bereich der Kerneinkerbung befinden ([93, Hees und Tschudi, 1990]). Diese Granula waren aber nicht immer sichtbar. Die Giemsa–Färbung war am besten dazu geeignet, diese Granula darzustellen.

Die neutrophilen Granulozyten werden daher als neutrophil bezeichnet, weil ihnen spezifische eosinophile oder basophile Granula fehlen ([49, Hawkey und Denett, 1990]). Da sie sich sowohl mit sauren als auch mit basischen Farbstoffen leicht anfärben, besitzen sie eine so genannte „färberische Neutralität“ ([93, Hees und Tschudi, 1990]). Generell sind die Granula jedoch nur sehr schwach anfärbbar ([66, Kolb, 1991]). In meinen Ausstrichen waren diese Granula gut mit der May–Grünwald und der Pappenheim–Färbung darzustellen. Die neutrophilen Granulozyten der Vögel und Reptilien enthalten sehr viele eosinophile Granula; sie werden daher als Heterophile bezeichnet ([49, Hawkey und Denett, 1990]). Wie bei Lösch et al. ([78, Lösch et al., 2000]) beschrieben, stellten sich bei meinen Untersuchungen die neutrophilen Granulozyten als runde Zellen dar, die einen segmentierten Kern, sowie viel Zytoplasma besitzen. Meistens waren drei bis vier Segmente sichtbar. Durch diese Segmentierung können die einzelnen Kernabschnitte in einer Reihe angeordnet werden, was den neutrophilen Granulozyten eine schnelle Migration zwischen den Endothelzellen ermöglicht ([94, Paape et al., 2003]). Sind mehr als fünf Segmente vorhanden, spricht man von einer Hypersegmentierung. Diese ist ein Zeichen von Überalterung

([93, Hees und Tschudi, 1990]). Die unreifen oder jugendlichen neutrophilen Granulozyten hingegen besitzen einen stabkernigen Zellkern ([94, Paape et al., 2003]; [58, Jain, 1993]). Dieser ist hufeisenförmig gebogen und nimmt viel Platz in der Zelle ein. In den untersuchten Blutausstrichen waren nur sehr selten stabkernige Granulozyten anzutreffen. Dies ist nicht verwunderlich, da die physiologische Anzahl der stabkernigen Granulozyten im Blut nur sehr gering ist. Im Blut des Rindes beträgt ihre Anzahl maximal lediglich 120 /  $\mu$ l. Damit sind sie zahlenmäßig sogar noch weniger als die basophilen Granulozyten vertreten ([126, Stöber und Gründer, 1990]; [51, Hofmann, 2005]; [58, Jain, 1993]). Eine Erhöhung der Anzahl an stabkernigen neutrophilen Granulozyten, z.B. bei Entzündungen, wird als Linksverschiebung bezeichnet.

Die eosinophilen Granulozyten waren gut an den zahlreichen, kleinen roten Granula zu erkennen, die die gesamte Zelle ausfüllten. Sie waren mit jeder der vier Übersichtsfärbungen gut darstellbar, bei der Diff-Quick-Färbung waren sie etwas undeutlicher als bei den anderen. Die Gestalt der Granula ist spezieabhängig. Die kleine runde, einheitliche Form ist charakteristisch für die eosinophilen Granulozyten des Rindes. Das Pferd besitzt die größten Granula unter den Haussäugetieren, welche so dicht gepackt in der Zelle vorkommen, dass sich die Zellmembran himbeerförmig über die Granula wölbt ([58, Jain, 1993]). In den Granula ist unter anderem Leukotrien B<sub>4</sub> enthalten. Im Gegensatz zu den eosinophilen Granulozyten der Menschen und der Pferde werden keine spasmogenen Leukotriene gebildet ([36, Freiburghaus und Jörg, 1990]). Bei allergischen Reaktionen wie z.B. Asthma kommt es typischerweise zu einer erhöhten Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Blut. Bei Rindern sind derartige asthmatische Erkrankungen, wie sie bei Mensch und Pferd vorkommen, nicht bekannt. Bei der Auswertung war festzustellen, dass der Kern der eosinophilen Granulozyten meistens nur zwei Segmente aufwies. Auch Jain beschreibt, dass der Kern der eosinophilen Granulozyten deutlich weniger segmentiert ist als der der neutrophilen Granulozyten ([58, Jain, 1993]).

Die Monozyten sind die größten der Blutzellen. Die Gestalt ihres Kerns kann sehr unterschiedlich sein, meistens besitzt er aber eine hufeisenförmige oder nur leicht eingebuchtete Form ([58, Jain, 1993]; [4, Al-Izzy et al., 1982]). Die von mir gefundenen Monozyten besaßen zumeist einen leicht eingebuchteten Kern. Jedoch waren in meinen Ausstrichen die Monozyten nicht häufig zu sehen. Dies liegt zum einen daran, dass die Monozyten beim Rind und vielen anderen Tierarten im Blut nur in einer geringen Anzahl vorkommen. Im Gegensatz dazu sind sie z.B. bei Elefanten recht häufig vorhanden ([49, Hawkey und Denett, 1990]). Zum anderen können die Monozyten des Rindes aufgrund der Vielgestaltigkeit ihres Kerns und dem seltenen Auftreten von azurophilen Granula morphologisch nur sehr schwer von großen Lymphozyten unterschieden werden ([66, Banks, 1986]; [17, Brown, 1987]). Am besten stellten sich die Monozyten in

meinen Präparaten mit der Giemsa-Färbung dar. Die wichtigste Aufgabe der Monozyten besteht in der Phagozytose. Nach nur einem sehr kurzen Aufenthalt in der Blutbahn wandern sie in die Gewebe aus und können dort nach der Differenzierung zum Makrophagen ihre Aufgabe als Freßzellen erfüllen. Durch ihren großen runden oder gebogenen Kern fällt den Monozyten die Auswanderung zwischen den Endothelzellen nicht so leicht wie den neutrophilen Granulozyten mit ihrem segmentierten Kern ([94, Paape et al., 2003]). Das bovine Immundefizienz Virus (BIV) infiziert bevorzugt Monozyten und Makrophagen, jedoch kommt es erst im späten Verlauf der Infektion zu einer Herabsetzung der Monozyten- und Makrophagenfunktion. Dasselbe gilt für die HIV-Infektion des Menschen ([111, Rovid et al., 1995]). Im Gegensatz dazu werden die Lymphozyten bei einer Infektion mit HIV zerstört. Da dies bei den Makrophagen nicht der Fall ist, und es sich bei diesen um langlebige Zellen handelt, könnten sie als Virusreservoir für HIV dienen ([60, Kalter et al., 1991]).

## 5.3 Elektronenmikroskopie

Unter dem Elektronenmikroskop stellen sich die Erythrozyten als scheibenförmige Zellen dar, welche eine unterschiedliche Form haben. Neben den typischen runden Zellen kamen unter anderem auch napfförmige Zellen vor. Die leichte Verformbarkeit ist bedingt durch die bikonkave Form der Erythrozyten ([66, Banks, 1986]). Diese Form wird durch ein Membranskelett aufrechterhalten, welches vor allem das Strukturprotein Spektrin enthält ([93, Hees und Tschudi, 1990]). Die Verformbarkeit der Erythrozyten gewährleistet, dass sie auch durch die kleinsten Gefäße passen. Der homogene Zellinhalt besteht zum größten Teil aus dem Blutfarbstoff Hämoglobin. Dieser macht sogar 95% der Trockensubstanz der Erythrozyten aus ([9, Liebich, 2004]). Das Hämoglobin wird von den Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum gebildet ([66, Kolb, 1991]). Während ihrer Differenzierung kommt es zum Verlust der Organelle und zum Ausstoß des Zellkerns. Da sie keine Organelle mehr besitzen, sind die Erythrozyten also nicht mehr zur Produktion des Blutfarbstoffs fähig. Die im Elektronenmikroskop sichtbare elektronendichte Struktur der Erythrozyten ist bedingt durch den hohen Eisengehalt des Hämoglobins ([66, Kolb, 1991]). Da die Zellmembran für Hämoglobin nicht permeabel ist, ist dieses auch für die Osmolarität der Erythrozyten verantwortlich ([17, Brown, 1987]).

Die Thrombozyten zeigten eine unterschiedliche Größe und Form. Meistens waren sie oval, teilweise aber auch rund. Die durchschnittliche Größe betrug  $1,5 - 2 \mu\text{m}$ . Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Du Plesseis et al., welcher für die Länge der Thrombozyten durchschnittlich  $2,185$



$\mu\text{m}$  angibt ([29, Du Plessis et al., 1996]). Im Zytoplasma waren zahlreiche  $\alpha$ -Granula zu sehen, bei den „dense bodies“ hingegen waren pro Zelle etwa ein bis zwei in seltenen Fällen auch drei vorhanden. Wie auch in der Literatur beschrieben, wurden keine Einstülpungen der Zellmembran für ein offenes kanalikuläres System (OCS) gefunden ([143, Zucker–Franklin et al., 1985]; [29, Du Plessis, 1996]). Die Unterschiede zwischen menschlichen und bovinen Thrombozyten sind folgende: Die Thrombozyten des Menschen sind größer, sie besitzen weniger Mikrotubuli, haben ein offenes kanalikuläres System und weisen keine „dense bodies“ auf. Nach Brown kann auch im Elektronenmikroskop zwischen einem Hyalomer und einem Granulomer unterschieden werden ([17, Brown, 1987]). Dies war bei meinen Präparaten nicht der Fall, da die Granula in der ganzen Zelle verteilt vorlagen. Bestätigt wird dies durch verschiedene Untersuchungen, welche ergaben, dass bei den Thrombozyten des Rindes im Gegensatz zu denen des Menschen die Granula eher in der Peripherie der Zelle vorkommen ([138, White, 1987]; [85, Morimoto et al., 1990]).

Die Ultrastruktur der Lymphozyten entspricht derjenigen, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist ([58, Jain, 1993]; [68, Kramer, 2000]; [125, Steffens, 2000]). Im Zytoplasma waren die Mitochondrien sehr gut sichtbar. Die in der Literatur erwähnte große Menge an Ribosomen und Poyribosomen ([66, Banks, 1986]; [93, Hees und Tschudi, 1990]) war im Zytoplasma sehr gut zu erkennen.

Die reifen neutrophilen Granulozyten sind aufgrund ihres segmentierten Kerns einfach zu identifizieren. Daher werden sie als segmentkernige neutrophile Granulozyten bezeichnet. Als Besonderheit unter den Haussäugetieren besitzt das Rind drei verschiedene Arten an Granula ([42, Gennaro et al., 1983]; [8, Baggiolini et al., 1985]). Diese haben zwar ein unterschiedliches Aussehen, waren aber dennoch nicht leicht voneinander zu unterscheiden. Da sie neben der unterschiedlichen Gestalt aber auch einen unterschiedlichen Inhalt besitzen, können die einzelnen Granula mittels enzymhistochemischer Untersuchungen identifiziert werden. Die jugendlichen neutrophilen Granulozyten besitzen einen stabförmigen Kern. Je nach Grad der Reifung konnte unter dem Elektronenmikroskop eine beginnende Segmentierung des Zellkerns beobachtet werden. Dabei wird zunächst ein gelappter und dann ein segmentierter Kern gebildet. Von Lappung wird gesprochen, wenn die Tiefe der Einschnürung weniger als  $\frac{2}{3}$  des Kerndurchmessers ausmacht. Macht sie mehr aus, wird von Segmentierung gesprochen ([93, Hees und Tschudi, 1990]). Die eosinophilen Granulozyten sind charakterisiert durch ihre spezifischen eosinophilen Granula, die je nach Tierart eine unterschiedliche Struktur aufweisen. Es existieren homogene Granula, sowie kristalline oder lamelläre Granula, welche ein längliches lamellenartiges Eiweißkristalloid enthalten. Von verschiedenen Autoren wird angegeben, dass das Rind und das Pferd ausschließ-

lich homogene Granula besitzen, während sich beim Menschen, sowie bei Hund und Katze kristalline Granula finden ([17, Brown, 1987];[93, Hees und Tschudi, 1990];[9, Liebich, 2004]). Bei meinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte ich jedoch auch vereinzelt kristalloide Granula feststellen. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Freiburghaus und Jörg, welche in den bovinen Erythrozyten ebenfalls eine kleine Menge an kristalloiden Granula ausmachten ([36, Freiburghaus und Jörg, 1990]).

Bei der Untersuchung der Monozyten entsprach die sich unter dem Elektronenmikroskop darstellende Morphologie weitestgehend der in der Literatur beschriebenen ([4, Al-Izzy et al., 1982];[58, Jain, 1993];[125, Steffens, 2000]). In einigen Monozyten konnten deutliche Vakuolen im Zytoplasma beobachtet werden. Dabei handelt es sich um Lysosomen, die nur bei reifen Monozyten vorkommen. Die anderen Zellorganelle stellten sich mit Ausnahme der Mitochondrien nicht deutlich dar.

## 5.4 Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden insgesamt 17 verschiedene Lektine verwendet, wobei die Lektine ConA, LCA, PSA, GSL-1, PNA, RCA, WGA, WGAs, DBA, SJA, SBA, UEA-1, PHA-E und PHA-L mit FITC markiert waren. Die Lektine MAA, SNA und VAA lagen biotinyliert vor. Es wurde gleichzeitig eine Kernfärbung mit einer Dapi-Farbstofflösung durchgeführt, um die einzelnen Zellen anhand der Morphologie und Größe ihrer Kerne voneinander unterscheiden zu können.

Die Erythrozyten der für diese Untersuchung herangezogenen Rinder zeigten eine deutlich positive Reaktion mit den Lektinen ConA, LCA, PHA-E, RCA, WGA und SNA. Die Lektine DBA, GSL-1, PHA-L, PSA, SJA, VAA und MAA reagierten nur schwach positiv, während bei den Lektinen PNA, SBA und WGAs keine Reaktion mit den Erythrozyten erkennbar war. Die Bindung von UEA verlief bei etwa der Hälfte der Präparate negativ, während bei der anderen Hälfte eine leichte Aufhellung des Zytoplasmas erkennbar war. Diese Ergebnisse stimmen mit den Feststellungen von Newman und Uhlenbruck überein, welche ebenfalls eine positive Bindung von WGA, sowie ein fehlende Bindung von PNA an den bovinen Erythrozyten nachwiesen. Jedoch zeigten bei deren Untersuchungen im Gegensatz zu meinen auch die Lektine PHA-E, LCA, RCA, ConA und UEA keine Reaktion mit den Erythrozyten ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977]). Auch Sumner und Howell stellten eine negative Bindung für ConA fest ([129, Sumner und Howell, 1936]). Übereinstimmend waren meine Untersuchungen auch mit denen von Emerson und Kornfeld hinsichtlich der positiven Reaktion von PHA-E, LCA, RCA und

WGA ([32, Emerson und Kornfeld, 1976]). Die Erythrozyten des Menschen zeigen erst nach Vorbehandlung mit Neuraminidase eine positive Reaktion von PNA ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977]); dies konnte ich mit meinen Untersuchungen nicht bestätigen. Auch reagieren sie positiv mit den Lektinen PHA-E, LCA und RCA ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977];[32, Emerson und Kornfeld, 1976]). Bei den Untersuchungen von Newman und Uhlenbruck wiesen die humanen Erythrozyten keine Bindung von ConA auf, bei WGA zeigten sie wie die bovinen Erythrozyten eine stark positive Reaktion ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977]). Unter den für meine Untersuchungen verwendeten Lektine befanden sich auch die für die menschlichen Blutgruppen spezifischen Lektine GSL-1 für die Blutgruppe B, sowie die für die Blutgruppe H spezifischen Lektine SNA und UEA ([62, Khan et al., 2002]). Die Ergebnisse meiner glykohistochemischen Untersuchungen deutet darauf hin, dass die Erythrozyten des Rindes viel Glukose bzw. Mannose und komplexe Kohlehydratstrukturen enthalten. Auch die anderen Zucker wie Galaktose, N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin, Fukose und Sialinsäure sind vorhanden, jedoch in geringerer Konzentration. Damit konnte ich die Untersuchungen von Hudson et al., Emerson und Kornfeld sowie Newman und Uhlenbruck nicht bestätigen, die bei den bovinen Erythrozyten vor allem die Kohlehydrate Galaktose und N-Acetylglukosamin nachwiesen ([32, Emerson und Kornfeld, 1976]; [56, Hudson et al., 1975];[89, Newman und Uhlenbruck, 1977]). In meinen Untersuchungen zeigte das für Galaktose spezifische Lektin PNA sowie das für N-Acetylglukosamin spezifische Lektin WGAs sogar keine Reaktion mit den Erythrozyten des Rindes.

Bei den Thrombozyten konnte eine stark positive Reaktion mit den Lektinen ConA, PSA, RCA und WGA festgestellt werden. Die Lektine LCA, PHA-E und PNA zeigten eine deutlich positive Reaktion. Es konnte keine Bindung von DBA, GSL-1, PHA-L, SBA, SJA, UEA, MAA, SNA und VAA beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein von hohen Konzentrationen an Glukose und Mannose, sowie auch Galaktose hin. Ebenso kommen N-Acetylglucosamin und komplexe Kohlehydratstrukturen vor, jedoch in geringerer Menge. Die Kohlehydrate N-Acetylgalaktosamin, Fukose und Sialinsäure sind hingegen nicht vorhanden. Dies widerspricht teilweise den Untersuchungen von Woodside und Kocholaty, die alle der oben genannten Kohlehydrate in den Thrombozyten des Rindes nachweisen konnten ([139, Woodside und Kocholaty, 1960]).

Bei den vorliegenden glykohistochemischen Untersuchungen zeigten die Lymphozyten des Rindes eine deutlich positive Reaktion mit den Lektinen ConA, LCA, PHA-E und RCA. Bei den Lektinen DBA, GSL-1, PHA-L, PSA und WGA konnte lediglich eine sehr schwache Reaktion festgestellt werden. Keine Bindung zeigten SBA, SJA, PNA, UEA, WGAs, MAA und VAA.

Diese Ergebnisse entsprechen denen von Newman und Uhlenbruck, welche ebenfalls eine positive Bindung von PHA-E und RCA und keine Bindung von UEA feststellen konnten. Jedoch zeigten die bovinen Lymphozyten bei deren Untersuchungen keine Reaktion mit den Lektinen LCA, WGA und ConA. Nach Vorinkubation mit Neuraminidase zeigte auch PNA eine deutliche Reaktion ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977]). Eine weitere Übereinstimmung findet sich mit den Beobachtungen von Pearson et al., bei denen die Lymphozyten ebenfalls positiv mit WGA und ConA, sowie negativ mit UEA reagierten. Jedoch war auch hier PNA positiv ([99, Pearson et al., 1987]). Die Bindung von PNA an die Lymphozyten des Rindes wird auch von anderen Autoren bestätigt. Dieses Lektin ist jedoch spezifisch für die T-Lymphozyten ([43, Gershwin et al., 1983]; [34, Fossum et al., 1987]; [59, Johansson und Morein, 1983]). Djilali et al. stellen wie bei meinen Untersuchungen eine positive Reaktion von WGA fest. Jedoch ist hier die Bindung ebenfalls auf die T-Lymphozyten beschränkt ([27, Djilali et al., 1987]). Die Lymphozyten des Menschen reagierten bei den Untersuchungen von Newman und Uhlenbruck ebenso wie die des Rindes positiv mit den Lektinen PHA-E und RCA, sowie negativ mit dem Lektin LCA. Im Gegensatz zu den bovinen Lymphozyten wurden die Lektine ConA und WGA gebunden. Nach einer Vorbehandlung mit Neuraminidase zeigte auch PNA eine positive Reaktion ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977]). Reisner et al. stellten bei ihren Untersuchungen an den humanen T-Lymphozyten fest, dass die reifen T-Lymphozyten im Blut nur zu einem sehr geringen Prozentsatz das Lektin PNA binden. Nach Behandlung mit Neuraminidase zeigten jedoch fast alle T-Lymphozyten eine positive Reaktion. Unreife T-Lymphozyten hingegen reagieren stets positiv mit PNA. Im Laufe der Reifung der T-Lymphozyten wird der Rezeptor für PNA also von der Sialinsäure maskiert. Mithilfe dieser Tatsache können zum einen akute Leukämien, bei denen vor allem für PNA positive unreife T-Lymphozyten auftreten, von chronischen Leukämien mit überwiegend für PNA negativen reifen T-Lymphozyten unterschieden werden. Zum anderen könnte der bei akuten Leukämien vorhandene Rezeptor für PNA als Zielobjekt für bestimmte Medikamente herangezogen werden, welche dann nur an den Zielzellen wirken würden ([105, Reisner et al., 1979]). Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen lassen auf das Vorhandensein größerer Mengen Glukose bzw. Mannose, Galaktose und komplexe Kohlehydratstrukturen schließen. N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin und Sialinsäure sind nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Die Untersuchung auf das Vorkommen von Fukose verlief negativ. Dies stimmt der Feststellung von Newman und Uhlenbruck zu, welche bei den Lymphozyten viel Galaktose, jedoch wenig Sialinsäure feststellten ([89, Newman und Uhlenbruck, 1977]).

Die neutrophilen Granulozyten zeigten die häufigsten positiven Reaktionen mit den verschiede-

nen Lektinen. So waren die Reaktionen mit ConA, LCA, PHA-E, PNA, PSA, RCA, SBA und WGA stark positiv und mit den Lektinen PHA-L, SNA und WGAs deutlich positiv. Die Lektine DBA, GSL-1 und UEA zeigten nur eine schwache positive Reaktion. Lediglich SJA, MAA und VAA banden nicht an die neutrophilen Granulozyten. Diese Ergebnisse zeigen das Vorhandensein aller Kohlehydratstrukturen bei den neutrophilen Granulozyten des Rindes an. Glukose bzw. Mannose, Galaktose, N-Acetylglukosamin und komplexe Kohlehydratstrukturen kommen jedoch in größeren Mengen vor als N-Acetylgalaktosamin, Fukose und Sialinsäure. In der Literatur gibt es noch keine Angaben zum Bindungsverhalten einzelner Lektine gegenüber den neutrophilen Granulozyten des Rindes.

Das Lektinbindungsverhalten bei den eosinophilen Granulozyten ähnelte stark dem der neutrophilen Granulozyten. Da die eosinophilen Granulozyten im Blut in einer weitaus geringeren Anzahl vorkommen, waren sie nicht in jedem Ausstrich zu finden. Daher konnten pro Lektin immer nur relativ wenige Zellen beurteilt werden. Bei der Untersuchung für UEA war kein eosinophiler Granulozyt zu finden. Die neutrophilen Granulozyten hingegen waren in nahezu jedem Ausstrich zahlreich vorhanden. Die Lektine ConA, PSA, WGA und WGAs zeigten eine stark positive Reaktion mit den eosinophilen Granulozyten. DBA, LCA, PHA-E, PNA, RCA, SBA, SJA, MAA, SNA und VAA waren deutlich positiv. Eine lediglich schwache positive Reaktion zeigten die Lektine GSL-1 und PHA-L. Auch die eosinophilen Granulozyten des Menschen weisen positive Reaktionen für die Lektine SBA und DBA auf ([30, Eguchi et al., 1988]; [72, Lee et al., 1987]). Das vorliegende Lektinbindungsmuster der eosinophilen Granulozyten des Rindes weist auf das Vorkommen großer Mengen an Glukose bzw. Mannose, Galaktose, N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin, komplexer Kohlehydratstrukturen, sowie Sialinsäure hin.

Die basophilen Granulozyten konnten bei den glykohistochemischen Untersuchungen nicht sicher von den neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten abgegrenzt werden. Daher sind keine Aussagen bezüglich des Lektinbindungsverhaltens oder bezüglich vorkommender Zuckerstrukturen bei den basophilen Granulozyten des Rindes möglich.

In den für diese Untersuchungen hergestellten Blutausstrichen waren die Monozyten in einigen Fällen nicht eindeutig von großen Lymphozyten zu unterscheiden. Aus diesem Grund konnte für die Lektine LCA, RCA, UEA, MAA, VAA und SNA keine Aussage über deren Bindung an die Monozyten des Rindes gemacht werden. Da die Monozyten im Blut des Rindes nur in sehr kleiner Zahl vorkommen, konnten pro Lektin nur relativ wenige Zellen beurteilt werden. Eine stark positive Reaktion wurde mit ConA beobachtet. Die Lektine WGA und WGAs zeigten eine deutlich positive Reaktion, während bei den Lektinen DBA, LCA, PHA-L, PSA und SBA ledig-

lich eine schwach positive Reaktion festzustellen war. Die Bindung von GSL-1, PNA und SJA verlief negativ. Die Ergebnisse der Lektinbindung deuten auf das Vorkommen größerer Mengen an Glukose bzw. Mannose und N-Acetylglukosamin hin.

Bei den Ergebnissen der Stärke der Lektinbindung an die verschiedenen Blutzellen muß berücksichtigt werden, dass es sich dabei um eine subjektive Beurteilung handelt, die durch viele Faktoren beeinflusst werden kann. Für eine objektive und exakte Auswertung müsste man den Grad der Fluoreszenz mit der Hilfe technischer Geräte messen.

Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass die Bindung der Lektine durch viele Faktoren beeinflusst werden kann. Dabei spielt die Qualität der Lektine eine große Rolle, welche abhängig von der Isolierung und Aufreinigung der Lektine ist. So können bei einer fehlerhaften Charge die Lektine bereits an Zucker gebunden sein. Dies führt dann zu einer mangelnden Bindung an das Präparat. Dies muß vor allem dann in Betracht gezogen werden, wenn für bestimmte Blutzellen spezifische Lektine nicht binden. Auch bei meinen Untersuchungen konnte ich teilweise feststellen, dass es innerhalb der Lektingruppen zu erheblichen Schwankungen kam. Als Beispiel seien die für N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektine DBA, SJA und SBA bei den neutrophilen Granulozyten genannt. Obwohl diese drei Lektine die gleiche Zuckerspezifität haben, kamen sowohl stark positive als auch schwach positive und negative Ergebnisse vor. Dabei ist aber auch die Spezifität einiger Lektine für verschiedene anomere Stellungen von Bedeutung. Hinzu kommt auch, dass die exakte Spezifität einiger Lektine noch nicht genau bekannt ist. Viele Lektine sind in der Lage, verschiedene Kohlehydrate zu binden, jedoch mit unterschiedlicher Affinität. Bei positiven Ergebnissen stellt sich dann die Frage, ob nun der Zucker vorherrschend ist, an den das Lektin primär bindet, oder etwa ein für das Lektin nicht so spezifischer Zucker, der dafür aber in sehr hohen Mengen vorliegt.

## 5.5 Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden die für T-Lymphozyten spezifischen Antikörper CD4 und CD8, sowie der für B-Lymphozyten spezifische Antikörper LCT30A herangezogen. Die Antikörper waren jeweils mit FITC markiert. Ebenfalls wurde wieder eine Kernfärbung mit DAPI-Farbstofflösung durchgeführt. Im Blut überwiegen die T-Lymphozyten gegenüber den B-Lymphozyten. Sie machen dort ca. 80% der Lymphozytezahl aus. Betrachtet man jedoch den gesamten Organismus, so ist die Menge an B- und T-Lymphozyten identisch ([78, Lösch et al., 2000]). Anhand der CD-Antigene können die T-Lymphozyten in CD4<sup>+</sup> positive

T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> positive zytotoxische T-Zellen unterschieden werden ([130, Teale et al., 1987]; [58, Jain, 1993]; [24, Davis und Hamilton, 1989]; [44, Glass und Spooner, 1990]).

Bei den Färbungen mit dem LCT30A-Antikörper konnte keine Bindung an die Thrombozyten, Lymphozyten oder Monozyten festgestellt werden. Lediglich einige Erythrozyten, sowie einige neutrophile und eosinophile Granulozyten zeigten eine schwach positive Reaktion. Der Rezeptor für LCT30A kommt also auch auf den Erythrozyten und Granulozyten vor. Die in der Literatur beschriebene Spezifität dieses Antikörpers für die bovinen T-Lymphozyten ([48, Harbo et al., 2004]) konnte somit nicht bestätigt werden.

Der CD4-Antikörper zeigte eine deutlich positive Reaktion mit den bovinen Erythrozyten, sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Die Reaktion mit den Lymphozyten verlief nur schwach positiv, bei den Thrombozyten und Monozyten negativ. Davis und Hamilton stellten fest, dass bei einigen Spezies CD4 neben den T-Helferzellen auch von den Monozyten und eosinophilen Granulozyten exprimiert wird ([24, Davis und Hamilton, 1998]). Dies kann für das Rind nur bei den eosinophilen Granulozyten bestätigt werden. Auch nach Jain besitzen die bovinen Monozyten CD4-Antigene ([58, Jain, 1993]), was mit meinen Untersuchungen ebenfalls nicht zu beobachten war. Das Vorkommen von CD4-Antigenen auf Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten wird in der Literatur nicht beschrieben. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen lassen jedoch darauf schließen, dass diese Antigene auch dort vorhanden sind.

Die Bindung des CD8-Antikörpers verlief bei den Lymphozyten stark positiv und bei den Erythrozyten deutlich positiv. Die neutrophilen Granulozyten zeigten eine schwach positive Reaktion, bei den Thrombozyten lag eine negative Reaktion vor. Eosinophile Granulozyten und Monozyten wurden in den Präparaten nicht gefunden. Die Bindung des CD8-Antikörpers an die Lymphozyten war weitaus stärker als die Bindung des CD4-Antikörpers. Dafür war die Bindung an die neutrophilen Granulozyten geringer. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die CD8-Antigene bei den Blutzellen vor allem bei den Lymphozyten vorkommen und zu einem großen Teil (etwa 80%) auch auf den Erythrozyten. Der CD4-Antikörper hingegen ist auf den anderen Blutzellen stärker als auf den Lymphozyten vertreten. Die Funktion der CD4-Antigene auf anderen Zellen als T-Helferzellen ist jedoch nicht bekannt ([24, Davis und Hamilton, 1998]). Da die meisten Lymphozyten von den CD4-bzw. den CD8-Antikörpern gebunden wurden, handelt es sich bei dem Großteil der Lymphozyten im Blut um T-Lymphozyten. Die häufigere und stärkere Bindung der CD8-Antikörper lässt darauf schließen, dass innerhalb der Population der T-Lymphozyten die Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen überwiegt.

Obwohl im Blutbild deutliche Unterschiede zwischen jungen und adulten, bzw. männlichen und

---

weiblichen Tieren zu sehen sind, waren weder bei den ultrastrukturellen, noch bei den glykohochemischen oder immunzytochemischen Untersuchungen Unterschiede zu erkennen.



# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Licht- und des Elektronenmikroskops die Struktur der Blutzellen des Rindes näher charakterisiert, sowie mit glykohistochemischen Techniken die Zuckerstrukturen der einzelnen Blutzellen näher bestimmt. Ausserdem wurde versucht, mittels Antikörper die einzelnen Lymphozyten-Populationen zu differenzieren. Dafür wurden Blutproben von insgesamt 46 Rindern unterschiedlichen Alters und Geschlechts der Rasse Fleckvieh verwendet.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden konventionelle Routinefärbungen (Diff-Quick, May-Grünwald, Giemsa und Pappenheim) verwendet und ihre Eignung für eine optimale Darstellung der bovinen Blutzellen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass sich die Färbungen nach Pappenheim und May-Grünwald besonders gut zur Darstellung der neutrophilen Granulozyten eigneten, da bei diesen Färbungen besonders deren Granula gut sichtbar waren. Die feinen Granula der Lymphozyten hingegen waren mit der Giemsa-Färbung besser zu erkennen. Alle anderen Blutzellen waren mit allen vier Färbungen ähnlich gut darstellbar.

Unter dem Elektronenmikroskop weisen die Blutzellen des Rindes einige charakteristische Besonderheiten auf. So besitzen bovine Thrombozyten deutliche „dense bodies“, die leicht von den bei allen Haussäugetieren vorkommenden  $\alpha$ -Granula zu unterscheiden sind. Einstülpungen des offenen kanalikulären Systems in der Zellmembran sind dagegen nicht erkennbar. Die neutrophilen Granulozyten des Rindes besitzen neben den primären und sekundären Granula so genannte große Granula, Diese sind größer und zahlreicher vorhanden als die beiden anderen Granula und kommen außer beim Rind nur bei anderen Wiederkäuerspezies vor.

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden die Lektine ConA, DBA, GSL-1, LCA, MAA, PHA-E, PHA-L, PNA, PSA, RCA, SBA, SJA, SNA, UEA-1, VAA, WGA und WGAs verwendet. Die Lektine MAA, SNA und VAA waren mit Biotin, die anderen mit FITC markiert. Dabei war die Verteilung der Lektinbindungsstellen an die einzelnen Blutzellen, sowie die Stärke der positiven Reaktion sehr unterschiedlich. Die neutrophilen Granulozyten wiesen die häufigsten positiven Reaktionen mit den Lektinen auf. Bei den Lektinen MAA, SJA, UEA-1

und VAA war zumeist eine negative Reaktion, bzw. eine lediglich schwach positive Reaktion festzustellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kohlehydrate Glukose bzw. Mannose, Galaktose und N-Acetylglukosamin bei den Blutzellen des Rindes am häufigsten vorkommen.

Bei den immunzytochemischen Untersuchungen wurden der für die B-Lymphozyten spezifische Antikörper LCT30A, sowie der für die T-Helferzellen spezifische Antikörper CD4 und der für zytotoxische T-Zellen spezifische Antikörper CD8 verwendet. Es konnte keine Bindung von LCT30A an die Lymphozyten beobachtet werden. Auch eine Bindung an andere Blutzellen blieb mit Ausnahme an einige Erythrozyten, sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten aus. Die beiden anderen Antikörper zeigten sowohl mit den meisten Lymphozyten, als auch mit den anderen Blutzellen (außer den Thrombozyten), deutliche bis stark positive Immunfärbungen. Der Antikörper CD8 zeigte eine sehr deutlich positive Reaktion mit den dem Großteil der Lymphozyten. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei den Lymphozyten im Blut vor allem um T-Lymphozyten handelt und innerhalb der Population der T-Lymphozyten die zytotoxischen T-Zellen überwiegen.

Bezüglich der Ultrastruktur, sowie der Bindung der Lektine und Antikörper konnten keine Unterschiede zwischen jungen und adulten oder männlichen und weiblichen Tieren festgestellt werden.

# Summary

## **Ultrastructural, immunohistochemical and glycohistochemical studies of bovine blood cells**

In the present studies the structure of the bovine blood cells was examined using light- and electron-microscopic methods and glycohistochemical techniques. Furthermore, the different lymphocyte populations were discerned using B- and T-cell specific antibodies. For this study, blood samples of 46 animals (cows, bulls and calves) of the same breed (German Fleckvieh) were used.

For light microscopic staining, Diff-Quick, May-Grünwald, Giemsa and Pappenheim were used and the results of the different staining methods compared. Staining with May-Grünwald and Pappenheim appeared especially well suited for demonstration of neutrophilic granulocytes, because they distinctly stain their granules. The fine granules observed in lymphocytes can be best recognized using Giemsa-staining. All other blood cells were equally well seen after staining with any of the four staining protocols.

At the ultrastructural level, the bovine blood cells show some special features different from other domestic animals. Bovine thrombocytes possess distinct dense bodies, which can be easily distinguished from the  $\alpha$ -granules, that are found in the thrombocytes of all domestic species. The bovine thrombocytes also lack the openings in the cell membrane, which are the openings of an intracellular canalicular system found in thrombocytes of the human and in several other mammalian species. Beside acrophilic and „specific“ granules, bovine neutrophilic granulocytes contain a third type of granules, the so-called „large granules“. These granules are bigger and more numerous than the two other types of granules.

For the glycohistochemical studies the lectins ConA, DBA, GSL-1, LCA, MAA, PHA-E, PHA-L, PNA, PSA, RCA, SBA, SJA, SNA, UEA-1, VAA, WGA and WGAs were used. The lectins MAA, SNA and VAA were conjugated with biotin, the others with FITC. A characteristic pattern of lectin binding was observed for the different cells. The neutrophilic granulocytes distinctly

stained with most lectins. The lectins MAA, SJA, UEA-1 and VAA showed usually only weak binding to the blood cells. The results of the glycohistochemical studies indicate that glucose, mannose, galactose and N-acetyl-glucosamine-residues are the most common carbohydrate structures of bovine blood cells.

In the immunohistochemical studies three different antibodies were applied. These were LCT30A, which is specific for B-lymphocytes, CD4, which shows specificity for T-helper cells and CD8 that is specific for cytotoxic T-cells. The LCT30A antibody used in this study did not bind to any of the lymphocytes. Generally no binding on the other cell types except to a few erythrocytes, neutrophilic and eosinophilic granulocytes was observed. The T-cell specific antibodies bound to most of the lymphocytes and also showed a strong binding to other blood cells, except thrombocytes. The positive reactions for CD8 was especially distinct and usually more intense compared to the reaction with the CD4 antibody. These results indicate that circulating blood lymphocytes are mostly T-lymphocytes and within this population most are cytotoxic T-cells.

There were no ultrastructural, glycohistochemical or immunohistochemical differences seen between young and adult or male and female animals.

# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>A</b>          | Antigen  |
| <b>ABC</b>        | Avidin–Biotin–Komplex  |
| <b>aG</b>         | $\alpha$ -Granula  |
| <b>Ak</b>         | Akanthozyt   |
| <b>AK</b>         | Antikörper   |
| <b>AND</b>        | Andere Leukozyten als Lymphozyten                                      |
| <b>APA</b>        | Abrus precatorius Agglutinin   |
| <b>APAAP</b>      | Alkalische–Phosphatase–Anti–alkalische Phosphatase                     |
| <b>Aqua dest.</b> | Aqua destillata (destilliertes Wasser)                                 |
| <b>B</b>          | Biotin   |
| <b>BLV</b>        | Bovines Leukmie Virus  |
| <b>Ca</b>         | Kalzium  |
| <b>CD</b>         | Cluster of differentiation   |
| <b>CFU–B</b>      | Colony–forming–unit B–Lymphozyten                                      |
| <b>CFU–BAS</b>    | Colony–forming–unit basophile Granulozyten                             |
| <b>CFU–E</b>      | Colony–forming–unit Erythrozyten                                       |
| <b>CFU–EOS</b>    | Colony–forming–unit eosinophile Granulozyten                           |
| <b>CFU–G</b>      | Colony–forming–unit neutrophile Granulozyten                           |
| <b>CFU–GEMM</b>   | Colony–forming–unit Granulozyten Erythrozyten Megakaryozyten Monozyten |
| <b>CFU GM</b>     | Colony–forming–unit Granulozyten Monozyten                             |
| <b>CFU–L</b>      | Colony–forming–unit Lymphozyten  |
| <b>CFU–M</b>      | Colony–forming–unit Monozyten  |
| <b>CFU–MK</b>     | Colony–forming–unit Megakaryozyten                                     |

---

|               |  |
|---------------|--|
| <b>CFU-S</b>  | Colony-forming-unit Stammzellen                  |
| <b>CFU-T</b>  | Colony-forming-unit T-Lymphozyten                |
| <b>ConA</b>   | Concanavalin Agglutinin                          |
| <b>D</b>      | Dacryozyten                                      |
| <b>DB</b>     | Dense body                                       |
| <b>DBA</b>    | Dolichos biflorus Agglutinin                     |
| <b>DTS</b>    | Dense tubular system                             |
| <b>E</b>      | Erythrozyten                                     |
| <b>EC</b>     | Euchromatin                                      |
| <b>ECP</b>    | Eosinophil cationic protein                      |
| <b>EDTA</b>   | Ethylene diamine tetraacetic acid                |
| <b>eG</b>     | Eosinophiler Granulozyt                          |
| <b>EM</b>     | Elektronenmikroskopie                            |
| <b>EO-CSF</b> | Eosinophil-colony-stimulating-factor             |
| <b>eR</b>     | Endoplasmatisches Retikulum                      |
| <b>ERY</b>    | Erythrozyten                                     |
| <b>F</b>      | Filament   |
| <b>FITC</b>   | Fluoreszeinisothiocyanat                         |
| <b>G</b>      | Granula  |
| <b>gG</b>     | Große Granula                                    |
| <b>GHC</b>    | Glykohistochemie                                 |
| <b>GM-CSF</b> | granulocyte-makrophage-colony-stimulating-factor |
| <b>Gr</b>     | Granulomer                                       |
| <b>GSL</b>    | Griffonia simplicifolia Agglutinin               |
| <b>HC</b>     | Heterochromatin                                  |
| <b>hG</b>     | Homogene Granula                                 |
| <b>HPA</b>    | Helix pomatia Agglutinin                         |
| <b>Hy</b>     | Hyalomer   |
| <b>Ig</b>     | Immunglobulin                                    |
| <b>IHC</b>    | Immunhistochemie                                 |
| <b>KG</b>     | Kristalline Granula                              |
| <b>L</b>      | Lektin   |
| <b>LBA</b>    | Lima bean Agglutinin                             |
| <b>LCA</b>    | Lens culinaris Agglutinin                        |

---

|              |   |
|--------------|---|
| <b>LEU</b>   | Leukozyten                                |
| <b>LM</b>    | Lichtmikroskopie                          |
| <b>LPA</b>   | Limulus polyphemus Agglutinin             |
| <b>LTA</b>   | Lotus tetragonolobus Agglutinin           |
| <b>LYM</b>   | Lymphozyten                               |
| <b>M</b>     | Mitochondrien                             |
| <b>m</b>     | Männlich                                  |
| <b>MAA</b>   | Maackia amurensis Agglutinin              |
| <b>MBP</b>   | Major basic protein                       |
| <b>MCH</b>   | Mean corpuscular hemoglobin               |
| <b>MCHC</b>  | Mean corpuscular hemoglobin concentration |
| <b>MCV</b>   | Mean corpuscular volume                   |
| <b>Mn</b>    | Magnesium                                 |
| <b>Mo</b>    | Monozyt                                   |
| <b>Nc</b>    | Nukleolus                                 |
| <b>nG</b>    | Neutrophiler Granulozyt                   |
| <b>NM</b>    | Neuraminidase                             |
| <b>OCS</b>   | Offenes kanalikuläres System              |
| <b>PAP</b>   | Peroxidase–Anti–Peroxidase                |
| <b>PBS</b>   | Phosphate buffered saline                 |
| <b>pG</b>    | Primäre Granula                           |
| <b>PHA–E</b> | Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro     |
| <b>PHA–L</b> | Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuko       |
| <b>PNA</b>   | Peanut Agglutinin                         |
| <b>Ps</b>    | Pseudopodien                              |
| <b>PSA</b>   | Pisum sativum Agglutinin                  |
| <b>PWM</b>   | Pokeweed mitogen                          |
| <b>QTL</b>   | Quantitative trait locus                  |
| <b>R</b>     | Ribosomen                                 |
| <b>RCA</b>   | Ricinus communis Agglutinin               |
| <b>RT</b>    | Raumtemperatur                            |
| <b>SA</b>    | Streptavidin                              |
| <b>SB</b>    | Scalebar                                  |
| <b>SBA</b>   | Soybean Agglutinin                        |

---

|               |                                    |
|---------------|------------------------------------|
| <b>S-ConA</b> | Succinyl-Concanavalin A            |
| <b>sG</b>     | Spezifische Granula                |
| <b>SJA</b>    | Saphora japonica Agglutinin        |
| <b>SNA</b>    | Sambucus nigra Agglutinin          |
| <b>STA</b>    | Solanum tuberosum Agglutinin       |
| <b>THR</b>    | Thrombozyten                       |
| <b>TCR</b>    | T-Zell-Rezeptor                    |
| <b>UEA</b>    | Ulex europaeus Agglutinin          |
| <b>V</b>      | Vakuolen                           |
| <b>VAA</b>    | Viscum album Agglutinin            |
| <b>VGA</b>    | Vicia graminea Agglutinin          |
| <b>w</b>      | Weiblich                           |
| <b>WC</b>     | Workshop cluster                   |
| <b>WGA</b>    | Wheat germ Agglutinin              |
| <b>WGAs</b>   | Wheat germ Agglutinin succinyliert |
| <b>ZK</b>     | Zellkern                           |
| <b>ZM</b>     | Zellmembran                        |
| <b>ZP</b>     | Zytoplasma                         |



# Anhang B

## Verzeichnis der Gebrauchslösungen

### Lichtmikroskopie

#### Giemsa-Lösung

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Giemsa-Stammlösung <sup>1</sup> | 0,3 ml   |
| Aqua dest.                      | ad 10 ml |

### Elektronenmikroskopie

#### Bleicitratlösung nach Reynolds

##### Natriumcitrat Stock

|   |           |
|---|-----------|
| Natriumcitrat $\text{Na}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$ <sup>1</sup> | 35,7 g    |
| Aqua dest.  | ad 100 ml |

##### Bleinitrat Stock

|  |           |
|--|-----------|
| Bleinitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ <sup>1</sup> | 33,1 g    |
| Aqua dest.   | ad 100 ml |

---

### **Bleicitrat-Lösung**

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| Aqua dest.             | 16 ml     |
| Natriumcitrat Stock    | 3 ml      |
| Bleinitrat Stock       | 2 ml      |
| NaOH, 1 M <sup>1</sup> | 4 ml      |
| Aqua dest.             | ad 100 ml |

### **Cacodylat-Puffer**

#### **Lösung A**

|   |           |
|---|-----------|
| Cacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}^2$ | 8,56 g    |
| Aqua dest.  | ad 200 ml |

#### **Lösung B**

HCl, 0,2 M<sup>1</sup>

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

|            |           |
|------------|-----------|
| Lösung A   | 50,0 ml   |
| Lösung B   | 4,2 ml    |
| Aqua dest. | ad 100 ml |

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

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Cacodylat-Puffer, 0,2 M | 50,0 ml |
| Aqua dest.              | 50,0 ml |

### **Epon**

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| Poly/bed 812 <sup>3</sup> | 16 ml |
|---------------------------|-------|

|                     |              |
|---------------------|--------------|
| DDSA <sup>3</sup>   | 10 ml        |
| NMA <sup>3</sup>    | 9 ml         |
| DMP-30 <sup>3</sup> | 0,3 – 0,5 ml |

### **Fixierungslösung nach Karnovsky**

#### **10% Paraformaldehyd-Lösung**

|                              |                  |
|------------------------------|------------------|
| Paraformaldehyd <sup>1</sup> | 10 g             |
| Aqua dest.                   | ad 100 ml        |
| NaOH, 0,1 M <sup>1</sup>     | bis zu 6 Tropfen |

#### **Karnovsky-Stammlösung**

|   |        |
|---|--------|
| Paraformaldehyd-Lösung                  | 20 ml  |
| Cacodylat-Puffer, 0,2 M                 | 50 ml  |
| Kalziumchlorid, wasserfrei <sup>4</sup> | 0,05 g |

#### **Karnovsky-Gebrauchslösung**

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Karnovsky-Stammlösung            | 10 ml   |
| Glutaraldehyd, 2,5% <sup>2</sup> | 1037 ml |

### **Kontrastierungslösung**

#### **Osmiumtetroxid-Lösung, 3%**

|                                   |      |
|-----------------------------------|------|
| Osmiumtetroxid, 4%ig <sup>3</sup> | 2 ml |
| Cacodylat-Puffer, 0,1 M           | 2 ml |

#### **Kaliumferrocyanid-Lösung, 3%**

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| Kaliumferrocyanid <sup>5</sup> | 0,3 g |
|--------------------------------|-------|

---

Cacodylat-Puffer, 0,1 M                      ad 10 ml

**Osmiumtetroxid (1%)–Kaliumferrocyanid (1,5%) in Cacodylatpuffer, 0,1 M**

Osmiumtetroxid-Lösung, 2%              4 ml

Kaliumferrocyanid-Lösung, 3%        4 ml

## **Glykohistochemie**

### **PBS-Puffer, pH 7,4**

NaCl<sup>1</sup>    42,50 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O<sup>1</sup>                              6,35 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O<sup>1</sup>                              1,95 g

Aqua dest.                                        ad 5 l

### **Azetat-Puffer, pH 5,0**

Die folgenden Lösungen werden im Verhältnis 141 : 59 gemischt:

#### **Natriumazetat-Lösung, 0,1 M**

Natriumazetat<sup>6</sup>                              8,2 g

Aqua dest.                                        1000 ml

#### **Essigsäure, 0,1 M**

Essigsäure<sup>7</sup>                                    5,8 ml

Aqua dest.                                        1000 ml

---

<sup>1</sup>MERCK, Darmstadt

<sup>2</sup>AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England

<sup>3</sup>POLYSCIENCES INC., Warrington, USA

<sup>4</sup>SERVA, Heidelberg

<sup>5</sup>SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen

<sup>6</sup>AGAR AIDS, Essex, England

<sup>7</sup>ROTH, Karlsruhe

# Abbildungsverzeichnis

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.1  | Zusammensetzung des Blutes . . . . .   | 4  |
| 2.2  | Ablauf der Hämatopoese . . . . .   | 6  |
| 3.1  | Flussdiagramm FITC–markierte Lektine . . . . .   | 60 |
| 3.2  | Flussdiagramm ABC–Methode . . . . .  | 64 |
| 3.3  | Flussdiagramm Antikörperfärbung . . . . .  | 67 |
| 4.1  | Lymphozyt, May–Grünwald–Färbung . . . . .  | 73 |
| 4.2  | Lymphozyt, Diff–Quick–Färbung . . . . .  | 73 |
| 4.3  | Lymphozyt, Giemsa–Färbung . . . . .  | 73 |
| 4.4  | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim–Färbung . . . . .  | 75 |
| 4.5  | Zwei segmentkernige neutrophile Granulozyten, Diff–Quick–Färbung . . . . .                                     | 75 |
| 4.6  | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, May–Grünwald–Färbung . . . . .  | 75 |
| 4.7  | Neutrophiler Granulozyt und ein Lymphozyt, Giemsa–Färbung . . . . .  | 75 |
| 4.8  | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt und segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim–Färbung . . . . . | 76 |
| 4.9  | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Giemsa–Färbung . . . . .   | 76 |
| 4.10 | Eosinophiler Granulozyt, Diff–Quick–Färbung . . . . .  | 77 |
| 4.11 | Eosinophiler Granulozyt, May–Grünwald–Färbung . . . . .  | 77 |
| 4.12 | Eosinophiler Granulozyt, Giemsa–Färbung . . . . .  | 78 |
| 4.13 | Zwei Monozyten und ein Lymphozyt, Pappenheim–Färbung . . . . .   | 79 |
| 4.14 | Junger Monozyt, Giemsa–Färbung . . . . .   | 79 |
| 4.15 | Thrombozyt, Elektronenmikroskop . . . . .  | 81 |
| 4.16 | Thrombozyten und ein Lymphozyt, Elektronenmikroskop . . . . .  | 82 |
| 4.17 | Lymphozyt, Elektronenmikroskop . . . . .   | 84 |
| 4.18 | Lymphozyten, Elektronenmikroskop . . . . .   | 85 |
| 4.19 | Lymphozyt, Elektronenmikroskop . . . . .   | 86 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.20 | Lymphozyt, Elektronenmikroskop . . . . .                               | 87  |
| 4.21 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop . . . . . | 89  |
| 4.22 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop . . . . . | 90  |
| 4.23 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop . . . . . | 91  |
| 4.24 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop . . . . .    | 92  |
| 4.25 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop . . . . .    | 93  |
| 4.26 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop . . . . .    | 94  |
| 4.27 | Eosinophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop . . . . .                 | 96  |
| 4.28 | Eosinophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop . . . . .                 | 97  |
| 4.29 | Monozyt, Elektronenmikroskop . . . . .                                 | 99  |
| 4.30 | Neutrophiler Granulozyt, ConA-FITC . . . . .                           | 102 |
| 4.31 | Lymphozyt, ConA-FITC . . . . .   | 102 |
| 4.32 | Eosinophiler und neutrophiler Granulozyt, ConA FITC . . . . .          | 102 |
| 4.33 | Erythrozyten, ConA-FITC . . . . .                                      | 102 |
| 4.34 | Lymphozyten, LCA-FITC . . . . .  | 105 |
| 4.35 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC . . . . .            | 105 |
| 4.36 | Eosinophile Granulozyten, LCA-FITC . . . . .                           | 105 |
| 4.37 | Segmentkernige neutrophile Granulozyten, LCA-FITC . . . . .            | 105 |
| 4.38 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC . . . . .            | 108 |
| 4.39 | Thrombozyten, PSA-FITC . . . . .                                       | 108 |
| 4.40 | Lymphozyt und neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC . . . . .              | 108 |
| 4.41 | Eosinophiler Granulozyt, PSA-FITC . . . . .                            | 108 |
| 4.42 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, GSL-1-FITC . . . . .          | 111 |
| 4.43 | Lymphozyt, GSL-1-FITC . . . . .  | 111 |
| 4.44 | Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, PNA-FITC . . . . .              | 113 |
| 4.45 | Basophiler Granulozyt, PNA-FITC . . . . .                              | 113 |
| 4.46 | Neutrophile Granulozyten, PNA-FITC . . . . .                           | 113 |
| 4.47 | Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC . . . . .                            | 113 |
| 4.48 | Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC . . . . .                            | 116 |
| 4.49 | Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC . . . . .                            | 116 |
| 4.50 | Lymphozyt, RCA-FITC . . . . .  | 116 |
| 4.51 | Eosinophiler Granulozyt, RCA-FITC . . . . .                            | 116 |
| 4.52 | Neutrophiler Granulozyt, VAA-Biotin . . . . .                          | 119 |
| 4.53 | Eosinophiler Granulozyt, VAA-Biotin . . . . .                          | 119 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.54 | Lymphozyt, WGA–FITC . . . . .                                  | 121 |
| 4.55 | Neutrophiler Granulozyt, WGA–FITC . . . . .                    | 121 |
| 4.56 | Erythrozyten, WGA–FITC . . . . .                               | 121 |
| 4.57 | Übersicht, WGA–FITC . . . . .                                  | 121 |
| 4.58 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, WGAs–FITC . . . . .   | 124 |
| 4.59 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, WGAs–FITC . . . . .      | 124 |
| 4.60 | Neutrophile Granulozyten, WGAs–FITC . . . . .                  | 124 |
| 4.61 | Lymphozyt, WGAs–FITC . . . . .                                 | 124 |
| 4.62 | Neutrophile Granulozyten, DBA–FITC . . . . .                   | 127 |
| 4.63 | Lymphozyt, DBA–FITC . . . . .                                  | 127 |
| 4.64 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, SBA–FITC . . . . .    | 129 |
| 4.65 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, SBA–FITC . . . . .    | 129 |
| 4.66 | Lymphozyt und neutrophiler Granulozyt, SBA–FITC . . . . .      | 129 |
| 4.67 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, SBA–FITC . . . . .       | 129 |
| 4.68 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, SJA–FITC . . . . .       | 132 |
| 4.69 | Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, SJA–FITC . . . . .      | 132 |
| 4.70 | Eosinophiler Granulozyt, SJA–FITC . . . . .                    | 132 |
| 4.71 | Monozyt, SJA–FITC . . . . .                                    | 132 |
| 4.72 | Neutrophiler Granulozyt, UEA–1–FITC . . . . .                  | 135 |
| 4.73 | Neutrophiler Granulozyt, UEA–1–FITC . . . . .                  | 135 |
| 4.74 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, MAA–Biotin . . . . .  | 137 |
| 4.75 | Neutrophiler und eosinophiler Granulozyt, MAA–Biotin . . . . . | 137 |
| 4.76 | Neutrophiler Granulozyt, SNA–Biotin . . . . .                  | 139 |
| 4.77 | Eosinophiler Granulozyt, SNA–Biotin . . . . .                  | 139 |
| 4.78 | Thrombozyten, SNA–Biotin . . . . .                             | 139 |
| 4.79 | Neutrophiler Granulozyt, SNA–Biotin . . . . .                  | 139 |
| 4.80 | Lymphozyt, PHA–E–FITC . . . . .                                | 142 |
| 4.81 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA–E–FITC . . . . .     | 142 |
| 4.82 | Segmentkernige neutrophile Granulozyten, PHA–E–FITC . . . . .  | 142 |
| 4.83 | Eosinophiler Granulozyt, PHA–E–FITC . . . . .                  | 142 |
| 4.84 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA–L–FITC . . . . .  | 145 |
| 4.85 | Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA–L–FITC . . . . .  | 145 |
| 4.86 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA–L–FITC . . . . .     | 145 |
| 4.87 | Lymphozyt, PHA–L–FITC . . . . .                                | 145 |



|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.88 | Segmentkernige neutrophile Granulozyten, LCT30A-FITC . . . . . | 148 |
| 4.89 | Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, LCT30A-FITC . . . . .   | 148 |
| 4.90 | Eosinophiler Granulozyt, LCT30A-FITC . . . . .                 | 148 |
| 4.91 | Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, LCT30A-FITC . . . . .    | 148 |
| 4.92 | Lymphozyt und neutrophile Granulozyten, CD4-FITC . . . . .     | 151 |
| 4.93 | Eosinophiler Granulozyt, CD4-FITC . . . . .                    | 151 |
| 4.94 | Eosinophiler Granulozyt, CD4-FITC . . . . .                    | 151 |
| 4.95 | Neutrophiler Granulozyt, CD4-FITC . . . . .                    | 151 |
| 4.96 | Lymphozyt, CD8-FITC . . . . .                                  | 154 |
| 4.97 | Lymphozyt, CD8-FITC . . . . .                                  | 154 |
| 4.98 | Neutrophiler Granulozyt, CD8-FITC . . . . .                    | 154 |
| 4.99 | Lymphozyt, CD8-FITC . . . . .                                  | 154 |

# Tabellenverzeichnis

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 2.1  | Physiologische Blutwerte des Rindes . . . . .                | 8   |
| 2.2  | Verschiedene Granula der neutrophilen Granulozyten . . . . . | 22  |
| 2.3  | Einteilung der Lektine . . . . .                             | 34  |
| 2.4  | Bindungsstellen der Lektine . . . . .                        | 41  |
| 2.5  | Blutgruppensysteme des Rindes . . . . .                      | 47  |
| 3.1  | Übersicht über die verwendeten Kälber . . . . .              | 52  |
| 3.2  | Übersicht über die verwendeten Kühe . . . . .                | 53  |
| 3.3  | Übersicht über die verwendeten Bullen . . . . .              | 54  |
| 3.4  | Übersicht FITC-markierte Lektine . . . . .                   | 58  |
| 3.5  | Übersicht Hemmzucker . . . . .                               | 61  |
| 3.6  | Übersicht biotinylierte Lektine . . . . .                    | 63  |
| 3.7  | Übersicht Antikörper . . . . .                               | 66  |
| 4.1  | Blutbilder der beprobten Rinder . . . . .                    | 69  |
| 4.2  | Übersichtsfärbungen Erythrozyten . . . . .                   | 71  |
| 4.3  | Übersichtsfärbungen Thrombozyten . . . . .                   | 72  |
| 4.4  | Übersichtsfärbungen Lymphozyten . . . . .                    | 72  |
| 4.5  | Übersichtsfärbungen neutrophile Granulozyten . . . . .       | 74  |
| 4.6  | Übersichtsfärbungen eosinophile Granulozyten . . . . .       | 77  |
| 4.7  | Übersichtsfärbungen Monozyten . . . . .                      | 78  |
| 4.8  | Einzelauswertung Lektine: ConA-FITC . . . . .                | 101 |
| 4.9  | Einzelauswertung Lektine: LCA-FITC . . . . .                 | 104 |
| 4.10 | Einzelauswertung Lektine: PSA-FITC . . . . .                 | 107 |
| 4.11 | Einzelauswertung Lektine: GSL-1-FITC . . . . .               | 110 |
| 4.12 | Einzelauswertung Lektine: PNA-FITC . . . . .                 | 112 |
| 4.13 | Einzelauswertung Lektine: RCA-FITC . . . . .                 | 115 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.14 Einzelauswertung Lektine: VAA–Biotin . . . . .     | 118 |
| 4.15 Einzelauswertung Lektine: WGA–FITC . . . . .       | 120 |
| 4.16 Einzelauswertung Lektine: WGAs–FITC . . . . .      | 123 |
| 4.17 Einzelauswertung Lektine: DBA–FITC . . . . .       | 126 |
| 4.18 Einzelauswertung Lektine: SBA–FITC . . . . .       | 128 |
| 4.19 Einzelauswertung Lektine: SJA–FITC . . . . .       | 131 |
| 4.20 Einzelauswertung Lektine: UEA–1–FITC . . . . .     | 134 |
| 4.21 Einzelauswertung Lektine: MAA–Biotin . . . . .     | 136 |
| 4.22 Einzelauswertung Lektine: SNA–Biotin . . . . .     | 138 |
| 4.23 Einzelauswertung Lektine: PHA–E–FITC . . . . .     | 141 |
| 4.24 Einzelauswertung Lektine: PHA–L–FITC . . . . .     | 144 |
| 4.25 Einzelauswertung Antikörper: LCT30A–FITC . . . . . | 147 |
| 4.26 Einzelauswertung Antikörper: CD4–FITC . . . . .    | 150 |
| 4.27 Einzelauswertung Antikörper: CD8–FITC . . . . .    | 153 |

# Literaturverzeichnis

- [1] ACKERMANN, G. A. ; YANG, J. ; WOLKEN, K. W.: Differential surface labeling and internalization of glucagon by peripheral leukocytes. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 31 (1983), S. 433–440
- [2] AGRAWAL, B. ; GOLDSTEIN, I. : Specific binding of concanavalin A to cross–linked dextran gels. *Biochemical Journal* 96 (1965), S. 23–25
- [3] AKIMOTO, Y. ; IMAI, Y. ; HIRABAYASHI, J. ; KASAI, K. i ; HIRANO, H. : Histochemistry and cytochemistry of endogenous animal lectins. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 33 (1998), S. 1–99
- [4] AL-IZZI, S. ; MAXIE, M. ; VALLI, V. : Morphology and cytochemistry of bovine bone marrow mononuclear phagocytes. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 46 (1982), S. 130–132
- [5] AL-IZZY, S. A. ; MAXIE, M. ; VALLI, V. ; WILKIE, B. ; JOHNSON, J. : The kinetics of mononuclear phagocytes in normal calves and in calves given *Corynebacterium parvum*. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 46 (1982), S. 138–145
- [6] ARAN, J. M. ; COLOMER, D. ; MATUTES, E. ; VIVES-CORRONS, J. L. ; FRANCO, R. : Presence of adenosine desaminase on the surface of mononuclear blood cells: Immunohistochemical localization using light and electron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39 (1991), S. 1001–1008
- [7] AYOUB, I. A. ; YANG, T. : Age–dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: A longitudinal study. *Developmental and Comparative Immunology* 20 (1996), S. 353–363

- [8] BAGGIOLINI, M. ; HORISBERGER, U. ; GENNARO, R. ; DEWALD, B. : Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. *Laboratory Investigation* 52 (1985), S. 151–158
- [9] BANKS, W. J.: *Applied Veterinary Histology*. Williams & Wilkins , Baltimore, 1986
- [10] BERGROTH, V. ; KONTTINEN, Y. T. ; REITAMO, S. : A method for the identification of human peripheral blood T lymphocytes by sequential immunogold and esterase double staining. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 31 (1983), S. 837–839
- [11] BIRMINGHAM, J. ; LESKA, E. : The isolation, long–term cultivation and characterisation of bovine peripheral blood monocytes. *Immunology* 41 (1980), S. 807–814
- [12] BOG-HANSEN, T. C. ; TAKEO, K. : Determination of dissociation constants by affinity electrophoresis: Complexes between human serum proteins and concanavalin A. *Electrophoresis* 1 (1980), S. 67–71
- [13] BOUW, J. : Present status of animal blood group research. *Veterinary Science Communications* 1 (1977), S. 105–110
- [14] BOUW, J. ; NASRAT, G. E. ; BUYS, C. : The inheritance of blood groups in the blood group system B in cattle. *Genetica* 35 (1964), S. 47–58
- [15] BOYD, W. C. ; SHAPLEIGH, E. : Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science* 119 (1954), S. 419
- [16] BRINKMANN VAN DER LINDEN, E. C. M. ; SONNENBURG, J. L. ; VARKI, A. : Effects of sialic acid substitutions on recognition by Sambucus nigra Agglutinin and Maackia amurensis Hemagglutinin. *Analytical Biochemistry* 303 (2002), S. 98–104
- [17] BROWN, E. M.: Blood and Bone Marrow. In: DELLMANN, H.-D. (Hrsg.) ; BROWN, E. M. (Hrsg.): *Textbook of Veterinary Histology*. Lea & Febiger, 1987
- [18] CHAMBERS, W. ; WASHBURN, S. ; CAMPOS, M. ; KLESZIUS, P. : Isolation of bovine eosinophils by density gradient centrifugation. *American Journal of Veterinary Research* 46 (1985), S. 154–156
- [19] CHIEN, J.-L. ; LI, S.-C. ; LAINE, R. A. ; LI, Y.-T. : Characterization of gangliosides from bovine erythrocyte membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 253 (1978), S. 4031–4035

- [20] CLEVERS, H. ; MACHUGH, N. D. ; BENSALD, A. ; BALDWIN, S. D. C. L. ; KAUSHAL, A. ; IAMS, K. ; HOWARD, C. J. ; MORRISON, W. I.: Identification of a bovine surface antigen uniquely expressed on CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>T cell receptor  $\gamma\delta$ T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 20 (1990), S. 809–817
- [21] COMMITTEE, N. : What is a lectin? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 206 (1981), S. 459–460
- [22] COOPER, H. S.: Lectins as probes in histochemistry and immunochemistry: The peanut (*Arachis hypogaea*) lectin. *Human Pathology* 15 (1984), S. 904–906
- [23] DAVIS, W. ; ELLIS, J. ; MACHUGH, N. ; BALDWIN, C. : Bovine pan T-cell monoclonal antibodies reactive with a molecule similar to CD2. *Immunology* 63 (1988), S. 165–167
- [24] DAVIS, W. ; HAMILTON, M. : Comparison of the unique characteristics of the immune system in different species of mammals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 63 (1998), S. 7–13
- [25] DENK, H. : Immunhistochemische Färbemethoden. In: BÖCK, P. (Hrsg.): *Mikroskopische Technik*. Urban & Schwarzenberg, 1989
- [26] DIXON, H. : Defining a lectin. *Nature* 292 (1981), S. 192
- [27] DJILALI, S. ; PARODI, A.-L. ; LEVY, D. : Wheat germ agglutinin (WGA): A bovine T-lymphocyte marker. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 16 (1987), S. 151–154
- [28] DJILALI, S. ; DACOSTA, B. ; KESSLER, J.-L. ; PARODI, A.-L. : Preparation and characterization of a monoclonal antibody against bovine lymphocyte surface antigen. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease* 14 (1991), S. 257–263
- [29] DU-PLESSIS, L. ; BOTHA, A. ; STEVENS, K. : Ultrastructure of buffalo, *Syncerus caffer*, platelets: Comparison with bovine and human platelets. *Journal of Morphology* 229 (1996), S. 309–314
- [30] EGUCHI, M. ; OZAWA, T. ; SUDA, J. ; SUGITA, K. ; FURUKAWA, T. : Lectins for electron microscopic distinction of eosinophils from other blood cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37 (1989), S. 743–749

- [31] ELLIS, J. ; MORRISON, W. I. ; GODDEERIS, B. ; EMERY, D. : Bovine mononuclear phagocytic cells: Identification by monoclonal antibodies and analysis of functional properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 17 (1987), S. 125–134
- [32] EMERSON, W. E. ; KORNFELD, S. : Characterisation of the oligosaccharide units of the bovine erythrocyte membran glycoprotein. *Biochemistry* 15 (1976), S. 1697–1703
- [33] FLETCHER, M. ; BRUNSCHWIG, J. ; LO, H. ; CALDWELL, K. ; LO, T. : Biochemical and morphological properties of bovine erythrocyte membrane glycoproteins. *Journal of Cellular Biochemistry* 19 (1982), S. 157–170
- [34] FOSSUM, C. ; A.BURNY ; PORTETELLE, D. ; MAMMERICKX, M. ; MOREIN, B. : Detection of B and T cells, with lectins or antibodies, in healthy and bovine leukemia virus–infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 18 (1987), S. 269–278
- [35] FRANZ, H. : 100 Jahre Lektinforschung - eine Bilanz. *Naturwissenschaften* 77 (1990), S. 103–109
- [36] FREIBURGHHAUS, J. ; A.JÖRG: Isolation of bovine eosinophils and characterisation of their leukotriene formation. *Agents and Actions* 31 (1990), S. 16–22
- [37] FURTHMAYR, H. ; TIMPL, R. : Immunochemical studies on structural proteins of the red cell membrane. *European Journal of Biochemistry* 15 (1970), S. 301–310
- [38] GABIUS, H.-J. : Glycohistochemistry: The why and how of detection and localization of endogenous lectins. *Anatomia Histologia Embryologia* 30 (2001), S. 3–31
- [39] GABIUS, H.-J. : Glycans: bioactive signals decoded by lectins. *Biochemical Society Transactions* 36 (2008), S. 1491–1496
- [40] GABIUS, H.-J. ; UHLENBRUCK, G. : Lektine. *Spektrum der Wissenschaft* (1988), S. 50–80
- [41] GASPER, P. W.: The hemopoietic system. In: FELDMANN, B. F. (Hrsg.) ; ZINKL, J. G. (Hrsg.) ; JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [42] GENNARO, R. ; DEWALD, B. ; HORISBERGER, U. ; GUBLER, H. U. ; BAGGIOLOINI, M. : A novel type of cytoplasmatic granule in bovine neutrophils. *The Journal of Cell Biology* 96 (1983), S. 1651–1661

- [43] GERSHWIN, L. J. ; LANCE, P. ; ROKITO, A. S.: Comparison of analysis of bovine surface immunoglobulin bearing and peanut agglutinin binding lymphocytes by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 5 (1983/1984), S. 185–196
- [44] GLASS, E. ; SPOONER, R. : Generation and characterisation of bovine antigen-specific T cell lines. *Journal of Immunological Methods* 128 (1990), S. 267–275
- [45] GOLDSTEIN, I. ; PORETZ, R. : Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E. (Hrsg.) ; SHARON, N. (Hrsg.) ; GOLDSTEIN, I. J. (Hrsg.): *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, 1986
- [46] GOLDSTEIN, I. J. ; HUGHES, R. C. ; MONSIGNY, M. ; OSAWA, T. ; SHARON, N. : What should be called a lectin? *Nature* 285 (1980), S. 66
- [47] HAMAZAKI, H. ; HOTTA, K. ; KONISHI, K. : Comparative studies of human, equine, porcine and bovine erythrocyte membrane sialoglycoproteins. *Comparative Biochemistry and Physiology* 55B (1976), S. 37–44
- [48] HARBO, S. J. ; BARRINGTON, G. M. ; ALLEN, A. J. ; SAMPLE, G. L. ; PARISH, S. M. ; HAMILTON, M. J. ; DAVIS, W. C.: Characterisation of lymphocyte populations by flow cytometry in a calf with sporadic juvenile lymphoma. *Veterinary Clinical Pathology* 33 (2004), S. 163–167
- [49] HAWKEY, C. M. ; DENETT, T. : *Farbatlas der Hämatologie*. Schlütersche , Hannover, 1990
- [50] HECKNER, F. ; FREUND, M. : *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*. Urban & Fischer , München-Jena, 2001
- [51] HOFMANN, W. : *Rinderkrankheiten: Innere und chirurgische Krankheiten*. Ulmer UTB , Stuttgart, 2005
- [52] HONBERG, L. ; LARSEN, B. : Bovine monoclonal antibodies to blood group antigens prepared by murine x bovine or (murine x bovine) x bovine interspecies fusions. *Animal Genetics* 23 (1992), S. 497–508



- [53] HOWARD, C. ; MORRISON, W. ; BENSaid, A. ; DAVIS, W. ; ESKRA, L. ; GERDES, J. ; HADAM, M. ; HURLEY, D. ; LEIBOLD, W. ; LETESSON, J.-J. ; MACHUGH, N. ; NAESSENS, J. ; O'REILLY, K. ; PARSONS, K. ; SCHLOTE, D. ; SOPP, P. ; SPLITTER, G. ; WILSON, R. : 3.2. Summary of workshop findings for leucocyte antigens of cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 27 (1991), S. 21–27
- [54] HOWARD, R. J. ; RODWELL, B. J. ; SMITH, P. M. ; CALLOW, L. ; MITCHELL, G. F.: Comparison of the surface proteins and glycoproteins on erythrocytes of calves before and during infection with *Babesia bovis*. *Journal of Protozoology* 27 (1980), S. 241–247
- [55] HUDGIN, R. L. ; STOCKERT, R. J.: The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 249 (1974), S. 5536–5543
- [56] HUDSON, B. G. ; WEGENER, L. J. ; WINGATE, J. M. ; CARRAWAY, K. L.: Chemical studies of the erythrocyte membrane glycoproteins from several species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 51B (1975), S. 127–135
- [57] HUMBLE, R. : Blood types in cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine* XVIII (1964), S. 379–389
- [58] JAIN, N. C.: *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger , Philadelphia, 1993
- [59] JOHANSSON, C. ; MOREIN, B. : Evaluation of labelling methods for bovine T and B lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 4 (1983), S. 345–359
- [60] KALTER, D. ; GENDELMAN, H. ; MELTZER, M. : Monocytes, dendritic cells, and Langerhans cells in human immunodeficiency virus infection. *Dermatologic Clinics* 9 (1991), S. 415–428
- [61] KAMPEN, A. H. ; OLSEN, I. ; TOLLERSRUD, T. ; STORSET, A. K. ; LUND, A. : Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113 (2006), S. 53–63
- [62] KHAN, F. ; KHAN, R. H. ; SHERWANI, A. ; MOHMOOD, S. ; AZFER, M. A.: Lectins as markers for blood grouping. *Medical Science Monitor* 8 (2002), S. RA293–300
- [63] KILPATRICK, D. C.: Animal lectins: A historical introduction and overview (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* 1572 (2002), S. 187–197

- [64] KOCOUREK, J. ; HOREJSI, V. : Defining a lectin. *Nature* 290 (1981), S. 188
- [65] KOCOUREK, J. : Historical backround. In: LIENER, I. (Hrsg.) ; SHARON, N. (Hrsg.) ; GOLDSTEIN, I. J. (Hrsg.): *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, 1986
- [66] KOLB, G. M. H.: *Vergleichende Histologie: Cytologie und Mikroanatomie der Tiere*. Springer-Verlag , Berlin, Heidelberg, 1991
- [67] KRAFT, W. ; DÜRR, U. m. ; FÜRLI, M. ; BOSTEDT, H. ; HEINRITZI, K. : Hämatologie. In: KRAFT, W. (Hrsg.) ; DÜRR, U. (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer, 1997
- [68] KRAMER, J. W.: Normal hematology of cattle, sheep and goats. In: FELDMANN, B. F. (Hrsg.) ; ZINKL, J. G. (Hrsg.) ; JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [69] KRITZENBERGER, M. ; WROBEL, K.-H. : Histochemical in situ identification of bovine embryonic blood cells reveals differences to the adult haematopoietic system and suggests a close relationship between haematopoietic stem cells and primordial germ cells. *Histochemistry and Cell Biology* 121 (2004), S. 273–289
- [70] KUNITA, S. ; KOYAMA, H. ; SAITO, H. : Preparation and characterization of monoclonal antibodies against bovine B lymphocyte surface antigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 18 (1988), S. 165–167
- [71] LANSDORP, P. M. ; KWAST, T. H. V. D. ; BOER, M. D. ; ZEIJLEMAKER, W. P.: Stepwise amplified Immunoperoxidase (PAP) staining.I. Cellular morphology in relation to membrane markers. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32 (1984), S. 172–178
- [72] LEE, M. ; TURCINOV, D. ; DAMJANOV, I. : Lectins as markers for eosinophilic leukocytes. *Histochemistry* 86 (1987), S. 269–273
- [73] LEVEN, R. M.: Megakaryocytes. In: FELDMANN, B. F. (Hrsg.) ; ZINKL, J. G. (Hrsg.) ; JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [74] LIEBICH, H.-G. : *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. Schattauer , Stuttgart, 2004

- [75] LIS, H. ; SHARON, N. : The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). *Annual Review of Biochemistry* 42 (1973), S. 541–574
- [76] LIS, H. ; SHARON, N. : Lectins as molecules and tools. *Annual Review of Biochemistry* 55 (1986), S. 35–67
- [77] LÖFFLER, G. : *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer–Verlag , Berlin Heidelberg New York, 2003
- [78] LÖSCH, U. ; CIHAK, J. ; ERHARD, M. ; KASPERS, B. : Blut und Abwehr. In: ENGELHARDT, W. (Hrsg.) ; BREVES, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. Enke, 2000
- [79] MACHUGH, N. D. ; MBURU, J. K. ; CAROL, M. J. ; WYATT, C. R. ; ORDEN, J. A. ; DAVIS, W. C.: Identification of two distinct subsets of bovine  $\gamma\delta$ T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology* 92 (1997), S. 340–345
- [80] MACKAY, C. R. ; HEIN, W. R.: A large proportion of bovine T cells express the  $\gamma\delta$ T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *International Immunology* 1 (1989), S. 540–545
- [81] MARTINEZ-AGOSTO, J. A. ; MIKKOLA, H. K. ; AL., V. H.: The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev.* 21 (2007), S. 3044–3060
- [82] MEYERS, K. M. ; HOPKINS, G. ; HOLMSEN, H. ; BENSON, K. ; PRIEUR, D. J.: Ultrastructure of resting and activated storage pool deficient platelets from animals with the Chediak–Higashi–syndrom. *American Journal of Physiology* 106 (1982), S. 364–377
- [83] MIKKOLA, H. K. A. ; ORKIN, S. H.: The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133 (2006), S. 3733–3744
- [84] MILLER, W. J.: Evidence for two new systems of blood groups in cattle. *Genetics* 54 (1966), S. 151–158
- [85] MORIMOTO, T. ; OGIHARA, S. ; TAKISAWA, H. : Anchorage of secretion–competent dense granules on the plasma membran of bovine platelets in the absence of secretory stimulation. *The Journal of Cell Biology* 111 (1990), S. 79–86
- [86] NAESSENS, J. : Surface Ig on B lymphocytes from cattle and sheep. *International Immunology* 9 (1997), S. 349–354

- [87] NAESSENS, J. ; HOPKINS, J. : Introduction and summary of workshop findings. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 52 (1996), S. 213–235
- [88] NAKAMOTO, W. ; MARTELINE, M. ; MACHADO, P. ; RUBIO-COLAUTO, E. ; SCHMIDT, F. ; TSAI, S. ; MOON, D. : Duffy blood group antigens (Fy<sup>a</sup> and Fy<sup>b</sup>) on cattle erythrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849 (1998), S. 490–493
- [89] NEWMAN, R. A. ; UHLENBRUCK, G. G.: Investigation into the occurrence and structure of lectin receptors on human and bovine erythrocyte, milk–fat globule and lymphocyte plasma–membrane glycoproteins. *European Journal of Biochemistry* 76 (1977), S. 149–155
- [90] NOWELL, P. C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research* 20 (1960), S. 462–461
- [91] ÖZEN, A. ; ASTI, R. ; KURTDEDE, N. : Light and electron microscopic studies on mast cells of the bovine oviduct. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 109 (2002), S. 381–420
- [92] ÖZEN, A. ; ERGÜN, L. ; ERGÜN, E. ; SIMSEK, N. : Morphological studies on ovarian mast cells in the cow. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31 (2007), S. 131–136
- [93] P. TSCHUDI, H. H.: Blut und Knochenmark. In: MOSIMANN, W. (Hrsg.) ; KOHLER, T. (Hrsg.): *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Verlag Paul Parey, 1990
- [94] PAAPE, M. J. ; BANNERMAN, D. D. ; ZHAO, X. ; LEE, J.-W. : The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary Research* 34 (2003), S. 597–627
- [95] PADGETT, G. A. ; HIRSCH, J. G.: Lysozyme: Its absence in tears and leukocytes of cattle. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 45 (1967), S. 569–570
- [96] PARMLEY, R. T. ; MARTIN, B. ; SPICER, S. : Staining of blood cells surfaces with a lectin–horseradish peroxidase method. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21 (1973), S. 912–922
- [97] PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, Volume one: Preparative and Optical Technology*. Churchill Livingstone , Edinburgh London and New York, 1980

- [98] PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, Volume two: Analytical technology*. Churchill Livingstone , Edinburgh London Melbourne and New York, 1985
- [99] PEARSON, T. W. ; ROELANTS, G. E. ; LUNIDIN, L. B. ; MAYOR-WITHEY, K. S.: The bovine lymphoid system: Binding and stimulation of peripheral blood lymphocytes by lectins. *Journal of Immunological Methods* 26 (1979), S. 271–282
- [100] PENEDO, M. C. T.: Red blood cell antigens and blood groups in the cow, pig, sheep, goat and, llama. In: FELDMANN, B. F. (Hrsg.) ; ZINKL, J. G. (Hrsg.) ; JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [101] PONTZER, C. H. ; RUSSEL, S. W.: Culture of macrophages from bovine bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 21 (1989), S. 351–362
- [102] PRIN-MATHIEU, C. ; ROUX, Y. L. ; FAURE, G. ; LAURENT, F. ; BENE, M. ; MOUSSAOUI, F. : Enzymatic activities of bovine periperal blood leukocytes and milk polymorphnuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9 (2002), S. 812–817
- [103] PSCHYREMBEL: *Klinisches Wörterbuch*. 260. Auflage. de Gruyter , Berlin, 2004
- [104] RASKIN, R. E. ; VALENCIANO, A. : Cytochemistry of normal leukocytes. In: FELDMANN, B. F. (Hrsg.) ; ZINKL, J. G. (Hrsg.) ; JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [105] REISNER, Y. ; BINIAMINOV, M. ; ROSENTHAL, E. ; SHARON, N. ; RAMOT, B. : Interaction of peanut agglutinin with normal human lymphocytes and with leukemic cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 76 (1979), S. 447–451
- [106] ROCHA, J. ; SANDERS, J. ; CHERBONNIER, D. ; LAWLOR, T. ; TAYLOR, J. : Blood groups and milk and type traits in dairy cattle: After forty years of research. *Journal of Dairy Science* 81 (1998), S. 1663–1680
- [107] ROCHA, J. ; SANDERS, J. ; CHERBONNIER, D. ; LAWLOR, T. ; TAYLOR, J. : Trait-based analysis in dairy cattle using blood group polymorphisms. *Journal of Dairy Science* 81 (1998), S. 1681–1689
- [108] ROMEIS, P. ; P.BÖCK (Hrsg.): *Mikroskopische Technik*. Urban & Schwarzenberg , München, 1989

- [109] ROSSI, C. R. ; KIESEL, G. : Bovine peripheral blood monocyte cultures: growth characteristics and cellular receptors for immunoglobulin G and complement. *American Journal of Veterinary Research* 38 (1977), S. 559–563
- [110] ROTH, J. ; KAEBERLE, M. : Evaluation of bovine polymorphnuclear leukocyte function. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2 (1981), S. 157–174
- [111] ROVID, A. H. ; CARPENTER, S. ; ROTH, J. A.: Monocyte function in cattle experimentally infected with bovine immunodeficiency–like virus. *Veterinary Immunology and immunopathology* 45 (1995), S. 31–43
- [112] ROYAL, G. C. ; FERGUSON, L. ; SUTTON, T. : Bovine erythrocyte antigens III. The isolation of blood-group specific substances from erythrocytes. *The Journal of Immunology* 71 (1952), S. 22–25
- [113] RÜDIGER, H. : Plant Lectins — More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica* 161 (1998), S. 130–152
- [114] RÜDIGER, H. : Lectine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. *Chemie in unserer Zeit* 15 (1981), S. 155–162
- [115] RÜDIGER, H. : Phythemagglutinins. *Journal of Medicinal Plant Research* 46 (1982), S. 3–9
- [116] RÜDIGER ET AL.: Human and animal glycoconjugates. *Current Medicinal Chemistry* 7 (2000), S. 398–416
- [117] RÜSSE, I. : Herz– und Kreislaufsystem. In: RÜSSE, I. (Hrsg.) ; SINOWATZ, F. (Hrsg.): *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. 2008
- [118] SCHRÖFFEL, J. ; RADA, A. ; THIELE, O. W. ; KOCH, J. : The J blood–group substance of cattle. *European Journal of Biochemistry* 22 (1971), S. 396–399
- [119] SHARON, N. : Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunology Today* 5 (1984), S. 143–147
- [120] SHARON, N. ; LIS, H. : Biological properties of lectins. In: LIENER, I. (Hrsg.) ; SHARON, N. (Hrsg.) ; GOLDSTEIN, I. J. (Hrsg.): *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, 1986

- [121] SHARON, N. ; LIS, H. : History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14 (2004), S. 53R–62R
- [122] SINOWATZ, F. : Blut, Knochenmark und lymphatisches System. In: HEES, H. (Hrsg.) ; SINOWATZ, F. (Hrsg.): *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Deutscher Ärzte–Verlag, 2000
- [123] SINOWATZ, F. : Histologische Technik und Mikroskopie. In: HEES, H. (Hrsg.) ; SINOWATZ, F. (Hrsg.): *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Deutscher Ärzte–Verlag, 2000
- [124] STABEL, J. R. ; KEHRLI, M. E. J. ; REINHARDT, T. A. ; NONNECKE, B. J.: Functional assesment of bovine monocytes isolated from peripheral blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58 (1997), S. 147–153
- [125] STEFFENS, W. : Ultrastructural features of leukocytes. In: FELDMANN, B. F. (Hrsg.) ; ZINKL, J. G. (Hrsg.) ; JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [126] STÖBER, M. ; GRÜNDER, H.-D. : Kreislauf. In: DIRKSEN, G. (Hrsg.) ; GRÜNDER, H.-D. (Hrsg.) ; STÖBER, M. (Hrsg.): *Gustav Rosenberger: Die klinische Untersuchung des Rindes*. Paul Parey Verlag, 1990
- [127] STORMONT, C. : Current status of blood groups in cattle. *Annals of the New York Academy of Science* 97 (1962), S. 251–68
- [128] STORMONT, C. ; CUMLEY, R. : Cellular antigens in cattle blood. *Journal of Heredity* 34 (1943), S. 35–41
- [129] SUMNER, J. B. ; HOWELL, S. F.: The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. *Journal of Bacteriology* 32 (1936), S. 227–237
- [130] TEALE, A. ; BALDWIN, C. ; MORRISON, W. ; ELLIS, J. ; MACHUGH, N. : Phenotypic and functional characteristics of bovine T lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 17 (1987), S. 113–123
- [131] THOMSEN., H. : *Investigations on bovine marker maps, blood groups and QTL in the ADR granddaughter design*. Institut für Tierzucht und Tierhaltung , Kiel, 2000

- [132] THOMSEN, H. ; REINSCH, N. ; XU, N. ; LOOFT, C. ; GRUPE, S. ; KÜHN, C. ; BROCKMANN, G. ; SCHWERIN, M. ; LEYHE-HORN, B. ; HIENDLEDER, S. ; ERHARDT, G. ; MEDJUGORAC, I. ; RUSS, I. ; FÖRSTER, M. ; BRENIG, B. ; REINHARDT, F. ; REENTS, R. ; BLMEL, J. ; AVERDUNK, G. ; KALM, E. : Mapping of the bovine blood group systems J, N', R' and Z show evidence for oligo-genetic inheritance. *Animal genetics* 33 (2002), S. 107–117
- [133] TUCKER, E. ; METENIER, L. ; GROSCLAUDE, J. ; CLARKE, S. ; KILGOUR, L. : Monoclonal antibodies to bovine blood group antigens. *Animal Genetics* 17 (1986), S. 3–13
- [134] WAELE, M. D. ; MEY, J. D. ; MOEREMANS, M. ; BRABANDER, M. D. ; CAMP, B. V.: Immunogold staining method for the light microscopic detection of leukocyte cell surface antigens with monoclonal antibodies. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 31 (1983), S. 376–381
- [135] WAELE, M. D. ; MEY, J. D. ; RENMANS, W. ; LABEUR, C. ; JOCHMANNS, K. ; CAMP, B. V.: Potential of Immunogold-silver staining for the study of leukocyte subpopulations as defined by monoclonal antibodies. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 34 (1986), S. 1257–1263
- [136] WAELE, M. D. ; RENMANS, W. ; SEGERS, E. ; VALCK, V. D. ; JOCHMANS, K. ; CAMP, B. V.: An Immunogold-silver staining method for detection of cell surface antigens in cell smears. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37 (1989), S. 1855–1862
- [137] WEARNE, K. A. ; WINTER, H. C. ; OSHEA, K. ; GOLDSTEIN, I. J.: Use of lectins for probing differentiated human embryonic stem cells for carbohydrates. *Glycobiology* 16 (2006), S. 981–990
- [138] WHITE, J. : The secretory pathway of bovine platelets. *Blood* 69 (1987), S. 878–885
- [139] WOODSIDE, E. ; KOCHOLATY, W. : Carbohydrates of human and bovine platelets. *Blood* 16 (1960), S. 1173–1183
- [140] WU, D. ; TAKAHASHI, K. ; LIU, N. ; KOGUCHI, A. ; MAKARA, M. ; SASAKI, J. ; GORYO, M. ; OKADA, K. : Distribution of T-lymphocyte subpopulation in blood and spleen of normal cattle and cattle with enzootic bovine leukosis. *Journal of Comparative Pathology* 120 (1999), S. 117–127



- [141] WYATT, C. R. ; MADRUGA, C. ; CLUFF, C. ; PARISH, S. ; HAMILTON, M. J. ; GOFF, W. ; DAVIS, W. C.: Differential distribution of  $\gamma\delta$ T-cell receptor lymphocyte subpopulation in blood and spleen of young and adult cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 40 (1994), S. 187–199
- [142] ZANETTI, M. ; LITTERI, L. ; GENNARO, R. ; HORSTMANN, H. ; ROMEO, D. : Bactene-cins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. *The Journal of Cell Biology* 111 (1990), S. 1363–1371
- [143] ZUCKER-FRANKLIN, D. ; BENSON, K. ; MEYERS, K. : Absence of a surface-connected canalicular system in bovine platelets. *Blood* 65 (1985), S. 241–244

# Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil F. Sinowatz für die Möglichkeit zu dieser Doktorarbeit und die sehr gute und freundliche Betreuung bedanken. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Tieranatomie II, insbesondere Frau Christine Neumüller und Frau Dr. Barabara Schick, für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Klee und den Mitarbeitern der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim für die Hilfe bei der Probenentnahme und Bereitstellung des Labors. Ich möchte mich auch bei Herrn Dr. Kury für die freundliche Unterstützung bei der Probenentnahme am Schlachthof Buchloe bedanken.

Vielen Dank an Loui Morgott, mit der ich viele lustige Stunden im Doktorandenlabor und am Mikroskop verbracht habe.

Ganz herzlich danke ich auch Florian Schleiderl für seine tatkräftige Unterstützung und die viele Zeit, die er für mich vor dem Computer verbracht hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben und mir nicht nur dabei sondern auch bei allem anderen immer zur Seite standen. Ich bedanke mich auch bei meinem Bruder Alex, der mir sehr geduldig mit vielen Tipps weiterhalf.