

Aus dem  
Lehrstuhl für Tieranatomie II  
Histologie und Embryologie  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

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

---

## **Ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchungen am Blut des Hundes (*Canis familiaris*)**

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

Von  
Maria-Louise Morgott  
aus München

München 2010

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: Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 13. Februar 2010



**Meiner Familie**

---

---

Kapitel I: Einleitung .....	1
Kapitel II: Literaturübersicht .....	4
1. Zytologie der Blutzellen des Hundes .....	4
1.1. Blutzusammensetzung und Aufgabe .....	4
1.2. Hämatopoese .....	5
1.3. Erythrozyten .....	6
1.3.1. Erythropoese.....	6
1.3.2. Struktur der Erythrozyten.....	8
1.3.3. Aufgabe der Erythrozyten .....	10
1.4. Leukozyten .....	10
1.4.1. Neutrophile Granulozyten .....	11
1.4.1.1. Granulopoese.....	12
1.4.1.2. Struktur der neutrophilen Granulozyten.....	14
1.4.1.3. Aufgabe der neutrophilen Granulozyten .....	15
1.4.2. Eosinophile Granulozyten .....	16
1.4.2.1. Bildung der eosinophilen Granulozyten.....	16
1.4.2.2. Struktur der eosinophilen Granulozyten .....	17
1.4.2.3. Aufgabe der eosinophilen Granulozyten.....	19
1.4.3. Basophile Granulozyten .....	20
1.4.3.1. Bildung der basophilen Granulozyten.....	20
1.4.3.2. Struktur der basophilen Granulozyten.....	21
1.4.3.3. Aufgabe der basophilen Granulozyten.....	21
1.4.4. Lymphozyten.....	22
1.4.4.1. T-Lymphozyten und B-Lymphozyten.....	23
1.4.4.2. Lymphopoese .....	24
1.4.4.3. Struktur der Lymphozyten .....	25
1.4.4.4. Aufgabe der Lymphozyten.....	26
1.4.5. Monozyten.....	27
1.4.5.1. Bildung der Monozyten.....	27
1.4.5.1. Struktur der Monozyten .....	28
1.4.5.2. Aufgabe der Monozyten.....	29
1.5. Thrombozyten .....	30
1.5.1. Thrombozytopoese .....	30
1.5.2. Struktur der Thrombozyten .....	31
1.5.3. Aufgabe der Thrombozyten .....	33
2. Blutbild des Hundes .....	34
3. Lektine und Lektinhistochemie .....	34
3.1. Historie der Lektine.....	35
3.2. Vorkommen und Funktion der Lektine .....	36
3.3. Struktur und Bindungseigenschaften .....	37
3.4. Funktionelle Kategorisierung.....	38
3.5. Lektinhistochemie: Definition und Methoden .....	39
3.6. Lektinhistochemische Untersuchungen an Blutzellen .....	40
4. Kohlenhydrate der Glykocalix der Blutzellen.....	41
4.1. Funktion und Bedeutung der Zuckerstrukturen für die Blutzelle .....	42

4.1.1. Abbau .....	43
4.1.2. Diapedese .....	43
4.1.3. Blutgruppen .....	44
4.2. Kohlenhydrate als Rezeptoren für Mikroorganismen .....	46
4.4. Funktion und Bedeutung der Zuckerstrukturen in der Lektinhistochemie .....	47
 Kapitel III: Material und Methoden .....	 48
 1. Material .....	 48
1.1. Überblick über die in der Arbeit verwendeten Hunde .....	48
1.2. Überblick über die in der Arbeit herangezogenen Lektine .....	50
1.3. Überblick über die in der Arbeit verwendeten Antikörper .....	52
2. Methoden.....	53
2.1. Probenentnahme .....	53
2.2. Fixierung für die lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.....	53
2.3. Fixierung für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen .....	53
2.4. Lichtmikroskopische Färbungen .....	54
2.5. Glykohistochemische Färbungen .....	55
2.5.1. FITC markierte Lektine.....	56
2.5.2. Biotnylierte Lektine.....	59
2.6. Immunzytochemische Färbungen .....	61
2.7. Aufarbeitung der Blutproben für die Elektronenmikroskopie .....	61
 IV: Ergebnisse .....	 63
 1. Lichtmikroskopische Untersuchungen an den Blutzellen des Hundes .....	 64
1.1. Erythrozyten .....	64
1.2. Granulozyten .....	64
1.2.1. Neutrophile Granulozyten .....	64
1.2.2. Eosinophile Granulozyten .....	68
1.2.3. Basophile Granulozyten .....	69
1.3. Thrombozyten .....	70
1.4. Agranulozyten .....	70
1.4.1. Lymphozyten.....	70
1.4.2. Monozyten.....	71
2. Glykohistochemische Untersuchungen an den Blutzellen des Hundes .....	72
2.1. Bindungsstellen für Convalaria ensiformis Agglutinin (Con A) .....	73
2.2. Bindungsstellen für Lens culinaris Agglutinin (LCA).....	75
2.3. Bindungsstellen für Pisum sativum Agglutinin (PSA) .....	76
2.4. Bindungsstellen für Ulex europaeus Agglutinin (UEA) .....	79
2.5. Bindungsstellen für Triticum vulgare Agglutinin (WGA).....	81
2.6. Bindungsstellen für succyliertes Triticum vulgare Agglutinin (WGAs) .....	83
2.7. Bindungsstellen für Glycine max Agglutinin (SBA) .....	85
2.8. Bindungsstellen für Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) .....	87
2.9. Bindungsstellen für Sophora japonica Agglutinin (SJA).....	89
2.10. Bindungsstellen für Peanut Agglutinin (PNA).....	91
2.11. Bindungsstellen für Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL-I) .....	93

---

2.12. Bindungsstellen für Ricinus communi-Agglutinin (RCA).....	95
2.13. Bindungsstellen für Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E).....	97
2.14. Bindungsstellen für Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L).....	99
2.15. Bindungsstellen für Maracia amurensis Agglutinin (MAL-I).....	101
2.16. Bindungsstellen für Sambucus nigra Agglutinin (SNA).....	103
2.17. Bindungsstellen für Viscum album Agglutinin (VAA) .....	105
3. Immunhistochemische Untersuchungen am Blut des Hundes	107
3.1. Immunhistochemischer Nachweis von CD4 .....	107
3.2. Immunhistochemischer Nachweis von CD8 .....	109
3.3. Immunhistochemischer Nachweis der B-Lymphozyten-Subpopulation.....	111
4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Blut des Hundes	113
4.1. Erythrozyten .....	113
4.2. Granulozyten .....	113
4.2.1. Neutrophile Granulozyten .....	113
4.2.2. Eosinophile Granulozyten .....	120
4.2.3. Basophile Granulozyten .....	123
4.3. Lymphozyten.....	125
4.4. Monozyten.....	131
4.5. Thrombozyten .....	134
V: Diskussion	137
1. Lichtmikroskopie der kaninen Blutzellen	137
2. Elektronenmikroskopie der Blutzellen des Hundes	144
3. Glykohistochemie der kaninen Blutzellen	147
4. Immunzytochemische Untersuchungen der kaninen Blutzellen	150
VI: Zusammenfassung	153
VII: Summary	155
Abkürzungsverzeichnis	157
Lösungen für die Elektronenmikroskopie, Lichtmikroskopie und Glykohistochemie	159
Abbildungsverzeichnis	164
Tabellenverzeichnis	168
Literaturverzeichnis	170
Danksagung	182

---

## Kapitel I: Einleitung

Lektine spielten in Wissenschaft und Forschung lange Zeit eine Nebenrolle. Nach ihrer „Entdeckung“ und ersten wissenschaftlichen Erwähnung in der Dissertation von Peter Hermann Stillmark im Jahre 1888 führten die Lektine lange Zeit ein Schattendasein in der Forschung.

Obwohl das ubiquitäre Vorkommen dieser erythrozytagglutinierenden Proteine seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt war, wurden diese kaum erforscht. Man hielt sie aufgrund ihrer blutgerinnenden Wirkung in erster Linie für Toxine (bei pflanzlichen Lektinen etwa im Dienste der Abwehr von Fraßfeinden) und untersuchte ihre verschiedenen Funktionen im Gesamtzusammenhang der pflanzlichen, tierischen oder menschlichen Organismen nicht weiter. Erst sehr viel später zeigte sich, dass diese Proteine und Glykoproteine auch andere Zelltypen agglutinieren und sich dabei zuckerspezifisch verhalten. Für diese Zell agglutinierenden, Zucker spezifischen Proteinen setzte sich ab den 1960er Jahren die Bezeichnung „Lektine“ durch, die 1954 von William C. Boyd der Boston University geprägt wurde und sich vom Lateinischen „legere: auswählen, auslesen“ ableitet. Er ersetzte den vormaligen, sich nun als zu eng erweisenden Begriff der „Hämagglutinine“, der nur auf die blutgerinnende Eigenschaft dieser Proteine anspielte.

Bis in die 1970er Jahre wurden nur sehr wenige Lektine isoliert und untersucht (Sharon und Lis, 2004). Dies änderte sich schlagartig mit der Erkenntnis, dass die Zuckerstrukturen auf der Zellmembran sowohl eine entscheidende Rolle beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung als auch bei der Interaktion der Zellen mit ihrer Umwelt und bei pathologischen Prozessen spielen. Während der Entwicklung, Differenzierung und Erkrankung einer Zelle ist eine charakteristische Änderung der Oberflächenstrukturen festzustellen (Gabius und Gabius, 1993):

Amerikanischen Studien der Princeton und Berkeley Universitäten zeigten, dass bestimmte pflanzliche Lektine, wie etwa das Concanavalin A, die Eigenschaft besaßen, bösartig mutierte Zellen zu agglutinieren, deren gesunde Elternzellen jedoch nicht. Diese Forschungsergebnisse ließen den Schluss zu, dass Krebserkrankungen mit einer Veränderung der Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche einhergehen, die von den Lektinen erkannt werden (Sharon und Lis, 2004).



---

Die Kohlenhydrate auf Krebszellen unterscheiden sich in Quantität wie auch Qualität von denen auf normalen Zellen (Gabijs et al.,1988). Folglich wurden Lektine von nun an bei Untersuchungen von bösartigen Zellmutationen verstärkt eingesetzt.

Neben diesem Einsatz in der Krebsforschung machte vor allem ihre Eigenschaft, spezifische Zucker zu binden, die Lektine interessant für die Forschung und bewirkte, dass sie in zahlreichen Untersuchungen für verschiedenste Zwecke eingesetzt wurden: so etwa bei der Isolierung und Bestimmung von Glykoproteinen, der Untersuchung von auf der Zellmembran befindlichen Kohlehydraten oder der Zellfraktionierung. Außerdem ermöglichten sie wichtige Erkenntnisse über die Interaktion von Proteinen und Kohlehydraten und es zeigte sich, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Zellerkennung spielen (Sharon, 1998).

Die Eigenschaft der Lektine, spezifische Zucker zu binden, steht auch beim vorliegenden veterinärmedizinischen Forschungsvorhaben im Mittelpunkt. Im Rahmen von ultrastrukturellen, immunzytochemischen und glykohistochemischen Untersuchungen soll das spezifische Bindungsverhalten von Lektinen konkrete Erkenntnisse über die verschiedenen Blutzellen des Hundes samt ihrer auf der Zellmembran befindlichen Zuckerstrukturen liefern, um diese dann genauer charakterisieren und klassifizieren zu können.

In der Forschung finden sich zwar bereits einige Studien, bei denen mit Hilfe von Lektinen bestimmte Blutzellen des Hundes untersucht worden sind. Es wurden jedoch noch keine Untersuchungen unternommen, bei denen sämtliche Blutzelltypen des Hundes mit Lektinen belegt wurden, um die Zuckertypen auf der Zelloberfläche konkret zu bestimmen. Dies soll die vorliegende Arbeit leisten.

Doch warum ist es sinnvoll, das gesamte Repertoire kaniner Blutzellen so genau zu untersuchen und zu klassifizieren? Eine genaue Erforschung der Kohlehydrate auf den Blutzellen wäre hilfreich beim inzwischen mehr und mehr angedachten Einsatz von Zuckern und Lektinen als Medikamente.

Der inzwischen häufig vertretenen Meinung folgend, dass beim Befall von Krankheitserregern die Bindung von Bakterien an die Oberflächenzucker der Wirtszelle die eigentliche Infektion einleitet, ließen sich bestimmte Zucker zur Vorbeugung oder zur Behandlung einsetzen.

Wenn es den krankheitserregenden Einzellern (Protozoen), Bakterien und Viren nämlich nicht gelingt, sich an mindestens eine Gewebeart ihres Wirts zu binden, werden sie durch die Abwehrmechanismen des Organismus entfernt (Gabijs und Gabijs, 1993).

---

Folglich ist es denkbar, Zucker zur Vorbeugung oder zur Behandlung von Infektionskrankheiten einzusetzen, indem geeignete Moleküle als eine Art molekularer Köder pathogene Bakterien abfangen, bevor diese ihr Wirtsgewebe erreichen. Mit diesem anti-adhäsiven Therapieansatz könnte es gelingen, mikrobiellen und viralen Infektionen vorzubeugen oder sie in ihrem Fortschreiten zu hemmen. Um die Adhäsion zu stören, bedarf es nicht gezwungenermaßen eines Kohlenhydrats – jede andere Substanz, die sich entweder an das bakterielle Lektin oder an das Oberflächen-Kohlenhydrat der Wirtszellen zu binden vermag, erfüllt denselben Zweck (Gabijs et al.,1988). Um solch alternative Adhäsion-Inhibitoren oder eben die passenden Zucker zu finden, bedarf es jedoch der genauen Kenntnis der Strukturen von Oberflächenzuckern auf den Blutzellen des Wirts. Dazu soll die vorliegende Dissertationsarbeit einen Beitrag leisten.

Im praktischen Teil des vorliegenden Forschungsvorhabens sollen sämtliche Blutzellen von 23 Testhunden verschiedenen Alters mit Lektinen versetzt und daraufhin mikroskopisch untersucht werden.

---

## **Kapitel II:      Literaturübersicht**

Der Literatur-Teil gibt zunächst eine allgemeine Übersicht über die Blutzellen des Hundes. Es schließt sich daran eine allgemeine Abhandlung zum Thema Lektine an, die Geschichte ihrer Entdeckung, ihre allgemeine strukturelle Morphologie, die Einteilung, Kategorisierung und Funktion und die Methoden der Lektinhistochemie. Anschließend wird auf das Vorkommen und die Funktion von Kohlenhydraten der Blutzellen eingegangen.

### **1. Zytologie der Blutzellen des Hundes**

In den nachfolgenden Unterpunkten sollen die Genese, Aufgabe und Struktur aller Blutzellentypen des Hundes näher beschrieben werden. Insbesondere liegt hierbei das Augenmerk auf die Existenz von Kohlenhydraten auf der Zellmembran, sofern diese bereits näher untersucht wurden.

#### **1.1. Blutzusammensetzung und Aufgabe**

Blut besteht sowohl beim Menschen als auch beim Tier aus einem flüssigen Anteil, dem Blutplasma, und einem zellulären Anteil. Das Blutvolumen beträgt durchschnittlich 6-7% des Körpergewichts. Beim Hund entspricht das Blutvolumen 85 bis 90ml/kg (Post, 2000). Das Blutplasma besteht zu 90% aus Wasser und 7-8% aus Gesamteiweiß, welches sich aus vielen verschiedenen Proteinen zusammensetzt. Den nicht gerinnenden Anteil des Blutplasmas nennt man Serum, welches der durch Blutgerinnung von korpuskulären Bestandteilen und Fibrin befreite, wässrige Teil des Blutes ist. Die zellulären Bestandteile werden von den roten Blutkörperchen (Erythrozyten), den weißen Blutzellen (Leukozyten) und den Blutplättchen (Thrombozyten) gebildet (Hees und Tschudi, 1990). Als wichtigster Funktionsträger des Kreislaufsystems übernimmt das Blut viele verschiedene Aufgaben. Es hat eine Transportfunktion für die Atemgase Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid sowie für Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Vitamine, Hormone, Mineralstoffe und Wasser (Kraft et al., 2005). Durch die Regulation des Ionenhaushaltes gewährleistet es die Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts.

---

Spezialisierte Blutzellen, wie z.B. Lymphozyten und Granulozyten, haben eine wichtige Funktion bei den Abwehrvorgängen des Körpers. Die die Gerinnung fördernden Eigenschaften der Thrombozyten schützen den Körper vor dem Verbluten. Außerdem ist der Körper durch das Blut in der Lage, seine Körpertemperatur konstant aufrechtzuerhalten (Hees, Sinowatz, 2000). Die Blutwerte der verschiedenen Haussäugetiere werden entscheidend von Alter, Geschlecht und Rasse beeinflusst. Ebenso wirken sich Ernährungszustand, emotionale Unruhe, Aufregung und Trainingszustand auf die unterschiedlichen Blutwerte aus. Die Gesamtleukozytenzahl wird durch Stresshormone beeinflusst. So reagieren etwa Hund und Katze mit einer deutlichen Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000) sehr leicht auf Stress.

## **1.2. Hämatopoese**

Bei der Hämatopoese unterscheidet man die pränatale und die postnatale Blutbildung. Die pränatale Hämatopoese gliedert sich in die megaloblastische, hepatolienale und die medulläre Periode. Während der megaloblastischen Periode werden Megaloblasten (kernhaltige, große Erythrozyten) im Mesenchym des Dottersacks und in den Gefäßsprossen des Embryos gebildet, in der hepatolienalen Periode kommt es zum erstmaligen Auftreten von Myeloblasten und ihren Abkömmlingen in der Leber und der Milz. Die medulläre Blutbildung findet dann vor allem im Knochenmark statt. Nach der Geburt entstehen die Blutzellen dann ausschließlich im Knochenmark (Mischke, 2003; Kraft et al., 2005), wobei aber Leber und Milz ihre Fähigkeit zur Blutbildung beibehalten und so bei Bedarf in der Lage sind, Blutzellen zu bilden (Gasper, 2000). Beim Hund beginnt die Hämatopoese ab dem 40. Tag der Embryonalentwicklung mit der Besiedelung von Leber, Milz und Thymus mit Stammzellen. Ab dem 45. Tag wird dann das Knochenmark besiedelt. Nach der Geburt liegt somit das gesamte Knochenmark als aktives Mark vor (Rüsse in Sinowatz, 2008) Die megaloblastische Phase findet im ersten Drittel der Trächtigkeit statt, bei 24 Tage alten Embryonen kann erstmalig eine intraembryonale Erythropoese nachgewiesen werden. Die hepatolienale Phase findet ab dem 40. Tag der Trächtigkeit statt. Am 48. Tag schließlich beginnt die medulläre Phase (Gasper, 2000).

Alle Blutzellen gehen aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle hervor, dem Hämozytoblasten, welcher in den Maschen des retikulären Bindegewebes im Knochenmark liegt. Der Hämozytoblast ist zu einer differenzierten Zellteilung fähig (Kolb, 1990) und ist

---

somit pluripotent, das heißt er kann sämtliche Zelltypen des lymphohämoetischen Systems hervorbringen. Die Entwicklung der reifen Endzellen zu ihrer jeweiligen Erscheinungsform wird dabei von humoralen Wachstumsfaktoren gesteuert (Mischke, 2003).

### **1.3. Erythrozyten**

Die Blutzellen lassen sich in die Klasse der roten und die Klasse der weißen Blutkörperchen einteilen. Während die reifen Thrombozyten und roten Blutkörperchen (Erythrozyten) über keinen eigenen Zellkern verfügen und stets im Blutkreislauf zirkulieren, haben die weißen Blutkörperchen (Leukozyten) einen Kern und können die Blutbahn - etwa im Dienste der Immunabwehr - aktiv verlassen.

Die Erythrozyten machen ungefähr 45% des gesamten Blutvolumens aus (Dellmann und Carithers, 1996). Die Bildung roter Blutkörperchen wird durch das Hormon Erythropoetin stimuliert, welches von Zellen des Nierenmarks gebildet wird (Rebar et al., 2002). Der relative Anteil der Erythrozyten am Vollblut wird als Hämatokrit bezeichnet (auch PCV – *packed cell volume* genannt). Abhängig vom Sauerstoffbedarf und vom Sauerstoffangebot variiert die Erythrozytenanzahl. Durch körperliche Beanspruchung oder Langzeitaufenthalte im Höhenklima erhöht sich der Hämatokrit (Kraft et al., 2005). Gebildet werden Erythrozyten im Knochenmark (Erythropoese). Der Erythrozyten-Abbau findet insbesondere in der Milz statt, wo sie von Makrophagen phagozytiert werden. Ihre Lebensdauer unterscheidet sich beim Tier Spezies-abhängig. Beim Hund beträgt sie durchschnittlich 100-115 Tage (Christian, 2000). Ungefähr 1% der zirkulierenden roten Blutkörperchen des Hundes werden täglich durch neue ersetzt (Rebar et al. 2002). Fast eine Million Erythrozyten bildet zum Beispiel ein gesunder 15 Kilogramm schwerer Hund pro Sekunde, um den Verluste alternder roter Blutzellen auszugleichen (Mischke, 2003) Die Anzahl der kaninen Erythrozyten im Blut beträgt  $5,5-8 \times 10^6/\text{mm}^3$  (Loeffler, 1994).

#### **1.3.1. Erythropoese**

Ausgehend von einer pluripotenten Stammzelle durchlaufen die Erythrozyten bei ihrer Entwicklung die Stadien des Proerythroblasten, des basophilen Erythroblasten, des polychromatischen Erythroblasten, des azidophilen Erythroblasten (Normoblast) und des Retikulozyten (Kraft et al., 2005). Der Proerythroblast ist eine große runde Zelle mit rundem

---

Kern, welcher grobes Chromatin und einen Nukleolus enthält. Er wird von einem schmalen dunkelblauen Zytoplasmasaum umgeben, welcher nicht granuliert ist und mit einer perinukleären Aufhellung in Erscheinung tritt. Von ihm unterscheidet sich der basophile Erythroblast durch den fehlenden Nukleolus. Der Kern enthält dunkelviolettes, scholliges Chromatin und ist von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben, welcher mittel stark basophil gefärbt ist. Der polychromatische Erythroblast zeichnet sich durch seine geringere Größe und den runden bis ovalen Kern aus. Sein Zytoplasma stellt sich durch den höheren Hämoglobinanteil blaugrauviolett dar. Bei den Normoblasten kommt es dann bereits zur vollständigen Hämoglobinisation. Das Zytoplasma des Retikulozyten erscheint im Frühstadium noch bläulich, später dann rötlich, ein Zellkern ist nicht mehr vorhanden (Reagan et al., 1998; Car, 2000; Mische, 2003).

Zu Beginn der Erythropoese reagiert das Zytoplasma durch seinen hohen Gehalt an RNA basophil, und lässt sich somit durch basische Farbstoffe gut anfärben. Aufgrund der zunehmenden Bildung von Hämoglobin reagiert das Zytoplasma mit zunehmender Zellreife eosinophil und bindet verstärkt den sauren Farbstoff Eosin. Während der Erythropoese werden die einzelnen Zellgenerationen kleiner. Durch Ausstoßen des Kerns entsteht aus der letzten kernhaltigen Erythrozytenvorstufe, dem polychromatischen Normoblasten, der Retikulozyt. Innerhalb weniger Tage verliert der Retikulozyt die letzten basophilen Reste, die der Zellmembran angelagert waren und wird als ausdifferenzierter Erythrozyt in die sinusoidalen Räume des Knochenmarks entlassen (Hees und Tschudi, 1990).

Die gesamte Erythropoese nimmt ca. 4-5 Tage in Anspruch (Hees und Sinowatz, 2000). Im Gegensatz zum Pferd, zum Rind, zum Schaf oder zur Ziege kommen beim Hund im Durchschnitt 0,5-1% Retikulozyten im peripheren Blut vor. Bei Blutverlusten steigt die Anzahl der Retikulozyten im peripheren Blut an (Meinkoth und Clinkbeard, 2000, Fernandez und Grindem, 2000). Sie werden zur Kompensation des verlorenen Blutes verstärkt freigesetzt (Mische 2006). Erythropoetin, ein Hormon des Nierenmarks, stimuliert die Produktion von Erythrozyten im Knochenmark. Die roten Blutkörperchen zirkulieren ungefähr 100 Tage im Blut, bevor sie von den Makrophagen der Milz, des Knochenmarks oder der Leber phagozytiert werden (Rebar et al., 2002).

---

### 1.3.2. Struktur der Erythrozyten

Die roten Blutkörperchen erscheinen als bikonkave Scheiben. Im Laufe ihrer Entwicklung verlieren die Erythrozyten der Säugetiere ihre Zellorganellen, insbesondere ihren Kern (Pyknosis) (Dellmann und Carithers, 1996). Durch den fehlenden Kern sind die Erythrozyten extrem formflexibel und können dadurch selbst die kleinsten Kapillaren der Endstrombahn passieren (Loeffler, 1994). Beim Hund findet sich im Blutausschlag regelmäßig das Phänomen der „Geldrollenbildung“ der Erythrozyten, die als Folge der aneinander gelagerten Blutkörperchen zu verstehen ist. Der Grund für die enge Aneinanderlagerung liegt in einer verminderten Ladung der Zellmembran. Dies wird durch die Scheibenform der roten Blutzellen noch unterstützt und bildet sich oft bei der napfförmigen Verformung beim Passieren der kleinen Kapillaren. Eine Tendenz zur leichten Geldrollenbildung findet sich durchaus auch bei gesunden Hunden, wird aber durch verschiedene Erkrankungen gefördert. Ein Überschuss an Protein (Hyperfibrinogenämie, Hyperglobulinämie) kann Ursache dafür sein, dass die sich einander abstoßenden negative Oberflächenladungen vermindert werden. Auch Entzündungen oder onkologische Grunderkrankungen können zu einer deutlichen Geldrollenbildung der Erythrozyten führen (Mischke, 2006). Die Zellmembran der Erythrozyten ist glatt und umschließt einen leicht viskösen Inhalt, der zu 37% aus Hämoglobin, zu 1% aus Enzymen und zu 65% aus Wasser besteht. Erythrozyten enthalten also in hoher Konzentration den Blutfarbstoff Hämoglobin, welcher eine wichtige Rolle beim Transport von Atemgasen spielt und die rote Farbe der Erythrozyten bedingt.

Auf der Zellmembran sind Rezeptoren zu finden, deren Kohlenhydratreste die Blutgruppen bestimmen. Auf der Innenseite der Zellmembran findet sich ein Netzwerk von Proteinen, das die Formelastizität der Erythrozyten unterstützt. Nach ca. 90 bis 100 Tagen verändern sich beim Hund die Viskositäten von Oberflächenstruktur und Zellmembran – die „gealterten“ Erythrozyten werden von hepatischen und lienalen Systemen erkannt und sodann weitgehend in der Milz abgebaut. Variationen in Zellform und Zellgröße sind in einem gewissen Maße physiologisch, können unter pathologischen Bedingungen (Tumor, Milzveränderungen etc.) aber auch verstärkt beobachtet werden. Physiologisch gestaltete Erythrozyten werden als Normozyten bezeichnet – hiervon abweichend unterscheidet man Makrozyten und Mikrozyten, welche morphologisch eine normale Form aufweisen, sich jedoch in der Größe von Normozyten unterscheiden (Hees und Tschudi, 1990; Christian, 2000; Kraft et al, 2005). Kanine Erythrozyten haben einen Durchmesser von 7,0µm und sind 1,7µm dick. In ihrem

---

Zentrum erscheinen sie heller, was auf den geringeren Durchmesser und Hämoglobingehalt in diesem Bereich zurückzuführen ist. Das Phänomen des Auftretens von unterschiedlich großen roten Blutzellen ohne Formveränderungen wird klinisch als Anisozytose bezeichnet (Kraft et al., 2005; Mischke, 2006). Abweichungen von der normalen Erythrozytengröße finden sich insbesondere bei asiatischen Hunderassen, wie Akita Inu, Chow Chow, Shar Pei und Shiba Inu. Die roten Blutzellen dieser Hunde sind typischerweise kleiner als bei anderen Hunderassen (Mischke, 2006). Bei Welpen finden sich außerhalb und innerhalb der roten Blutkörperchen Hämoglobinkristalle, die auf die noch nicht vollständig abgeschlossene Entwicklung des mononukleären Phagozytose-Systems (MPS) zurückgeführt werden können (Lund, 1974; Spurling, 1977). Außerdem liegen bei Welpen in den ersten Lebenstagen physiologischerweise größere Erythrozyten vor als beim adulten Tier, die allerdings schnell abgebaut werden (Mischke, 2006). Bei der Geburt liegen die Erythrozytenzahlen deutlich unter dem Referenzbereich von adulten Hunden (5,1 T/ $\mu$ l). Im Gegensatz dazu weichen Hämatokrit und Hämoglobingehalt postnatal kaum ab. Kurz nach der Geburt kommt es jedoch zunächst zu einer Abnahme von Hämatokrit und Hämoglobin. Die Erythrozytenzahl sinkt während der ersten zwei Wochen kontinuierlich ab, Hämatokrit und Hämoglobin sogar bis zu vier Wochen post partum. Der Grund dafür ist die rasche Zunahme des Zellvolumens, welches sich aufgrund des schnellen Wachstums bzw. der schnellen Gewichtszunahme der Welpen ständig erhöht. In Folge steigt schließlich auch der Erythrozytenbedarf an. Gleichzeitig werden die großen fetalen roten Blutkörperchen durch kleinere Erythrozyten ersetzt. Die Folgen sind Abnahme von MCV (mittleres Erythrozytenvolumen), erhöhte Retikulozytenzahl (bis zu 7%), Anisozytose, Polychromasie und Poikilozytose (abnormal und unterschiedlich geformte Zellen). Veränderungen der Erythrozyten im Laufe von Infektionskrankheiten sind bei Hunden häufiger zu finden als bei anderen Tieren (Pinkerton et al., 1974; Mischke, 2003; Kraft et al., 2005).

Hinsichtlich der Messwerte von Erythrozytenzahl, des Hämoglobins sowie des Hämatokrits existieren zum Teil erhebliche rassebedingte Unterschiede. So haben Pudel, Deutscher Schäferhund, Boxer, Dackel und Chihuahuas oft erhöhte Werte. Der Geschlechtsunterschied hinsichtlich dieser Messwerte ist dagegen nur minimal ausgeprägt (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000).



---

### **1.3.3. Aufgabe der Erythrozyten**

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten besteht im Transport der Atemgase Sauerstoff und in untergeordneter Weise auch des Kohlenstoffdioxids, der durch das Hämoglobin gewährleistet wird (Hees und Tschudi, 1990). Man unterscheidet verschiedene Hämoglobintypen, die genetisch fixiert sind. Der Embryo bildet zuerst nur das embryonale Hämoglobin, welches in der Folge durch das fötale Hämoglobin ersetzt wird. Dieses übernimmt den Transport des Sauerstoffs bis zur Geburt. Bereits vor der Geburt enthalten die Erythrozyten dann in steigendem Maße das adulte Hämoglobin. Sowohl embryonales als auch foetales Hämoglobin zeigt jeweils eine höhere Affinität zu Sauerstoff als das adulte. Dies wirkt sich vor allem bei der Sauerstoffübertragung in der Plazenta aus. Der Hämoglobingehalt des adulten Hundes beträgt 14 g/dl.

Weiterhin sind die roten Blutkörperchen an der Regulation des pH-Wertes des Blutes beteiligt (Loeffler, 1994). Der an das Hämoglobin gebundene Sauerstoff wird in das Gewebe abgegeben, Kohlenstoffdioxid wird zu etwa 5% ebenfalls mit Hilfe des Hämoglobins aus dem Gewebe abtransportiert (Rowley und Ratcliffe, 1988). Auf der Zelloberfläche der Erythrozyten sind antigene Strukturen vorhanden, welche die Blutgruppenzugehörigkeit festlegen (Sharon und Lis, 1993). Beim Hund unterscheidet man bisher 8 verschiedene Erythrozytenantigene (Mischke, 2003).

### **1.4. Leukozyten**

Die Zahl der Leukozyten im Blut des Hundes ist deutlich geringer als die der Erythrozyten. Nur ein kleiner Teil der weißen Blutkörperchen zirkuliert im Blutkreislauf. Der Hauptteil der Leukozyten befindet sich im Bindegewebe oder in den lymphatischen Organen (Kraft et al., 2005). Leukozyten sind kernhaltige Blutzellen und übernehmen wichtige Aufgaben im Rahmen der Abwehrprozesse des Körpers (Loeffler, 1994). Bei Hunden fallen Veränderungen der Blutwerte des weißen Blutbildes durch Geschlechtsunterschiede gering aus und können daher vernachlässigt werden. Signifikante Abweichungen im Blutbild dagegen liegen vor bedingt durch Altersunterschiede: So sind etwa höhere Leukozytenzahlen bei Welpen physiologisch bedingt. Ebenso können sich auch Stress und Kortikosteroidtherapien auf das Blutbild auswirken (Smith, 2000). Welpen haben im Vergleich zu adulten Tieren in den

---

ersten 2 Lebenstagen aufgrund des Geburtsstresses erhöhte Leukozytenwerte. Anschließend wird in der ersten Lebenswoche ein Absinken der Gesamtleukozytenzahl beobachtet, der sich durch Kolostrumaufnahme und geringere Kortikosteroidhormonausschüttung aufgrund des abklingenden Stresses erklären lässt (Kraft et al., 2005; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000; Smith, 2000).

Alle Leukozyten enthalten Granula im Zytoplasma, doch nicht alle sind lichtmikroskopisch zu sehen. Demzufolge unterscheidet man Granulozyten und Agranulozyten. Alle Granulozyten besitzen einen gelappten Kern (Dellmann und Carithers, 1996). Sie sind amöboid beweglich und können die Blutbahn aktiv verlassen (Diapedese). Vor allem im interstitiellen Bindegewebe übernehmen sie eine entscheidende Funktion im Rahmen der unspezifischen Abwehr (Nickel et al., 1996). Je nach Anfärbbarkeit ihrer Granula lassen sich die Granulozyten in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilen. Im Folgenden sollen nun die verschiedenen Typen der Granulozyten sowie der Agranulozyten (Lymphozyten und Monozyten) hinsichtlich Bildung, Struktur und Aufgabe näher beschrieben werden.

#### **1.4.1. Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten bilden den Hauptteil der Leukozyten; mit 55-75% stellen sie die größte Fraktion der weißen Blutkörperchen dar. Abhängig von der Kernsegmentierung unterscheidet man stabkernige neutrophile Granulozyten, mit nur einem Kernsegment, von segmentkernigen, welche mehrere Kernsegmenten enthalten (Kraft et al., 2005). Ihre Granula sind neutrophil und lassen sich sowohl mit basischen als auch mit sauren Farbstoffen nur schwach anfärben (Nickel et al., 1996). Liegt ihr Anteil an der Leukozytengesamtzahl über 50%, spricht man von einem neutrophilen Blutbild, welches man beim Menschen, beim Pferd und bei den Karnivoren findet (Hees und Tschudi, 1990). Die absolute Neutrophilenzahl unterliegt einer ständigen Dynamik der Produktion und der Freisetzung der Zellen (Mischke, 2003).

---

#### **1.4.1.1. Granulopoese**

Der Reifungsvorgang der Granulozyten lässt sich in drei Abschnitte gliedern. Die Granulopoese beginnt mit der Reifung im Knochenmark, anschließend folgt die Phase im Blutstrom und endet schließlich mit dem Aufenthalt im Gewebe (Mischke, 2003). Alle Granulozytenarten entwickeln sich aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle, dem Myeloblasten. Aus diesem entsteht durch mitotische Teilung der Progranulozyt. Über den Progranulozyten wird dann die Stufe der Promyelozyten erreicht, welcher sich weiterhin mitotisch teilen kann. In der nun folgenden Differenzierungsphase der Granula endet die mitotische Aktivität. Bei den Myelozyten, dem nachfolgenden Stadium, lassen sich bereits neutrophile, eosinophile und basophile Vorstufen unterscheiden. Beim sich anschließenden Metamyelozyten weisen die Granula dann ihre jeweilige charakteristische Färbung auf. Es folgt eine weitere Ausdifferenzierung zu stabkernigen (Jugendform) und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten. Bereits die jugendliche Form kann das Knochenmark verlassen, typischerweise gehen neutrophile Granulozyten jedoch erst in ihrer reifen segmentkernigen Form ins Blut über (Hees und Tschudi, 1990). Während der Granulopoese werden bei Hund und Katze 3-4 Mitosen durchlaufen: So findet je eine Mitose im Stadium des Myeloblasten und Promyelozyten statt, wohingegen der Myelozyt zwei Mitosen durchläuft (Smith, 2000). Der Myeloblast hat eine mäßig entrundete Form mit einem ovalen bzw. einseitig gebuchteten Zellkern und feinem, transparent erscheinenden Chromatin. Sein Zytoplasma ist schwach bis mittelstark basophil. Es enthält noch keine Granula und stellt sich somit homogen dar. Das Stadium des Promyelozyten hat eine runde bis ovale Zellform. Der Promyelozyt ist die größte Zelle der granulozytären Zellreihe. Der Kern ist ebenfalls oval bis mäßig rund und beinhaltet sichtbare Nukleoli. Das Zytoplasma des Promyelozyten ist basophil gefärbt und enthält azurophile Primärgranula, welche sich deutlich rötlich darstellen (Smith, 2000, Mischke, 2003). Zusätzlich weist der Promyelozyt eine perinukleäre Aufhellungszone auf. Mit dem Myelozyten erreicht die Zelle eine zunehmend runde Zellform. Sein Zellkern ist länglich oval bis bohnenförmig und enthält ebenfalls deutlich ausgebildete Nukleoli in exzentrischer Lage. Das Zytoplasma stellt sich nur noch schwächer basophil dar. Als letzte Vorstufe vor der stabkernigen Form erscheint der Metamyelozyt vorwiegend rund mit einem bohnenförmigen Kern. Es lassen sich mikroskopisch keine Nukleoli nachweisen. Ohne perinukleäre Aufhellungszone und schwach azidophil stellt sich sein Zytoplasma dar (Mischke, 2003). Im

---

Knochenmark unterscheidet man einen Stammzellenpool, einen proliferierenden Pool mit Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten sowie einen Reifungs- oder Reservepool mit Metamyelozyten, stab- und segmentkernigen Granulozyten. Im Stammzellenpool finden sich pluripotente Stammzellen, aus denen sich Progenitorzellen entwickeln. Die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten entstehen aus derselben Progenitorzelle, welche sich in zwei unipotente Progenitorzellen differenziert, die jeweils der Vorläuferzelle der Neutrophilen oder Monozyten entspricht. Die Eosinophilen und Basophilen wiederum haben ihre eigenen Progenitorzellen. Im Reservepool wird stets eine Anzahl stab- und segmentkerniger Granulozyten im Knochenmark zurückgehalten, welche bei Bedarf in die Blutbahn entlassen werden können. Der Reservepool kann mindestens das 10fache an neutrophilen Granulozyten, verglichen mit dem peripheren Blut, enthalten. Wird dieser Pool in kurzer Zeit geleert, treten im peripheren Blut vermehrt Juvenilformen (stabkernige Granulozyten, Metamyelozyten) der Neutrophilen auf (Mischke, 2003). Physiologischerweise sind keine Metamyelozyten in der kaninen Blutbahn zu finden. Ist der Verbrauch von neutrophilen Granulozyten in der Peripherie größer als das Knochenmark produzieren kann - zum Beispiel bei Infektionen oder Entzündungen - treten vermehrt Jugendformen ins periphere Blut über, und es lassen sich eine größere Anzahl stabkerniger Granulozyten, Metamyelozyten, Myelozyten und in geringen Maße sogar Promyelozyten im Blut finden. Dies wird als „Neutrophilie mit Linksverschiebung“ bezeichnet (Smith, 2000).

Produktion und Reifung der Granulozyten unterliegen dem Einfluss von Interleukin 5 (Mischke, 2003). Nur 10% der neutrophilen Granulozyten befinden sich im Blut bzw. dem Gewebe, der größte Teil befindet sich im Speicherkompartiment des Knochenmarks. Bei akuten Infektionskrankheiten gehen im Rahmen der Immunabwehr vermehrt stabkernige Granulozyten aus dem Knochenmark ins Blut über. Kanine neutrophile Granulozyten werden innerhalb von 3-5 Tagen im Knochenmark gebildet. Ihr Übertritt ins Kreislaufsystem wird dabei durch neurohormonale Mechanismen gesteuert. Einmal im Blut angelangt, teilen sie sich in einen marginalen und einen zentralen Pool auf. Beim Hund sind beide Kompartimente im Gegensatz zur Katze etwa gleich groß. Bereits nach zirka 7 Stunden verlassen sie wieder das Blut und treten ins Gewebe über. Aus diesem Grund findet man bei gesunden Tieren nur eine relativ geringe Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut (Smith, 2000; Mischke 2003). Bei akuten Infektionen wandern die Neutrophilen schneller ins Gewebe, so dass ihre Blutphase deutlich verkürzt sein kann. Dabei werden sie von Chemokinen angelockt, die bei entzündlichen Prozessen freigesetzt werden. Einmal ins Gewebe abgewandert, haben die

---

Neutrophilen keine Möglichkeit mehr, in die Blutbahn zurückzugelangen. Im Rahmen ihrer Abwehrfunktion phagozytieren sie Mikroorganismen oder Fremdpartikel, bevor sie nach 2-4 Tagen durch Apoptose zugrunde gehen (Mischke, 2003). Auch von den Makrophagen von Milz, Leber und Knochenmark werden gealterte neutrophile Granulozyten schließlich phagozytiert (Rebar et al. 2002).

#### **1.4.1.2. Struktur der neutrophilen Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten haben einen stark gelappten Kern. Man unterscheidet je nach Anzahl der Kernsegmente stabkernige von den segmentkernigen Blutzellen. Die stabkernigen neutrophilen Granulozyten machen 4% der Neutrophilen aus. Beim gesunden Hund kommen sie nur in kleiner Anzahl vor (Smith, 2000; Kraft et al., 2005). Der Kern des stabkernigen neutrophilen Granulozyten hat häufig eine hufeisenförmige Gestalt. Sein Chromatin erscheint weniger stark heterochromatisch als bei den reifen Granulozyten (Thrall et al., 2004; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Der Kern der segmentkernigen Neutrophilen besteht dagegen in der Regel aus 3 bis 5 Segmenten, die über eine dünne Chromatinbrücke verbunden sind. Mit zunehmendem Alter der Zelle steigt auch die Zahl der Segmente (Nickel et al., 1996; Smith, 2000). Neutrophile Granulozyten haben einen Durchmesser von 12-15 µm, bzw. sind 2-2,5x so groß wie Erythrozyten (Rebar et al., 2002). Das dunkle Heterochromatin des Zellkerns wird von wenigen hellen euchromatischen Regionen durchsetzt (Reagan et al., 1998). Der Zellkern bestimmter neutrophiler Granulozyten (ca. 4,5% der Gesamtzahl) beim weiblichen Tier kann einen Chromatinanhang des X-Chromosoms besitzen, welcher in der Fachliteratur als „Drumstick“ oder „Barr-Körperchen“ bezeichnet wird. Dieser Chromatinanhang ist bei männlichen Hunden nicht zu finden (Smith, 2000).

Im Zytoplasma finden sich zahlreiche feine Granula, die neutrophil sind, die sich also sowohl mit basischen als auch mit sauren Farbstoffen schwach anfärben lassen. Es ergibt sich eine rosa-violette Mischfarbe, auch „Färberische Neutralität“ genannt (Hees und Tschudi, 1990). Ultrastrukturell werden elektronendichte Primärgranula, welche Peroxidase-positiv reagieren, von kleineren pleomorphen, weniger elektronendichten Sekundärgranula, die Peroxidase-negativ reagieren, unterschieden. Die Primärgranula werden im Golgi-Apparat gebildet und entsprechen den üblichen zellulären Lysosomen. Im Stadium des Promyelozyten und frühen Myelozyten sind sie die vorherrschende Art von Granula. Im Gegensatz zu diesen werden die Sekundärgranula erst später gebildet und sind vor allem beim Myelozyten und reifen

---

Granulozyten zu finden (Smith, 2000). In diesen Granula befinden sich katalytisch aktive Inhalte wie etwa Lysozym, Laktoferrin, Kobalophilin, alkalische Phosphatase und verschiedene saure Proteine. Zusätzlich gibt es noch eine weitere Art von Granula, welche primären Lysosomen entsprechen und verschiedene saure Hydrolasen, basische Proteine und saure Glykosaminoglykane enthalten (Dellmann und Carithers, 1996).

#### **1.4.1.3. Aufgabe der neutrophilen Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten spielen eine bedeutende Rolle im Abwehrsystem des Körpers. Durch ihre Beweglichkeit sind sie in der Lage, die Blutbahn aktiv zu verlassen, auf bestimmte Reize hin (Chemotaxis) das Gewebe zu durchwandern, Mikroorganismen und Fremdpartikel zu phagozytieren und diese mit ihren lysosomalen Enzymen der Granula abzubauen. Des Weiteren können die Granula auch nach außen ins interstitielle Gewebe abgegeben werden, wo sie extrazelluläre Elemente verstoffwechseln. Die Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten beträgt ungefähr 6 Tage (Kraft et al., 2005; Thrall et al., 2004). Durch physiologische Stimuli wie Training und pathologische Stimuli, Infektionen oder Entzündungen, wird der marginale Pool der Neutrophilen mobilisiert, der sodann schneller ins Gewebe übertreten kann. Physiologischerweise wird ein großer Anteil in Lunge, Speichel, Urin und Magendarmtrakt benötigt. Neben dem Abtöten von Mikroorganismen und der Phagozytose von Fremdpartikeln spielen neutrophile Granulozyten auch eine Rolle bei der Blutgerinnung und Fibrinolyse. Ebenso haben sie auch zytotoxische, parasitizide und tumorizide Eigenschaften (Mischke, 2003). Bakterien werden an veränderten Oberflächeneigenschaften oder „*opsonic receptor*“ erkannt, von den Pseudopodien der Neutrophilen umschlossen und schließlich in Phagosomen eingebaut. Diese fusionieren mit den Lysosomen, es bilden sich sogenannte Phagolysosomen. Durch den Granulainhalt werden die Bakterien schließlich getötet (Smith, 2000). Die beim Hund und häufiger noch bei Feliden beobachtete Stress-bedingte Neutrophilie nivelliert sich rasch wieder, was auf eine starke Variabilität des marginalen Neutrophilenpools zurückzuführen ist. Durch Blutdrucksteigerung erhöht sich die Fließgeschwindigkeit des Blutes, wodurch sich die marginalen Neutrophilen von der Endothelwand lösen und somit die Zellzahl im Blut klinisch schließlich höher erscheint. Durch Verlangsamung des Blutflusses dagegen treten neutrophile Granulozyten vermehrt ins Gewebe über, was eine Erniedrigung der Zellzahl im Blut zur Folge hat (Kraft et al., 2005).

---

## **1.4.2. Eosinophile Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten machen im Differential-Blutbild des Hundes 1-4% der Leukozytenzahl aus. Bei allergischen und parasitären Erkrankungen steigt ihr Anteil an (Kraft et al., 2005).

### **1.4.2.1. Bildung der eosinophilen Granulozyten**

Die Granulopoese bis zum Myelozyten verläuft bei allen Granulozytenarten gleich (vgl. Punkt 1.4.1.1.). Erst im Stadium des Myelozyten bilden sich die spezifischen eosinophilen Granula. Die Entwicklung der eosinophilen Granulozyten geht dann über den eosinophilen Metamyelozyten hin zum eosinophilen Granulozyt (Young, 2000; Mischke, 2003). Der Eosinophiloblast ist nicht eindeutig zu identifizieren. Beim eosinophilen Promyelozyt, der sich mit einer runden bis ovalen Zellform darstellt, enthält ein basophil gefärbtes Zytoplasma mit azurophilen Primärgranula und eosinophiler Granulation (Mischke, 2003). Die azurophile Färbung ist im Myelozytenstadium nicht mehr zu erkennen. Seine Granula erscheinen groß mit elektronendichten homogenen Inhalt, welche durch Fusion und Kondensation kleiner Vakuolen oder granulärer Körper, die vom Golgi-Apparat gebildet werden, entstehen. Ihr elektronendichtes Material wird von Polyribosomen synthetisiert, um anschließend zum Golgi-Apparat transportiert und dort in Granula verpackt zu werden (Young, 2000). Der Zellkern der Myelozyten ist oval mit deutlichen Nukleoli. Das Zytoplasma des eosinophilen Myelozyten weist intensiv eosinophil anfärbbare Granula auf, in denen die basophile Basisgranulierung wegfällt. Der Zellkern stellt sich länglicher dar und enthält auch noch einen gut erkennbaren Nukleolus. Auf der nächsten Stufe, dem eosinophilen Metamyelozyten, sind dann bereits die typischen reifen, eosinophilen Granula im Zytoplasma zu erkennen. Der reife Eosinophile enthält einen hufeisenförmigen, etwas segmentierten Zellkern und ist fast vollständig mit eosinophilen Granula ausgefüllt. Der Speicherpool im Knochenmark ist bei den eosinophilen Granulozyten nur sehr gering ausgeprägt. Bei einem allergischen Geschehen oder einer Parasiteninfektion kommt es jedoch sehr schnell zu einer erhöhten Bildung und Freisetzung im Knochenmark (Mischke, 2003). Stimuliert wird die Produktion der eosinophilen Granulozyten durch Interleukin 5, welches von den T-Lymphozyten gebildet wird.

---

Endogene Sekretion von Glukokortikoide oder Verabreichung von diesen führt zu einer verminderten Produktion der Eosinophilen im Knochenmark und zu ihrer zunehmenden Apoptose im Gewebe. Aus diesem Grund kommt es auch bei gestressten Tieren zu verminderten Werten der eosinophilen Granulozyten im Blut (Rebar et al., 1998). Der Aufenthalt im Blut ist insgesamt nur sehr kurz. Typischerweise verlassen die Eosinophilen schon nach 30 Minuten die Blutbahn und wandern ins Gewebe. Vor allem in subepithelialen Strukturen der Haut, des Atmungs-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts werden hohe Zahlen von Eosinophilen gefunden. Dies erklärt sich durch die in diesen Gewebe kontinuierlich stattfindende Antigenexposition und die hohe Mastzellichte, deren freigesetzte chemotaktischen Faktoren die eosinophilen Granulozyten anlocken. Eosinophile Granulozyten können mehrere Tage im Gewebe überleben und während dieses Zeitrahmens funktionsfähig bleiben, bevor sie von Zellen des mononukleären Phagozytosesystems abgebaut werden, degenerieren oder durch epitheliale Transmigration verloren gehen (Mischke, 2003).

#### **1.4.2.2. Struktur der eosinophilen Granulozyten**

Der Durchmesser der kaninen eosinophilen Granulozyten beträgt 12 $\mu$ m-20 $\mu$ m. Diese sind somit hinsichtlich der Größe mit den Neutrophilen vergleichbar. Der Kern ist gelappt oder segmentiert, mit dichtem Chromatin (Rebar et al., 1998). Im Gegensatz zu den Neutrophilen ist der Zellkern allerdings meist deutlich weniger segmentiert. Die Zellorganellen, wie Golgi-Apparat, Mitochondrien, Ribosomen und Endoplasmatische Retikulum stellen sich bei den Eosinophilen deutlich prominenter dar (Young, 2000). Charakteristisch für die eosinophilen Granulozyten sind die zahlreichen großen Granula im Zytoplasma, die sich mit sauren Farbstoffen intensiv anfärben lassen und häufig den Kern überdecken können (Thrall et al., 2004). In seltenen Fällen können beim Hund einzelne Granula nahezu die Größe von Erythrozyten erreichen (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000; Thrall et al., 2004). In der Ultrastruktur zeigen die Granula des Hundes unregelmäßige, lamelläre oder kristalloide Strukturen (Hees und Tschudi, 1990). Die Granula sind Träger zellspezifischer Enzyme, z.B. Katalase, saure Phosphatase, Proteasen, Dehydrogenasen, und Kathepsin. Bei kaninen Eosinophilen kann die Ausbildung der Granula sehr unterschiedlich ausfallen. Die Granula variieren sowohl in Anzahl als auch in der Größe (zwischen 2 $\mu$ m-4 $\mu$ m). Neben den Granula finden sich auch wenige, kleine Vakuolen im Zytoplasma des kaninen Eosinophilen (Young,



---

2000; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Dieses Phänomen kann besonders häufig bei der Rasse Greyhound beobachtet werden und ist wahrscheinlich als Folge des Färbeprozesses des Blutausriches zu verstehen, bei dem die eosinophilen Granula regelrecht ausgewaschen werden und somit „leere“ Vakuolen zurückbleiben (Thrall et al., 2004). Die Granula der Eosinophilen können auch unterschiedliche Formen aufweisen: sie zeigen sich häufig rund bis oval, mit einem Durchmesser von 1-2µm. Ihr dichtes Zytoplasma wird teilweise von einer Membran umgeben. Zum Teil sind auch helle Vesikel nachweisbar, die mit einer Kappe aus dunklem Material versehen sind (Young, 2000; Hung, 1970). Aber auch andere Granula mit heller Innenstruktur kommen vor. Im Gegensatz zu anderen Spezies wie Pferd, Rind, Gorilla und Nerz, können bei Katze, Meerschweinchen, Maus, Ratte, Rhesusaffe, Mensch und Hund kristalloide Strukturen in den Granula enthalten sein. Ungefähr 10% der kaninen eosinophilen Granula enthalten kristalloide Strukturen in ihrer Matrix. Diese Granula können in unterschiedlichen Morphologien auftreten: Sie variieren in ihrer Form von einem einzelnen großen Kristalloid auf nur einer Seite, bis hin zu mehreren, sich in der Größe unterscheidenden Kristalloiden, welche eher am Rand der Granula zu finden sind; auch als diskontinuierliches Band an der Granulamembran treten sie auf. Im Gegensatz zur Katze oder zu den Nagetieren oder den Menschen, bei denen sie sich als hohle Zylinder darstellen bzw. als Platten vorliegen, kommen sie beim Hund sowohl als große, triangelförmige, als auch als kleine, längliche oder unregelmäßige Gebilde vor. Die lamelläre Struktur der Kristalloide baut sich aus hellen und dunklen Banden auf.. Zudem sind einzelne große Granula zu finden, die in ihrem dichten Zytoplasma auch helle Areale aufweisen, welche sich bis in den hellen Randsaum ausbreiten können. Die Bedeutung dieser Aufhellungen ist noch unklar (Hung, 1972). Die homogenen Primärgranula entwickeln sich im Gegensatz zu den Neutrophilen, bei denen sowohl Primär- als auch Sekundärgranula unabhängig voneinander im Golgi-Apparat entstehen, zu Sekundärgranula mit kristalloiden Strukturen. Diese Sekundärgranula kommen im Stadium des Promyelozyten nur selten vor, werden im Myelozytenstadium prominenter, um dann in späteren Stadien die vorherrschende Granulaart zu sein. Die kristalloiden Granula sind ein typisches Zeichen für reife eosinophile Granulozyten. Zwischen den einzelnen Kernsegmenten sind bei Hund, Katze und Pferd auch spezifische, pleomorphe „Mikrogranula“ (0,02-0,2µm) zu finden. An der Zellmembran sind oberflächliche, spärlich verbreitete Mikrovilli zu finden. Außerdem sind hier Rezeptorenproteine für IgE, IgG und verschiedene Komplementfaktoren, wie C1, C3b, C3d und C4, lokalisiert.

---

Bei den eosinophilen Granulozyten kommen bis zu 40% mehr IgG-Rezeptoren auf der Zelloberfläche vor als bei den Neutrophilen (Young, 2000).

### **1.4.2.3. Aufgabe der eosinophilen Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten werden vor allem von Antigen-Antikörper-Komplexen, heterologen Gammaglobulinen, Fibrin und Histamin chemotaktisch angezogen (Kraft et al., 2005). Die eosinophilen Granulozyten übernehmen eine wichtige Funktion bei der systemischen, immunbedingten Hypersensitivitätsreaktion. Werden Antigene von Parasiten oder Allergenen an das spezifische IgE der Mastzellen gebunden, degranulieren diese und setzen Histamin frei, welches die Eosinophilen aktiviert. Beim Abtöten von Plattwürmern oder Nematoden, welche IgG oder Komplement auf ihrer Zelloberfläche gebunden haben, sind eosinophile Granulozyten von zentraler Bedeutung. Auch Ektoparasiten, die eine Gewebeeinwanderung oder eine intensive Gewebekontaktphase haben, erhöhen die Zahl der eosinophilen Granulozyten (Rebar et al., 1998). Über die in den Granula enthaltene Histaminase spielen Eosinophile auch eine wichtige Rolle bei der Immunglobulin-E-vermittelten Immunreaktion vom Soforttyp („Typ-1-Allergie“) und der zellvermittelten Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ („Typ-4-Allergie“). Befinden sich größere Zielstrukturen außerhalb der Zelle, wird der Inhalt der membrangebundenen Granula nach außen abgegeben. Im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten spielen die eosinophilen Granulozyten bei der Phagozytose von Bakterien keine bedeutende Rolle. Ihre Hauptfunktion liegt in der Aufnahme von Antigen-Antikörper-Komplexen. Vor allem bei Allergien und Parasitenbefall ist ihre Anzahl im Blut erhöht. Außerdem haben sie einen dämpfenden Einfluss auf entzündliche Geschehen, indem sie die entzündlich wirkenden Produkte enzymatisch abbauen (Young, 2000; Thrall et al., 2004; Kraft et al., 2005). Dafür sind die in den Granula enthaltenen Histaminasen zuständig, die die Effekte von Histamin aus den IgE-sensibilisierten Mastzellen abschwächen bzw. hemmen. Außerdem können sie sowohl Bradykinin als auch Serotonin, welche als primäre Entzündungsmediatoren ebenfalls von den Mastzellen freigesetzt werden, inaktivieren (Mische, 2003). Das basische Hauptprotein ist besonders bei der anthelminthischen Reaktion bedeutsam. Die Lebensdauer der eosinophilen Granulozyten beträgt ungefähr 8-14 Tage (Kraft et al., 2005). Auch bei der Zerstörung neoplastischer Zellen spielen sie eine Rolle (Rebar et al., 1998).

---

In den ersten beiden Lebenswochen lässt sich klinisch eine erhöhte Zahl von Eosinophilen im Blut finden. Dieses Phänomen ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vor allem beim Deutschen Schäferhund beobachtet und ist häufig auch noch bei adulten Tieren zu sehen. Es wird sowohl ein Rassecharakteristikum als auch eine Rasseprädisposition für Erkrankungen des Eosinophilie-Komplexes (Enteritis, Myositis, Panositis) diskutiert. Obwohl bei Vergleichsuntersuchungen der Rassen Golden Retriever und Beagle ebenfalls eine erhöhte Zahl von eosinophilen Granulozyten in den ersten beiden Lebenswochen nachgewiesen werden konnten, war beim Deutschen Schäferhund die höchste Anzahl zu verzeichnen (Mischke, 2006). Auch beim Rottweiler wurden rassetypische Erhöhungen der Eosinophilenzahl im Blut festgestellt (Mischke, 2005).

### **1.4.3. Basophile Granulozyten**

Basophile Granulozyten bilden die kleinste Fraktion der Leukozyten. Sie machen bei den verschiedenen Spezies nur etwa 0,5-1% aus (Nickel et al., 1996). Aufgrund ihrer geringen Konzentration im zirkulierenden Blut stößt man bei Erstellung des Differentialblutbild nur selten auf Basophile. Obwohl ihre Zellmembran wie die Mastzelle ebenfalls IgE bindet und beide von der gleichen Progenitorzelle abstammen, konnte bisher noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, dass sich der basophile Granulozyt in eine Mastzelle differenzieren kann (Thrall et al., 2004).

#### **1.4.3.1. Bildung der basophilen Granulozyten**

Wie schon erwähnt, verläuft bei allen Granulozytenarten die Entwicklung bis zum Myelozyten gleich. Bei den basophilen Granulozyten entwickeln sich dann auf der Stufe des Myelozyten die spezifischen basophilen Granula. Über den basophilen Metamyelozyt entsteht der basophile Granulozyt. Funktionell gesehen sind basophile Granulozyten keine Endzellen (Scott und Stockham, 2000; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Die Produktion und Reifung wird, wie auch bei den Eosinophilen, von Interleukin 5 reguliert (Mischke, 2003). Die basophilen Granulozyten gehen aus der gleichen Progenitorzelle wie die Mastzellen hervor. Beide Zelltypen haben ähnliche Funktionen. Sie zirkulieren nur für kurze Zeit im Blut, bevor sie dann ins Gewebe übertreten, wo sie sich für mehrere Wochen aufhalten (Rebar et al.2002).

---

Die Speicherkapazität im Knochenmark ist, wie bei den Eosinophilen, nur sehr gering ausgeprägt. Die Kinetik der basophilen Granulozyten ist eng mit der der Eosinophilen verknüpft. Das in den Granula der Basophilen gespeicherte Histamin und die von ihnen gebildeten chemotaktischen Faktoren bewirken die Akkumulation von Eosinophilen im Gewebe (Mische, 2003).

#### **1.4.3.2. Struktur der basophilen Granulozyten**

Basophile Granulozyten stellen sich als runde Zellen mit einer Größe von 12-20µm dar (Rebar et al., 2002). Der Zellkern wird meist von den groben, basophil gefärbten Granula überlagert. In den Granula findet man neben Histamin und Heparin auch Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Serotonin und verschiedene chemotaktische Faktoren (Hees und Tschudi, 1990; Loeffler, 1994; Scott und Stockham, 2000). Durch Antigene stimulierte Basophile produzieren zusätzlich einen plättchenaktivierenden Faktor und chemotaktische Faktoren, welche die eosinophilen Granulozyten anlocken. Der Kern ist im Gegensatz zum Neutrophilen weniger segmentiert (Rebar et al., 2002; Scott und Stockham, 2000). Morphologie und Anzahl der basophilen Granula variieren tierartspezifisch. So enthalten kanine basophile Granulozyten meist nur wenige, dunkle Granula, wohingegen Rind und Pferd zahlreiche, kleinere Granula aufweisen, die häufig den Zellkern überdecken können (Rebar et al., 2002; Scott und Stockham, 2000; Thrall et al., 2004). Beim Hund enthält das Zytoplasma mehrere Typen von verschieden großen Granula. Es finden sich neben voluminösen auch kleine Granula. Ihre Form variiert von rund bis oval, sie können aber auch eine kantige Gestalt aufweisen. Weniger prominent als bei den anderen Granulozytenformen stellen sich Mitochondrien, Ribosomen, RER und der Golgi-Apparat dar, wohingegen Mikrotubuli und Mikrofilamente deutlicher zu erkennen sind. An der Zellmembran sitzen neben IgG-Rezeptoren auch Rezeptoren für das Immunglobulin E, das vor allem bei allergischen Erkrankungen zu einer massiven Freisetzung des Granulainhalts führt. Die Phagozytosefähigkeit basophiler Granulozyten ist gering (Scott und Stockham, 2000).

#### **1.4.3.3. Aufgabe der basophilen Granulozyten**

Die Funktion der Basophilen ähnelt stark der von Mastzellen. Histamin und chemotaktische Faktoren für Eosinophile, Heparin, Plättchen-aktivierender Faktor, Thromboxan A<sub>2</sub>,

---

Leukotriene und SRS-A sind wichtige Mediatoren bei allergischen und entzündlichen Reaktionen (Mische, 2003). Die Synthese von Heparin zur Verhinderung der Blutgerinnung dürfte jedoch im Vordergrund stehen (Liebich, 2004). Ihm wird eine Schutzwirkung gegen die intravasale disseminierte Gerinnung zugesprochen (Kraft et al., 2005). Basophile sind in der Lage Immunglobuline vom IgE-Typ zu binden. Durch deren Quervernetzung kommt es zur Degranulation und Freisetzung von Histamin und Serotonin. Dadurch beeinflussen sie Entzündungsreaktionen und können so allergische Reaktionen auslösen (Engelhardt und Breves, 2000; Rebar et al., 2002). Es wird auch eine Beteiligung bei der immunologischen Abwehr von Parasiten vermutet (Moritz, 2007). Weiterhin sind Basophile durch das freigesetzte Heparin, welches wiederum die Freisetzung der Lipoproteinlipase aus den Gefäßendothelien bewirkt, am Fettstoffwechsel beteiligt (Mische, 2003). Aktivierte basophile Granulozyten synthetisieren außerdem verschiedene Zytokine, welche bei Entzündungsprozessen eine entscheidende Bedeutung haben (Rebar et al., 2002).

#### **1.4.4. Lymphozyten**

Zu den Agranulozyten zählt man die Lymphozyten und Monozyten. Sie besitzen im Gegensatz zu den Granulozyten im Zytoplasma keine lichtmikroskopisch sichtbaren Granula (Dellmann und Carithers, 1996). Morphologisch kann man Lymphozyten ihrer Größe nach in kleine Lymphozyten, mittelgroße Lymphozyten und große Lymphozyten unterteilen (Mischke, 2003). Beim Hund sind die kleinen Lymphozyten am häufigsten zu finden (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Nur ein kleiner Teil der Lymphozyten zirkuliert im Blut, der weitaus größere Teil ist in den lymphatischen Organen konzentriert. Immunologisch unterscheidet man T- und B-Lymphozyten (Kolb, 1990). Sie unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer Entwicklung und ihrer funktionellen Aufgaben. Ihre Lebensdauer variiert von Stunden bis hin zu mehreren Jahren (Dellmann und Carithers, 1996). B-Lymphozyten differenzieren sich zu Plasmazellen, welche durch die Produktion von Antikörpern in der humoralen Immunität eine wichtige Rolle spielen, wohingegen T-Lymphozyten durch die Bildung von Zytokinen in der zellulären Immunität von Bedeutung sind (Rebar et al., 2002). Beim Welpen liegt in den ersten Lebenswochen physiologischerweise eine deutliche Lymphozytose vor und erreicht annähernd die Anzahl von neutrophilen Granulozyten (Mischke, 2005). Zwischen der dritten und achten Lebenswoche wird das Maximum der Lymphozytenzahl erreicht, das wesentlich über den Werten adulter Tiere liegt. Dieser Anstieg

---

erklärt sich durch den Kontakt des lymphatischen Systems der Welpen mit vielen neuen Antigenen, z.B. durch den Nahrungswechsel, Verlassen der Wurfkiste usw. Durch Involution des Thymus erreicht die Lymphozytenzahl langsam den Wert adulter Tiere, der im 6. Monat schließlich erreicht ist (Mischke, 2005, Kraft et al., 2005). Im Blutausstrich gesunder adulter Hunde kann man in geringem Maße Reaktionsformen von Lymphozyten finden, welche durch stark basophiles Zytoplasma charakterisiert sind. Beim Jungtier deutet ein Anstieg dieser reaktiven Lymphozyten auf eine anhaltende Aktivierung der Lymphozyten durch Antigene bei Impfung oder Infektion hin (Mischke, 2005).

#### **1.4.4.1. T-Lymphozyten und B-Lymphozyten**

Mit Routinefärbungen sind T- und B-Lymphozyten nicht zu unterscheiden (Kolb, 1990). Dazu ist eine spezielle immunzytochemische Technik notwendig. T-Lymphozyten machen den größeren Anteil (80%) der zirkulierenden Lymphozyten aus (Mischke, 2003; Heckner und Freund, 2001). T-Lymphozyten erhalten ihre spezifische Prägung im Thymus. In ständiger Bewegung zirkulieren sie zwischen Blutbahn, Geweben und lymphatischen Organen (Heckner und Freund, 2001). Im zirkulierenden Blut unterscheidet man mehrere Subpopulationen der T-Zellen. Als funktionelle Untergruppen unterscheidet man zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen, T-Supressorzellen, T-Gedächtniszellen und sogenannte Killerzellen (Engelhardt und Breves, 2000). Die T-Lymphozyten sind durch das CD2-Antigen gekennzeichnet. Über monoklonale Antikörper können sie in weitere Subpopulationen eingeteilt werden, wobei die CD8-Zellen den Hauptanteil der T-Zellen im Knochenmark darstellen. Sie entsprechen den Suppressorzellen und zytotoxischen Zellen. CD4-Antigene findet man vorwiegend auf den T-Helferzellen (Mische, 2003). CD bedeutet „*cluster of differentiation*“. Es sind charakteristische Oberflächenmoleküle, wobei CD4-Moleküle auf T-Helferzellen und CD8-Moleküle auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert werden. Sie dienen als Co-Rezeptoren und verstärken die Signale, die über den T-Zell-Antigenrezeptor in die Zelle gelangen (Engelhardt und Breves, 2000). B-Lymphozyten bilden den kleineren Anteil der Lymphozyten im Blut. Sie fungieren als Vorläufer der Plasmazellen und sezernieren verschiedene Antikörper. Sie sind sogenannte Endzellen der B-Zellreihe. Zusätzlich zu den Oberflächenantigenen, wie z.B. CD10, CD19 und CD20, findet man Immunglobulina auf der Zellmembran, die als Rezeptoren für spezifische Antikörper dienen. Diese sind identisch mit den von B-Lymphozyten und Plasmazellen gebildeten Antikörpern und für jeden B-Zellklon

---

spezifisch (Mischke, 2003; Heckner und Freund, 2001). Auch B-Lymphozyten sind in der Lage, aus der Blutbahn ins Gewebe zu wechseln (Kolb, 1990).

Neben B- und T-Lymphozyten sind als größte Fraktion der Lymphozyten die natürlichen Killerzellen zu nennen. Als sogenannte „Null-Zellen“ exprimieren sie weder T- noch B-Zellmarker. Im Blut erscheinen sie mit einem weiten, azurophilen, granularen Zytoplasma. Funktionell unterscheidet man zur MHC (Major *Histocompatibility Complex*)-unabhängigen Lyse von Zielzellen fähige Zellen und andere Zellen, die eine Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität besitzen, welche die Vernichtung neoplastischer und virusinfizierter Zellen ermöglicht (Mischke, 2003). Zu diesen Null-Zellen werden zum Beispiel die natürlichen Killerzellen gezählt, aber auch große granuläre Lymphozyten (Thrall et al., 2004). Den Hauptanteil der zirkulierenden Lymphozyten machen mit 80% die T-Zellen aus, denen mit 20% die B-Zellen folgen, während mit nur 10% die Null-Zellen die kleinste Fraktion der Lymphozyten ausmachen (Mischke, 2003; Heckner und Freund, 2001).

T-Lymphozyten sind vor allem im Thymus, den Lymphknoten und im Blut zu finden, während die B-Lymphozyten hauptsächlich im Knochenmark und der Milz lokalisiert sind (Heckner und Freund, 2001).

#### **1.4.4.2. Lymphopoese**

Die Entwicklung der Lymphozyten beginnt mit der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark, dem Hämozytoblasten. Aus diesem geht die Vorläuferzelle des lymphatischen Systems hervor, die auf ihrer Oberfläche bereits eine Determination zum späteren B- bzw. T-Lymphozyten trägt (Heckner und Freund, 2001). Aus dem Lymphoblasten entwickeln sich direkt die kleinen und großen Lymphozyten. Kleine Lymphozyten sind in der Lage, sich nach Stimulation wieder in Lymphozytoblasten rückzudifferenzieren. Die unreifen Lymphozyten gelangen aus dem Knochenmark ins Blut, über das sie den Thymus erreichen, um sich dort zu reifen T-Lymphozyten zu entwickeln (Hees und Tschudi, 1990). Hier findet der letzte Schritt zur reifen immunkompetenten Zelle statt (Heckner und Freund, 2001). Die aus dem Knochenmark hervorgegangenen Lymphozyten besiedeln reaktives lymphatisches Gewebe, wie Lymphknoten, Milz, Tonsillen, Thymus und die Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebe. Nach Reifung im Thymus besiedeln die T-Lymphozyten die sekundären lymphatischen Organe, wie Lymphknoten, Milz und Peyersche Platten (Mischke, 2003).

---

Bereits auf der Vorläuferzelle des lymphatischen Systems im Knochenmark existiert eine Determination zum späteren B-Lymphozyten. Sie verlassen das Knochenmark als unreife Zellen und zirkulieren über die Blutbahn in Milz, Lymphknoten, Peyersche Platten und Mandeln, wo sie sich zu reifen immunkompetenten B-Lymphozyten entwickeln (Valli und Jacobs, 2000). Eine Teil der T- und B-Lymphozyten entwickelt sich wahrscheinlich von vornherein im Gastrointestinaltrakt, bei dieser Reifung kommt es dann zur Ausbildung von Oberflächenrezeptoren und Immunglobulinen gegen körperfremde Antigene. In Thymus, Lymphknoten und Ductus thoracicus sind überwiegend T-Zellen zu finden, während B-Zellen in Milz und Knochenmark häufiger vorkommen (Mischke, 2003).

#### **1.4.4.3. Struktur der Lymphozyten**

Der kanine Lymphozyt hat eine Größe von 9-12µm (Rebar et al., 2002). Charakteristisch für Lymphozyten ist der große runde, heterochromatinreiche Kern, welcher von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben ist. Die hohe Dichte an Ribosomen, Polyribosomen sowie das raue Endoplasmatische Retikulum bedingen dabei die schwache Basophilie des Zytoplasmas. Beim Hund sind viele Ribosome im Zytoplasma nachweisbar, Mitochondrien und der Golgi-Apparat stellen sich dabei nur undeutlich dar. In der Peripherie findet man nur wenige RER. Der Kern der kleinen Lymphozyten füllt die Zelle fast vollständig aus und besteht aus dichtem, verklumptem Heterochromatin. Dieser wird nur von einem geringen Zytoplasmasaum umgeben. Je größer der Lymphozyt ist, umso aufgelockerter ist das Chromatin. Die Zellmembran kann sowohl glatt als auch – je nach Reife bzw. Zellaktivität – mit Mikrovilli besetzt sein. Bei den mittleren und großen Lymphozyten dagegen ist wesentlich mehr Zytoplasma zu erkennen, welches typischerweise blassblau gefärbt ist. Hier stellen sich auch die Zellorganellen deutlicher dar, auch die Zentriolen sind beim Lymphozyten klarer zu erkennen als bei den anderen Leukozyten. Glykogenpartikel erscheinen als kleine Granula oder kleine Gruppen (Steffens, 2000). Morphologisch sind T- und B-Zellen nicht zu unterscheiden. Lediglich die zur Plasmazelle differenzierte B-Zelle ist deutlich zu erkennen. Auch reaktive Lymphozyten weisen bestimmte strukturelle Eigenheiten auf, so sind sie mit einer Größe von 15-20µm etwas prominenter als nicht reaktive Lymphozyten; auch der Kern erscheint größer mit reticulärem Chromatinmuster. Ein Nukleolus im Kern kann vorhanden sein. Das Zytoplasma stellt sich hell bis dunkel blau dar, ist reichlich vorhanden und kann eine Aufhellung um den Kern bilden (Rebar et al., 2002). Zwei Drittel der kaninen B-



---

Lymphozyten haben IgG-Rezeptoren, das restliche Drittel IgM-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Bei den Pre-B-Lymphozyten sind lediglich IgM-Rezeptoren zu finden, IgG findet man erst bei der reifen B-Zelle (Mischke, 2003).

#### **1.4.4.4. Aufgabe der Lymphozyten**

T-Lymphozyten sind für die zelluläre Immunität verantwortlich (Dellmann und Carithers, 1996). Zytotoxische T-Zellen erkennen Fremdanigen – auch auf infizierten Zellen – und töten diese ab (Loeffler, 1994). Über Antigen-präsentierende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen bzw. dendritische Zellen sind T-Lymphozyten mit ihrem jeweiligen Rezeptor in der Lage, das entsprechende Antigen zu binden. Außerdem aktivieren sie B-Zellen, die ebenfalls mit einem entsprechenden Oberflächenrezeptor ausgestattet sind (Mischke, 2003). Die T-Helferzellen stimulieren die B-Lymphozyten zur humoralen Immunantwort. Über bestimmte Mediatoren, z.B. Lymphokine, fördern sie außerdem die Proliferation der B-Lymphozyten. Einer überschießenden Immunantwort wird durch die T-Suppressorzellen entgegengewirkt. Sogenannte Gedächtniszellen erkennen auch nach langer Zeit das auslösende Antigen wieder und können somit sofort darauf reagieren (Heckner und Freund, 2001; Moritz, 2007). Nach Antigenkontakt bilden T-Zellen und in geringerem Maße auch B-Zellen Zytokine, die bei entzündlichen und immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Mischke, 2003; Engelhardt und Breves, 2000). Lymphozyten sind auch in der Lage Lymphokine zu synthetisieren, welche Monozyten, Granulozyten, aber auch andere B- und T-Lymphozyten beeinflussen. B-Lymphozyten sind verantwortlich für die humorale Immunität (Dellmann und Carithers, 1996). Sie tragen auf ihrer Oberfläche Immuglobuline und entwickeln sich nach Antigenkontakt zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Die Antikörperbildung findet vor allem in den sekundär lymphatischen Organen statt (Mischke, 2003). Mit Hilfe von T-Lymphozyten kommt es zur Transformation der B-Lymphozyten in Immunoblasten, die sich wiederum zu Plasmazellen differenzieren (Dellmann und Carithers, 1996). Plasmazellen sind 10-20µm groß mit einem exzentrisch gelegenen Zellkern, welcher von tiefblauem Zytoplasma umgeben ist. Perinukleär findet man einen hellen Hof, auch Vakuolen sind im Zytoplasma häufig zu finden. Die Aufgabe der Plasmazelle besteht aus der Produktion von Immunglobulinen (Kraft et al., 2005). Auch bei den B-Lymphozyten bilden sich langlebige Gedächtniszellen aus, die nach erneutem Antigenkontakt rasch im Dienste der Immunabwehr reagieren können (Heckner und Freund,

---

2001). Über die Keimzentrumsreaktion kommt es dann rasch zur Bildung von antikörperbildenden Plasmazellen (Mischke, 2003).

### **1.4.5. Monozyten**

Monozyten sind die größten Zellen unter den Leukozyten. Sie machen 1-4% der weißen Blutzellen aus (Kraft et al., 2005). Morphologisch ähneln sie sich bei allen Tierarten (Reagan et al., 1998). Nach 1-2 Tagen im Blut wandern sie ins Bindegewebe und entwickeln sich dort weiter zu Makrophagen (Hees und Tschudi, 1990). Aus ihnen können sich auch Histiozyten, Mastzellen und in verschiedenen Fällen Endothelzellen, Fibroblasten, Fettzellen, glatte Muskelzellen und Osteoblasten entwickeln (Kolb, 1990). Monozyten sind mithin keine Endzellen, sondern können unter bestimmten Bedingungen in andere Zellen des mononukleären Phagozytosesystem transformiert werden (Bienzle, 2000).

#### **1.4.5.1. Bildung der Monozyten**

Auch der Monozyt entsteht aus dem Hämatozytoblasten. Über den Monoblasten erreicht er das Stadium des Promonozyten. Durch mitotische Teilung entwickelt sich dann schließlich der Monozyt (Bienzle, 2000). Monozyten entstehen aus der gleichen Stammzelle wie auch die Granulozyten. Der Monoblast ähnelt morphologisch dem Myeloblasten (vgl. Granulopoese) und ist nur schwer von ihm zu unterscheiden (Mischke, 2003; Bienzle, 2000). Verschiedene Wachstumsfaktoren regulieren die Produktion und Reifung des Monozyten im Knochenmark: der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor, der Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor und das Interleukin 6 (IL6). Der Promonozyt zeigt einen unregelmäßig eingebuchteten Kern, welcher von hell-basophilem Zytoplasma umgeben ist (Mischke, 2003). Ein Bündel Mikrofilamente in Kernnähe erleichtert die Unterscheidung Promonozyt-Monozyt. Seine Zellmembran kann Pseudopodien und Vakuolen aufweisen (Bienzle, 2000). Aus diesem entwickelt sich schließlich der Monozyt, die größte Blutzelle des peripheren Blutes. Der Monozyt weist einen großen bohnenförmigen oder gelappten Zellkern auf, der allerdings sehr vielgestaltig sein kann, sowie grau-blaues Zytoplasma mit staubähnlicher Vakuolierung (Mischke, 2003). Dieser geht aus dem Knochenmark ins Blut über. Nach einer kurzen Verweildauer in der Blutbahn wandert der Monozyt ins Bindegewebe und differenziert sich dort zum Makrophagen sowie anderen Zelltypen des mononukleären

---

Phagozytosesystems (Thrall et al., 2004; Rebar et al., 2002). Zum mononukleären Phagozytosesystem zählen außerdem Monozyten, Promonozyten und deren Vorläufer im Knochenmark (Bienzle, 2000). Im Gegensatz zu den Granulozyten gibt es bei den Monozyten keinen Knochenmarksspeicher. Reife Monozyten gehen direkt ins Blut über, wo sie sich wie die neutrophilen Granulozyten in einen marginalen und eine zirkulierenden Pool teilen, bevor sie nach 1-2 Tagen ins Gewebe übertreten. Dort können sie dann als Makrophagen mehrere Monate bis Jahre überleben. Sie bilden zusammen mit den Monozyten im Blut und deren Vorläufer das mononukleäre Phagozytosesystem (Mischke, 2003). Ein Übertritt vom Gewebe zurück ins zirkulierende Blut ist nicht mehr möglich (Bienzle, 2000). Je nach Lokalisation der Makrophagen im Gewebe werden sie unterschiedlich genannt, so findet man Monozyten im Blut, Kupffersche Sternzellen in der Leber, Alveolarmakrophagen in der Lunge, Histiocyten im Bindegewebe und der Haut, Osteoclasten im Knochen, Mikroglia im ZNS und Pleural- bzw Peritonealmakrophagen auf der Serosa (Engelhardt und Breves, 2000).

#### **1.4.5.1. Struktur der Monozyten**

Der Monozyt hat eine Größe von 15-20µm (Reagan et al., 1998). Der große, häufig nierenförmige Kern ist von basophilem Zytoplasma umgeben, welches die verschiedenen Zellorganellen enthält, hier findet man auch azurophile Granula, die sich rötlich gefärbt darstellen (Hees und Tschudi, 1990). Diese sind primäre Lysosomen und enthalten verschiedene proteinspaltende Enzyme. Der Zellkern des kaninen Monozyten ähnelt in seiner Form der stabkerniger Neutrophiler, Metamyelozyten oder Myelozyten. Aufgrund seiner Kernform und der Granula im Zytoplasma ist der der Monozyt leicht mit reifen Neutrophilen zu verwechseln. Das typisch blau gefärbte Zytoplasma erleichtert die Unterscheidung (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Im Gegensatz zu den Neutrophilen sind im Zytoplasma der Monozyten auch Glykogenpartikel zu finden. Ebenso enthalten sie mehr Mitochondrien (Rowley and Ratcliffe, 1988). Im aktiven Zustand bilden sich fingerförmige Ausstülpungen auf der Oberfläche aus, die im inaktiven Zustand glatt ist. (Hees und Tschudi, 1990). Neben den Mikrovillie ist die Zellmembran zusätzlich durch mehrere Einkerbungen charakterisiert. Auf der Zelloberfläche ist der Fc-Rezeptor für das Immunglobulin IgG lokalisiert. Im Gegensatz zu Mensch, Rind und Kaninchen fehlen beim Hund die Rezeptoren für IgM. Zusätzlich findet man hier auch die Komplementfaktoren C3b und C3d, Glukokortikoidrezeptoren, außerdem Rezeptoren für Insulin, Glykagon und Thyrotropin. Eine

---

einmalige Verabreichung von ACTH oder Glukokortikoiden führt beim Hund im Gegensatz zu Mensch, Maus, Ratte und Meerschweinchen, die daraufhin eine Monozytopenie entwickeln, zu einer Monozytose. Die Ursache für dieses Phänomen ist noch nicht geklärt, es wird allerdings eine Verschiebung aus dem Knochenmark bzw. aus dem marginalen in den zirkulierenden Monozytenpool vermutet (Bienzle, 2000). Mit zunehmendem Alter sinkt die Zahl der Azurgranula. Der kanine Monozyt ist durch seine Größe und das basophile bzw. blau-graue Zytoplasma charakterisiert. Dieses enthält mehrere unterschiedlich große Vakuolen, welche ebenfalls in der Größe variieren können und meist auf einer Seite der Zelle vermehrt auftreten. Gelegentlich kann man so eine Vakuole auch innerhalb des Zellkerns finden. Die Kernform ist sehr variabel und kann nahezu jede Gestalt annehmen. Die Enden des Kerns sind jedoch meist vergrößert und knopfartig verdickt (Bienzle, 2000; Thrall et al., 2004).

#### **1.4.5.2. Aufgabe der Monozyten**

Monozyten sind amöboid beweglich und sind wesentlicher Bestandteil des mononukleären Phagozytosesystems. Sie phagozytieren Antigenmaterial und sind somit an der unspezifischen Immunität beteiligt (Dellmann und Carithers, 1996). Neben Bakterien phagozytieren sie auch größere Organismen wie Hefen oder Protozoen, beschädigte oder tote Zellen und Zelltrümmer (Thrall et al., 2004). Obwohl die Phagozytosefähigkeit geringer als bei den Neutrophilen ausgeprägt ist, kommt ihr eine wichtige Bedeutung zu. Die Monozyten phagozytieren vor allem Pathogene, mit denen die Neutrophilen überfordert sind. Dies trifft zum Beispiel bei intrazellulären Parasiten wie Listerien oder aber bei Pathogenen, die mit einer granulomatösen Entzündung einhergehen, zu. Auf der Membran der Monozyten sitzen Lektin-ähnliche Rezeptoren, die Zucker auf der Bakterienoberfläche oder an Gewebszellen erkennen und binden können (Bienzle, 2000). Die intrazelluläre Zerstörung der Mikroorganismen kommt durch die in den Lysosomen enthaltenen Hydrolasen und Peroxidasen zustande (Mische, 2003). Auch bei der Virusabwehr kommt ihnen durch die Bildung von Interferon entscheidende Bedeutung zu (Dellmann und Carithers, 1996).

Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation. Sie besitzen Rezeptoren für Immunglobuline und Komplemente auf ihrer Zellmembran, wodurch sie mit Antikörpern oder Komplement-beladenen Erythrozyten und Thrombozyten phagozytieren (Mische, 2003). Durch die Spaltung der aufgenommenen Antigene und anschließende

---

Präsentation an der Zelloberfläche erfolgt die Antigenerkennung durch T-Helferzellen und somit die Aktivierung der spezifischen Abwehr (Engelhardt und Breves, 2000). Zusätzlich sezernieren sie mehrere verschiedene biologisch aktive Substanzen, wie z.B. Interleukin 1, Interleukin 6, Tumornekrosefaktor, Komplementkomponenten, proteolytische Enzyme (Elastase, Lysozym, Kollagenase) und Prostaglandine (Mischke, 2003). Durch den *colony-stimulating-factor* (CSF) und PgE regulieren sie die Granulopoese (Bienzle, 2000). Außerdem sind sie beim Abbau der roten Blutkörperchen und der Eisenverwertung beteiligt (Thrall et al., 2004).

## **1.5. Thrombozyten**

Die Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind spindelförmige Gebilde und entstehen aus Abschnürungen aus Megakaryozyten (Loeffler, 1994). Neben ihrer Hauptfunktion in der Hämostase sind Thrombozyten auch wichtige Mediatoren der Vasokonstriktion. Häufig kommen sie in kleinen oder größeren Gruppen in der Blutbahn vor. Ihre Gesamtzahl wird von der Milz reguliert (Hees und Tschudi, 1990). Sie sind nicht beweglich und haben eine Lebensdauer von zirka 8-10 Tagen (Dellmann und Carithers, 1996). Im Blutausschlag des Hundes erscheinen Thrombozyten als granuläre, basophile Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 1-4µm. Meistens ist ihre Zellmembran nur undeutlich begrenzt und enthält schmale Fortsätze. Kanine Blutplättchen sind kleiner als die der Katze (Mischke, 2006), ähneln aber im Volumen denen von Schwein und Mensch (Tablin, 2000). Häufig findet man einzelne Thrombozyten, aber auch kleine Gruppen kommen vor (Rebar et al., 1998). Der Referenzbereich für kanine Thrombozyten liegt bei 150.000-500.000 /µl (Kraft et al., 2005).

### **1.5.1. Thrombozytopenese**

Im Gegensatz zu den anderen Entwicklungsreihen nehmen die Knochenmarkszellen der Thrombozytopenese gegenüber den Vorläuferzellen an Größe zu (Hees und Tschudi, 1990). Aus der hämatopoetischen Stammzelle geht der Megakaryoblast hervor, mit einem mehrmals gekerbten Kern, der viele Vakuolen enthält (Heckner und Freund, 2001). Der Megakaryoblast ist eine sehr große Zelle mit einem einzelnen runden Nukleus und einem prominenten Nukleolus. Die nächste Entwicklungsstufe ist der Promegakaryozyt. Diese Zelle ist noch größer als ihre Vorstufe mit einem gelappten Kern und dunkelblauen agranulären Zytoplasma

---

(Reagan et al., 1998). Bereits beim Megakaryoblasten setzt eine Vermehrung des Chromosomensatzes – ohne nachfolgende Kernteilung – ein. Durch nochmaliges Teilen der Chromosomen beim Promegakaryozyten entsteht der Megakaryozyt, die Knochenmarksriesenzelle (Leven, 2000). Der Megakaryozyt ist typischerweise 100-200µm groß, hat einen großen, mehrfach gelappten Kern und ein granulereiches Zytoplasma (Reagan et al., 1998). Durch zisternenartige Einstülpungen der Plasmamembran des Megakaryozyten entstehen schließlich die Thrombozyten. Es kommt zur Abschnürung und Fragmentierung der Zytoplasmateile (Heckner und Freund, 2001). Die Freisetzung der Thrombozyten entsteht durch Zerfall der bis dahin zusammenhängenden Zytoplasmastruktur des reifen Megakaryocyten in mehrere Micropartikel mit feiner Azurranulation (Mischke, 2003). Die fertigen Thrombozyten sind kleine Zellen ohne Kern und mit hell rosa gefärbten Zytoplasma mit zum Teil deutlichen purpurroten Granula (Reagan et al., 1998). Die Entwicklung des Megakaryozyten aus der Stammzelle wird vom Thrombopoetin reguliert. Die Herkunft des Thrombopoetin ist ungewiss, es wird allerdings eine Verbindung mit Leber, Endothelzellen und Fibroblasten vermutet. Beim Hund findet sich der Großteil der Thrombozyten im Blut, in der Milz befindet sich der restliche Teil. Die Lebensspanne der kaninen Blutplättchen beträgt 3-7 Tage, bevor sie von den Makrophagen des MPS phagozytiert werden (Rebar et al., 2002).

### **1.5.2. Struktur der Thrombozyten**

Thrombozyten gleichen spindelförmigen Gebilden, welche beim Säugetier keinen Zellkern enthalten. Man unterscheidet zwei Zonen: eine durchsichtige Randzone, Hyalomer genannt, umgibt die dichte Zentralzone, die als Granulomer bezeichnet wird (Loeffler, 1994). Im Bereich des Granulomers findet man Mitochondrien, Lysosome, Peroxisome und alpha-Granula, welche Gerinnungsproteine enthalten. Zusätzlich lassen sich auch noch zahlreiche Glykogenpartikel und einige elektronendichte Granula nachweisen. Sogenannte „*dense bodies*“, finden. Das Hyalomer enthält ein System aus Vesikeln und Mikrotubuli. Die Zellmembran der Blutplättchen ist von vielen Glykoproteinen besetzt und wird deswegen auch als Glykokalix bezeichnet. Die Glykoproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, indem sie verschiedenen Plasmaproteinen (Fibrinogen, Immunglobulin IgG, IgM) und Gerinnungsfaktoren (Faktor V, Faktor VIII) als Rezeptor dienen und so die Adhäsion und Aggregation der Plättchen ermöglichen (Tablin, 2000). Die Glykokalix kann mit Lektinen und Rutheniumrot dargestellt werden (Sinowatz, 2000). Morphologisch werden

---

elektronendichte Granula von den  $\alpha$ -Granula und den Lysosomen unterschieden. In den elektronendichten Granula sind Adeninnukleotide, Serotonin, anorganische Phosphate und Kalzium zu finden. Die  $\alpha$ -Granula dagegen enthalten zahlreiche Proteine, wie z.B. Plättchenfaktor 4,  $\beta$ -Thromboglobulin, Wachstumsfaktoren, Fibrinogen, Faktor V und VIII, Fibronektin, von-Willebrandt-Faktor und Thrombospondin. Verschieden saure Hydrolasen dagegen findet man in den Lysosomen. Durch die Freisetzung des Granulainhaltes wird die Plättchenaggregation bewirkt (Engelhardt und Breves, 2000). Die Kontraktion der Mikrotubuli führt zur Freisetzung des Granulainhaltes, welcher durch das offene kanalikuläre System aus der Zelle austritt. In manchen Thrombozyten ist ein schwach entwickelter Golgiapparat zu finden, während raue oder glatte endoplasmatische Retikula und Ribosome seltener auftreten. Ein offenes kanalikuläres System (OCS) verbindet die Oberfläche der Plättchenmembran mit dem Zellinneren. Durch dieses System kommt es zur Kommunikation zwischen Plättcheninnerem und der Plättchenumgebung. Es wird durch Einbuchtungen der Zellmembran gebildet. Unterhalb der Mikrotubuli, welche sich unter der Zellmembran befinden, gibt es ein zweites Tunnelsystem, das „dense tubular system“, das keine Verbindung zur Membranoberfläche hat. Die Mikrotubuli bilden das Zytoskelett der Thrombozyten und bestimmen so die Form der Zellen. Auch bei der Form der Pseudopodien und der Sekretion des Granulainhaltes spielen sie eine wichtige Rolle (Tablin, 2000).

Die Thrombozyten des Hundes variieren in Form und Größe. Man unterscheidet solche mit runder und andere mit ovaler Gestalt, aber auch bikonvexe oder flache mit glatter Kontur kommen vor (Rebar et al, 1998). Häufiger jedoch findet sich die runde Form mit zentralen acurophilen Granula, welche von einer schwach blau gefärbten Matrix umgeben sind, eingeschlossen in einer dünnen Membran. Andere erscheinen agranulär oder haben nur sehr wenige Granula. Lange fadenähnliche Gebilde ragen von der Zelloberfläche in verschiedenen Richtungen der Umgebung. Der Durchmesser bei runden Thrombozyten ist  $2,5\mu\text{m}$ , bei ovalen bis  $3,5\mu\text{m}$ . Die Dicke beträgt  $0,5\mu\text{m}$  (Tablin, 2000; Rebar et al., 1998). Sehr große Durchmesser sind meist bei sehr jungen, frisch aus dem Knochenmark freigesetzten Thrombozyten zu messen. Vor allem findet sich dieses Phänomen bei einer verstärkten Nachproduktion der Blutplättchen. Beim Cavalier King Charles Spaniel dagegen sind diese Riesenthrombozyten ein rassetypischer Normalbefund und physiologisch (Mischke, 2006). Die Anzahl der Granula ist ein wichtiger Indikator bei der Bestimmung des Alters der Zellen. So haben junge Thrombozyten deutlich mehr Granula als alte Thrombozyten. Man findet

---

diese jungen Thrombozyten häufig bei vorausgegangen Blutverlusten. Die Oberfläche der kaninen Plättchen ähnelt der von Katze, Rind, Pferd, Ziege und Schaf, während Form und Größe zwischen den verschiedenen Spezies und innerhalb einer Spezies durchaus variieren können. Die Größe der Blutplättchen lässt Rückschlüsse auf die Aktivität der Thrombozyten zu; so sind kleinere Plättchen metabolisch und funktionell weniger aktiv als Größere. Auch die Anzahl der Pseudopodien auf der Zellmembran ist ein Indiz für die Aktivität der Zelle. Flache Einkerbungen auf der Zelloberfläche sind Öffnungen des offenen kanalikulären Systems, welche sich innerhalb der Plättchen verzweigen (Tablin, 2000).

### **1.5.3. Aufgabe der Thrombozyten**

Die Hauptfunktion der Thrombozyten besteht in der primären Hämostase. Durch den Verschluss kleinster Verletzungen in der Gefäßwand tragen sie zur Instandhaltung der Blutgefäße bei (Rebar et al., 1998). Sobald das Blut in Kontakt mit subendothelialen Strukturen, wie Kollagenfasern, die Basalmembran oder Gewebe, durch das es zur Freisetzung von Gewebethromboplastin oder Phospholipiden kommt, gerät, laufen die verschiedenen Mechanismen der Blutstillung an (Mischke, 2003). Bei Verletzung der Gefäßwand werden vasokonstriktorische Substanzen aus den Granula der Thrombozyten freigesetzt, durch die sich der betroffene Gefäßabschnitt kontrahiert. Die Blutplättchen bilden Pseudopodien aus, wodurch sie in der Lage sind, sich zusammenzulagern (Dellmann und Carithers, 1996). Die Thrombozytenadhäsion wird durch den von-Willebrand-Faktor vermittelt, welcher vom Gefäßendothel und von Megakaryozyten gebildet wird. Durch die Adhäsion der Blutplättchen werden diese aktiviert, sie verändern ihre Form (Bildung der Pseudopodien) und setzen ihre Granulainhaltsstoffe frei. Durch Aggregation entsteht ein Gefäßpfropf, welcher die Verletzung abdichtet. Beim Hund sind ca. 80% der Hämostasestörungen auf zu niedrige Plättchenzahlen oder Fehlfunktionen der Plättchen zurückzuführen, z.B. bei der erblichen von-Willebrandt-Erkrankung, Thromboasthenie, Thrombozytenagglutination (Engelhardt und Breves, 2000). Das vermehrte Vorkommen von Riesenthrombozyten im Hundeblood ist bei 50% der Hunde mit einer immunmedierten Thrombozytopenie, bei 25% mit Neoplasien, bei 20% mit Entzündungsgeschehen und bei 15% mit anderen Gründen vergesellschaftet (Weiss und Townsend, 1998).



## 2. Blutbild des Hundes

In der folgenden Tabelle sind die physiologischen Blutwerte des Hundes angegeben:

Tabelle 2.1. Referenzbereiche verschiedener hämatologischer Messgrößen bei adulten Hunden (unter Verwendung der Angaben von Jain, 2000; Kraft und Dürr, 2005)

Messgröße	Einheit konventionell	SI-Einheit	Hund
Hämoglobin	G/dl	Mmol/l	15-19 9,3-11,8
Erythrozytenzahl	$10^6/\mu\text{l}$	$10^{12}/\text{l}(T/\text{l})$	6-9
Hämatokrit	%	L/l	38-55
MCV	$\text{Mm}^3$	fl	60-77
MCH	Pg	Fmol	17-23 1,0-1,4
MCHC	G/dl	Mmol/l	31-34 19-21
Gesamtleukozytenzahl	$10^3/\mu\text{l}$	$10^9/\text{l}(G/\text{l})$	6-12 (16)*
<b>Differentialblutbild (relative Zahlen)</b>	%		55-75
Segmentkernige neutrophile Granulozyten			
Stabkernige neutrophile Granulozyten	%		0-3
Eosinophile Granulozyten	%		0-6
Basophile Granulozyten	%		0-1
Monozyten	%		0-4
Lymphozyten	%		12-30
<b>Differentialblutbild (absolute Zahlen)</b>	$10^3/\mu\text{l}$	$10^9/\text{l}(G/\text{l})$	3-10
Segmentkernige neutrophile Granulozyten			
Stabkernige neutrophile Granulozyten	$10^3/\mu\text{l}$	$10^9/\text{l}(G/\text{l})$	0-0,03
Eosinophile Granulozyten	$10^3/\mu\text{l}$	$10^9/\text{l}(G/\text{l})$	0-0,06
Basophile Granulozyten	$10^3/\mu\text{l}$	$10^9/\text{l}(G/\text{l})$	<0,04
Monozyten	$10^3/\mu\text{l}$	$10^9/\text{l}(G/\text{l})$	0-0,5
Lymphozyten	$10^3/\mu\text{l}$	$10^9/\text{l}(G/\text{l})$	1-4
Thrombozyten	$10^3/\mu\text{l}$	$10^9/\text{l}(G/\text{l})$	150-500

MCV = mean corpuscular volume, mittleres Erythrozytenvolumen

MCH = mean corpuscular haemoglobin, mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten

MCHC = mean corpuscular haemoglobin concentration, mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten

\* bei Stress/Erregung können höhere Leukozytenzahlen vorliegen

## 3. Lektine und Lektin histochemie

Nach dieser überblicksartigen Zusammenfassung der Histologie kaniner Blutzellen sollen im Anschluss die Lektine, ihre Struktur und ihre Bindungseigenschaften eingehend erläutert werden. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der spezifischen Histochemie der Lektine.

---

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine nichtimmunogenen Ursprungs, die sich spezifisch an Kohlenhydrate binden (Nultsch, 2001). Der Name Lektin leitet sich von dem lateinischen Wort *legere, auswählen*, ab und geht auf die Studie von Boyd und Shapleigh aus dem Jahre 1954 zurück. Er ersetzt die ehemalige Bezeichnung Phythämagglutinin, welcher die Herkunft und biologische Funktion in den Vordergrund stellt (Franz, 1990). Charakteristisch für Lektine ist ihre Fähigkeit, Erythrozyten zu agglutinieren (Nultsch, 2001). Ursprünglich wurden Lektine aus Pflanzen isoliert, sie können aber auch tierischen oder bakteriellen Ursprungs sein (Franz, 1990). Goldstein formulierte Jahre später folgende Definition: "Ein Lektin ist ein Zucker bindendes (pflanzliches) Protein oder Glykoprotein nichtimmunogenen Ursprungs, das Zellen agglutiniert und / oder Glykokonjugate präzipitiert." (Goldstein et al. 1980).

### 3.1. Historie der Lektine

1888 entdeckt Stillmark die Stoffgruppe der Lektine in den Samen von *Ricinus communis*. Im Rahmen seiner Dissertationsarbeit beobachtet er die agglutinierende Eigenschaft des Ricins bei Erythrozyten. Kurz darauf gelingt es Hellin ein weiteres toxisches Hämagglutinin aus *Abrus preatorius* (Paternosterbohne) zu isolieren, das Abrin. 1891 veröffentlicht Ehrlich erste immunologische Studien. In seinen Untersuchungen über das Immunsystem verwendet er Ricin und Abrin als Antigene, wodurch erstmals Erkenntnisse über die Bildung und Spezifität von Antikörpern gewonnen werden konnten. Landsteiner wies 1902 die Reversibilität der Hämagglutination durch pflanzliche Agglutinine nach. Zusammen mit Raubitschek isolierte er 1908 erstmals nicht toxische Phyttagglutine aus Schmetterlingsblütlern, das Phasin (Rüdiger et al., 2000). 1936 entdeckten Summer und Howell, dass Concanavalin A, aus *Convalaria ensiformis*, nicht nur Erythrozyten agglutiniert, sondern auch Stärkegranula und Mukoproteine ausfällt. Durch Sukrose konnte die Hämagglutination gehemmt werden, woraus geschlossen werden konnte, dass es sich bei Lektinrezeptoren um verschiedenartige Kohlenhydratgruppen handeln könnte. Durch die verschiedenartige Stärke der Hämagglutination bei unterschiedlichen Blutgruppen konnten sowohl Boyd und Reguera 1949, als auch Renkonen 1948 die Blutgruppenspezifität bestimmter Lektine nachweisen. 1983 grenzte Uhlenbruck Antikörper und Lektine eindeutig voneinander ab (Franz, 1990).

---

### 3.2. Vorkommen und Funktion der Lektine

Lektine sind in der Natur weit verbreitet, sie kommen nicht nur in Pflanzen vor, sondern auch in Viren, Bakterien, Tieren und Menschen (Barondes, 1981). Sie fungieren vor allem als Erkennungsmoleküle (Aswell und Morell, 1972; Lis und Sharon, 1989). Bei Pflanzen haben sie eine wichtige Funktion bei dem Transport von Kohlenhydraten, in der Entwicklung der Samenformation oder der Samenkeimung (Germination) und bei der Kontrolle des Zellwachstums, außerdem spielen sie eine wichtige Rolle im Pflanzenimmunsystem (Sharon, 1984). Als erstes Lektin wurde das Ricin von Stillmark aus der Rizinuspflanze isoliert. Pflanzenlektine übernehmen wichtige Funktionen. So kommt Concanavalin A in den Samen der Fabacee *Convalaria ensiformis* vor und übernimmt dort seine Aufgabe als Speicherprotein (Nultsch, 2001). Außerdem schützen Lektine die Pflanzen vor Infektionen und sind in der Lage, das Wachstum von parasitären Pilzen zu hemmen. Aufgrund ihrer toxischen Wirkung können Lektine mithin auch als natürlicher Fraßschutz dienen. Besonders häufig findet man Lektine in den Samen von Hülsenfrüchten, von denen viele mithilfe dieser Lektine eine Symbiose mit Knöllchenbakterien eingehen. In den Fünfzigerjahren entdeckte Duguid, dass sich an den Fimbrien von Bakterien kohlenhydratbindende Moleküle befinden, welche für die Adhäsion an die Zellen des Wirts verantwortlich sind (Gabius et al., 1988). Lektine auf Bakterien sind von großer Bedeutung für den Ablauf von Infektionen, sie gelten als sogenannte Pathogenitätsmarker. Auch auf Viren lassen sich Lektine finden. Über Hämmagglutinin ist es Viren möglich, an die Sialinsäure der Zelloberfläche zu binden und somit den Wirt zu infizieren (Franz, 1990). Beispiele für virale und bakterielle Lektine sind unter anderem das Influenzavirus-Hämagglutinin oder das Polyomavirus-Protein 1, bei den Bakterien sind das Enterotoxin und Cholera toxin wichtige Lektine, über die die Wirtszelle infiziert wird (Nelson und Cox, 2001).

1974 haben Aswell und Morell membrangebundene Lektine auf Säugetierorganen nachgewiesen. Lektine können zur Agglutination von Erythrozyten, malignen Zellen, Embryonalzellen, Hefezellen und Bakterien führen. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion und initiieren die Signaltransduktion (Rüdiger et al., 2000). Man findet sie innerhalb der Zelle, im Zytoplasma, in den Zellorganellen und auf Zellmembranen (Sharon, 1998). Auch das "Homing"-Phänomen, die Einwanderung rezirkulierender Lymphozyten in sekundär lymphatische Organe wird durch Lektine vermittelt (Franz, 1990). Sharon

---

beschreibt auch die lektinvermittelte Phagozytose von mikrobiellen Krankheitserregern und von Tumorzellen (Gabijs et al., 1988).

### **3.3. Struktur und Bindungseigenschaften**

Lektine sind Glykoproteine, die eine große strukturelle Vielfalt aufweisen. Sie unterscheiden sich hinsichtlich Größe, Aminosäurezusammensetzung und Struktur (Sharon et al., 1998; Sharon und Lis, 1989). Die Fähigkeit Zucker zu binden und Zellen zu agglutinieren ist ihnen jedoch allen gemein. Im Gegensatz zu anderen Typen Kohlenhydrat bindender Proteine besitzen sie mindestens zwei Zuckerbindungsstellen (Goldstein et al., 1978), anhand derer sie Zellen agglutinieren können. In der Regel sind die Zuckerbindungsstellen eines Moleküls identisch. Das Molekulargewicht der Lektine schwankt zwischen 8500 Da und 300 000 Da (Pühler et al., 2000). Sie bestehen aus zwei bis vier Untereinheiten, wobei pro Untereinheit normalerweise je eine Zuckerbindungsstelle vorhanden ist. Die stets reversible Bindung (Sharon, 1984) erfolgt durch van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen (Loris, 2002). Für die Bindung von Zuckern sind ebenso Metallione wie Mangan ( $Mn^{2+}$ ) und Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) nötig, die zwar keinen direkten Kontakt mit dem Kohlenhydrat haben, aber bei der Stabilität der Aminosäuren in der aktiven Kette des Lektins helfen. (Varki, 1999). Bei den tierischen Lektinen fungieren die Metallione aber auch als direkter Bindungspartner für den Zucker (Loris, 2002). Aufgrund der verschiedenen Molekulargewichte, Struktur und Anzahl der Untereinheiten werden mehrere Lektintypen unterschieden, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

Die Kategorisierung der Lektintypen erfolgt anhand der Zuckerspezifität der Lektine. So weisen etwa viele Lektine eine stärkere Affinität zu Oligosacchariden auf als zu Monosacchariden. Je nachdem durch welchen Zucker das Lektin am wirksamsten gehemmt werden kann, ist die Spezifität festgelegt und das Lektin wird in die jeweilige Gruppe eingeteilt (Sharon, 1984; Sharon und Lis, 1997; Goldstein und Poretz, 1986).

### 3.4. Funktionelle Kategorisierung

Nach ihrer Zuckerbindungsspezifität werden alle heute bekannten Lektine in die folgenden Gruppen eingeteilt (Radek, 1996):

1. Glukose spezifische Lektine; 2. Galaktose spezifische Lektine; 3. Fukose spezifische Lektine; 4. Mannose spezifische Lektine; 5. Oligosaccharid spezifische Lektine

Tabelle 2.2. Einteilung der Lektine nach ihrer Zuckerbindungsspezifität (Goldstein und Poretz, 1986)

Zuckerspezifität	Ursprung des Lektins	Abkürzung des Lektins
1. N-Acetyl-D-Glukosamin-(GlcNAc)-bindende Lektine	<i>Triticum vulgare</i> <i>Ulex europaeus II</i> <i>Griffonia simplicifolia II</i> <i>Solanum tuberosum</i>	WGA UEA II GSL II STA
2. Galaktose bzw. N-Acetyl-D-Galaktosamin-(GalNAc)-bindende Lektine	<i>Glycine max</i> <i>Helix pomatia</i> <i>Bauhinia purpurea</i> <i>Maclura pomifera</i> <i>Visea villosa</i> <i>Dolichos biflorus</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Griffonia simplicifolia I</i> <i>Ricinus communis</i> <i>Erythrina cristagalli</i> <i>Sophora japonica</i>	SBA HPA BPA MPA VVA DBA PNA GSL I RCA ECA SJA
3. L-Fukose bindende Lektine	<i>Ulex europaeus I</i> <i>Lotus tetragonolobus</i>	UEA I LTA
4. D-Mannose / D-Glukose-bindende Lektine	<i>Convalaria ensiformis</i> <i>Lens culinaris</i> <i>Pisum sativum</i>	Con A LCA PSA
5. Oligosaccharid bindende Lektine	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA-E PHA-L

---

Die am besten untersuchte Familie der Pflanzenlektine sind die der Familie *Leguminosaceae*, hierzu gehören unter anderem Lektine wie Con A, SJA und LCA. Zwei kleinere Pflanzenfamilien mit charakterisierten Lektine ist einerseits die Familie der *Gramineae* mit WGA und andererseits die der *Solanaceae* mit den Lektinen von Tomate und Kartoffel. Es besteht eine enorme Vielfalt von Zuckerbindungsspezifitäten innerhalb der Pflanzelektine, weshalb sie aufgrund ihrer Spezifität klassifiziert werden (Varki, 1999).

### **3.5. Lektin histochemie: Definition und Methoden**

Lektin histochemie ist die Darstellung der Bindung eines Lektins an einen gewebsgebundenen Kohlenhydratrest, mikroskopisch sichtbar gemacht durch einen geeigneten Marker (Brooks et al., 1997). Vor der Einführung der Lektin histochemie wurde die Identifikation von Kohlenhydraten mit anderen Methoden untersucht. Diese waren aber begrenzt in ihrer Spezifität für bestimmte Zucker und brachten nur unvollständige Informationen über den strukturellen Aufbau der Glykane. Lektine dagegen reagieren spezifisch mit den Kohlenhydrat- und Oligosaccharidsequenzen von Glykokonjugaten. Dadurch haben sie eine wichtige Funktion als spezifischer Marker zur Lokalisierung und Charakterisierung des Zuckerprofils von Zellen und Geweben (Gabius, 1997). Sie können nicht nur Zucker voneinander unterscheiden, sondern häufig auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere oder Oligosaccharide verschiedener Kettenlänge (Rüdiger, 1981). Die meisten der in der Histochemie eingesetzten Lektine sind pflanzlichen Ursprungs, mit nur wenigen Ausnahmen, wie das Lektin der Schnecke *Helix pomatia*, welches in der Histopathologie benutzt wird. Die Methoden der Lektin histochemie entsprechen häufig denen der Immunhistochemie. Wie bei dieser werden auch bei den Lektinen direkte, indirekte, Peroxidase, Antiperoxidase (PAP), Avidin-Biotin, Avidin-Biotin-Komplex Methoden verwendet (Denk, 1987). Die Anwendung von Lektinen in der Histopathologie und die Voraussetzungen dafür, wie zum Beispiel passende Gewebefixation, wurden von Mason und Matthews 1988, Walker 1989 und Danuy 1994 erforscht. In der direkten Methode ist das Lektin mit einem Enzym oder Fluoreszenzstoff markiert. Die Avidin-Biotin-Complex Methode ist sensitiver als die direkte und man benötigt eine geringere Lektinmenge. In der Elektronenmikroskopie wird das Lektin mit einer elektornendichten Kennzeichnung wie Ferritin versehen (Gabius, 1997).

---

### 3.6. Lektin histochemische Untersuchungen an Blutzellen

Die ersten Untersuchungen an Blutzellen mit Lektinen wurden von Stillmark 1888 durchgeführt. Er isolierte erstmalig ein Lektin aus den Samen von *Ricinus communis* und wies nach, dass dieses Protein in der Lage ist, Erythrozyten zu agglutinieren. 1947 / 48 entdeckten Boyd und Renkonen die Blutgruppenspezifität bestimmter Lektine. So entdeckte Boyd anti-A in der *Lima bean*, Mäkelä und Mäkelä anti-B in den Samen von *Bandeirae simplicifolia*, anti-H fand Renkonen in *Cytisus sessilifolius*, *Laburnum alpinum* und *Lotus tetragonolobulus*. Anti-AB wurden wesentlich häufiger als anti-B gefunden. Bird entdeckte 1956 anti-AB in *Crotalaria striata*, Krüp und Braun 1952 in *Sophora japonica* (Gold und Balding, 1975). Watkins und Morgan benutzten 1952 Lektine um die Kohlenhydratstruktur der Blutgruppenantigene zu beweisen (Rüdiger et al., 2000). Von Anfang an waren Lektine ein wichtiger Bestandteil in der Forschung der Blutgruppenserologie. Bis heute werden einige von ihnen in der Blutgruppendiagnostik verwendet, etwa aus *Dolichos biflorus* (A1), *Helix pomatia* (A) und *Vicia graminea* (N) (Franz, 1990). Lektine wurden auch bei Untersuchungen der kaninen Blutzellen verwendet. Bereits 1978 ließen die Ergebnisse einer Studie von Bhalla, Gaur und Bhatia darauf schließen, dass manche Lektine als diagnostisches Mittel eingesetzt werden können, um das Blut verschiedener Tierarten zu unterscheiden (Bhalla et al., 1978). Bereits 1983 wurde das Agglutinin der Erdnuss (PNA) als fluoreszierender Marker eingesetzt, um T-Lymphozyten im Hundeblood zu identifizieren (Rigal, et al., 1983). In einer Studie von Madewell et al. wurde die Lektinbindung an kaninen Lymphozyten an 19 Testhunden mit und ohne neoplastisches Syndrom mittels der Durchflusszytometrie untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen (Madewell et al., 1984). Es zeigte sich, dass die Testhunde mit Lymphosarkom gegenüber den klinisch gesunden Hunden eine erhöhte Bindungstendenz mit Con A aufwiesen, was auf den möglichen Einsatz von Lektinen bei Blutuntersuchungen im Dienste einer Krebsprophylaxe schließen ließ.

1987 wurde in einer Studie von Letwin und Quimby die Wirkung von Con A; LPS (Lipopolysaccharid), PWM (pokeweed mitogen) und PHA auf die Replikation und die Immunglobulinsynthese von kaninen Lymphozyten erforscht. Dabei zeigte sich, dass spezifische Konzentrationen von Con A die Ausdifferenzierung von T-Lymphozyten zu Unterdrückerzellen aktivieren können (Letwin und Quimby, 1987). Bei einer weiteren

---

Untersuchung kaniner T-Lymphozyten wurde 1988 PNA zusammen mit dem Oberflächenimmoglobulin SIg als Oberflächenmarker eingesetzt (Turnwald et al., 1988).

Tajima et al. untersuchten 1990 die Verteilung von Con A und PHA Bindungsstellen auf Pferde-, Rinder- und Hundelymphozyten und der Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass die spezifische Verteilung der Bindungsstellen eine Schlüsselrolle spielen beim Bindungsverhalten der verschiedenen Lymphozyten (Tajima et al., 1990).

Eine Studie von Andrews et al. untersuchte 1992 die Reaktivität vom Lektin der Flechte mit kaninen Erythrozyten. Von den 69 eingesetzten Flechtenlektinen führten 43 zu einer Agglutinierung kaniner Erythrozyten. Die übrigen Lektine wiesen ein differenziertes Agglutinationsverhalten bei den untersuchten Blutzellen auf, das dabei in keinem erkennbaren Zusammenhang mit den bekannten Blutgruppentypen stand (Andrews et al., 1992).

1993 gelang Darbes et al. der lektinhistochemische Nachweis und die teilweise Identifizierung von Glykoproteinen auf feline und kanine Thrombozyten anhand der Markierung mit den biotinylierten Lektinen LCA, PSA, WGA und PHA-L.

Usui et al. untersuchten 1994 den Phänotyp roter Blutzellen beim Hund mit dem FITC-markierten Lektin Clerodendron trichotomum. Auch bei dieser Studie zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Krebsbefall und veränderten Zuckerstrukturen auf den roten Blutzellen: Das Agglutinationsverhalten bestimmter Blutzellen veränderte sich bei der Erkrankung des Wirts an einem Mammatumor von negativ zu positiv, was auf eine neue Blutzellenpopulation mit neuartigen Zuckerstrukturen, bedingt durch den Tumor, schließen ließ (Usui et al., 1994).

2007 entwickelten Kato et al. eine neue Kulturmethode kaniner Lymphozyten mit Hilfe von Con A und dem humanen Interleukin-2 (rhIL-2), die sich als nützlich erweisen könnte sowohl für die Erzeugung lymphokin aktivierter Killerzellen als auch für die adaptive Immuntherapie tumorbefallener Hunde (Kato et al., 2007).

#### **4. Kohlenhydrate der Glykocalix der Blutzellen**

An der Oberfläche der Zellmembran von Blutzellen sind Kohlenhydratgruppen lokalisiert. Sie verleihen der Zelle ihre Spezifität, z.B. Blutgruppenmerkmale. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und der Oberflächenantigenität. Dieser Mantel aus Kohlenhydratgruppen besteht vor allem aus Glykoproteinen und Glykolipiden. Ist die



---

Zellmembran sehr dicht mit Zuckermolekülen besetzt, spricht man von einer Glykocalix. Durch die vielfältige Struktur der Zuckermoleküle und ihre verschiedenen Kettenverzweigungen, besteht eine große Variabilität beim Aufbau der Oligosaccharide der Zellmembran. Das Oberflächenmuster der Glykoproteine und Glykolipide ist sehr komplex und enthält vornehmlich nur wenige Zucker, diese sind vor allem Glukose, Fukose, Mannose, Glukosamin, Galaktose und Sialinsäure, die sich unterschiedlich verknüpfen (Nelson und Cox, 2001).

#### **4.1. Funktion und Bedeutung der Zuckerstrukturen für die Blutzelle**

Die Zuckerreste auf der Zellmembran der Blutzellen haben wichtige Funktionen in intrazellulären Erkennungs- und Adhäsionsprozessen, sowie in der Blutgruppenspezifität und Antigenität. Die einzelnen Komponenten der Zellmembran (Lipide, Proteine, Glykoproteine, Glykolipide) bilden charakteristische supramolekulare Komplexe, welche in bestimmter Anordnung verschiedene Funktionen innehaben (Sinowatz, 2000). Sie bilden z.B. Rezeptoren, welche eine wichtige Rolle in der immunologischen Reaktionskette spielen, sie dienen auch zur Identifikation von körperfremd und körpereigen, Glykolipide auf den Erythrozyten bestimmen die Blutgruppe (Nelson und Cox, 2001). Glykoproteine und Glykolipide verleihen der Zelloberfläche Individualität und haben eine wichtige Funktion als Oberflächenantigen (Karlson et al., 1994). Die Zuckerstrukturen der Blutzellen sind aber nicht nur für Kommunikationsprozesse, Blutgruppenspezifität und Antigenität wichtig, sondern werden auch bei der Diapedese und beim Abbau alter Blutzellen benötigt. Auch als Rezeptor für Mikroorganismen wie Viren oder Bakterien haben sie eine große Bedeutung, wodurch die Infektionserreger die Zelle infizieren können (Sharon und Lis, 1993).

##### **4.1.1. Abbau**

So schützt die Sialinsäure am Ende der Oligosaccharidketten der Erythrozyten vor deren Abbau in der Leber. Hepatozyten enthalten Lektinmoleküle, welche spezifisch Oligosaccharidketten mit Galaktoseresten binden, die nicht mehr durch einen terminale Sialinsäurerest geschützt werden. Junge Erythrozyten besitzen mehrere Membranglykoproteine mit Sialinsäure endenden Oligosaccharidketten. Dadurch werden sie von den Leberzellen nicht als alt erkannt und können weiter im Blut zirkulieren (Nelson und

---

Cox, 2001). Der Abbau der Erythrozyten steht im direkten Verhältnis zur Stoffwechsellistung der Tiere. So bedingt die höhere Neubildungsrate bei kleineren Tieren wie Hund oder Katze eine relativ hohe Anzahl an Retikulozyten im Blut, den Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen. Im Gegensatz dazu kommen diese bei Pferden und anderen Unpaarhufern bedingt durch die verzögerte Freisetzung aus dem Knochenmark nicht im peripheren Blut vor. Auch bei den Blutplättchen kommt es zu deutlichen Änderungen in dem Kohlenhydratmuster auf der Zellmembran, wodurch sie vom mononukleären Phagocytosesystem der Leber und Milz erkannt und abgebaut werden (Engelhardt und Breves, 2000).

#### **4.1.2. Diapedese**

Die Migration von Leukozyten durch die Kapillarwand ins Gewebe wird ebenfalls durch Zuckerstrukturen vermittelt. Es ist von entscheidender Bedeutung für die Immunreaktion des Körpers, dass die Abwehrzellen gezielt an den Ort der Infektion gelangen. Bestimmte Oberflächenrezeptoren der Leukozyten, sogenannte Selektine (Glykoproteine), ermöglichen den Kontakt zwischen dem Blutgefäß und der Blutzelle. Es kommt zu einer geregelten Erkennung zwischen Endothel und den zirkulierenden weißen Blutkörperchen (Varki, 1999). Ein endothelialer Glykoproteinrezeptor vermittelt die Bindung des Lymphozyten an die Gefäßwand. Außer diesem Homing-Rezeptor gibt es auch noch zwei andere Selektine, welche im aktivierten Gewebe gebildet werden, das E-Selektin und das P-Selektin (Sharon und Lis, 1993). Selektine sind Bestandteil der Familie der Lektine, welche in der Plasmamembran vorkommen und eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Erkennungsprozessen spielen (Nelson und Cox, 2001). Infiziertes Gewebe schüttet Zytokine und Interleukin-1, sowie den Tumor-Nekrose-Faktor alpha aus, welche das Endothel anregen, E- und P-Selektine auszuprägen. E- und P-Selektin ragen in die Blutbahn und fangen Leukozyten ab, welche auf ihrer Oberfläche einen Kohlenhydratmantel mit komplementären Strukturen enthalten und so an die Gefäßwand gebunden werden können (Sharon und Lis, 1993). An der Infektionsstelle geht das P-Selektin an der Endotheloberfläche eine Wechselwirkung mit einem spezifischen Oligosaccharid der Glykoproteine zirkulierender T-Lymphozyten ein. Eine weitere Wechselwirkung zwischen Endothel und T-Lymphozyt, vermittelt durch Integrin Moleküle in der Plasmamembran der T-Zelle und einem Adhäsionsprotein der Endothelzelle verlangsamt den Fluß des Lymphozyten (Nelson und Cox 2001). Durch die Bindung der Selektine an die

---

Leukozyten, werden diese bei ihrer Wanderung verlangsamt und rollen schließlich durch diese Adhäsion an der Endothelwand entlang, bis sie in das Gewebe eintreten können (Varki, 1999). Mithilfe des E-Selektins an der Endotheloberfläche und des L-Selektins der T-Zelle, gelingt es dieser in das Gewebe überzutreten (Nelson und Cox 2001). Über chemotaktische Faktoren wie Komplementkomponenten z.B. C5a, Interleukin-8 und andere werden sie in das Entzündungsgebiet gelockt, wo sie dann Mikroorganismen phagozytieren (Engelhardt und Breves, 2000).

### **4.1.3. Blutgruppen**

Glykoproteine und Glycolipide auf der Oberfläche von Erythrozyten bestimmen die Blutgruppe (Sharon und Lis, 1993; Hale, 1995). Diese Blutgruppenantigene bestehen aus einem Trägermolekül (Lipid) und der eigentlich determinanten Gruppe, welches meistens ein Oligosaccharid ist. Als Zucker kommen Galaktose, Galaktosamin, N-Acetyl-Galaktosamin, Fukose und N-Acetyl-D-Glukosamin vor. Die Oligosaccharide des AB0-Systems beim Menschen unterscheiden sich nur durch den Austausch eines einzigen Kohlenhydratrestes. Die Blutgruppe 0 wird durch die sogenannte H-Substanz gekennzeichnet. Diese besteht aus N-Acetyl-Glukosamin, Fukose und Galaktose. An die H-Substanz der Blutgruppe A ist ein Molekül N-Acetyl-Galakotsamin konjugiert, bei der Blutgruppe B dagegen ein Galaktoserest (Nelson und Cox, 2001). Beim Hund werden die Blutgruppen nach dem DEA-System (Dog-Erythrocyt-Antigen) klassifiziert. 8 verschiedene Erythrozytenantigene werden beim Hund nach dem DEA-System eingeteilt, DEA 1.1, DEA 1.2., DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 6, DEA 7, DEA 8 (Mischke, 2003; Hale, 1995). Die alte Klassifikation teilt die verschiedenen Blutgruppen nach folgendem System ein, A1, A2, B, C, D, F, Tr und He. Tabelle 2.3. gibt eine Übersicht über die verschiedenen Blutgruppensystem beim Hund inklusive zugehöriger Blutgruppenfaktoren und Allele (Kraft und Dürr, 2005; Hale, 1995; Bell, 1983). Der Hund kann für jede Blutgruppe positiv oder negativ sein, enthält also auf seiner Erythrozytenmembran eines dieser Antigene oder nicht. Eine Ausnahme darin ist das DEA 1-System, welches sich durch die verschiedenen Allelen 1.1 (A1), 1.2 (A2), 1.3 (A3) und einem Null-Typ definiert. Bei diesen ist der Hund entweder für einen dieser Phänotypen positiv oder für alle insgesamt negativ, die Phänotypen kommen also nicht zusammen bei einem Tier vor. Dieses Blutgruppensystem wird autosomal dominant vererbt (Kohn et al., 1998; Symons und Bell, 1991; Hale, 1995). Im Hundeblood kommen bei den meisten

Blutgruppen keine natürlich erworbene Blutgruppenantigene vor, sie bilden diese erst nach Transfusion oder in der Trächtigkeit (Couto, 2006). Die erste Bluttransfusion verläuft also ohne Probleme, wird allerdings einem DEA 1.1 negativen Hund das Blut eines DEA 1.1 positiven Tieres transfundiert, kommt es zu einer Antikörperbildung, was zu einer verzögerten Hämolyse führt (Hale, 1995). Kommt es zu einer weiteren DEA 1.1 positiven Blutübertragung auf den DEA 1.1 negativen Hund, kann es durch die Sensibilisierung zu einer akuten, hämolytischen Transfusionsreaktion kommen (Mischke, 2003). Aus diesem Grund wird von DEA 1.1 positiven Hunden als Blutspender abgesehen (Hale, 1995). Wird eine DEA 1.1. negative Hündin von einem DEA 1.1. positiven Rüden gedeckt, kann es bei den Welpen zu einer neonatalen Isoerythrolyse kommen (Mischke, 2003; Thrall et al., 2004). Die Blutgruppe DEA1.1 hat die höchste Antigenität, ein DEA1.1 negativer Hund sollte aus diesem Grund nur DEA1.1 negatives Blut erhalten (Kohn et al., 1998). Natürlich vorkommende Antikörper im Blut finden sich bei den Blutgruppe DEA 3, DEA 5 und DEA 7. So finden sich bei 20% der DEA 3 negativen Hunde und bei 20-50% aller DEA 7 negativen Hunde diese natürlichen Antikörper im Blut. Bei diesen Blutgruppen kann es schon bei der ersten Transfusion zu immunmedierten Transfusionsreaktionen kommen, aus welchem Grund sie nicht als Blutspender hergenommen werden. Der Großteil aller Hunde hat die Blutgruppe DEA 4 durch ihre die Abwesenheit natürlichen Antikörper und fehlender Transfusionsreaktion werden Tiere dieser Blutgruppe als „Universal-Spender“ hergenommen (Hale, 1995).

Tabelle 2.3. Übersicht der kaninen Blutgruppen nach Hale, 1995, Bell, 1983

DEA-System	„alte Klassifikation“	Blutgruppenfaktor	Allele	Natürlich vorkommene Antikörper	Transfusionsreaktion
1.1	A1	Aa1	A <sup>a1</sup>	Nein	akute hämolytische Reaktion
1.2	A2	Aa2	Aa,A <sup>-</sup>	Nein	akute hämolytische Reaktion
3	B	Ba	B <sup>a</sup> ,B <sup>-</sup>	Ja	verzögert, keine Hämolyse
4	C	Ca	C <sup>a</sup> ,C <sup>-</sup>	Nein	keine
5	D	Da	D <sup>a</sup> ,D <sup>-</sup>	Ja	verzögert,

					keine Hämolyse
6	F	Fa	F <sup>a</sup> ,F <sup>r</sup>	Nein	Unbekannt
7	Tr	Tr <sup>tr</sup>	Tr <sup>tr</sup> ,Tr <sup>0</sup> Tr <sup>r</sup>	Ja	verzögert, keine Hämolyse
8	He		-	Nein	unbekannt
-	J	Ja	J <sup>a</sup> ,J <sup>r</sup>		
-	K	Ka	K <sup>a</sup> ,K <sup>r</sup>		
-	L	La	L <sup>a</sup> ,L <sup>r</sup>		
-	M	Ma	M <sup>a</sup> ,M <sup>r</sup>		
-	N	Na	N <sup>a</sup> ,N <sup>r</sup>		

#### 4.2. Kohlenhydrate als Rezeptoren für Mikroorganismen

In den fünfziger Jahren entdeckte Duguid, dass sich an den Fimbrien von Bakterien Kohlenhydrat bindende Moleküle befinden, die für die Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle verantwortlich sind (Gabijs et al., 1988). Viele Enterobacteriaceae haben die Fähigkeit Oberflächenlektine zu bilden, welche dann spezifisch an die Kohlenhydratstrukturen der Wirtszelle binden und sie so infizieren. Aber auch andere Bakterien nutzen diese Möglichkeit zur Infektion, wie zum Beispiel verschiedene Arten der Actinomyces. Auch Protozoen wie *Giardia lamblia* oder Viren wie der Myxovirus oder Paramyxovirus infizieren auf diese Weise ihren Wirt (Sharon und Lis, 1989). So infiziert das Influenzavirus zum Beispiel die roten Blutkörperchen, indem es sich über sein Lektin an die Sialinsäure des Erythrozyten heftet (Sharon und Lis, 1993). Das Influenzavirus heftet sich mit seinem Hämagglutinin an den Kohlenhydratanteil der Wirtszelle, wodurch es über Endozytose in die Blutzelle gelangen kann (Nelson und Cox, 2001). Ebenso kann sich ein Blutgruppenspezifisches bakterielles Lektin an Blutgruppenantigene der Zellen im befallenen Organ anbinden. Auf diese Weise können Blutgruppen bestimmte Infektionen begünstigen bzw. bieten so bestimmte Blutgruppen einen gewissen Schutz vor Infektionen mit Erregern, die diese Lektine gebrauchen. So werden Menschen mit der Blutgruppe NN nicht von *E. coli* mit M- Fimbrien infiziert (Gabijs et al., 1988) und Menschen mit Blutgruppe 0 haben ein höheres Risiko mit *Helicobacter* infiziert zu werden, als Träger von Antigen A oder B (Rüdiger et al., 2000). *Helicobacter pylori* bindet das spezifische Oligosaccharide Le<sup>b</sup> der Magenschleimhaut, welches Teil der Determinanten für die Blutgruppe 0 des Menschen ist.

---

Dies erklärt die höhere Anfälligkeit von Trägern dieser Blutgruppe für Helicobacterinfektionen (Nelson und Cox, 2001).

#### **4.3. Kohlenhydrate im Rahmen der *antiadhäsiven Therapie***

Das Zustandekommen Lektin-vermittelte Adhäsionen von Mikroorganismen an zelluläre Oberflächenstrukturen ist ein entscheidender Schritt in Hinblick auf die daraus resultierende Infektion eines Organismus. Umgekehrt kann durch Störung der Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen Mikroorganismus und Zielzelle die Besiedelung zellulärer Oberflächen verhindert und die Infektkette so – wie Sharon und Lis 1993, Ni und Tizard, 1996, Sharon, 1996 und schließlich Lindhorst 2000 beschreiben - unterbrochen werden. Als antiadhäsives Agens kommen dabei zum einen Zucker oder zuckerähnliche Strukturen in Frage, die den Kohlenhydratresten auf der Oberfläche der jeweiligen Zielzellen entsprechen und so im Stande sind mikrobielle Lektine zu blockieren (Sharon, 1996; Lindhorst, 2000). Zum anderen kann aber auch die Blockade der zellulären Rezeptoren durch Lektin-ähnliche Liganden die Adhäsion von Mikroorganismen an Epithelien wirksam verhindern (Sharon und Lis 1993).

#### **4.4. Funktion und Bedeutung der Zuckerstrukturen in der Lektin histochemie**

Durch die Zuckerspezifität der Lektine eignen sich diese ganz besonders, um die genaue Kohlenhydratzusammensetzung der Zellmembran der Blutzellen zu untersuchen. Die Glykokonjugate der verschiedenen Blutkörperchen können mit Lektinen als Sonden genau lokalisiert werden. Ein Nachteil der lektin histochemischen Untersuchung der Blutzellen liegt darin, dass es nicht möglich ist, zu unterscheiden, ob es sich bei dem Bindungsrezeptor um ein Oligo- oder Polysaccharid bzw. ein Glykoprotein oder Glykolipid handelt (Rüdiger et al., 2000; Gabius et al., 1988).

---

## Kapitel III: Material und Methoden

### 1. Material

Zur ultrastrukturellen, lichtmikroskopischen, glykohistochemischen und immunhistochemischen Untersuchung wurden Blutaussstriche von insgesamt 23 gesunden Hunden verschiedener Altersklassen und Rassen verwendet. Diese wurden sowohl mit 4 lichtmikroskopischen Färbungen, 17 unterschiedlichen Lektinen als auch mit 3 Antikörpern angefärbt. Zusätzlich sind sie elektronenmikroskopisch untersucht worden.

#### 1.1. Überblick über die in der Arbeit verwendeten Hunde

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die verwendeten Tiere gegeben mit Angaben von Rasse, Alter und Geschlecht. Insgesamt wurden die Hunde in 3 Altersgruppen eingeteilt, Gruppe I (jüngere Hunde) < 5 Jahre, Gruppe II (mittelalte Hunde) 5-9 Jahre, Gruppe III (ältere Hunde)  $\geq 10$  Jahre. Von dem Blut der Hunde, welches für die glykohistochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen verwendet wurde, wurde im Synlab Labor Augsburg zusätzlich noch ein kleines Blutbild erstellt, deren Ergebnisse in Tabelle 3.1. dargestellt werden.

Tabelle 3.1. Übersicht über die in dieser Doktorarbeit verwendeten Junghunde

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter	EM	LM	GHC	IHC
	Gruppe I: < 5 Jahre						
1	Golden Retriever	wbl	3 Jahre	X	X	X	X
2	Beagle	wbl	2 Jahre		X	X	
3	DSH	ml	3 Jahre			X	
4	Husky	wbl	1,5 Jahre			X	
5	Appenzeller-Mix	wbl	2 Jahre			X	
6	Griffon-Mix	ml.k.	3 Jahre			X	
7	Schnauzer-Mix	wbl	2 Jahre				X

Tabelle 3.2. Übersicht über die in dieser Doktorarbeit verwendeten mittelalten Hunde

	Gruppe II: 5-9 Jahre			EM	LM	GHC	IHC
8	Chihuahau	ml.k.	5 Jahre	X	X	X	
9	Pinscher-Mix	ml.k.	5 Jahre	X	X	X	X
10	DSH-Mix	wbl.k.	8 Jahre			X	
11	DSH-Mix	wbl.k.	9 Jahre			X	
12	Border Collie Mix	wbl.k.	6 Jahre			X	
13	Foxhound-Mix	ml.k.	6 Jahre				X
14	Setter-Mix	ml.k.	8 Jahre				X
15	DSH	wbl	6 Jahre				X



Tabelle 3.3. Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten älteren Hunde

	Gruppe III: $\geq 10$ Jahre			EM	LM	GHC	IHC
16	Jack Russel Terrier	wbl.k.	10 Jahre		X	X	
17	BSH-Mix	ml	10 Jahre		X	X	
18	Papillon-Mix	wbl.k.	15 Jahre			X	
19	Jack Russel-Mix	ml	12 Jahre			X	
20	Briard	wbl.k.	14 Jahre	X	X	X	X
21	Yorkshire Terrier	wbl.k.	10 Jahre	X	X	X	X
22	Boxer-Mix	ml.k.	12 Jahre	X	X	X	X
23	DSH	ml.k.	11 Jahre	X	X	X	X

Von den einzelnen Blutproben wurden Blutausstriche auf Super Frost®-Objektträgern angefertigt und bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluss aufbewahrt.

## 1.2. Überblick über die in der Arbeit herangezogenen Lektine

Die glykohistochemischen Untersuchungen wurden mit folgenden FITC-markierten Lektinen durchgeführt:

Tabelle 3.4. Überblick über in dieser Arbeit verwendeten FITC-markierten Lektine

	<b>Lektin</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Zuckerspezifität</b>
1	Wheat germ Agglutinin	Weizenkeim ( <i>Triticum vulgare</i> )	WGA	N-Acetyl-Glukosamin, Chitin
2	Wheat germ Agglutinin, succinyliert	Weizenkeim ( <i>Triticum vulgare</i> )	WGAs	N-Acetyl-Glukosamin, Chitin
3	Soybean Agglutinin	Sojabohne ( <i>Glycine max</i> )	SBA	N-Acetyl-galaktosamin
4	Dolichos biflorus-Agglutinin	Afrikan. Pferdebohne ( <i>Dolichos biflorus</i> )	DBA	N-Acetyl-galaktosamin
5	Saphora japonica-Agglutinin	Sojabohne ( <i>Chin. Schnurbaum</i> )	SJA	N-Acetyl-galaktosamin
6	Peanut-Agglutinin	Erdnuss ( <i>Arachis hypogea</i> )	PNA	Galaktose
7	Griffonia simplicifolia-Agglutinin I	Afrik. Schwarzbohne ( <i>Griffonia simplicifolia</i> )	GSL-I	Galaktose
8	Ricinus communis-Agglutinin	Kastorbohne ( <i>Ricinus communis</i> )	RCA	Galaktose
9	Ulex europaeus-Agglutinin I	Stechginster ( <i>Ulex europaeus</i> )	UEA-I	$\alpha$ -L-Fukose
10	Concanavalin Agglutinin	Schwertbohne ( <i>Convalaria ensiformis</i> )	Con A	Glukose, Mannose
11	Lens culinaris-Agglutinin	Linse ( <i>Lens culinaris</i> )	LCA	Glukose, Mannose
12	Pisum sativum-Agglutinin	Erbse ( <i>Pisum sativum</i> )	PSA	Glukose, Mannose
13	Phaseolus vulgaris-Erythroagglutinin	Gartenbohne ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	PHA-E	Komplexe Kohlenhydratstrukturen
14	Phaseolus vulgaris-Leukoagglutinin	Gartenbohne ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	PHA-L	Komplexe Kohlenhydratstrukturen

Außerdem wurden noch folgende biotinylierte Lektine bei den glykohochemischen Untersuchungen verwendet:

Tabelle 3.5. Überblick über in dieser Arbeit verwendeten biotinylierten Lektine

	Lektin	Herkunft	Abk.	Zuckerspezifität
1	Makacia amurensis Agglutinin	Asiatisches Gelbholz ( <i>Makacia amurensis</i> )	MAL-I	N-Acetylneuraminsäure
2	Sambucus nigra Agglutinin	Schwarzer Holunder ( <i>Sambucus nigra</i> )	SNA	N-Acetylneuraminsäure
3	Viscum album Agglutinin	Mistel ( <i>Viscum album</i> )	VAA	Galaktose

---

### 1.3. Überblick über die in der Arbeit verwendeten Antikörper

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

Tabelle 3.6. Überblick über die in dieser Arbeit herangezogenen Antikörper

Zielzelle	Antikörper	Konz.	Tierart	Sekundärantikörper	Konz.
CD4-Lymphozyten	CD4 (Serotec)	1:100	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC vom Kaninchen (DAKO)	1:20
CD8-Lymphozyten	CD8 (Serotec)	1:200	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC vom Kaninchen (DAKO)	1:20
B-Lymphozyten	CADO34A (VMRD)	1:68	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC vom Kaninchen (DAKO)	1:20

---

## **2. Methoden**

### **2.1. Probenentnahme**

Allen Hunden wurde venöses Blut aus der Vena cephalica entnommen. Anschließend sind Ausstriche auf entfetteten und unbeschichteten Objektträgern (SuperFrost) der Firma Menzel-Gläser aus Braunschweig angefertigt worden. Die Ausstriche sind bei Zimmertemperatur Luft-getrocknet und wurden unter Lichtausschluss aufbewahrt.

### **2.2. Fixierung für die lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen**

Sowohl für die lichtmikroskopischen, als auch für die glykohistochemischen Färbungen wurden die Luft-getrockneten Blutausstriche jeweils 10 Minuten in Methanol fixiert.

### **2.3. Fixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Das Blut von 7 Hunden wurde für die Elektronenmikroskopie verwendet. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 700×g zentrifugiert. Der entstandene Plasmaüberstand ist vorsichtig vom Leukozytensaum abpipetiert worden. Anschließend wurde zur Fixierung das gleiche Volumen frischer Karnovsky-Gebrauchlösung (Karnovsky, 1975) auf den Leukozytensaum pipetiert. Daraufhin inkubierten die Proben mit der Karnovsky-Lösung für 1h bei 4°C im Kühlschrank. Dadurch verfestigten sich der Leukozytensaum und die angrenzende Erythrozytenschicht. Das noch anhaftende flüssige Blut ist in 0,1M Cacodylat-Puffer (pH 7,2) abgespült worden. Die nun feste Zellprobe wurde nochmals mit der Karnovsky-Gebrauchlösung behandelt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Pellet in 1mm<sup>3</sup> Stücke geschnitten und in 0,1M Cacodylat-Puffer (pH 7,2) drei Mal gewaschen. Die Proben sind dann mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumferrozyanid eingebettet worden.

---

## **2.4. Lichtmikroskopische Färbungen**

Je 10 Blutausstriche wurden mit 4 verschiedenen lichtmikroskopischen Färbungen angefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Wie oben beschrieben, wurden die Blutausstriche mit Methanol fixiert. Anschließend wurden sie mit verschiedenen Übersichtsfärbungen behandelt und mit einem Tropfen Eukitt (Riedel de Haen AG, Seelze) eingedeckelt. Es sind folgende Färbungen durchgeführt worden: Giemsa, May-Grünwald, Pappenheim und Diff-Quick. Alle Färbungen wurden dem Protokoll nach Romeis (1989) entsprechend ausgeführt.

### Giemsa-Färbung

Die Luft-getrockneten und mit Methanol fixierten Ausstriche wurden 45 Minuten lang mit der verdünnten Giemsa-Gebrauchslösung inkubiert. Die Färbelösung enthält Eosin, Methylenblau, Methylenazur und Methylviolett, welche in Methanol und Glycerin gelöst sind. Nach dem Abkippen der Lösung wurden die Ausstriche noch kurz in Aqua dest. gespült, wiederum Luft getrocknet und mit Eukitt® eingedeckelt. Die Verdünnung der Giemsa-Lösung: 0,3ml der Giemsa-Stammlösung in ein mit Aqua dest. gefülltes Becherglas tropfen und dabei das Glas schwenken.

### May-Grünwald-Färbung

Die Luft-getrockneten Ausstriche wurden für 3-5 Minuten mit der unverdünnten Färbelösung bedeckt. Die Färbelösung wird aus Eosin und Methylenblau hergestellt, welche in Methanol gelöst wird. Anschließend wird die aufgetropfte Lösung durch Hinzufügen der gleichen Menge Aqua dest. verdünnt und für weitere 5-10 Minuten inkubiert. Erst bei dieser verdünnten Lösung kommt es zur eigentlichen Anfärbung der Blutzellen. Das Präparat nimmt einen rötlichen Farbton an. Nach der Inkubationszeit ist das Präparat wiederum mit Aqua dest. abgespült, Luft getrocknet und mit Eukitt® eingedeckelt worden.

### Pappenheim-Färbung

Die panoptische Färbung nach Pappenheim stellt eine Kombination aus der Giemsa- und May-Grünwald-Färbung dar. Für die Pappenheim-Färbung sind die Luft getrockneten Blutausstriche erst 3 Minuten lang mit der May-Grünwaldlösung bedeckt worden. Daraufhin wurde die gleiche Menge Aqua dest. hinzugefügt, welches nach 1 Minute abgegossen wurde. Anschließend wurden die vorgefärbten Ausstriche mit verdünnter Giemsa-Lösung für 20

---

Minuten überschichtet. Nach Abkippen der Färbelösung sind sie nochmal mit Aqua dest. Abgespült worden und mit Eukitt® eingedeckelt.

#### Diff-Quick-Färbung

Diese Schnellfärbung gehört zu der Gruppe der Romanowski-Färbungen. Nach 10 minütiger Fixierung in Methanol wurden die Blutausstriche jeweils 5 Minuten in die Färbelösungen 1-3 getaucht. Nach Spülung mit Aqua dest. wurden sie mit Eukitt® eingedeckelt.

#### Auswertung:

Die Auswertung der lichtmikroskopisch gefärbten Blutausstriche erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Aristoplan) der Firma Leitz, Wetzlar. An dieses war eine Canon-Powershot A95-Digitalkamera gekoppelt.

### **2.5. Glykohistochemische Färbungen**

Die glykohistochemischen Untersuchungen wurden sowohl mit an den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelten, als auch mit biotinylierten Lektinen durchgeführt. Zum Nachweis der Glykokonjugate der kaninen Blutzellen wurde die direkte Methode verwendet. Lektine, die an spezifischen Zucker binden, waren direkt FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) gekoppelt. Die sialinsäurespezifischen Lektine (MAL-I, VAA, SNA) waren an Streptavidin-FITC konjugiert.

---

### 2.5.1. FITC markierte Lektine

Insgesamt wurden 14 FITC markierte Lektine bei den glykohistochemischen Untersuchungen verwendet, mit welchen je 19 Blutausrichtriche angefärbt worden sind, um die Bindungsfähigkeit des jeweiligen Lektins zu untersuchen. Zur Sichtbarmachung der Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop wurden die Blutausrichtriche zusätzlich mit DAPI-Antikörpern gegengefärbt. Die herangezogenen Lektine sind in Tabelle 3.1. zusammen mit ihrer Zuckerspezifität aufgeführt. Für die FITC markierten Lektine wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Fixieren der Blutausrichtriche in Methanol (10min)
2. Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4) 3x 5 Minuten
3. Bedecken der Blutausrichtriche mit FITC-gekoppeltem Lektin (10µg/ml PBS-Puffer) und anschließende 60 minütige Inkubation in feuchter Kammer mit Lichtausschluss bei Raumtemperatur
4. Spülen der Blutausrichtriche in PBS-Puffer (pH 7,4) 3x 5 Minuten
5. Bedecken der Ausstriche mit DAPI (Verdünnung 1:7500, DAPI-Stammlösung 1mg/ml) für 10 Minuten in feuchter Kammer unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur
6. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4) 2x 5 Minuten unter Lichtausschluss
7. Spülen der Ausstriche in Aqua dest unter Lichtausschluss, 2x 5 Minuten
8. Eindeckeln der fertigen Blutausrichtriche mit Gel-Mount, Fluo-Mount oder selbst hergestelltes PVA Mounting Medium, welchem als Ausbleichschutz DABCO zugesetzt worden ist.

Bis zur Auswertung wurden die Blutausrichtriche bei 7°C im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt.

#### Positivkontrolle:

Als Positivkontrolle wurden Präparate von Prostatakarzinomen verwendet, deren Lektinbindungseigenschaften bekannt waren.

---

#### Negativkontrolle:

Parallel zu jeder Färbung wurden Negativkontrollen durchgeführt, um mögliche Eigenfluoreszenzen der Blutzellen auszuschließen. Anstelle des jeweiligen Lektins wurde in diesem Fall die gleiche Menge an PBS-Puffer verwendet. Konnte keine positive Lektinbindung an die Blutzellen nachgewiesen werden, wurde das jeweilige Lektin zur Kontrolle zusätzlich mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (1,5 h, 2 h) und Temperaturen (2 h im Kühlschrank) angefärbt.

#### Kompetitive Hemmung:

Bei deutlich positiv reagierenden Lektinen wurde zur Überprüfung der Zuckerspezifität des jeweiligen Lektins die Hemmung mit dem jeweils entsprechenden Zucker durchgeführt, um einen Einfluß auf die Bindungsstärke zu testen. Dazu wurde das zu untersuchende Lektin mit einer 0,4 molaren Lösung des entsprechenden Hemmzuckers versehen und bei Raumtemperatur 60 Minuten lang inkubiert. Das Lektin-Protokoll wurde wie sonst auch durchgeführt, anstelle des reinen Lektins aber wurde die Lektin-Zucker-Mischung aufpipetiert. Das Lektin-Hemmstoff-Gemisch wurde auf je zwei Ausstriche aufgetragen, zusätzlich wurde als Positivkontrolle ein Blutaussstrich mit reinem Lektin versehen.



Tabelle 3.7. Hemmzucker

Lektin	Zuckerspezifität	Hemmzucker	Konzentration	Inkubationszeit
WGA	N-Acetylglukosamin	Chitin-Hydrolysat (Vector, Burlingame, USA)	1:4	30 Minuten
WGAs	N-Acetylglukosamin	Chitin-Hydrolysat (Vector, Burlingame, USA)	1:4	30 Minuten
SBA	N-Acetylgalaktosamin	N-Acetyl-D-Galaktosamin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	172,4mg/ml	1 Stunde
Con A	Glukose, Mannose	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8mg/ml	1 Stunde
RCA	$\beta$ -D-Galaktose	Methyl- $\alpha$ -Galactopyranosid	84,8mg/ml	1 Stunde
LCA	Glukose, Mannose	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8mg/ml	1 Stunde
PSA	Glukose, Mannose	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8mg/ml	1 Stunde
PHA-E	Komplexe Kohlenhydratstrukturen	Essigsäure (Roth, Karlsruhe)	24 $\mu$ l/ml	1 Stunde
PHA-L	Komplexe Kohlenhydratstrukturen	Essigsäure (Roth, Karlsruhe)	24 $\mu$ l/ml	1 Stunde
GSL-I	Galaktose	Methyl- $\alpha$ -D-Galactopyranoside (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	84,8mg/ml	1 Stunde
RCA	Galaktose	Methyl- $\alpha$ -D-Galactopyranoside (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	84,8mg/ml	1 Stunde

### Überprüfung der Spezifität für Neuraminsäure

Für die Lektine UEA, RCA und WGA wurde zusätzlich ihre Neuraminsäurespezifität überprüft. Durch Vorbehandlung des Blutaussstriches mit dem Enzym Neuraminidase sollte herausgefunden werden, ob diese Lektine nun besser binden oder negative Lektine in der Lage sind, dadurch mit bestimmten Zellstrukturen der Blutzellen eine Bindung einzugehen. Pro Lektin wurden 4 Blutausstriche verwendet, wobei 1 Blutausstrich als Positivkontrolle verwendet wurde. Durch das Enzym Neuraminidase wird von verschiedenen Glykoproteinen die Sialinsäure abgespalten. Sialinsäure wird häufig als Oberbegriff für N- und O-Derivate der Neuraminsäure oder auch als Synonym für die N-Acetylneuraminsäure (NANA) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Neuraminidase stammt von *Vibrio cholerae* (Firma Sigma-Aldrich). Sie 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 die Temperatur von 37°C benötigt. Zum Herstellen der Gebrauchslösung wurde eine Einheit der Neuraminidase mit 3,6ml Acetat-Puffer (pH 5,0) verdünnt. Zur Herstellung des Acetat-Puffers (Walpole) wurde eine 0,1molare Natriumacetat-Lösung mit einer 0,1molaren Essigsäure-Lösung im Verhältnis 141:59 vermischt (Romeis, 1989).

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol (10min)
2. Waschen in Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) 3x 5 Minuten
3. Bedecken der Blutausstriche mit 200 $\mu$ l verdünnter Neuraminidase, Inkubation über Nacht in feuchter Kammer
4. Spülen in PBS-Puffer (pH 7,4) 3x 5 Minuten
5. Bedecken der Ausstriche mit 200 $\mu$ l Lektin (10 $\mu$ g/ml), Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss in feuchter Kammer
6. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4) 3x 5 Minuten
7. Bedecken mit DAPI (Verdünnung 1:7500), Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss
8. Spülen mit PBS-Puffer (pH 7,4) 2x 5 Minuten unter Lichtausschluss
9. Waschen in Aqua dest. 2x 5 Minuten unter Lichtausschluss
10. Eindeckeln

### **2.5.2. Biotinylierte Lektine**

Die sialinsäurespezifischen Lektine wurden mittels der Streptavidin-Biotin-Methode nachgewiesen, welches einer Variante der Avidin-Biotin-Methode entspricht. Das Protein Streptavidin stammt von *Streptomyces avidinii* und zeichnet sich durch seine hohe Bindungsaffinität zu dem Vitamin Biotin aus. Das an Biotin gekoppelte Lektin bindet bei dieser Methode an seine spezifischen Kohlenhydratstrukturen. Das ebenfalls an Biotin gebundene FITC bildet mit dem Streptavidin einen Komplex. Dieser Streptavidin-FITC-Komplex bindet mit hoher Affinität an das biotinylierte Lektin, durch die FITC-Markierung wird die Bindungsstelle des Lektins sichtbar. In Tabelle 3.5. sind die wichtigsten

---

Eigenschaften dieser Lektine aufgeführt. Insgesamt wurden je 10 Blutausstriche pro Lektin herangezogen.

Für die biotinylierten Lektine wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol (10min)
2. Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4) 3x 5 Minuten
3. zur Reduzierung der Hintergrundfärbung Probe trocknen und mit Dako Protein Block Serum Free bedecken, Inkubation für 10 Minuten in feuchter Kammer
4. Objektträger trocknen und mit 300µl biotinylierten Lektin (5µg/ml MAL-I, 5µg/ml SNA, 1µg/ml VAA) bedecken, 60 minütige Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur
5. Spülen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4) 3x 5 Minuten
6. Objektträger trocknen und mit 300µl aufgetauten Streptavidin/FITC (Verdünnung 1:500) bedecken, Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Lichtausschluss
7. Waschen der Blutausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4) 3x 5 Minuten
8. Bedecken der Ausstriche mit DAPI (Verdünnung 1:7500) für 10 Minuten in feuchter Kammer unter Lichtausschluss
9. Spülen mit PBS-Puffer, 2x 5 Minuten
10. Waschen der Blutausstriche mit Aqua dest. 2x 5 Minuten
11. Eindeckeln der fertigen Ausstriche in Eukitt®

Um das positive Ergebnis noch zu verstärken, wurden anschließend pro Lektin noch zwei weitere Blutausstriche mit höherer Konzentration gefärbt. Diese betrug bei MAL-1 und SNA 10µg/ml und für VAA 2µg/ml.

#### Auswertung:

Die Auswertung der glykohistochemisch gefärbten Blutausstriche erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20) der Firma Leitz, Wetzlar. Die für die Photoaufnahmen verwendete Kamera war die Progress®CFcool.

---

## **2.6. Immunzytochemische Färbungen**

Für die Immunzytochemie wurden insgesamt 10 Blutausstriche verschiedener Hunde untersucht. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3.6. näher beschrieben.

Die immunzytochemischen Untersuchungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Ausstriche in Methanol fixieren (10 Minuten)
2. 3x in PBS-Puffer (pH 7,4) je 5 Minuten waschen
3. Ausstriche mit Dako Protein Block Serum-Free bedecken, Inkubation 10 Minuten bei Raumtemperatur, danach abgießen
4. 200µl Primärantikörper in Dako Antibody Diluent auftragen und über Nacht in feuchter Kammer im Kühlschrank bei 4°C inkubieren
5. 3x in PBS-Puffer (pH 7,4) je 5 Minuten spülen
6. 200µl Sekundärantikörper (Anti Maus IgG FITC vom Kaninchen) auf die Blutausstriche auftragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
7. 3x in PBS-Puffer (pH 7,4) je 5 Minuten spülen
8. zur Kernfärbung Dapi (Verdünnung 1:7500) auftragen und 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubieren
9. 3x in PBS-Puffer (pH7,4) je 5 Minuten waschen
10. kurz mit Leitungswasser abspülen
11. Eindeckeln

### Auswertung:

Die Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Blutausstriche erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20) der Firma Leitz, Wetzlar. Für die Photoaufnahmen wurde eine Progress®CF cool Kamera verwendet.

## **2.7. Aufarbeitung der Blutproben für die Elektronenmikroskopie**

Nach der Fixierung der Blutproben und Anfertigung der 1mm<sup>3</sup> Blöcke folgte Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90%, je 30 Minuten, abs. Ethanol 3 mal 30 Minuten) und die schrittweise Einbettung in Epon (2 mal 15 Minuten Propylenoxid, 1 Stunde Propylenoxid-Epon-Gemisch 2:1, über Nacht Propylenoxid-Epon-Gemisch 1:1, am

---

nächsten Tag 1 Stunde reines Epon) eingebettet. Es folgte die Polymerisierung in Gelatinekapseln (Plannet, Wetzlar) bei 60° über 24 Stunden. Anschließend wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) 1µm dicke Semidünnschnitte zur Übersicht angefertigt und mit Rizardson gefärbt. Es folgte eine lichtmikroskopische Beurteilung. Daraufhin wurden Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt, die auf Kupfergrids aufgezogen und mit gesättigtem Uranylacetat und mit Bleizitratlösung (Reynolds, 1963) nachkontrastiert wurden.

Auswertung:

Die Auswertung und photographische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Proben erfolgte an dem Transmissionselektronenmikroskop EM Zeiss902 (Zeiss, Oberkochen).

## Kapitel IV: Ergebnisse

Tabelle 4.1. Blutbilder der untersuchten Hunde

	Leuko G/l	Ery T/l	Hb g/l	HTK l/l	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	Tz G/l
<b>Jüngere Hunde</b>								
Hund 1	9,1	7,59	180	0,59	77,6	23,7	30,6	190
Hund 2	11,5	6,35	144	0,45	71,0	22,7	31,9	200
Hund 4	6,6	6,15	138	0,40	72,0	21,0	30,1	195
Hund 5	6,7	6,62	167	0,54	77,2	25,2	30,7	167
Hund 7	15,2	6,37	150	0,45	70,0	23,5	33,6	174
<b>Mittelalte Hunde</b>								
Hund 10	7,5	6,84	158	0,49	71,5	23,1	32,3	291
Hund 11	7,3	6,64	149	0,47	71,2	22,4	31,5	181
Hund 12	8,2	8,22	191	0,57	69,0	23,2	33,7	195
Hund 13	10,3	8,25	199	0,52	62,9	24,1	38,1	182
Hund 14	11,1	7,16	167	0,50	70,3	23,3	33,2	264
Hund 15	7,1	6,56	164	0,49	73,9	25,0	33,8	157
<b>Ältere Hunde</b>								
Hund 17	5,8	6,20	144	0,49	78,2	23,2	29,7	256
Hund 18	9,1	8,17	189	0,58	71,2	23,1	32,5	376
Hund 19	13,6	6,92	162	0,56	80,1	23,4	29,2	147
Hund 20	8,7	8,87	201	0,60	67,8	22,7	33,4	239
Hund 21	12,0	6,65	141	0,45	67,5	21,2	31,4	254
Hund 22	6,8	6,21	140	0,43	69,1	22,5	32,6	155

---

## 1. Lichtmikroskopische Untersuchungen an den Blutzellen des Hundes

Es wurden je 10 Blutausstrichen von Hunden verschiedenen Alters, Rasse und Geschlecht mit 4 verschiedenen lichtmikroskopischen Färbungen untersucht. Je nach Färbung unterscheiden sich die verschiedenen Zellen in ihrer farblichen Variation.

### 1.1. Erythrozyten

In allen Blutausstrichen sind runde, annähernd gleich große rote Blutzellen in einer blassrosa Färbung zu finden. Ihr mittlerer Durchmesser beträgt ca. 7µm. Ihre bikonkave Form erklärt sich durch den fehlenden Zellkern, was sich durch eine zentrale Aufhellung zeigt, wodurch die Erythrozyten sehr formflexibel sind und auch kleinste Gefäße problemlos passieren können. Die roten Blutkörperchen sind von einer glatten Zellmembran umgeben, welche einen homogenen Zellinhalt umgibt. Zum Teil findet man auch die typische Geldrollenbildung der roten Blutzellen. Abhängig von der jeweiligen Färbung variiert die Farbe der Erythrozyten.

Tabelle 4.2. Lichtmikroskopische Färbungen Erythrozyten

Struktur	Giensa	May-Grünwald	Pappenheim	Diff-Quick
Zytoplasma	blasses Rot	hellrot	rot	violett

### 1.2. Granulozyten

In den lichtmikroskopischen Färbungen wurden alle Granulozytenarten gefunden (Segmentkernige, Stabkernige, Eosinophile und Basophile). Vor allem die neutrophilen Granulozyten waren in jedem Präparat in großer Anzahl vorhanden.

#### 1.2.1. Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten verfügen morphologisch ebenfalls über eine runde Zellform. Sie unterscheiden sich hinsichtlich des Kerns in segmentkernige Granulozyten (2-4 Kernsegmente) und stabkernige Granulozyten ("hufeisenförmiger Kern"). Sie haben einen Durchmesser von 9-13µm. Der Kern hat eine dunkelviolette Farbe, Kernsegmente segmentkerniger Granulozyten können über fadenförmige Chromatinbrücken miteinander verbunden sein. Durchscheinende neutrophile Granula füllen das gesamte Zytoplasma aus. Außer den segmentkernigen und stabkernigen Granulozyten wurde auch ein jugendlicher Neutrophiler, ein sogenannter Metamyelozyt, gefunden, welcher einen

---

charakteristischen bohnenförmigen Kern aufweist. In dieser Zelle stellt sich das Chromatin gröber dar als bei den adulten Formen. Bei Metamyelozyten ist das Zytoplasma deutlich dunkler gefärbt - es ist von bläulicher Farbe und enthält ebenfalls neutrophile Granula.



Tabelle 4.3. Lichtmikroskopische Färbungen Neutrophile Granulozyten

Struktur	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	Diff-Quick
Zellkern	Rosa	Blau	Rotviolett	dunkelblau
Zytoplasma	Weiß bis hellblau	rötlich	rötlich	hellblau
Granula	weiß	rötlich	rötlich	hellblau

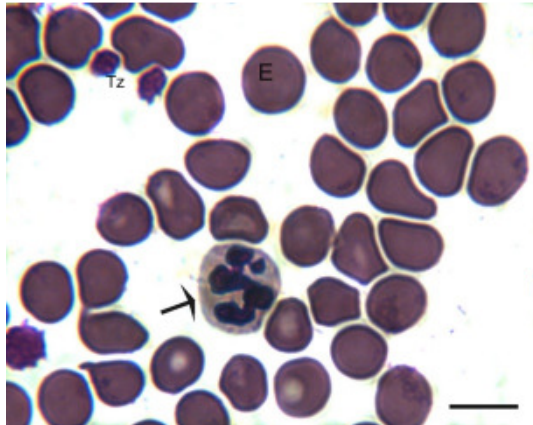


Abbildung 4.1: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung (Hund, wbl. 5 Jahre); die verschiedenen Kernsegmente des neutrophilen Granulozyten (Pfeil) sind über dünne Chromatinbrücken verbunden

E = Erythrozyt  
Tz = Thrombozyt  
SB = 10µm

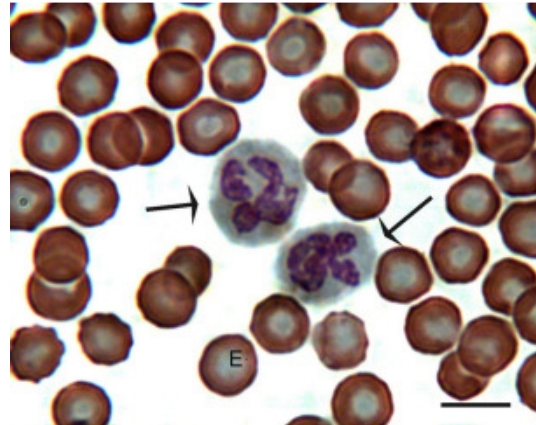


Abbildung 4.2: zwei segmentkernigen Granulozyten, Giemsa-Färbung (Hund,wbl. 10 Jahre); beide Zellkerne der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (Pfeile) weisen die typische Segmentierung des Kerns auf

E = Erythrozyt  
Tz = Thrombozyt  
SB = 10µm

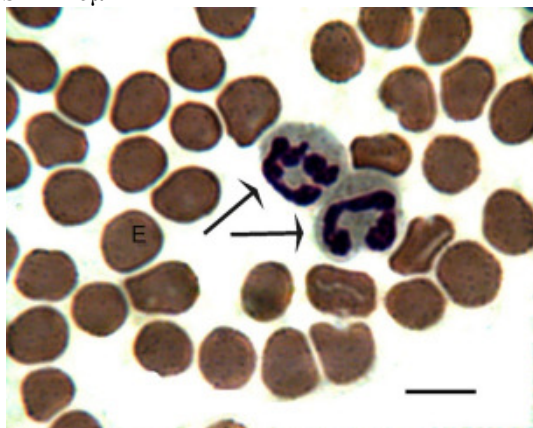


Abbildung 4.3: Segmentkerniger und stabkerniger neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung (Hund, ml. 10Jahre); über dem stabkernigen Granulozyten liegt ein segmentkernigen neutrophilen Granulozyten

E = Erythrozyt  
SB = 10µm

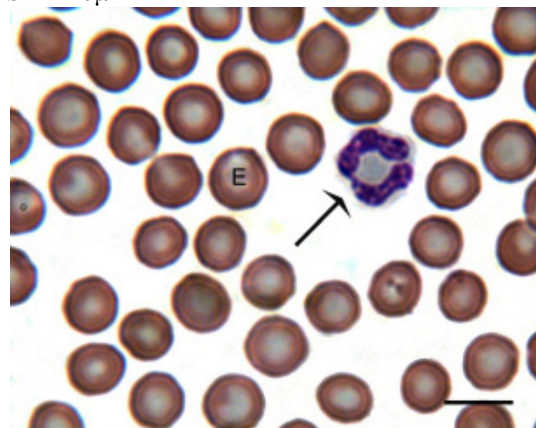


Abbildung 4.4: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung (Hund, ml. 10Jahre); der hufeisenförmige Zellkern des stabkernigen neutrophilen Granulozyten weist schon leichte Anzeichen einer Segmentierung auf

E = Erythrozyt  
SB = 10µm

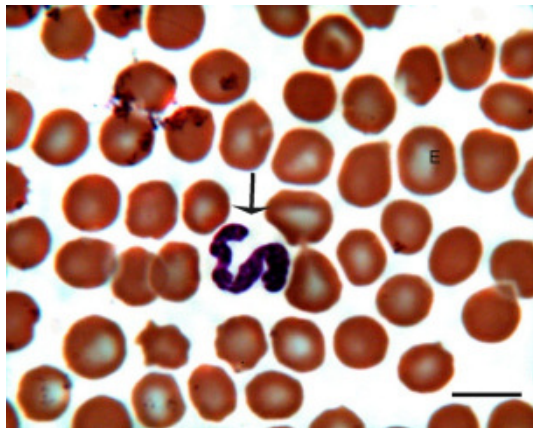


Abbildung 4.5: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung (Hund, ml. 5Jahre)  
Neutrophiler Granulozyt (Pfeil) mit charakteristisch segmentiertem Zellkern  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

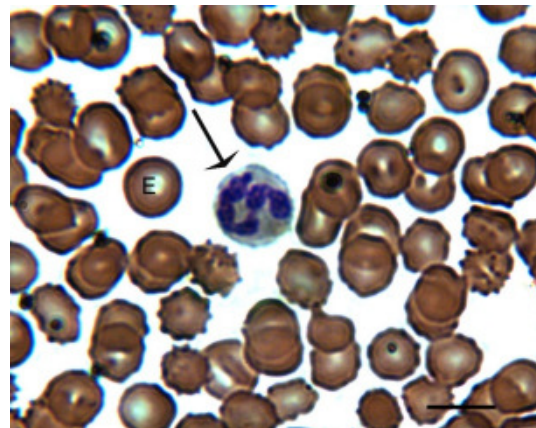


Abbildung 4.6: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung (Hund, wbl. 3Jahre);  
das Zytoplasma des segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (Pfeil) zeigt eine schwach azidophile Färbung  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

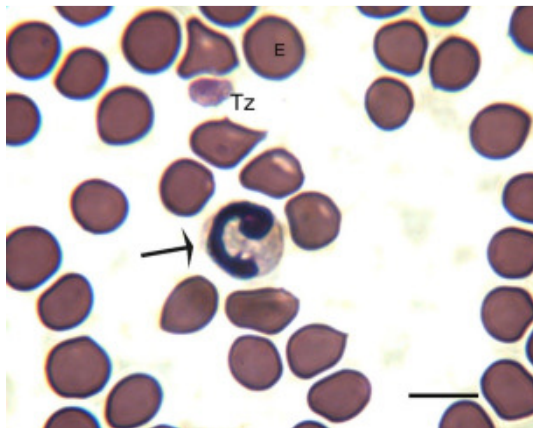


Abbildung 4.7: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung (Hund, wbl. 3Jahre);  
der Zellkern des stabkernigen neutrophilen Granulozyten (Pfeil) hat eine typische hufeisenförmige Form  
E = Erythrozyt  
Tz = Thrombozyt  
SB = 10µm

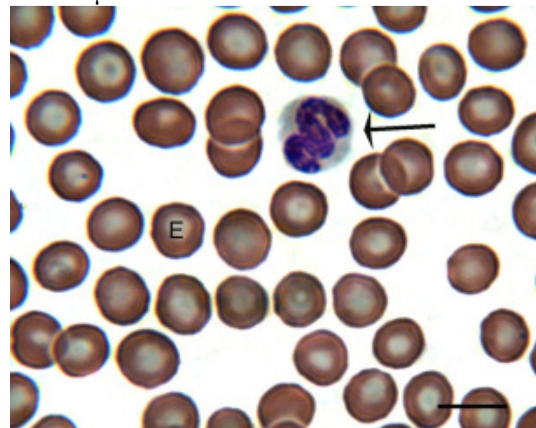


Abbildung 4.8: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung (Hund, ml.10Jahre);  
im Zytoplasma des segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (Pfeil) sind keine Granula zu sehen  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

### 1.2.2. Eosinophile Granulozyten

Meist etwas größer als die neutrophilen Granulozyten stellen sich auch die eosinophilen Granulozyten als runde Zellen dar. Der Kern von eosinophilen Granulozyten ist weniger stark segmentiert als bei den segmentkernigen Granulozyten. Im Zytoplasma finden sich zahlreiche typisch rötlich gefärbte Granula, die zum Teil den Kern überdecken können. Im Gegensatz zu Eosinophilen anderer Tierarten können die Granula kaniner Eosinophiler in Größe und Gestalt stark variieren.

Tabelle 4.4. Lichtmikroskopische Färbungen Eosinophile Granulozyten

Struktur	Giensa	May-Grünwald	Pappenheim	Diff-Quick
Zellkern	rotviolett	rosa	violett	dunkelblau
Zytoplasma	rötlich	hellblau	hellblau	bläulich
Granula	rot	Rot-orange	rot	rot

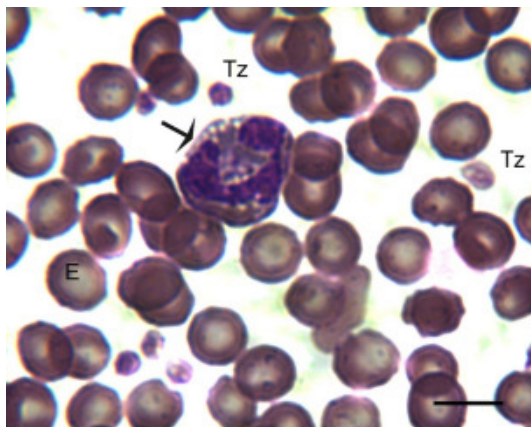


Abbildung 4.9: Eosinophiler Granulozyt Diff-Quick-Färbung (Hund, ml. 10Jahre); das Zytoplasma des Eosinophilen (Pfeil) ist von zahlreichen dunklen Granula ausgefüllt  
E = Erythrozyt  
Tz = Thrombozyt  
SB = 10µm

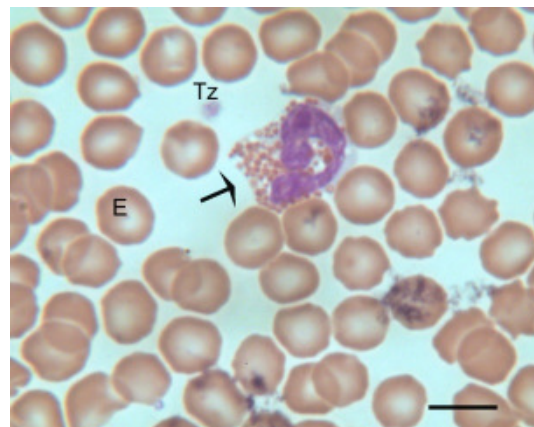


Abbildung 4.10: Eosinophiler Granulozyt Giemsa-Färbung (Hund, ml. 5Jahre); der segmentkernige Zellkern des Eosinophilen (Pfeil) wird zum Teil von den pinkfarbenen Granula überdeckt  
E = Erythrozyt  
Tz = Thrombozyt  
SB = 10µm

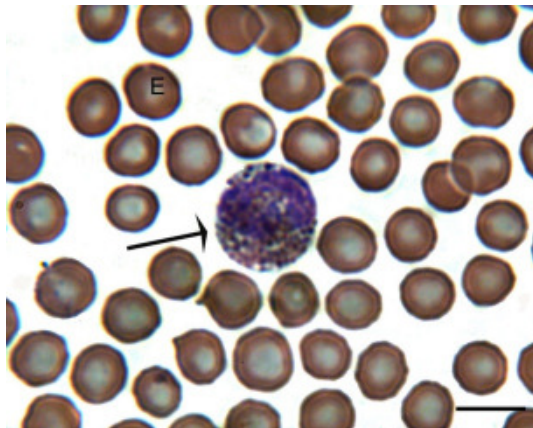


Abbildung 4.11: Eosinophiler Granulozyt  
Papanheim-Färbung (Hund wbl. 10 Jahre);  
auch hier ist das Zytoplasma des Eosinophilen (Pfeil)  
von mehreren Granula ausgefüllt  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

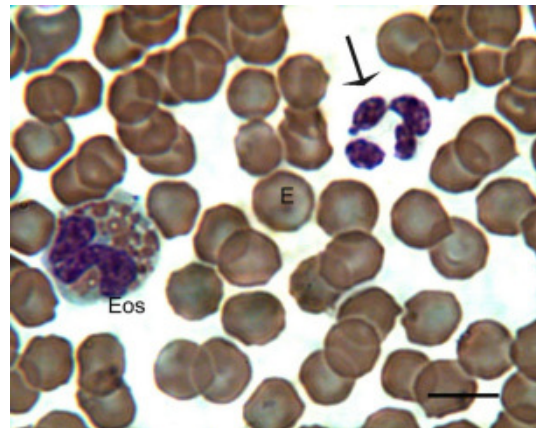


Abbildung 4.12: Eosinophiler Granulozyt  
Giemsa-Färbung (Hund, ml. 10 Jahre);  
neben dem eosinophilen Granulozyten (Eos) liegt ein  
segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Pfeil), dem die  
typischen Granula des Eosinophilen fehlen  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

### 1.2.3. Basophile Granulozyten

Lediglich in der Diff-Quick Färbung konnte ein basophiler Granulozyt gefunden werden. Der Kern stellt sich violett dar und ist hufeisenförmig. Das hellblaue Zytoplasma wird von dunkelblauen Granula ausgefüllt, welche zum Teil den Kern überlagern. Das Auftreten basophiler Granulozyten im Hundeblut ist extrem selten.

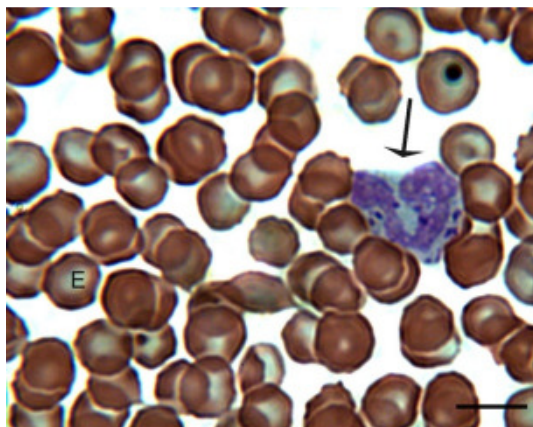


Abbildung 4.13: Basophiler Granulozyt,  
Diff-Quick-Färbung (Hund, ml. 10 Jahre);  
der basophile Granulozyt (Pfeil) weist wenige,  
dunkel lila gefärbte Granula auf, die den Zellkern  
zum Teil überlagern  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

---

### 1.3. Thrombozyten

Thrombozyten findet man in fast allen Ausstrichen. Sie erscheinen als kleine basophile Partikel, bläulich, granuär angefärbt, mit einem Durchmesser von 1-4µm. Häufig kommen sie zusammengelagert in kleinen Gruppen vor, können aber auch vereinzelt zwischen den anderen Blutzellen gefunden werden. Kanine Thrombozyten können rassespezifische Unterschiede aufweisen. Meistens stellen sie sich als spindelförmige Gebilde ohne Zellkern dar. Die Unterscheidung von durchsichtiger Randzone und dichter Zentralzone fällt in der lichtmikroskopischen Untersuchung schwer.

Tabelle 4.5. Lichtmikroskopische Färbungen Thrombozyten

Struktur	Giensa	May-Grünwald	Pappenheim	Diff-Quick
Zytoplasma	Helles lila	Blassblau	Dunkelblau	violett

### 1.4. Agranulozyten

Im Unterschied zu den Granulozyten weisen die Agranulozyten mit den Lymphozyten und Monozyten keine lichtmikroskopisch sichtbaren Granula im Zytoplasma auf.

#### 1.4.1. Lymphozyten

Lymphozyten werden in kleine, mittlere und große Lymphozyten unterteilt. Die Unterscheidung geschieht anhand des Zytoplasmasaums, der den großen, runden Zellkern umgibt. Zum Teil kann der Zellkern auf einer Seite eine Einbuchtung aufweisen, meist stellt er sich aber als runde Form dar, der die Zelle fast vollständig ausfüllt. Der Zellkern ist violett gefärbt und von einem mehr oder weniger breiten hellblauen Zytoplasmasaum umgeben.

Tabelle 4.6. Lichtmikroskopische Färbungen Lymphozyten

Stuktur	Giensa	May-Grünwald	Pappenheim	Diff-Quick
Zellkern	Rotviolett	Dunkellila	Blauviolett	violett
Zytoplasma	Blau	Blau	Dunkelblau	Helles lila

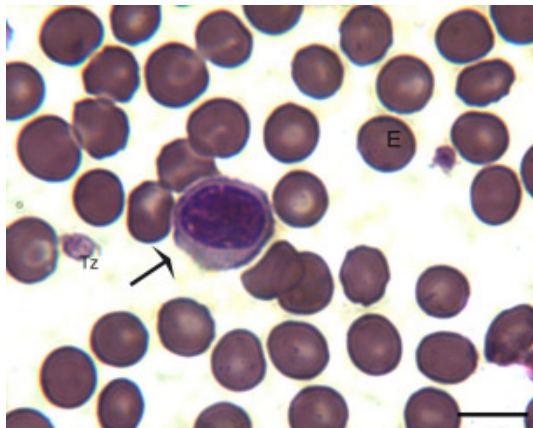


Abbildung 4.14: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung (Hund, ml. 10Jahre); der Zellkern des Lymphozyten (Pfeil) ist von einem moderaten Zytoplasmasaum umgeben. Neben den normal großen Erythrozyten (E) lassen sich auch Thrombozyten (Tz) finden  
SB = 10µm

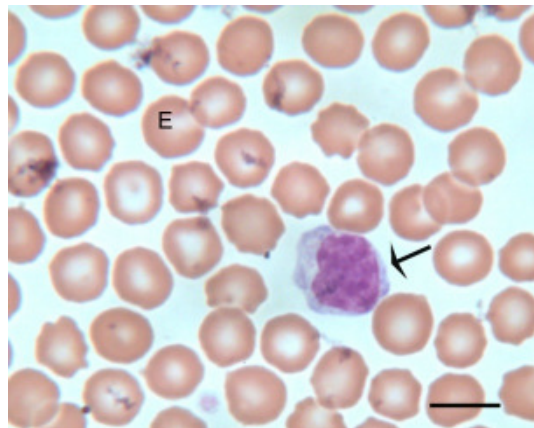


Abbildung 4.15: Lymphozyt, Giemsa-Färbung (Hund, ml. 5Jahre); Lymphozyt (Pfeil) mit moderatem Zytoplasmassaum. Die normal großen Erythrozyten (E) haben eine zentrale Aufhellung  
SB = 10µm

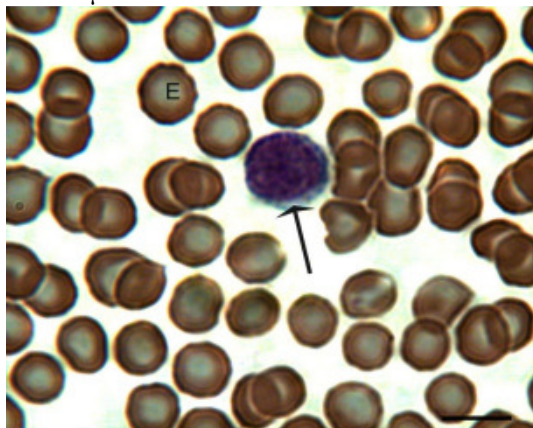


Abbildung 4.16: Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung (Hund, wbl. 10Jahre); ein schmaler Zytoplasmasaum umgibt den Zellkern des Lymphozyten (Pfeil)  
E = Erythrozyten  
SB = 10µm

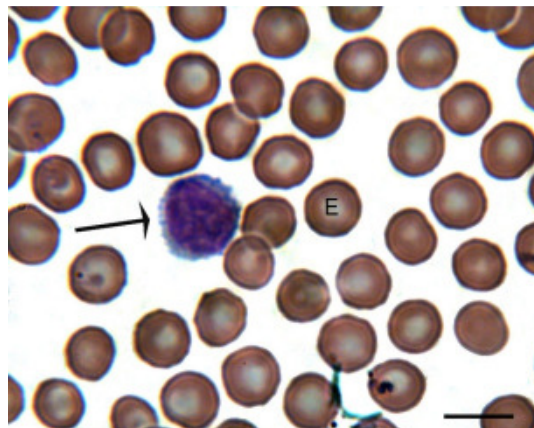


Abbildung 4.17: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung (Hund, ml. 10Jahre); der Lymphozyt (Pfeil) hat nur einen schmalen Zytoplasmrand  
SB = 10µm

### 1.4.2. Monozyten

Als größte Blutzellen stellen sich die Monozyten dar. Sie sind 14-20µm groß und besitzen einen vielgestaltigen Kern. Der meist nierenförmige Kern ist von basophilem Zytoplasma umgeben. Zum Teil findet man unterschiedlich große Vakuolen im Zytoplasma.

Tabelle 4.7. Lichtmikroskopische Färbungen Monozyten

Stuktur	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	Diff-Quick
Zellkern	violett	rotviolett	dunkelviolet	violett
Zytoplasma	blau	hellblau	dunkelblau	helllila

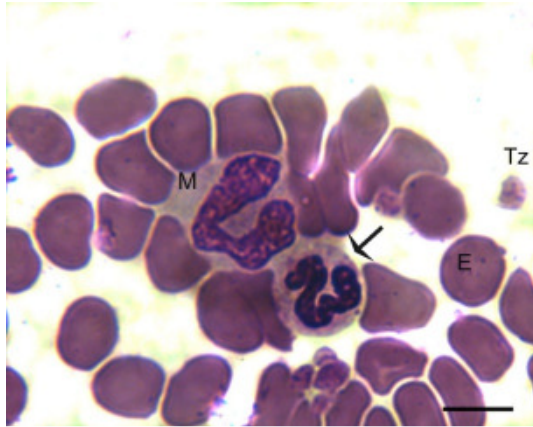


Abbildung 4.18: Monozyt und segmentkerniger neutrophiler Granulozyt  
Diff-Quick-Färbung (Hund, ml. 10Jahre)  
Neben dem segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (Pfeil) liegt ein deutlich größerer Monozyt (M) mit hufeisenförmigen Zellkern. In seinem Zytoplasma sind noch keine Vakuolen zu sehen  
E = Erythrozyt  
Tz = Thrombozyt  
SB = 10 µm

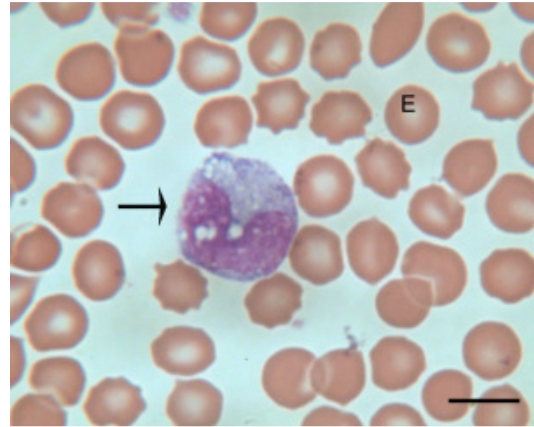


Abbildung 4.19: Monozyt  
Giemsa-Färbung (Hund, ml. 5Jahre)  
Das Zytoplasma des Monozyten (Pfeil) enthält mehrere typische Vakuolen  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

## 2. Glykohistochemische Untersuchungen an den Blutzellen des Hundes

Zum Nachweis spezifischer Zuckerreste auf den kaninen Blutzellen wurden 19 Blutausstriche mit FITC und 10 Blutausstriche von Hunden verschiedenen Alters, Rasse und Geschlecht mit Streptavidin-FITC markierten Lektinen inkubiert. Es wurde zwischen negativer Reaktion (-), schwach positiver Reaktion (+), deutlich positiver Reaktion (++) und stark positiver Reaktion (+++) unterschieden. Bei der Auswertung wurden alle Blutausstriche einzeln bewertet und im Anschluss daran ein Mittelwert der häufigsten Reaktion gebildet. Die Negativkontrollen, welche zu jeder Lektinfärbung parallel angefertigt wurden, zeigten in allen Proben keinerlei Fluoreszenz. Aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz waren die Erythrozyten auch bei negativen Reaktionen schwach sichtbar. Die zur Überprüfung der Zuckerspezifität eingesetzten Hemmzucker führten bei allen getesteten Lektinen zu einer deutlichen Abschwächung der Lektinreaktion mit den Blutzellen. Bei der Überprüfung der Neuraminsäurespezifität von

UEA, WGA und RCA konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Färbungsintensität zwischen mit Neuraminidase und ohne Neuraminidase behandelten Lektinen festgestellt werden.

## 2.1. Bindungsstellen für Convalaria ensiformis Agglutinin (Con A)

Die Membran der Erythrozyten reagierte deutlich positiv bei fast allen Tieren. Das Plasma der roten Blutkörperchen dagegen zeigte keine positive Reaktion. Thrombozyten wiesen ebenfalls bei keinem der Hunde eine positive Reaktion auf. Bei den Lymphozyten kam es zu unterschiedlichen Reaktionen bei den einzelnen Testhunden. 42% der getesteten Tiere zeigten eine schwach positive Reaktion an der Membran der Lymphozyten. Der Hauptanteil der Lymphozyten aber war negativ. Das Plasma der neutrophilen Granulozyten dagegen reagierte meist positiv (47%) und zeigte eine deutliche Fluoreszenz. Die Stärke der Reaktion wies keine Unterschiede hinsichtlich der Kernsegmentierung auf. Bei den Eosinophilen kam es zu einer schwach positiven Reaktion des Plasmas. Die Granula des Basophilen dagegen zeigte eine deutliche Fluoreszenz.

Tabelle 4.8. Auswertung Con A  
(- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv)

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	-	-	12 (63%)	7 (37%)	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>	19 (100%)	-	-	-	19 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	3 (16%)	2 (11%)	9 (47%)	5 (26%)	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					1 von 1
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	1(100%)	-	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					1 von 1
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	1 (100%)	-	



<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	10 (53%)	8 (42%)	1 (5%)	-	
Zytoplasma	-	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					

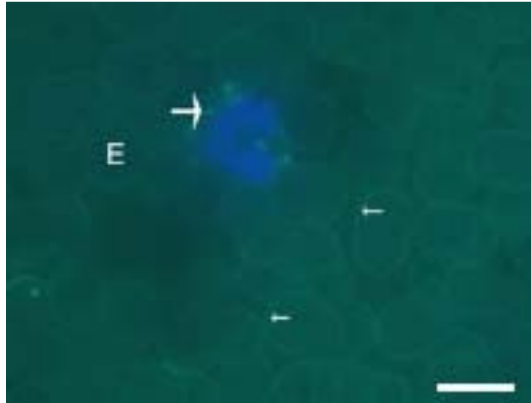


Abbildung: 4.20: Basophiler Granulozyt  
Con A-FITC (Hund, wbl. 6 Jahre)  
Die Zellmembran (kleine Pfeile) der Erythrozyten (E) weisen eine deutlich positive Reaktion auf. Auch die Granula des Basophilen (Pfeil) sind deutlich positiv.  
SB = 10µm

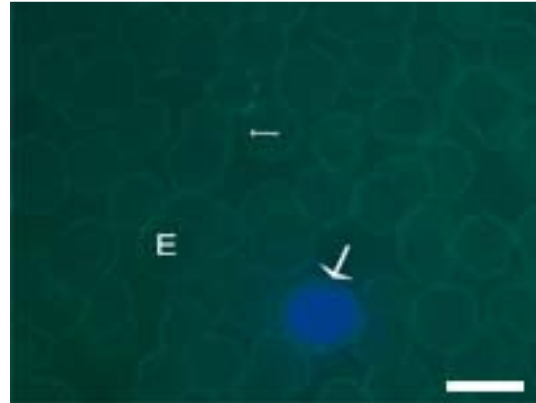


Abbildung 4.21: Lymphozyt  
Con A-FITC (Hund, wbl. 2 Jahre)  
Sowohl die Zellmembran des Lymphozyten (großer Pfeil), als auch die Membran (kleiner Pfeil) der Erythrozyten (E) zeigen eine deutliche Bindung mit Con A.  
SB = 10µm

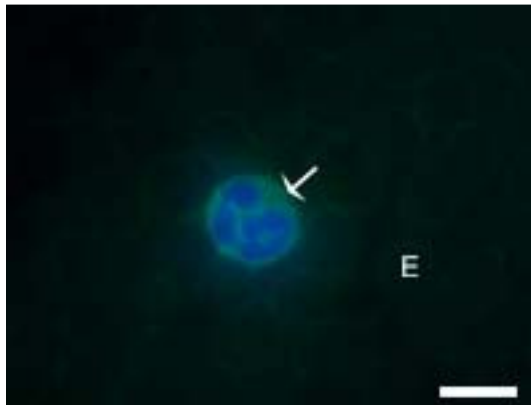


Abbildung 4.22: Neutrophiler Granulozyt  
Con A-FITC (Hund, wbl. 6 Jahre)  
Das Zytoplasma und die Zellmembran des Neutrophilen (Pfeil) sind deutlich positiv.  
E= Erythrozyten  
SB = 10µm

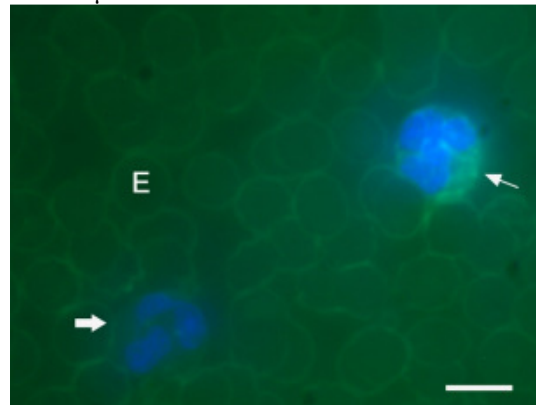


Abbildung 4.23: Lymphozyt, neutrophiler Granulozyt  
Con A-FITC (Hund, ml. 12 Jahre)  
Im Gegensatz zu der deutlich positiven Reaktion der Erythrozytenmembran und dem Zytoplasma des Neutrophilen (dünner Pfeil), weist der Lymphzyt (dicker Pfeil) keine positive Reaktion auf.  
E= Erythrozyt  
SB = 10µm

## 2.2. Bindungsstellen für Lens culinaris Agglutinin (LCA)

Die Membran der Erythrozyten reagierte zu 47% schwach positiv mit LCA. In vielen Fällen leuchtet die Zellmembran regelrecht und strahlte in die Umgebung. Bei den Thrombozyten unterschieden sich die Reaktionen voneinander, ein Teil zeigte keine Fluoreszenz, der andere Teil dagegen reagierte durchaus deutlich positiv (33%). Die Lymphozyten zeigten zum größten Teil keine Reaktion. Das Plasma der Neutrophilen ging eine deutlich positive LCA-Bindung ein. Es wurden auch Monozyten gefunden, die allerdings keine Bindungsstellen für LCA enthielten.

Tabelle 4.9. Auswertung LCA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	5 (26%)	9 (47%)	5 (26%)	-	
Zytoplasma	-	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					18 von 19
Membran	9 (50%)	3 (16%)	6 (33%)	-	
Zytoplasma	9 (50%)	3 (16%)	6 (33%)	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	1 (5%)	12 (63%)	6 (32%)	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					
Membran	16 (84%)	3 (16%)	-	-	19 von 19
Zytoplasma	16 (84%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					2 von 19
Membran	2 (100%)				
Zytoplasma	2 (100%)				

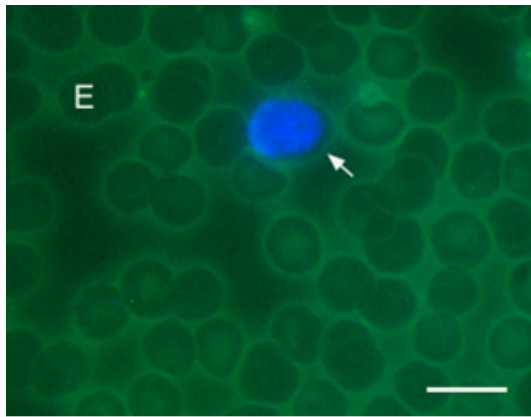


Abbildung 4.24: Lymphozyt  
LCA-FITC (Hund, wbl. 8Jahre)  
Die Zellmembran des Lymphozyten (Pfeil) und der Erythrozyten (E) zeigen eine positive Reaktion.  
SB = 10µm

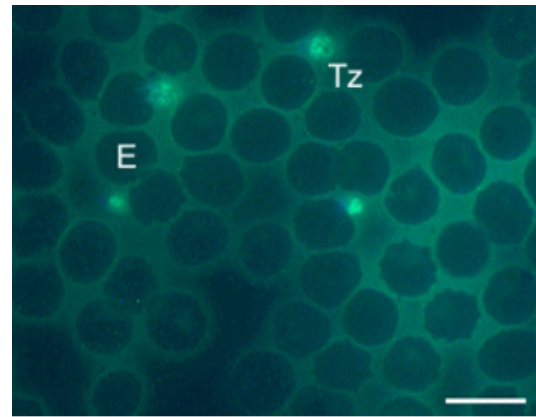


Abbildung 4.25: Thrombozyten  
LCA-FITC (Hund, wbl. 6Jahre)  
Die Zellmembran der Erythrozyten (E) ist deutlich positiv. Auch die Thrombozyten (Tz) weisen eine stark positive Bindung mit LCA auf.  
SB = 10µm

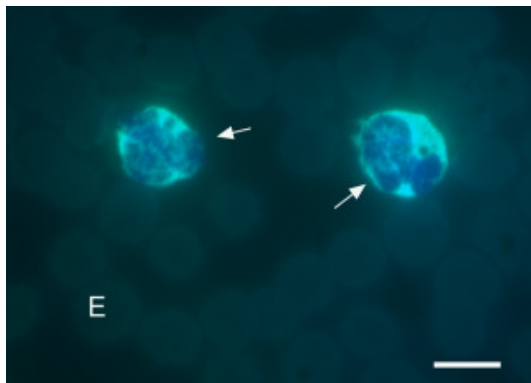


Abbildung 4.26: Neutrophile Granulozyten  
LCA-FITC (Hund, wbl. 3Jahre)  
Die Erythrozyten (E) sind negativ, Das Zytoplasma und die Zellmembran der Neutrophilen (Pfeil) reagiert deutlich positiv.  
SB = 10µm



Abbildung 4.27: Neutrophiler Granulozyt  
LCA-FITC (Hund, ml. 12 Jahre)  
Sowohl die Zellmembran der Erythrozyten (E), als auch die Membran und das Zytoplasma des Neutrophilen (Pfeil) sind deutlich positiv.  
SB = 10µm

### 2.3. Bindungsstellen für *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

Der Großteil der Erythrozytenmembran der untersuchten Hunde war schwach positiv. Die Thrombozyten zeigten meistens keine Reaktion mit PSA, wobei auch hier 26% doch noch eine deutlich Reaktion zeigten und sowohl die Zellmembran, als auch das Plasma fluoreszierten. Bei den Lymphozyten wurden bei 89% keine Bindungsstellen gefunden. Im Gegensatz zu diesen reagierten die Neutrophilen wieder deutlich positiv. Das Plasma der Neutrophilen zeigte zum überwiegenden Teil eine deutliche Fluoreszenz. Die gefundenen

Monozyten wiesen unterschiedliche Reaktionen auf. Größtenteils hatte sie keine positiven Bindungsstellen mit PSA, es konnte aber auch ein Monozyt mit deutlich positiver Reaktion der Zellmembran gefunden werden.

Tabelle 4.10. Auswertung PSA  
 (- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv)

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	5 (26%)	11 (58%)	3 (15%)	-	
Zytoplasma	-	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	12 (63%)	2 (11%)	5 (26%)	-	
Zytoplasma	12 (63%)	2 (11%)	5 (26%)	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	15 (79%)	4 (21%)	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	17 (89%)	2 (11%)	-	-	
Zytoplasma	-	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					3 von 19
Membran	2 (67%)	-	-	-	
Zytoplasma	2 (67%)	-	1 (33%)	-	

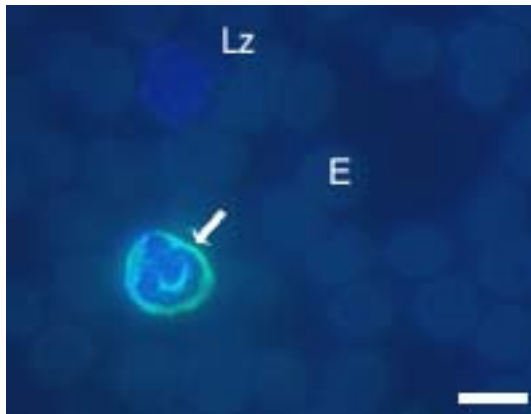


Abbildung 4.28: Lymphozyt, neutrophiler Granulozyt PSA-FITC (Hund, wbl. 14Jahre); die Zellmembran der Erythrozyten (E) und der Lymphozyt (Lz) sind negativ. Das Zytoplasma und die Membran des Neutrophilen ist deutlich positiv.  
SB = 10µm

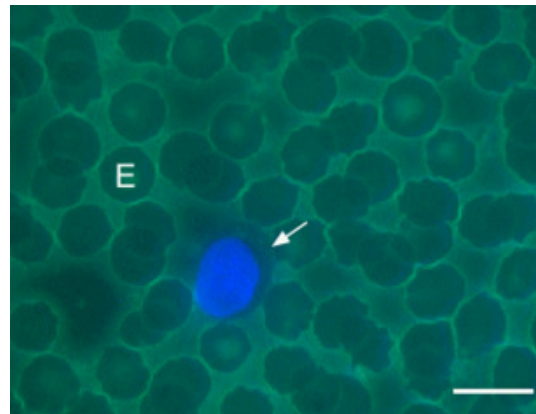


Abbildung 4.29: Lymphozyt, PSA-FITC (Hund, ml. 12Jahre); der Lymphozyt (Pfeil) zeigt keine Reaktion mit PSA. Die Zellmembran der Erythrozyten (E) ist deutlich positiv.  
SB = 10µm

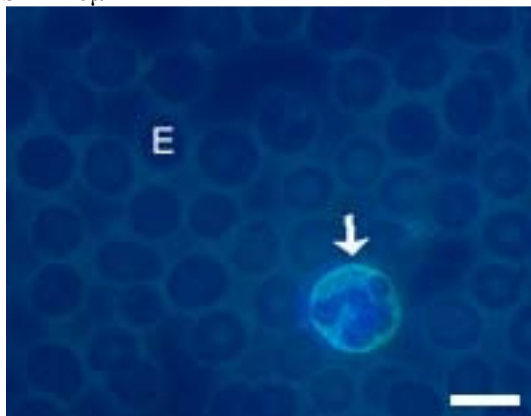


Abbildung 4.30: Neutrophiler Granulozyt PSA-FITC (Hund, ml. 12Jahre); sowohl das Zytoplasma (Pfeil), als auch die Membran des Neutrophilen sind deutlich positiv.  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

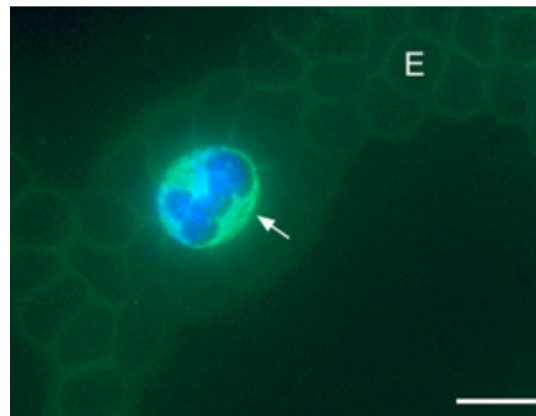


Abbildung 4.31: Neutrophiler Granulozyt PSA-FITC (Hund, wbl. 9Jahre); die Zellmembran der Erythrozyten (E) weist eine deutlich positive Bindung mit PSA auf. Auch der Neutrophile (Pfeil) reagiert deutlich.  
SB = 10µm

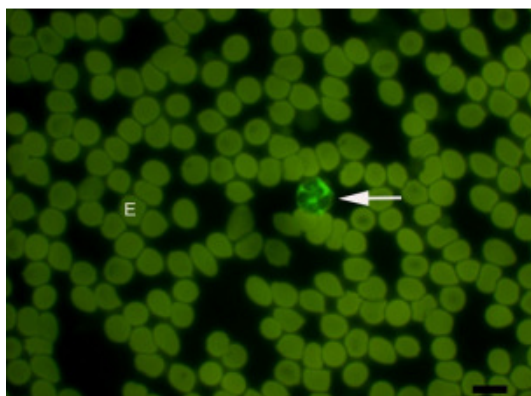


Abbildung 32: Neutrophiler Granulozyt FITC-PSA, Hund; das Zytoplasma des Neutrophilen (Pfeil) zeigt eine deutlich positive Reaktion. Die Erythrozyten (E) sind schwach positiv.  
SB = 10µm

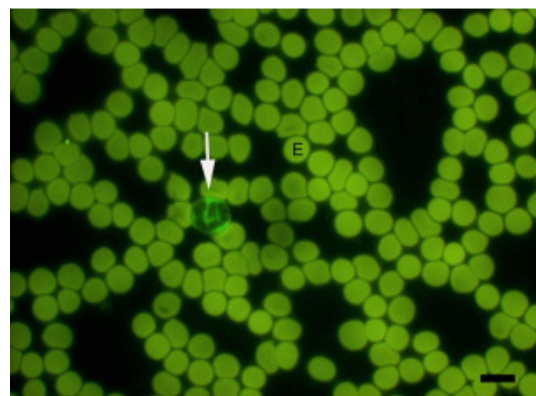


Abbildung 33: Neutrophiler Granulozyt FITC-PSA, Hund; eine deutlich positive Bindungsreaktion weist das Zytoplasma des Neutrophilen auf.  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

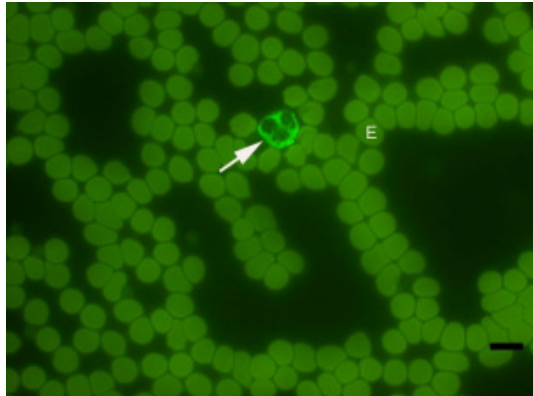


Abbildung 34: Neutrophiler Granulozyt, FITC-PSA, Hund; die Erythrozyten (E) weisen eine schwach positive Reaktion mit PSA auf. Der Neutrophile (Pfeil) zeigt dagegen eine deutlich positive Reaktion. SB = 10µm

#### 2.4. Bindungsstellen für *Ulex europaeus* Agglutinin (UEA)

Die Bindungsstellen für UEA sind im Hundeblood eher gering ausgeprägt, lediglich die Granula der Eosinophilen reagieren deutlich positiv. Alle anderen Blutzellen zeigen größtenteils keine positive Reaktion. Ein kleiner Teil der Erythrozyten und Neutrophilen weisen schwach positive Bindungsstellen auf. So reagieren 15% der roten Blutkörperchen mit ihrer Membran und ihrem Plasma, sowie 15% der neutrophilen Granulozyten positiv mit ihrem Plasma mit UEA.

Tabelle 4.11. Auswertung UEA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	16 (84%)	3 (15%)	-	-	
Zytoplasma	16 (84%)	3 (15%)	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	16 (84%)	-	-	-	
Zytoplasma	16 (84%)	3 (15%)	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					2 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	2 (11%)	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					1 von 19
Membran	1 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (100%)	-	-	-	



Abbildung 4.35: Lymphozyt, UEA-FITC (Hund, wbl. 2Jahre); weder der Lymphozyt (Pfeil) noch die Erythrozyten (E) zeigen eine positive Reaktion. SB = 10µm



Abbildung 4.36: Lymphozyt, UEA-FITC (Hund, wbl. 1,5 Jahre); die Erythrozyten (E) und der Lymphozyt (Pfeil) reagieren beide negativ mit UEA. SB = 10µm



Abbildung 4.37: Neutrophiler Granulozyt, UEA-FITC (Hund, wbl. 1,5Jahre); auch der Neutrophile (Pfeil) weist keine Bindungsstellen auf.  
E = Erythrozyt  
SB = 10 $\mu$ m

## 2.5. Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (WGA)

Die Membran der Erythrozyten stellt sich sehr unterschiedlich dar, einerseits zeigt sie eine deutlich Reaktion (21%), dann wiederum nur eine schwach positive (36%) bis gar keine (42%). Die Thrombozyten weisen häufig deutliche Bindungsstellen für WGA auf, ebenso fluoresziert der Großteil des neutrophilen Plasmas nach Bindung mit WGA. Die Lymphozyten dagegen sind nur zu einem geringen Anteil schwach positiv, nur 16% des Plasmas zeigen eine schwach positiv Reaktion. Die Granula des gefundenen basophilen Granulozyten und das Plasma des Monozyten dagegen reagieren deutlich positiv.



Tabelle 4.12. Auswertung WGA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	8 (42%)	6 (36%)	4 (21%)	-	
Zytoplasma	8 (42%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	-	4 (21%)	13 (68%)	2 (11%)	
Zytoplasma	-	4 (21%)	13 (68%)	2 (11%)	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	-	-	3 (16%)	16 (84%)	
Zytoplasma	-	-	3 (16%)	16 (84%)	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Basophile Granulozyten</b>					1 von 19
Membran			-		
Zytoplasma			1 (100%)		
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	13 (68%)	-	-	-	
Zytoplasma	13 (68%)	3 (16%)	3 (16%)	-	
<b>Monozyten</b>					1 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	1 (100%)	-	

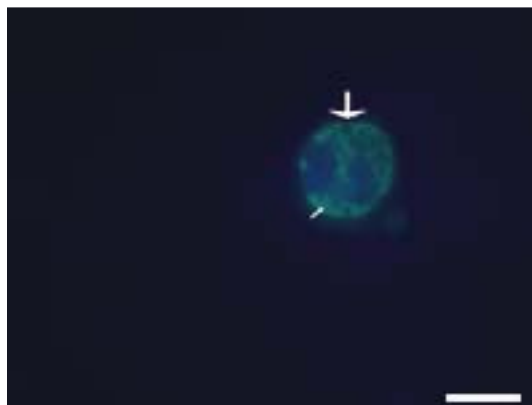


Abbildung 4.38: Basophiler Granulozyt, WGA-FITC (Hund, wbl. 10Jahre); das Zytoplasma des Basophilen ist deutlich positiv. Seine Granula (Pfeil) dagegen reagierten negativ mit WGA.  
SB = 10µm

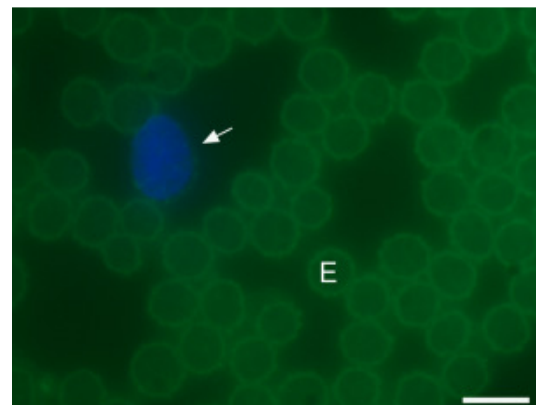


Abbildung 4.39: Lymphozyt, WGA-FITC (Hund, wbl. 1,5Jahre); die Zellmembran der Erythrozyten (E) zeigt deutlich positive Reaktionen. Der Lymphozyt (Pfeil) ist negativ.  
SB = 10µm

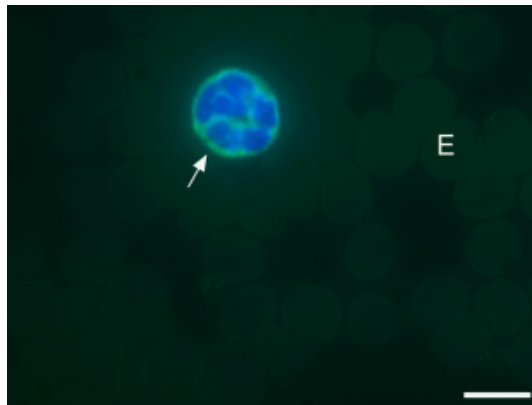


Abbildung 4.40: Neutrophiler Granulozyt, WGA-FITC (Hund, wbl. 9Jahre); das Zytoplasma und die Membran des Neutrophilen (Pfeil) weisen eine deutlich positive Reaktion auf. Die Erythrozyten (E) sind negativ.  
SB = 10 $\mu$ m



Abbildung 4.41: Lymphozyt, WGA-FITC (Hund, wbl. 14Jahre); das Zytoplasma der Erythrozyten (E) und der Lymphozyt (Pfeil) weisen eine negative Reaktion mit WGA auf.  
SB = 10 $\mu$ m

## 2.6. Bindungsstellen für succyliertes *Triticum vulgare* Agglutinin (WGAs)

Sowohl die roten Blutkörperchen, als auch die Thrombozyten sowie die Lymphozyten wiesen keine Bindungsstellen mit WGAs auf. Ein Großteil der Neutrophilen Granulozyten zeigte eine deutliche Reaktion, bei der das Plasma klar fluoreszierte. Das Plasma der gefundenen Monozyten reagierte schwach bis deutlich mit WGAs. Der einzelne Eosinophile wies nur eine schwache Reaktion bei seinen Granula auf. Die Monozyten zeigten überwiegende deutlich positive Reaktionen ihres Zytoplasmas mit WGAs.

Tabelle 4.13. Auswertung WGAs

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	2 (11%)	-	-	-	
Zytoplasma	2 (11%)	5 (25%)	10 (53%)	2 (11%)	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					1 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	1 (100%)	-	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					5 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	2 (40%)	3 (60%)	-	



Abbildung 4.42: Lymphozyt, WGAs-FITC (Hund, wbl. 10Jahre); der Lymphozyt (Pfeil) und die Erythrozyten (E) sind beide negativ.  
SB = 10µm

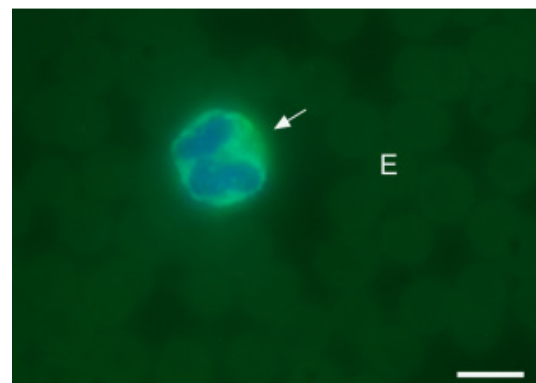


Abbildung 4.43: Monozyt, WGAs-FITC (Hund, wbl. 6Jahre); das Zytoplasma und die Zellmembran des Monozyten (Pfeil) reagieren deutlich positiv. Die Erythrozyten (E) sind negativ.  
SB = 10µm

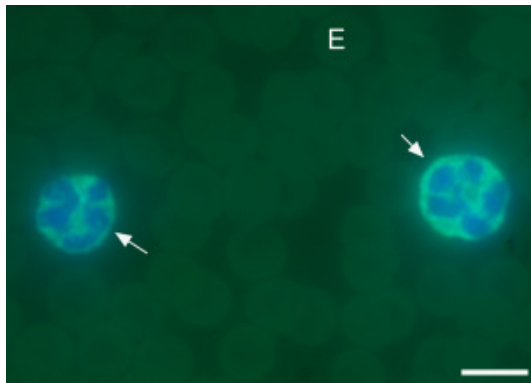


Abbildung 4.44: Neutrophile Granulozyten, WGAs-FITC (Hund, wbl. 10Jahre); die Zellmembran und das Zytoplasma der Neutrophilen (Pfeil) weisen eine deutlich positive Reaktion auf.  
E = Erythrozyt  
SB = 10 $\mu$ m

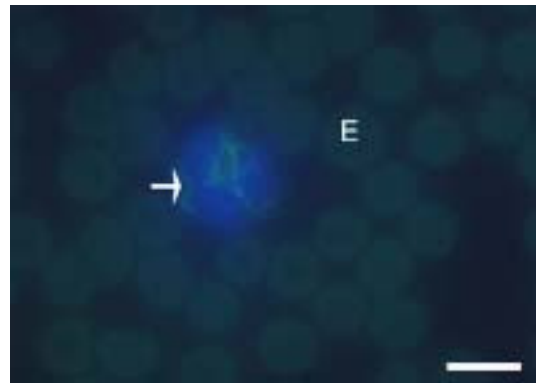


Abbildung 4.45: Neutrophiler Granulozyt WGAs-FITC (Hund, ml. 10Jahre); das Zytoplasma und die Zellmembran des Neutrophilen zeigen eine deutlich positive Reaktion. Die Erythrozyten (E) reagieren nicht mit WGAs.  
SB = 10 $\mu$ m

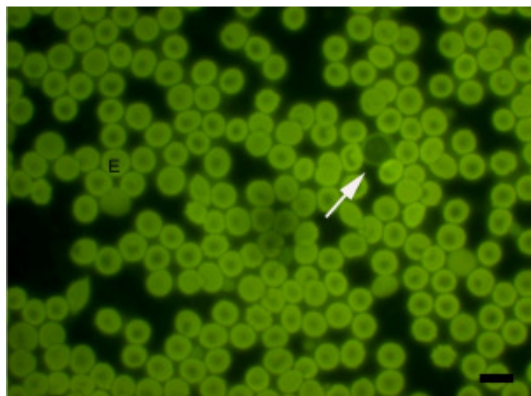


Abbildung 4.46: Lymphozyt, FITC-WGAs, Hund; der Lymphozyt (Pfeil) zeigt keine Bindungsstellen mit WGAs. Die Erythrozyten (E) sind ebenfalls negativ.  
SB = 10 $\mu$ m

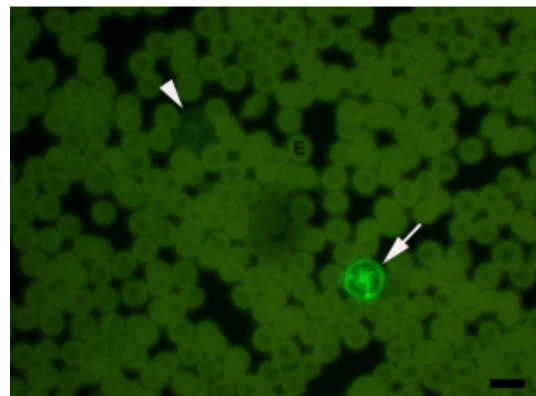


Abbildung 4.47: Neutrophiler Granulozyt, FITC-WGAs, Hund; das Zytoplasma des Neutrophilen (dünner Pfeil) weist eine deutlich positive Reaktion auf. Darüber liegt eine Neutrophiler (dicker Pfeil) ohne Bindungsstellen.  
E = Erythrozyt  
SB = 10 $\mu$ m

## 2.7. Bindungsstellen für Glycine max Agglutinin (SBA)

Auch für SBA zeigten die Erythrozyten und die Thrombozyten keine Reaktion. Bei den Lymphozyten reagierte das Plasma meistens negativ auf SBA, aber 16% wiesen doch eine schwache Reaktion auf. Die neutrophilen Granulozyten hatten bei 42% nachweisbare Bindungsstellen, der Großteil dieser Blutzellen aber war zu 58% negativ. Auch der untersuchte Eosinophile war nicht reaktiv mit SBA. Eine schwach positive Reaktion dagegen war bei den Monozyten zu beobachten.

Tabelle 4.14. Auswertung SBA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>	19 (100%)	-	-	-	19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma					
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	11 (58%)	-	-	-	
Zytoplasma	11 (58%)	3 (16%)	5(26%)	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					1 von 19
Membran	1 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (100%)	-	-	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	16 (84%)	-	-	-	
Zytoplasma	16 (84%)	3 (16%)	-	-	
<b>Monozyten</b>					1 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	1 (100%)	-	

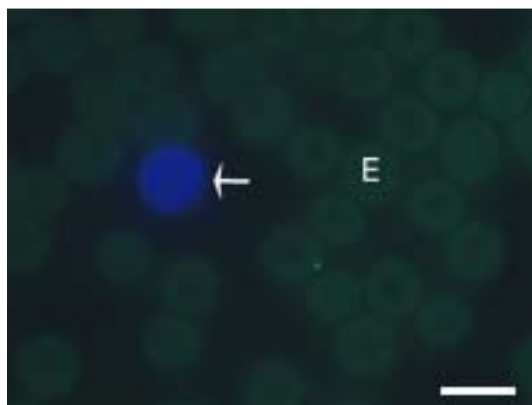


Abbildung 4.48: Lymphozyt, SBA-FITC (Hund, wbl. 1,5Jahre); weder die Erythrozyten (E) noch der Lymphozyt (Pfeil) reagieren positiv mit SBA. SB = 10µm



Abbildung 4.49: Lymphozyt, Neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC (Hund, ml. 10Jahre); im Gegensatz zu den Erythrozyten (E) und dem Lymphozyten (dicker Pfeil) weist der Neutrophile (dünner Pfeil) eine positive Reaktion auf. SB = 10µm



Abbildung 4.50: Neutrophiler Granulozyt  
SBA-FITC (Hund, ml. 10Jahre)  
Das Zytoplasma und die Zellmembran des  
Neutrophilen (Pfeil) reagieren deutlich positiv.  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

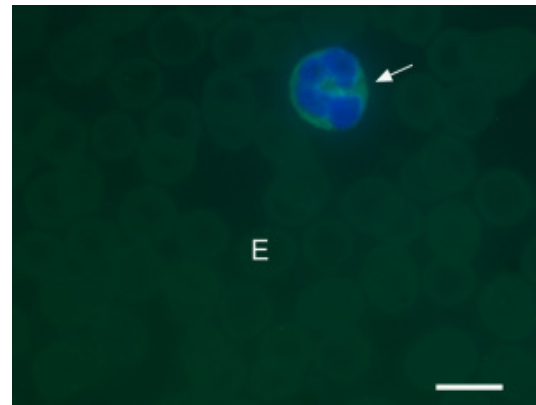


Abbildung 4.51: Neutrophiler Granulozyt  
SBA-FITC (Hund, ml. 10Jahre=  
Die Erythrozyten (E) sind negativ. Die Zellmembran  
und das Zytoplasma des Neutrophilen (Pfeil) weisen  
positive Bindungsreaktionen auf.  
SB = 10µm

## 2.8. Bindungsstellen für Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

Für DBA konnten weder bei den Erythrozyten, noch bei den Thrombozyten, sowie bei den neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten Bindungsstellen gefunden werden. Lediglich die Eosinophilen zeigten bei ihren Granula im Plasma eine schwach positive Reaktion, wobei auch negative Reaktionen auftraten.

Tabelle 4.15. Auswertung DBA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					2 von 19
Membran	1 (50%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (50%)	1 (50%)	-	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					

Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					1 von 19
Membran	1 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (100%)	-	-	-	



Abbildung 4.52: Neutrophiler Granulozyt, DBA-FITC (Hund, wbl. 2Jahre); weder der Neutrophile (Pfeil) noch die Erythrozyten (E) zeigen eine positive Reaktion.  
SB = 10 $\mu$ m



Abbildung 4.53: Lymphozyt, DBA-FITC (Hund, wbl. 3Jahre); sowol die Erythrozyten (E), als auch der Lymphozyt (Pfeil) sind negativ.  
SB = 10 $\mu$ m

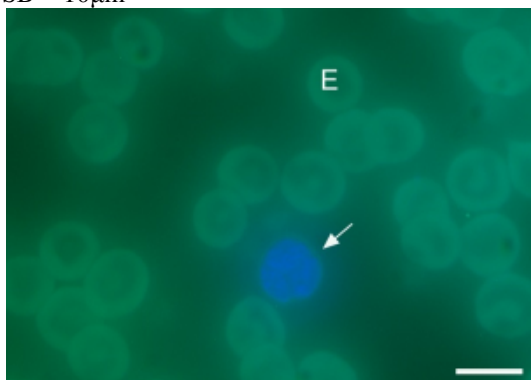


Abbildung 4.54: Lymphozyt, DBA-FITC (Hund, wbl. 14Jahre); der Lymphozyt (Pfeil) und die Erythrozyten (E) zeigen eine negative Reaktion.  
SB = 10 $\mu$ m



Abbildung 4.55: Monozyt, DBA-FITC (Hund, wbl. 1,5Jahre); der Monozyt (Pfeil) und die Erythrozyten (E) haben keine Bindungsstellen mit DBA.  
SB = 10 $\mu$ m

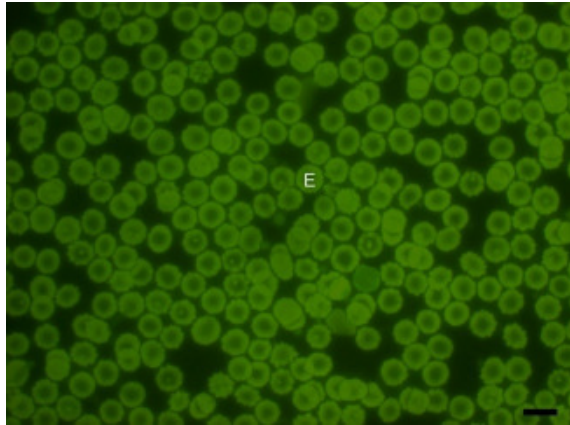


Abbildung 4.56: Erythrozyten, FITC-DBA, Hund; die Erythrozyten (E) weisen keine Reaktion mit DBA auf. SB = 10  $\mu$ m

## 2.9. Bindungsstellen für *Sophora japonica* Agglutinin (SJA)

Der Großteil der kaninen Blutzellen ist nicht reaktiv mit SJA. So weisen Thrombozyten, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten sowie Monozyten keine positiven Bindungsstellen auf. Lediglich die Erythrozyten und die Eosinophilen zeigen schwach positive Reaktionen, wobei dies bei den roten Blutkörperchen eher selten zutrifft (26%) und lediglich die Membran betrifft, wohingegen die Eosinophilen die Granula im Zytoplasma positive Bindungsstellen aufweisen.

Tabelle 4.16. Auswertung SJA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	14 (74%)	5 (26%)	-	-	
Zytoplasma	14 (74%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					2 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	2 (100%)	-	-	



<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					2 von 19
Membran	2 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	2 (100%)	-	-	-	

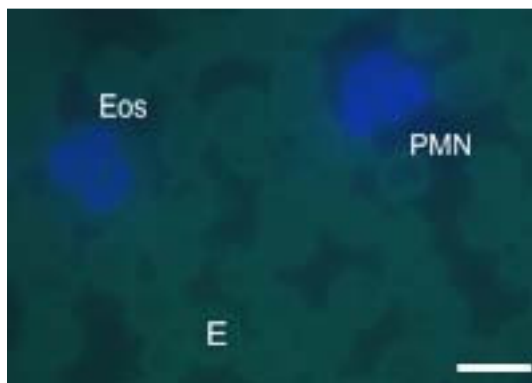


Abbildung 4.57: Eosinophiler und neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC (Hund, ml. 10Jahre); weder die Eosinophilen (Eos), noch die Neutrophilen (Pfeil) oder Erythrozyten (E) zeigen eine positive Reaktion. SB = 10µm



Abbildung 4.58: Eosinophiler Granulozyt, SJA-FITC (Hund, wbl. 1,5Jahre); die Granula des Eosinophilen (Pfeil) und die Zellmembran der Erythrozyten (E) weisen eine schwach positive Reaktion auf. SB = 10µm



Abbildung 4.59: Lymphozyt, SJA-FITC (Hund, wbl. 10 Jahre); die Erythrozyten (E) sind schwach positiv. Der Lymphozyt (Pfeil) dagegen hat keine Bindungsstellen. SB = 10µm



Abbildung 4.60: Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC (Hund, wbl. 14 Jahre); der Neutrophile (Pfeil) ist negativ, die Erythrozyten (E) zeigen eine schwach positive Reaktion. SB = 10µm

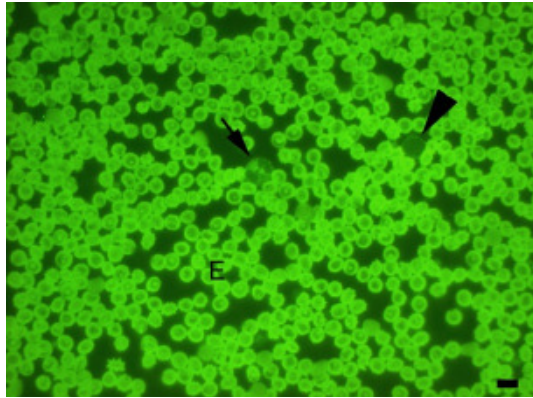


Abbildung 61: Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt, FITC-SJA, Hund; sowohl der Neutrophile (dünner Pfeil) als auch der Lymphozyt (dicker Pfeil) weisen keine Reaktion mit SJA auf. Die Erythrozyten (E) dagegen sind deutlich positiv.  
SB = 10  $\mu$ m

### 2.10. Bindungsstellen für Peanut Agglutinin (PNA)

Es zeigte sich bei allen kaninen Blutzellen keine positive Reaktion mit PNA.

Tabelle 4.17. Auswertung PNA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					1 von 19
Membran	1 (100%)				
Zytoplasma	1 (100%)				
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					

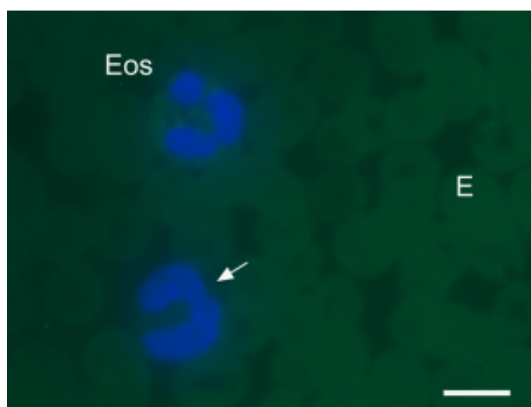


Abbildung 4.62: Neutrophiler und eosinophiler Granulozyt, PNA-FITC (Hund, ml. 3Jahre); sowohl der Eosinophile (Eos), als auch der Neutrophile (Pfeil) und die Erythrozyten (E) zeigen eine negative Reaktion.  
SB = 10µm

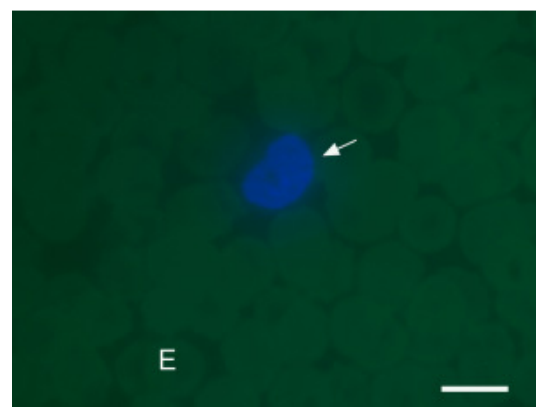


Abbildung 4.63: Lymphozyt, PNA-FITC (Hund, ml. 3Jahre); Erythrozyten (E) und Lymphozyt (Pfeil) sind negativ.  
SB = 10µm

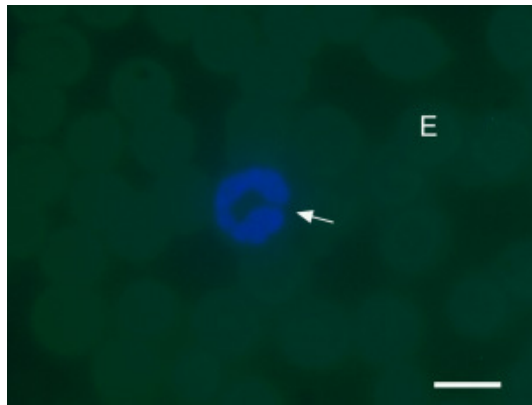


Abbildung 4.64: Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC (Hund, wbl. 14Jahre); der stabkernigen Neutrophile (Pfeil) weist keine Bindungsstellen auf.  
E = Erythrozyt  
SB = 10 $\mu$ m

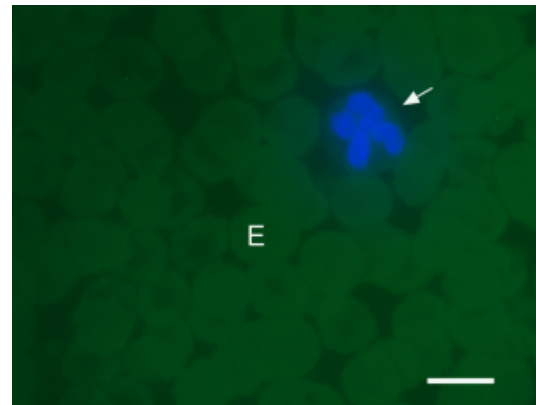


Abbildung 4.65: Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC (Hund, ml. 3Jahre); keine Bindungsstellen bei den Erythrozyten (E) und dem Neutrophilen (Pfeil).  
SB = 10 $\mu$ m

## 2.11. Bindungsstellen für *Griffonia simplicifolia* Agglutinin (GSL-I)

Die roten Blutkörperchen wiesen für GSL-I keine Bindungsstellen auf. Ebenso zeigten die Thrombozyten und Lymphozyten keine positive Reaktion. Bei den neutrophilen Granulozyten kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen. 63% wiesen deutlich positive Bindungsstellen im Plasma auf, bei 32% waren die Reaktionen im Plasma dagegen nur schwach positiv. Die Monozyten wiesen deutlich positiv Bindungsstellen im Plasma auf, auch die Eosinophilen zeigten bei ihren Granula eindeutig positive Reaktionen. Auch die basophilen Granulozyten konnten deutlich positive Bindungsstellen an ihren Granula aufweisen.

Tabelle 4.18. Auswertung GSL-I

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	2 (11%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (5%)	6 (32%)	12 (63%)	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					3 von 19
Membran	1 (33%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (33%)	2 (67%)	-	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					1 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	1 (100%)	-	
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					3 von 19
Membran	1 (33%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (33%)	-	2 (67%)	-	

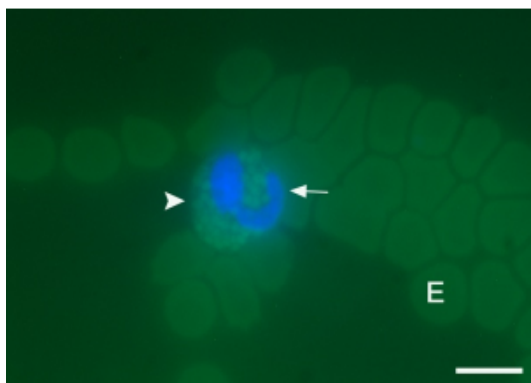


Abbildung 4.66: Eosinophiler Granulozyt, GSL-1-FITC (Hund, wbl. 6Jahre); neben den negativen Erythrozyten (E) zeigt der Eosinophile (dünner Pfeil) mit seinen Granula (dicker Pfeil) eine schwach positive Reaktion.  
SB = 10µm

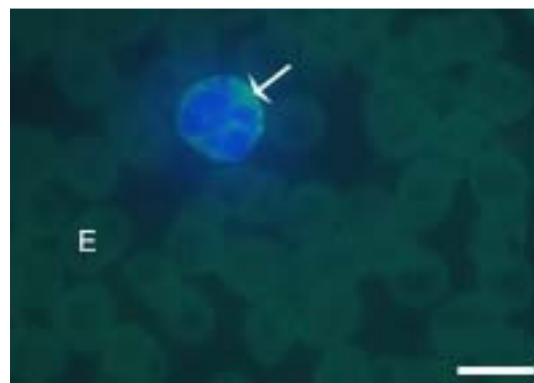


Abbildung 4.67: Neutrophiler Granulozyt, GSL-1-FITC (Hund, wbl. 14Jahre); sowohl der Neutrophile (Pfeil), als auch die Erythrozyten (E) sind negativ.  
SB = 10µm

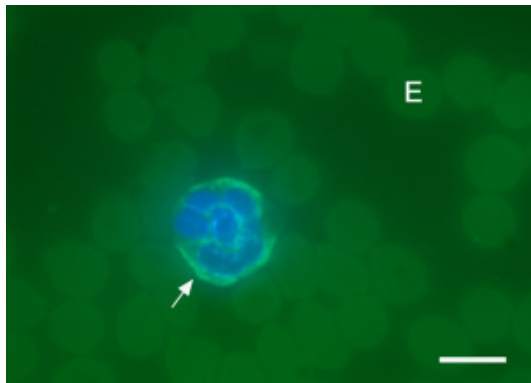


Abbildung 4.68: Neutrophiler Granulozyt, GSL-1-FITC (Hund, ml. 5Jahre); das Zytoplasma des Neutrophilen (Pfeil) ist deutlich positiv.  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

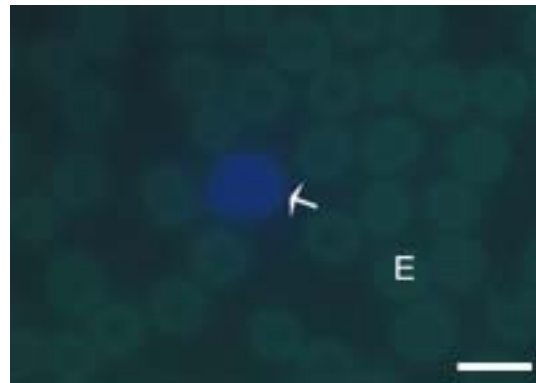


Abbildung 4.69: Lymphozyt, GSL-1-FITC (Hund, wbl. 2Jahre); die Erythrozyten (E) und der Lymphozyt (Pfeil) sind negativ.  
SB = 10µm

## 2.12. Bindungsstellen für *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

Die Erythrozyten weisen unterschiedliche Reaktionen mit RCA auf. Der Großteil der roten Blutkörperchen zeigt schwache bis deutlich positive Reaktionen auf. Es sind aber durchaus auch negative Erythrozyten zu finden. Thrombozyten und Monozyten dagegen sind immer negativ. Deutlich positive Bindungsstellen zeigen die neutrophilen Granulozyten in ihrem Plasma. Bei den Lymphozyten kommt es hauptsächlich zur negativen Reaktion mit RCA.

Tabelle 4.19. Auswertung RCA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					18 von 18
Membran	4 (22%)	6 (33%)	8 (44%)	-	
Zytoplasma	4 (22%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					18 von 18
Membran	18 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	18 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					18 von 18
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	2 (11%)	15 (83%)	1 (6%)	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					0 von 18
Membran					
Zytoplasma					
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 18
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					18 von 18
Membran	17 (94%)	1 (6%)	-	-	
Zytoplasma	17 (94%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					2 von 18
Membran	2 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	2 (100%)	-	-	-	

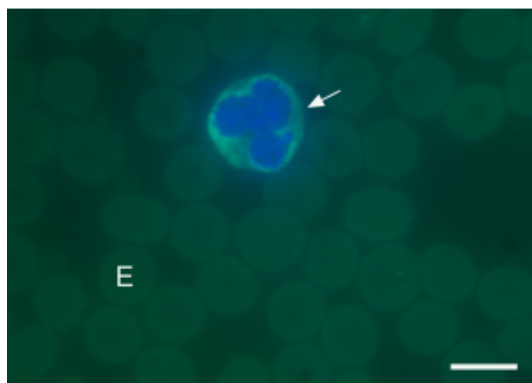


Abbildung 4.70: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC (Hund, wbl. 2Jahre); das Zytoplasma und die Zellmembran des Neutrophilen (Pfeil) weisen eine deutlich positive Reaktion auf. Die Erythrozyten (E) sind negativ.  
SB = 10µm

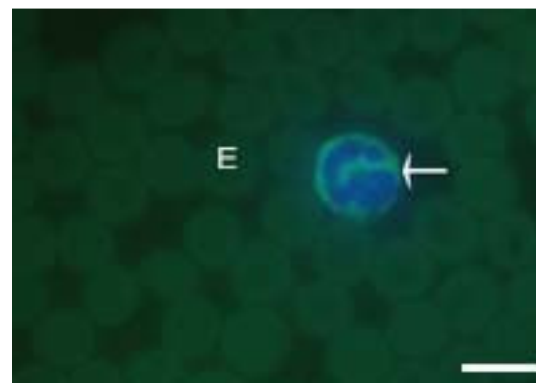


Abbildung 4.71: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC (Hund, wbl. 2Jahre); im Gegensatz zur deutlich positiven Reaktion des Neutrophilen (Pfeil) weisen die Erythrozyten (E) nur eine schwach positive Reaktion auf.  
SB = 10µm

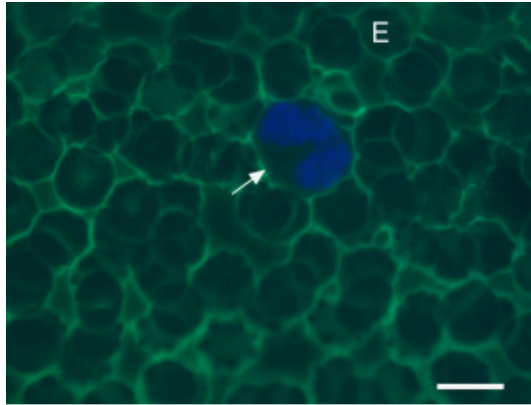


Abbildung 4.72: Monozyt, RCA-FITC (Hund, ml. 10Jahre); die Zellmembran der Erythrozyten (E) ist deutlich positiv. Der Monozyt (Pfeil) weist keine Bindungsstellen auf.  
SB = 10 $\mu$ m

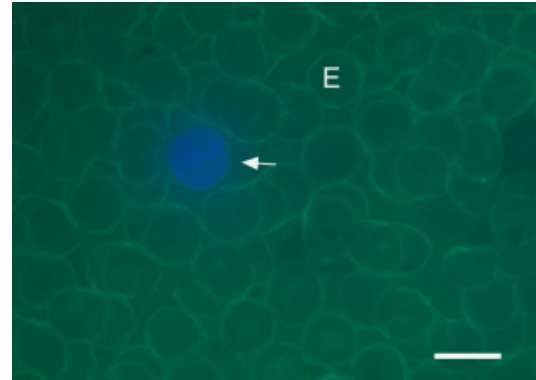


Abbildung 4.73: Lymphozyt, RCA-FITC (Hund, ml. 5Jahre); die Zellmembran der Erythrozyten (E) zeigt deutlich positive Bindungsreaktionen. Der Lymphozyt (Pfeil) reagiert mit seiner Zellmembran nur schwach positiv.  
SB = 10 $\mu$ m

### 2.13. Bindungsstellen für Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)

Bei der Inkubation der kaninen Blutzellen mit PHA-E waren der Großteil der Erythrozyten und Lymphozyten negativ. Nur ein geringer Prozentsatz dieser Blutzellen wies positive Reaktionen auf, so fluoreszierte bei 11% der roten Blutkörperchen und lediglich bei 5% der Lymphozyten die Membran. Die neutrophilen Granulozyten unterschieden sich in ihrer Reaktion. Sie wiesen deutlich bis stark positive Bindungsstellen an ihrer Membran und in ihrem Zytoplasma auf. Bei den Monozyten waren auch Abweichungen in ihrer Reaktion zu beobachten. Zum Teil waren sie negativ, andere wiesen wiederum deutlich positive Bindungsstellen im Plasma auf. Die Granula der Eosinophilen waren schwach positiv.



Tabelle 4.20. Auswertung PHA-E

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	17 (89%)	2 (11%)	-	-	
Zytoplasma	17 (89%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	-	-	14 (74%)	5 (26%)	
Zytoplasma	-	-	14 (74%)	5 (26%)	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					1 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	1 (100%)	-	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	18 (95%)	1 (5%)	-	-	
Zytoplasma	18 (95%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					3 von 19
Membran	1 (33%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (33%)	-	2 (67%)	-	

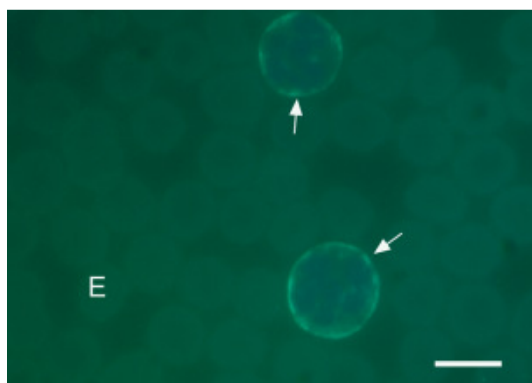


Abbildung 4.74: Lymphozyt, PHA-E-FITC (Hund, ml. 10Jahre); die Membran und der schmale Zytoplasmasaum der Lymphozyten (Pfeil) zeigt deutlich positive Bindungsreaktionen. Die Erythrozyten (E) sind negativ.  
SB = 10µm

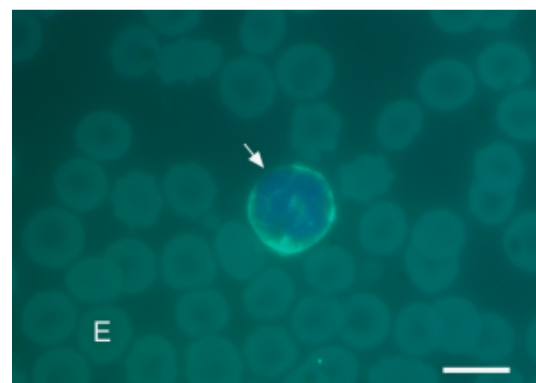


Abbildung 4.75: Neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC (Hund, ml. 12Jahre); neben den negativen Erythrozyten (E) findet sich ein positiver Neutrophiler (Pfeil).  
SB = 10µm

---

#### **2.14. Bindungsstellen für Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L)**

Die Erythrozyten zeigten zum Großteil keine Reaktion. Ein kleiner Teil aber wies schwach positive Bindungsstellen an ihrer Membran auf. Die Thrombozyten und Lymphozyten wiesen ebenfalls keine Reaktion mit PHA-L auf. Bei den Neutrophilen unterschieden sich die Bindungsstellen. Der Hauptanteil der neutrophilen Granulozyten hatte keine Reaktion. Der Rest fluoresziert schwach bis deutlich mit ihrem Plasma. Ebenfalls deutlich positive Bindungsstellen waren bei den Monozyten zu finden. Die Granula der eosinophilen Granulozyten dagegen reagierten nur schwach positiv.

Tabelle 4.21. Auswertung PHA-L

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					19 von 19
Membran	15 (79%)	4 (21%)	-	-	
Zytoplasma	15 (79%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					19 von 19
Membran	10 (53%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (53%)	6 (31%)	3 (16%)	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					1 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	1 (100%)	-	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 19
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					19 von 19
Membran	19 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	19 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					1 von 19
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	1 (100%)	-	

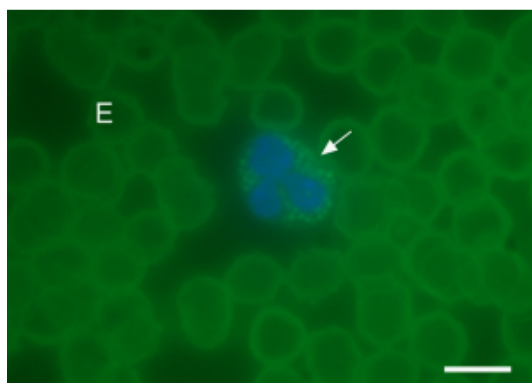


Abbildung 4.76: Eosinophiler Granulozyt, PHA-L-FITC (Hund, wbl. 8Jahre); die Granula des Eosinophilen (Pfeil) weisen eine schwach positive Bindung auf. Die Zellmembran der Erythrozyten (E) ist ebenfalls positiv.  
SB = 10µm

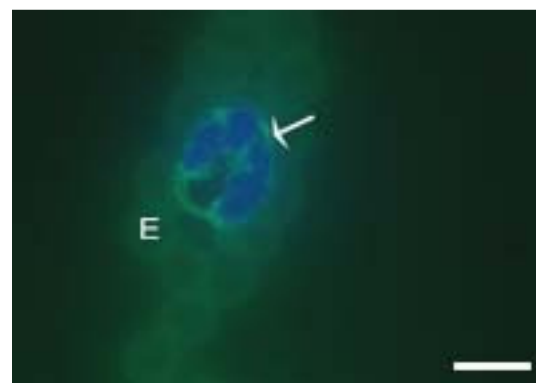


Abbildung 4.77: Neutrophiler Granulozyt, PHA-L-FITC (Hund, wbl. 1,5Jahre); die Erythrozyten (E) sind schwach positiv. Der neutrophile Granulozyt (Pfeil) weist ebenfalls eine positive Bindungsreaktion auf.  
SB = 10µm

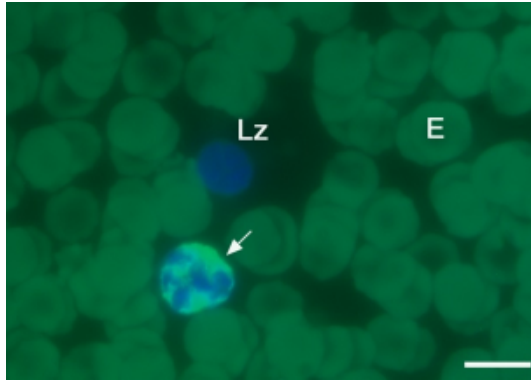


Abbildung 4.78: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, PHA-L-FITC (Hund, wbl. 2Jahre); das Zytoplasma und die Zellmembran des Neutrophilen (Pfeil) sind deutlich positiv. Erythrozyten (E) und Lymphozt (Lz) dagegen weisen keine Bindungsstellen auf.  
SB = 10µm

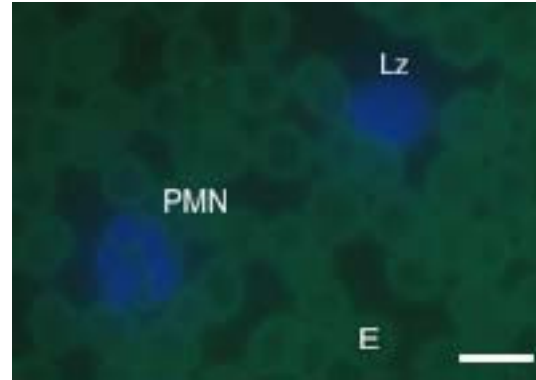


Abbildung 4.79: Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt PHA-L-FITC (Hund, ml. 10Jahre); die Erythrozyten (E) sind schwach positiv. Das Zytoplasma des Neutrophilen (PMN) weist eine negative Reaktion auf.  
Lz = Lymphozyt  
SB = 10µm

### 2.15. Bindungsstellen für *Makacia amurensis* Agglutinin (MAL-I)

Beim Färben mit dem sialinsäurespezifischen Lektine MAL-I wiesen sowohl die Thrombozyten, als auch die Lymphozyten sowie die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten keine positiven Bindungsstellen auf. Es reagierten lediglich die roten Blutkörperchen und die eosinophilen Granulozyten positiv. Die Erythrozyten zeigten überwiegend schwach positive Bindungsstellen sowohl im Plasma als auch in der Membran. Bei den Eosinophilen fluoreszierten nur die Granula im Plasma deutlich bis stark.

Tabelle 4.22. Auswertung MAL-I

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

Zelle	0	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					10 von 10
Membran	1 (10%)	6 (60%)	3 (30%)	-	
Zytoplasma	1 (10%)	6 (60%)	3 (30%)	-	
<b>Thrombozyten</b>					10 von 10
Membran	10 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					10 von 10
Membran	10 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (100%)	-	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					2 von 10
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	1 (50%)	1 (50%)	
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 10
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					10 von 10
Membran	10 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					2 von 10
Membran	2 (100%)				
Zytoplasma	2 (100%)				

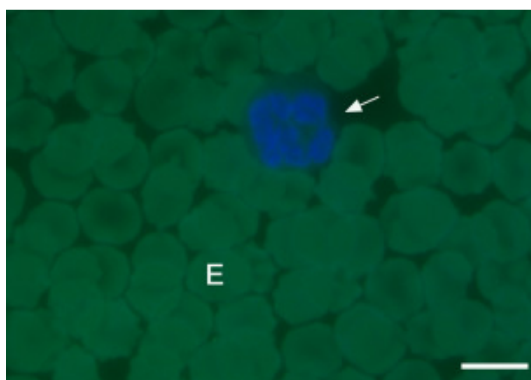


Abbildung 4.80: Neutrophiler Granulozyt, MAL-I-Biotin (Hund, ml. 3Jahre); weder die Erythrozyten (E) noch der Neutrophile (Pfeil) weisen positive Reaktionen auf.  
SB = 10µm

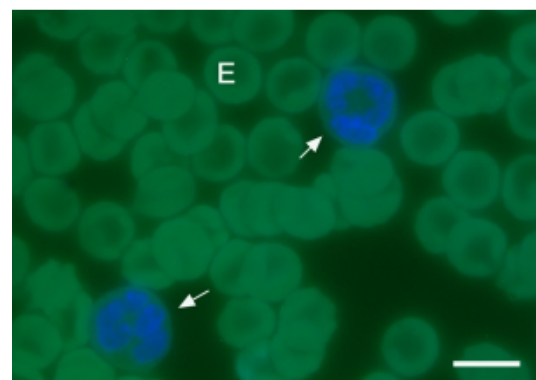


Abbildung 4.81: Neutrophile Granulozyten, MAL-I-Biotin (Hund, wbl. 8Jahre); die Erythrozyten (E) weisen eine schwach positive Reaktion auf. Die Neutrophilen (Pfeil) dagegen sind negativ.  
SB = 10µm

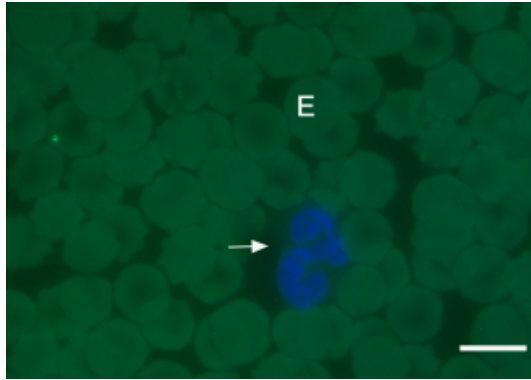


Abbildung 4.82: Neutrophiler Granulozyt, MAL-I-Biotin (Hund, ml. 3Jahre); sowohl die Erythrozyten (E), als auch der Neutrophile (Pfeil) zeigen keine Bindungsstellen.  
SB = 10 $\mu$ m

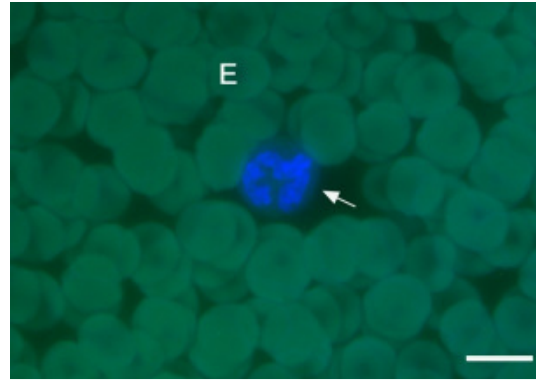


Abbildung 4.83: Neutrophiler Granulozyt, MAL-I-Biotin (Hund, ml. 5Jahre); der Neutrophile (Pfeil) ist negativ.  
E = Erythrozyt  
SB = 10 $\mu$ m

### 2.16. Bindungsstellen für *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)

Auch bei SNA wiesen die Thrombozyten, die Lymphozyten, die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten nur negative Reaktionen auf. Die Erythrozyten zeigten vorwiegend schwach positive Reaktionen nicht nur an der Membran sondern auch im Plasma. Die Granula der eosinophilen Granulozyten dagegen fluoreszierten deutlich.

Tabelle 4.23. Auswertung SNA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					10 von 10
Membran	1 (10%)	9 (90%)	-	-	
Zytoplasma	1 (10%)	9 (90%)	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					10 von 10
Membran	10 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					10 von 10
Membran	10 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (100%)	-	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					2 von 10
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	2 (100%)	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 10
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					10 von 10
Membran	10 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					1 von 10
Membran	1 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (100%)	-	-	-	

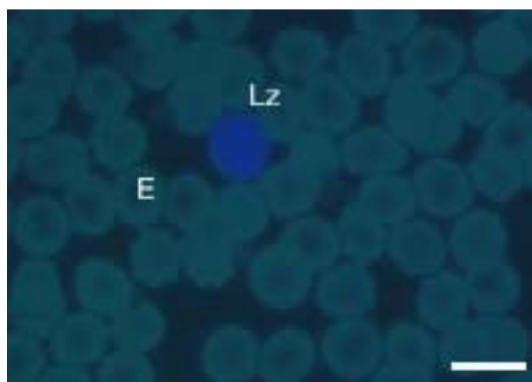


Abbildung 4.84: Lymphozyt, SNA-Biotin (Hund, wbl. 10Jahre); der Lymphozyt (Pfeil) zeigt keine positive Reaktion mit SNA. Auch die Erythrozyten (E) sind negativ.

SB = 10µm

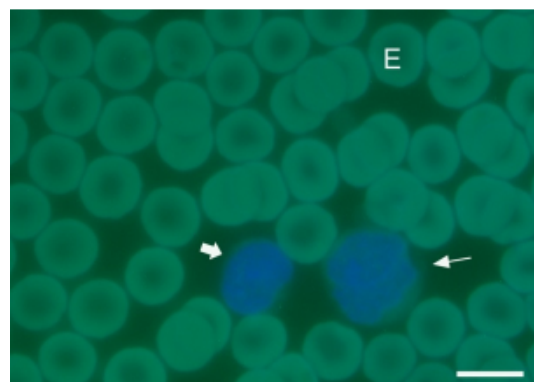


Abbildung 4.85: Lymphozyt und Monozyt, SNA-Biotin (Hund, wbl. 10Jahre); weder der Lymphozyt (dicker Pfeil) noch der Monozyt (dünner Pfeil) reagieren mit SNA.

E = Erythrozyt

SB = 10µm

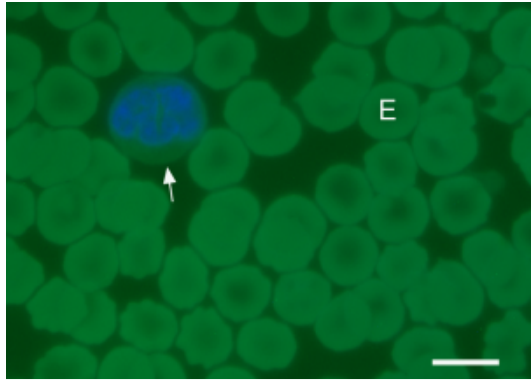


Abbildung 4.86: Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin (Hund, wbl. 9Jahre); der Neurophile (Pfeil) hat keine Bindungsstellen. Die Erythrozyten (E) sind schwach positiv.  
SB = 10µm

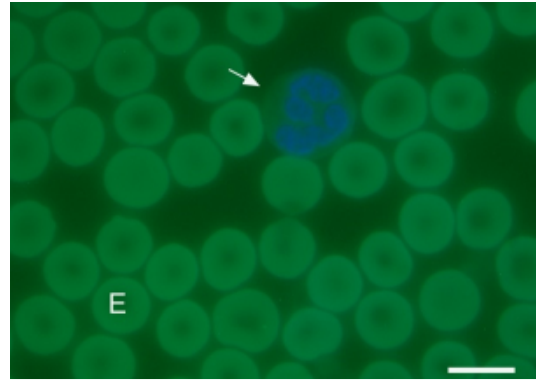


Abbildung 4.87: Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin (Hund, wbl. 10Jahre); die Erythrozyten (E) zeigen nur schwach positive Reaktionen. Der Neurophile (Pfeil) ist negativ.  
SB = 10µm

### 2.17. Bindungsstellen für *Viscum album* Agglutinin (VAA)

Der Großteil der roten Blutkörperchen zeigte schwach positive Reaktionen mit VAA. Bei Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten fehlte eine positive Reaktion. Die neutrophilen Granulozyten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Bindungsstärke. 60% zeigten eine schwache bis deutliche Reaktion, 40% wiederum hatten keine Bindungsstellen. Basophile und eosinophile Granulozyten dagegen hatten deutlich positive Reaktionen in ihren jeweiligen Granula.



Tabelle 4.24. Auswertung VAA

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					10 von 10
Membran	1 (10%)	9 (90%)	-	-	
Zytoplasma	1 (10%)	9 (90%)	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					10 von 10
Membran	10 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					10 von 10
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	4 (40%)	3 (30%)	3 (30%)	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					1 von 10
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	1 (100%)	-	
<b>Basophile Granulozyten</b>					1 von 10
Membran	-	-	-	-	
Zytoplasma	-	-	1 (100%)	-	
<b>Lymphozyten</b>					10 von 10
Membran	10 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	10 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					1 von 10
Membran	1 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	1 (100%)	-	-	-	

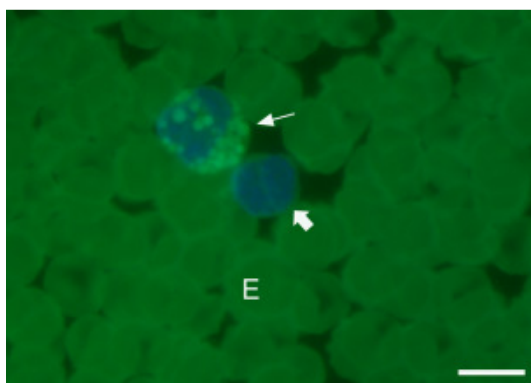


Abbildung 4.88: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, VAA-Biotin (Hund, ml. 3Jahre); die Granula des Eosinophilen (dünner Pfeil) sind deutlich positiv. Der Lymphozyt (dicker Pfeil) zeigt keine Reaktion. Die Erythrozyten (E) sind schwach positiv. SB = 10µm

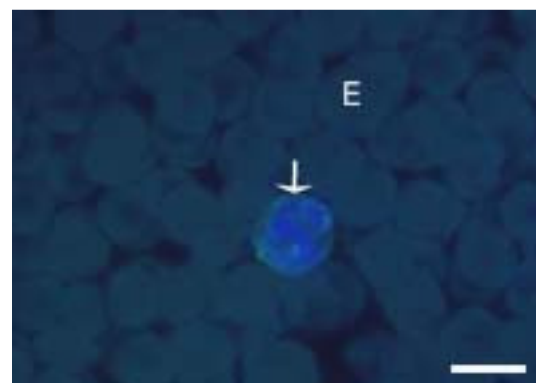


Abbildung 4.89: Neutrophiler Granulozyt, VAA-Biotin (Hund, ml. 5Jahre); das Zytoplasma des Neutrophilen (Pfeil) weist eine positive Bindungsreaktion auf. E = Erythrozyt SB = 10µm

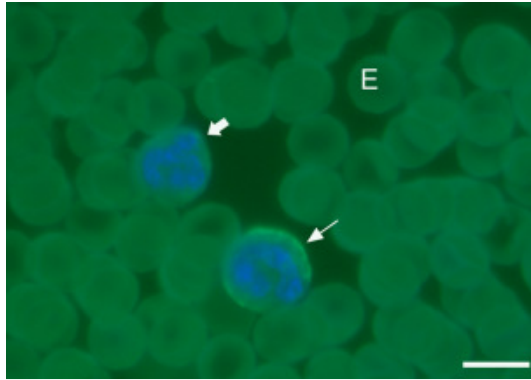


Abbildung 4.90: Neutrophile Granulozyten, VAA-Biotin (Hund, wbl. 10Jahre); die Erythrozyten (E) und ein Neutrophiler (dicker Pfeil) sind negativ. Der untere Neutrophile (dünne Pfeil) dagegen hat ein schwach positives Zytoplasma.  
SB = 10µm

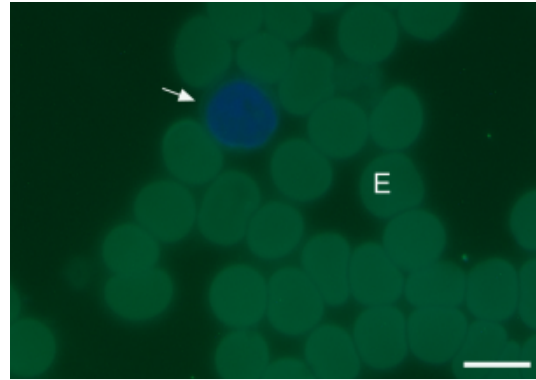


Abbildung 4.91: Lymphozyt, VAA-Biotin (Hund, wbl. 9Jahre); der Lymphozyt (Pfeil) reagiert nicht mit VAA.  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

### 3. Immunhistochemische Untersuchungen am Blut des Hundes

#### 3.1. Immunhistochemischer Nachweis von CD4

Der immunhistochemische Nachweis von CD 4 führte bei den Erythrozyten bei 58% zu einer schwach bis deutlich positiven Reaktion der Membran. 43% reagierten negativ. Bei den Lymphozyten reagierten der überwiegende Anteil nicht mit CD4. Lediglich bei 28% zeigte die Zellmembran positive Bindungsstellen. Die Membran der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten fluoreszierte dagegen deutlich. Bei den Thrombozyten konnte keine Reaktion festgestellt werden.

Tabelle 4.25. Auswertung CD4

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					7 von 7
Membran	3 (43%)	2 (29%)	2 (29%)	-	
Zytoplasma	3 (43%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					7 von 7
Membran	7 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	7 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					7 von 7
Membran	2 (29%)	-	5 (71%)	-	
Zytoplasma	2 (29%)	-	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					0 von 7
Membran					
Zytoplasma					
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 7
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					7 von 7
Membran	5 (71%)	1 (14%)	1 (14%)	-	
Zytoplasma	5 (71%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					5 von 7
Membran	1 (20%)	-	4 (80%)	-	
Zytoplasma	1 (20%)	-	-	-	



Abbildung 4.92: Neutrophiler Granulozyt, CD4-FITC (Hund, ml. 6Jahre); die Zellmembran des Neutrophilen (Pfeil) weist eine deutlich positive Reaktion auf. Die Erythrozyten (E) sind negativ.  
SB = 10µm



Abbildung 4.93: Lymphozyt, CD4-FITC (Hund, wbl. 6Jahre); der Lymphozyt (Lz) zeigt keine Bindung.  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

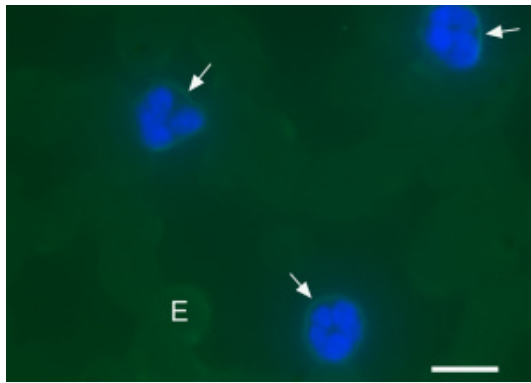


Abbildung 4.94: Neutrophile Granulozyten, CD4-FITC (Hund, wbl. 10Jahre); die Zellmembran der Neutrophilen (Pfeil) weist eine deutlich positive Bindung auf.  
E = Erythrozyt  
SB = 10µm

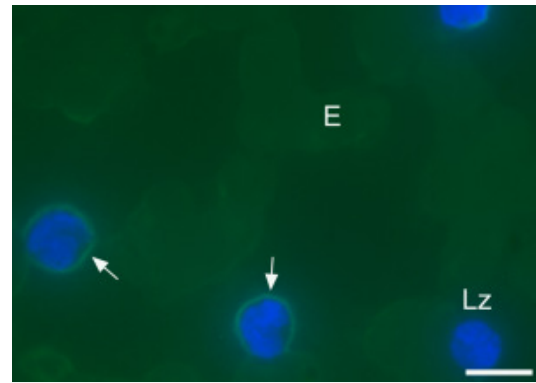


Abbildung 4.95: Neutrophile Granulozyten und Lymphozyt, CD4-FITC (Hund, wbl. 10Jahre); neben dem negativen Lymphozyten (Lz) liegen zwei Neutrophile (Pfeil) mit deutlich positiver Zellmembran. Die Erythrozyten (E) haben eine schwach positive Zellmembran.  
SB = 10µm

### 3.2. Immunhistochemischer Nachweis von CD8

Bei Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten zeigte die immunhistochemische Untersuchung von CD8 kein Reaktion. Auch der überwiegende Anteil der neutrophilen Granulozyten wies keine Bindung auf. Lediglich 14% der Neutrophilen zeigten eine schwach positive Reaktion ihrer Membran. Bei den roten Blutkörperchen zeigten 43% eine deutlich positive Reaktion der Zellmembran, der überwiegende Anteil aber wies keine positiven Bindungsstellen auf.

Tabelle 4.26. Auswertung CD8

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

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					7 von 7
Membran	4 (57%)	-	3 (43%)	-	
Zytoplasma	4 (57%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					7 von 7
Membran	7 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	7 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					7 von 7
Membran	6 (86%)	1 (14%)	-	-	
Zytoplasma	6 (86%)	-	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					0 von 7
Membran					
Zytoplasma					
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 7
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					7 von 7
Membran	7 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	7 (100%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					3 von 7
Membran	3 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	3 (100%)	-	-	-	

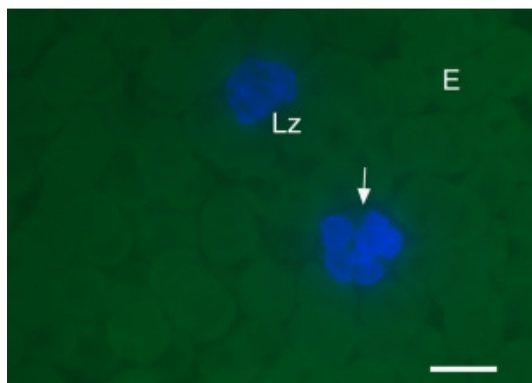


Abbildung 4.96: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, CD8-FITC (Hund, ml. 8Jahre); weder der Neutrophile (Pfeil) noch der Lymphozyt (Lz) oder die Erythrozyten (E) weisen eine positive Reaktion auf. SB = 10µm

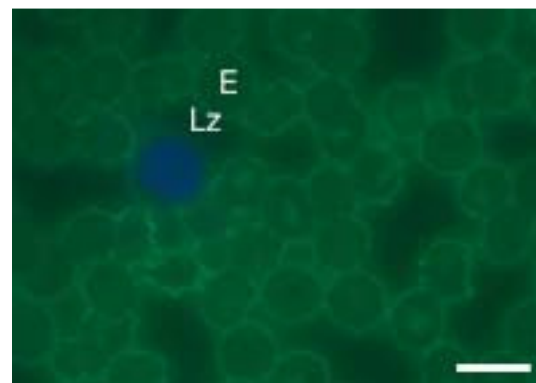


Abbildung 4.97: Lymphozyt, CD8-FITC (Hund, wbl. 10Jahre); die Zellmembran der Erythrozyten (E) zeigt eine deutlich positive Reaktion. Der Lymphozyt (Lz) ist negativ. SB = 10µm

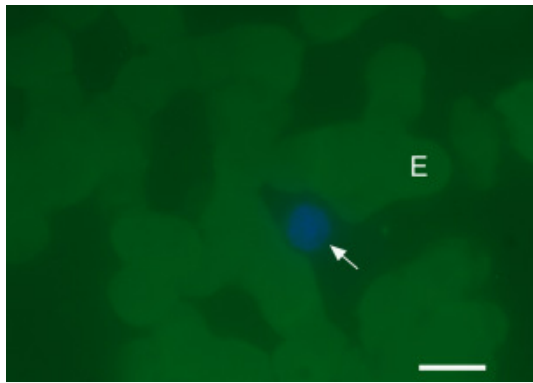


Abbildung 4.98: Lymphozyt, CD8-FITC (Hund, wbl. 10Jahre); sowohl beim Lymphozyten (Pfeil), als auch bei den Erythrozyten (E) keine positive Bindung.  
SB = 10 $\mu$ m

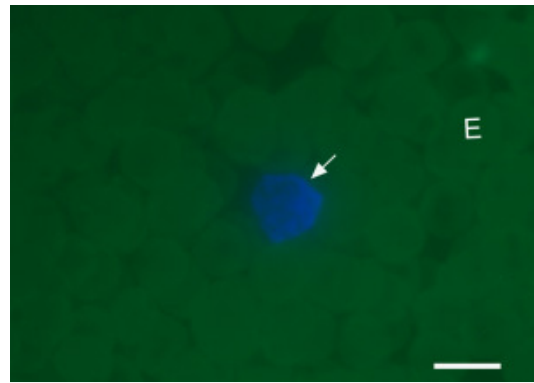


Abbildung 4.99: Lymphozyt, CD8-FITC (Hund, ml. 12Jahre); Erythrozyten (E) und Lymphozyt (Pfeil) sind negativ.  
SB = 10 $\mu$ m

### 3.3. Immunhistochemischer Nachweis der B-Lymphozyten-Subpopulation

Zur Untersuchung der B-Lymphozyten-Subpopulation wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet. Der überwiegende Anteil der Lymphozyten und der neutrophilen Granulozyten wies eine negative Reaktion auf. Bei 57% der Erythrozyten zeigte die Membran eine schwach positive Fluoreszenz. Die Membran der Lymphozyten und der Neutrophilen wies bei je 29% eine schwache Reaktion auf. Die Thrombozyten reagierten überhaupt nicht. Bei den Monozyten kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen. Der Hauptanteil reagierte negativ, es konnten aber auch deutlich positive Reaktionen an der Monozytenmembran gefunden werden.

Tabelle 4.27. Auswertung der B-Lymphozyten- Subpopulation  
 (- = negativ, + = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv)

Zelle	-	+	++	+++	Anzahl der Tiere
<b>Erythrozyten</b>					7 von 7
Membran	2 (29%)	4 (57%)	1 (14%)	-	
Zytoplasma	2 (29%)	-	-	-	
<b>Thrombozyten</b>					7 von 7
Membran	7 (100%)	-	-	-	
Zytoplasma	7 (100%)	-	-	-	
<b>Neutrophile Granulozyten</b>					7 von 7
Membran	5 (71%)	2 (29%)	-	-	
Zytoplasma	5 (71%)	-	-	-	
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					0 von 7
Membran					
Zytoplasma					
<b>Basophile Granulozyten</b>					0 von 7
Membran					
Zytoplasma					
<b>Lymphozyten</b>					7 von 7
Membran	5 (71%)	2 (29%)	-	-	
Zytoplasma	5 (71%)	-	-	-	
<b>Monozyten</b>					3 von 7
Membran	2 (29%)	-	1 (14%)		
Zytoplasma	2 (29%)	-			



Abbildung 4.100: Monozyt, CADO34A-FITC (Hund, ml. 6Jahre); weder der Monozyt (Pfeil) noch die Erythrozyten (E) weisen eine Bindungsreaktion auf. SB = 10µm

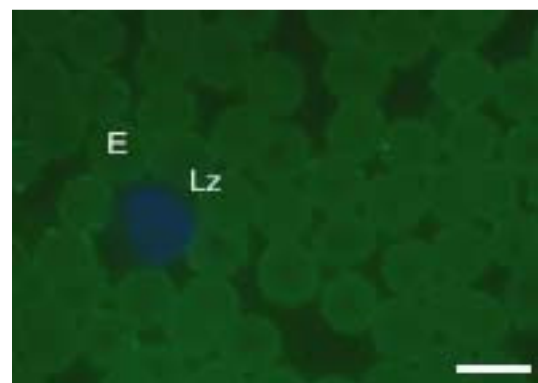


Abbildung 4.101: Lymphozyt, CADO34A-FITC (Hund, ml. 6Jahre); der negative Lymphozyt (Lz) wird von schwach positiven Erythrozyten (E) umgeben. SB = 10µm

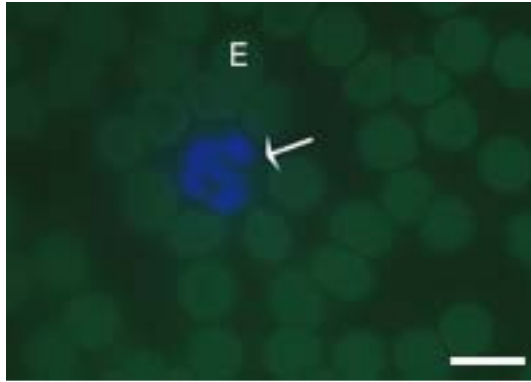


Abbildung 4.102: Neutrophiler Granulozyt, CADO34A-FITC (Hund, ml. 8Jahre); weder der neutrophile Granulozyt (Pfeil) noch die Erythrozyten (E) weisen eine positive Bindungsreaktion auf. SB = 10 $\mu$ m

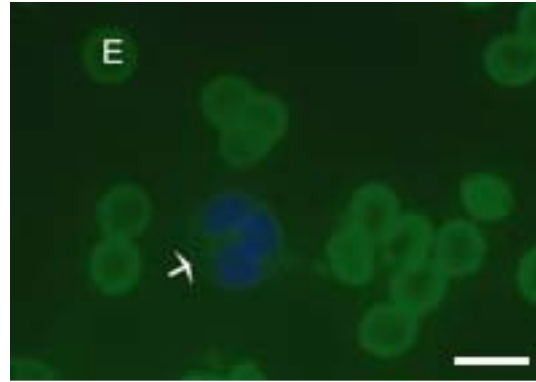


Abbildung 4.103: Neutrophiler Granulozyt, CADO34A-FITC (Hund, wbl. 10Jahre); die Erythrozyten (E) sind schwach positiv. Der neutrophile Granulozyt (Pfeil) dagegen ist negativ.. SB = 10 $\mu$ m

## 4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Blut des Hundes

### 4.1. Erythrozyten

Die reifen Erythrozyten besitzen typischerweise keinen Zellkern und enthalten keine Zellorganellen mehr. Das Zytoplasma ist homogen gefärbt. Zum Teil lassen sich einzelne elektronendurchlässige Vakuolen innerhalb der roten Blutkörperchen finden. Die Zellmembran ist glatt.

### 4.2. Granulozyten

#### 4.2.1. Neutrophile Granulozyten

Bei den neutrophilen Granulozyten unterscheidet man die Jugendform, die stabkernigen Granulozyten, von den reifen, segmentkernigen Granulozyten. Die stabkernigen neutrophilen Granulozyten haben einen typischen U-förmigen Zellkern, das Heterochromatin findet sich direkt an der Zellkernmembran. An der Oberfläche der Zellmembran können einige Zytoplasmaausläufer ausgebildet sein. Im Cytoplasma liegen die charakteristischen Granula. Morphologisch kann man elektronendichte, etwas kleinere Granula, von den etwas größeren helleren Granula unterscheiden. Alle Granula haben eine runde oder längliche Form. Aufgrund ihrer Morphologie lassen sie sich nicht genauer einteilen. Außerdem kommen kleine Mitochondrien und rauhe endoplasmatische Retikula im Cytoplasma vor. Neben dem Golgi-Apparat besitzen sie auch häufig Vakuolen, welche sich in ihrer Größe unterscheiden



---

können und mit Elektronen durchlässigen Inhalten gefüllt sind. Die reifen segmentkernigen Granulozyten haben typischerweise einen Kern aus mehreren Segmenten. Auch hier ordnet sich das Heterochromatin an die Kernmembran an und umgibt das im Kern liegende Euchromatin. Die im Zytoplasma liegenden Granula entsprechen denen der stabkernigen Granulozyten. Ebenso lassen sich daneben auch Vakuolen, Mitochondrien, rER finden. Im Cytoplama lassen sich daneben auch noch vereinzelt Glykogenpartikel finden, die sich zum Teil in kleinen Gruppen zusammenlagern. Aus der Zellmembran ragen zum Teil Zytoplasmaausläufer.



Abbildung 4.104:

---

Abb.4.104: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Hund);  
die verschiedenen Segmente des Zellkern (N) sind gut zu erkennen.  
Im Zytoplasma des Neutrophilen sind kleine Vesikel (Vs) zu finden.  
An der Zellmembran liegen Mitochondrien (Mi).  
E = Erythrozyt  
SB = 2 $\mu$ m

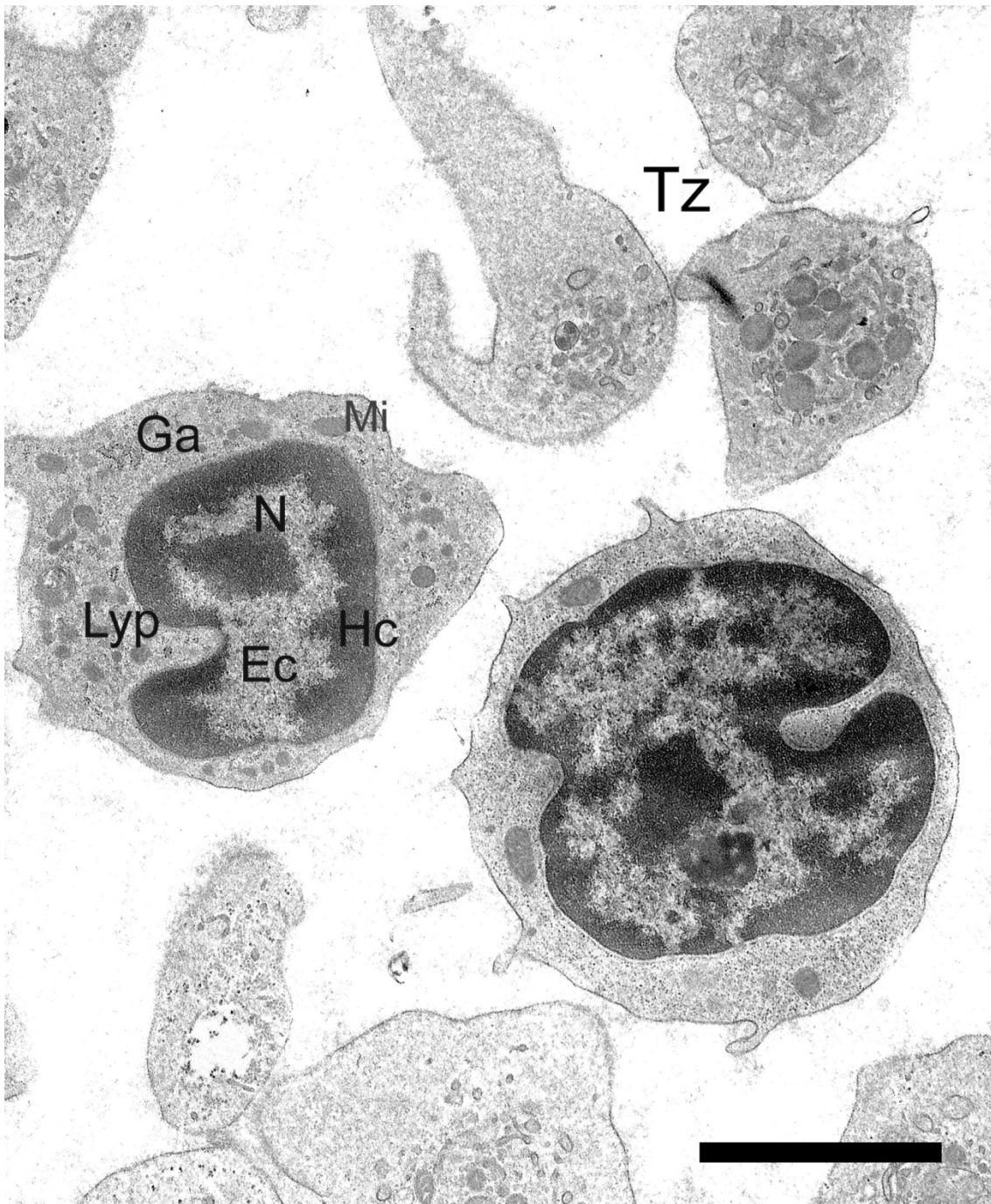


Abbildung 4.105: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Hund); auch bei den stabkernigen neutrophilen Granulozyten lassen sich im Zellkern (N) das vor allem am Rand gelegene Heterochromatin (Hc) vom Euchromatin (Ec) unterscheiden. Neben den primären Lysosomen (Lyp) sind der Golgi-Apparat (GA) und Mitochondrien (Mi) erkennbar. Über dem Neutrophilen finden sich 3 Thrombozyten (Tz).

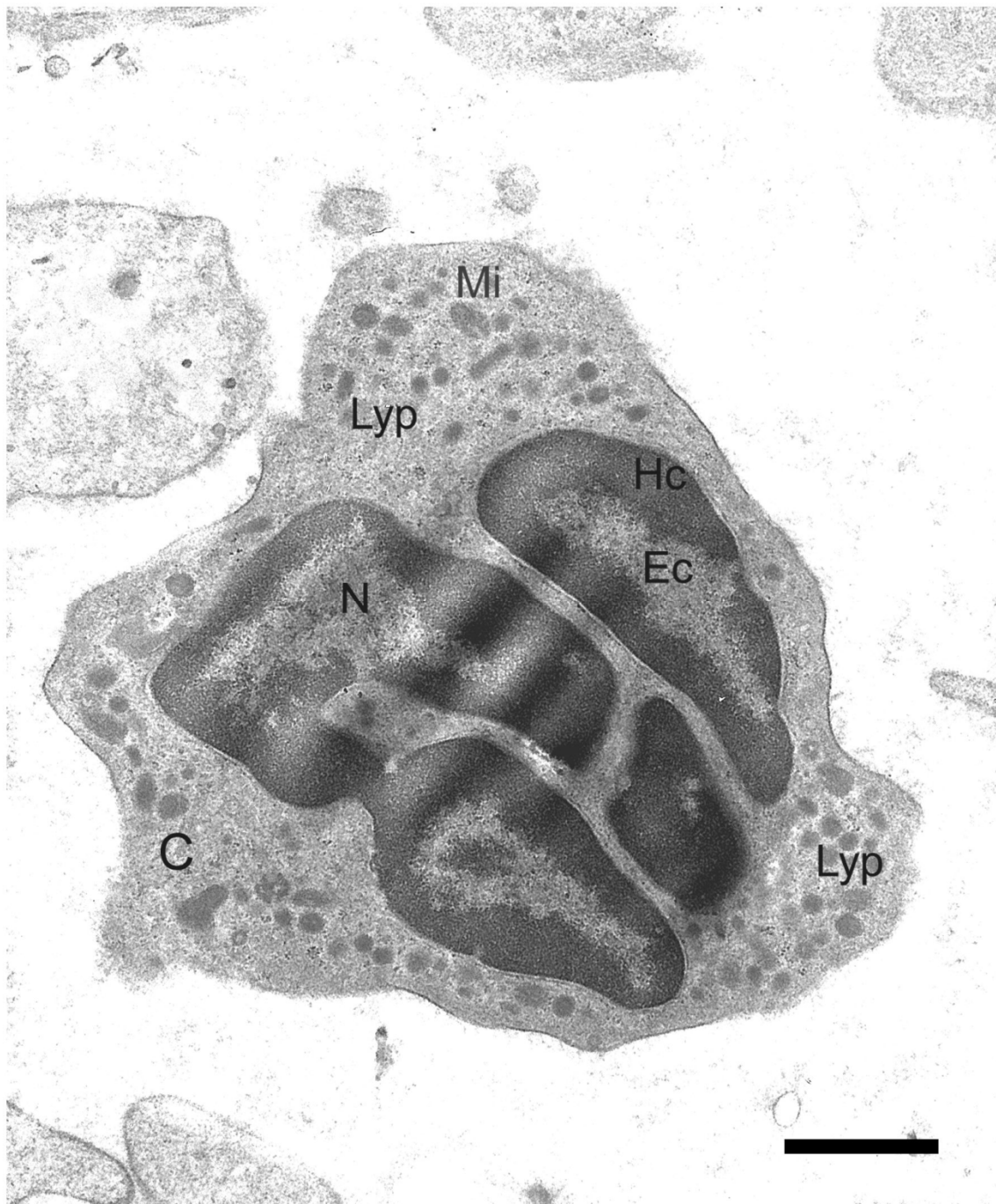


Abbildung 4.106: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Hund);  
der Zellkern (N) besteht aus elektronendichtem Heterochromatin (Hc) und weniger elektronendichtem  
Euchromatin (Ec). Er ist in mehrere Kernsegmente unterteilt. Im Zytoplasma (C) lassen sich primäre Lysosomen  
(Lyp) und Mitochondrien (Mi) finden.  
SB = 3µm

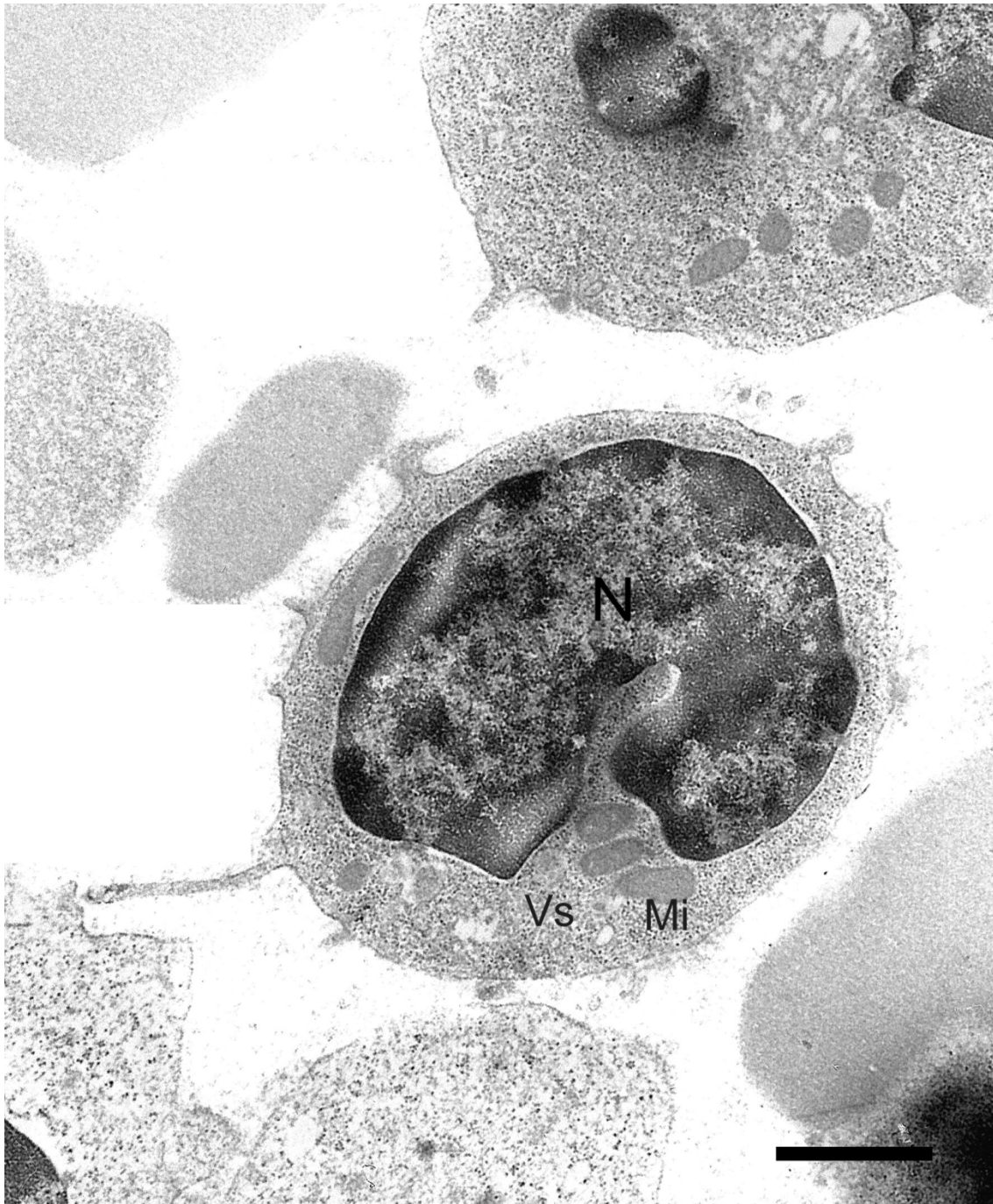


Abbildung 4.107: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Hund);  
der Zellkern (N) des stabkernigen neutrophilen Graulozyten hat die charakteristische bohnenförmige Gestalt.  
Mi = Mitochondrium  
Vs = Vesikel  
SB = 3µm

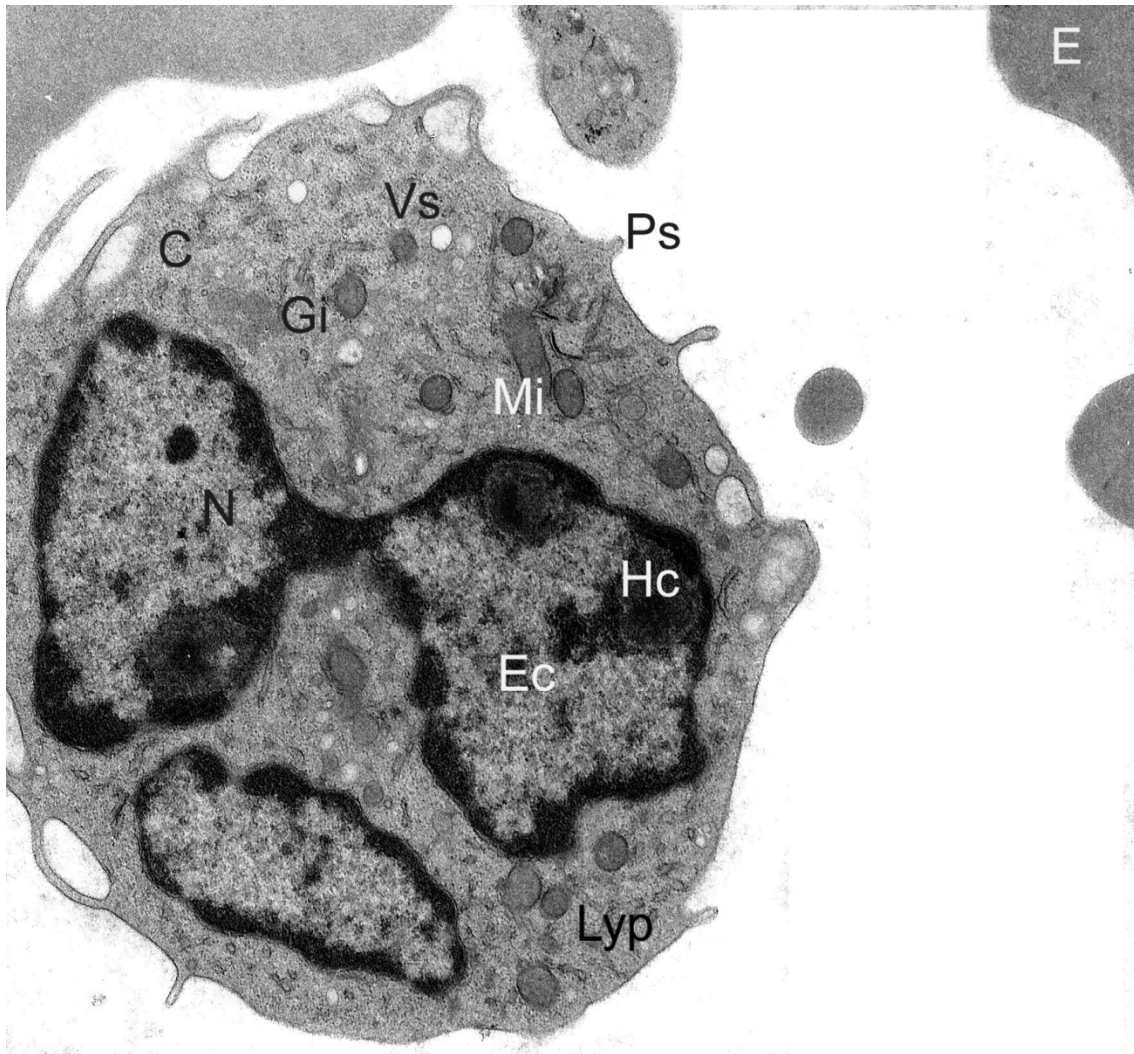


Abbildung 4.108: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Hund); die verschiedenen Segmente des Zellkern (N) sind über eine schmale Chromatinbrücke verbunden. Im Zytoplasma (C) finden sich Mitochondrien (Mi), Vesikel (Vs) und primäre Lyosomen (Lyp). Auf der Zellmembran sind Pseudopodien (Ps) ausgebildet.

Gi = reife Granula  
Ec = Euchromatin  
Hc = Heterochromatin  
E = Erythrozyt  
SB = 2 $\mu$ m

---

#### **4.2.2. Eosinophile Granulozyten**

Im Aufbau ähneln die eosinophilen Granulozyten den neutrophilen Granulozyten. Im Zytoplasma lassen sich neutrophile von eosinophilen Granula unterscheiden, welche größer sind und keinen homogenen Inhalt haben. In den eosinophilen Granula finden sich lamelläre und kristalloide Strukturen. Die Granula variieren in Größe und Form. Man kann konzentrisch geschichtete, elektronendichte von ungleichmäßig elektronendichten Granula differenzieren. Pro Zelle kann es ein oder mehrere Kernsegmente geben. Auch bei diesen lagert sich das Heterochromatin an die Kernmembran und umgibt das Euchromatin. Im Zytoplasma lassen sich nur noch vereinzelt Mitochondrien oder rER finden. Wie bei den neutrophilen Granulozyten kommen im Zytoplasma vereinzelte Glykogenpartikel vor.



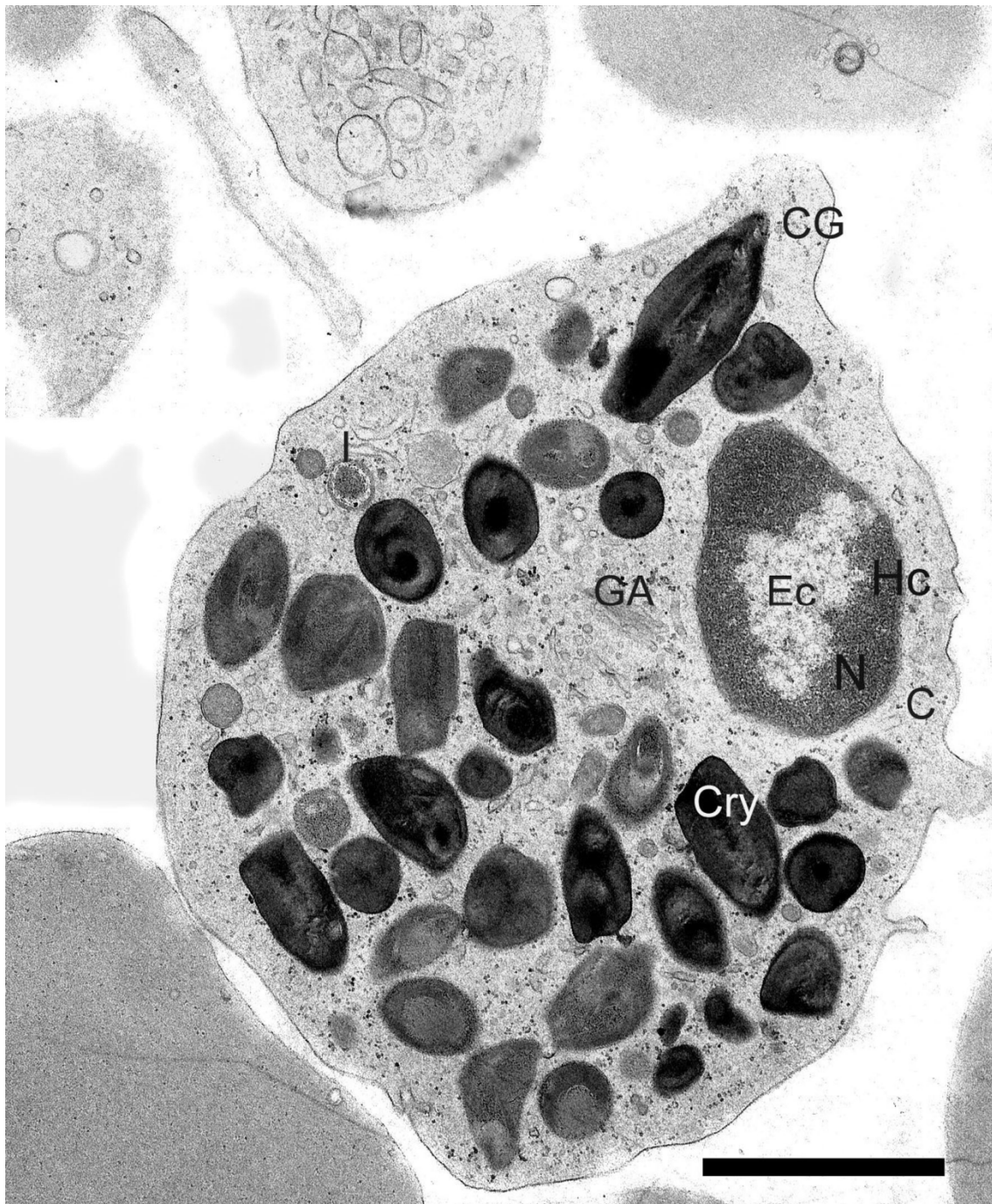


Abbildung 4.109: Eosinophiler Granulozyt (Hund);  
im Zytoplasma (C) des Eosinophilen lassen sich die verschiedenen Granulaarten unterscheiden. Zum einen finden sich die unreifen Granula (I), außerdem ausgereifte Granula (CG), in denen man ihren kristallinen Inhalt (Cry) erkennen kann.

Ec = Euchromatin  
Hc = Heterochromatin  
GA = Golgi-Apparat  
N = Zellkern  
SB = 2 $\mu$ m

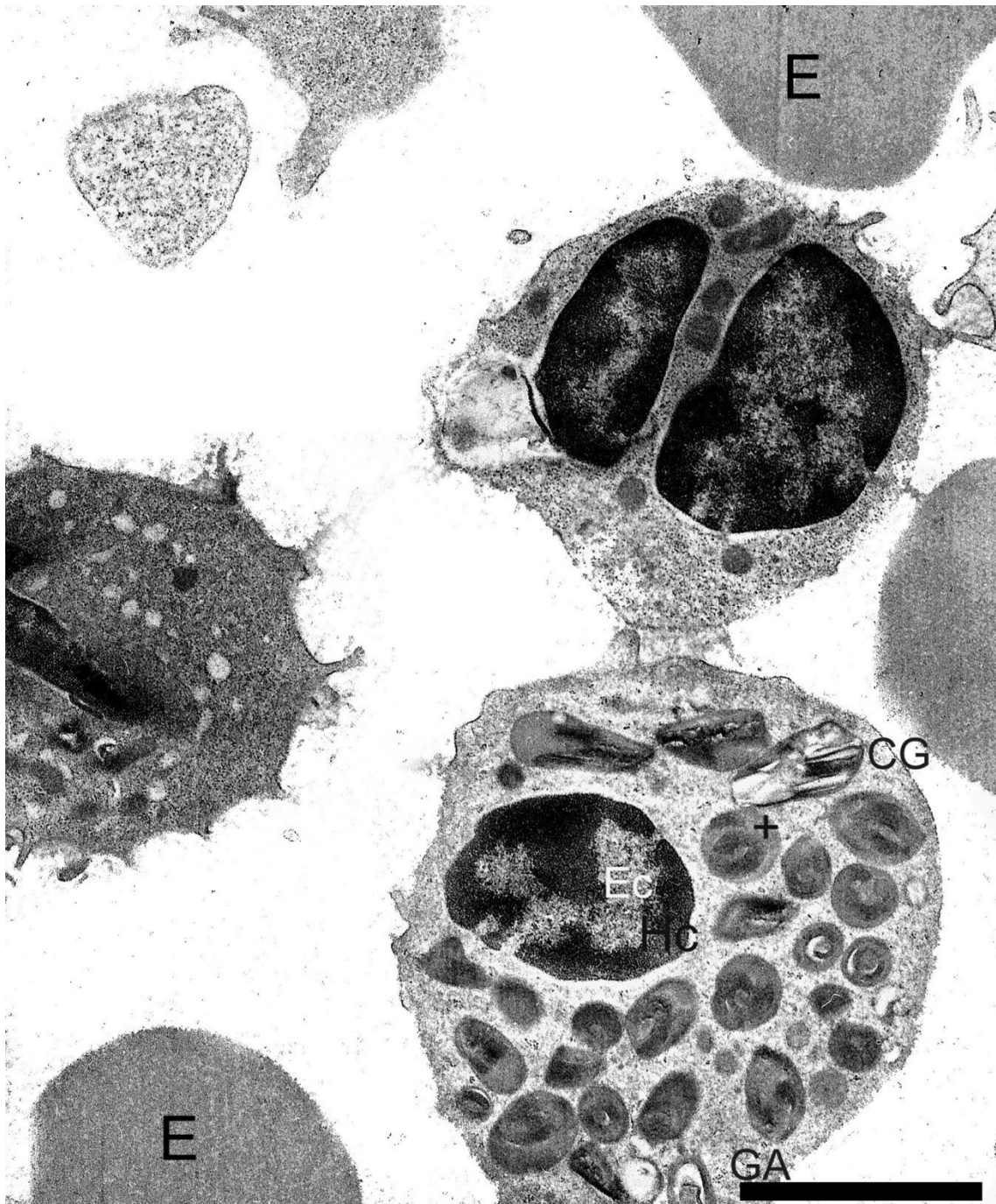


Abbildung 4.110: Eosinophiler Granulozyt (Hund);  
im Zytoplasma des Eosinophilen sind die konzentrisch geschichteten Granula (+) sehr schön zu erkennen. Im  
Gegensatz zu diesen unterscheiden sich die ausgereiften kristalloiden Granula (CG).

E = Erythrozyt  
Ec = Euchromatin  
Hc = Heterochromatin  
GA = Golgi-Apparat  
SB = 2µm

---

### **4.2.3. Basophile Granulozyten**

Der Zellkern des basophilen Granulozyten besteht aus einem oder mehreren Segmenten. Das an die Kernmembran gelagerte Heterochromatin umgibt das Euchromatin. Im Zytoplasma findet man große metachromatische Granula mit elektronundurchlässigem Inhalt. Neben diesen kommen auch einzelne Vakuolen mit elektronendurchlässigem Inhalt vor. Neben den Glykogenpartikeln im Zytoplasma konnten keine Mitochondrien oder rER gefunden werden. Von der Zellmembran ausgehend ziehen Zytoplasmaausläufer in die nähere Umgebung und nehmen Kontakt mit den Nachbarzellen auf.

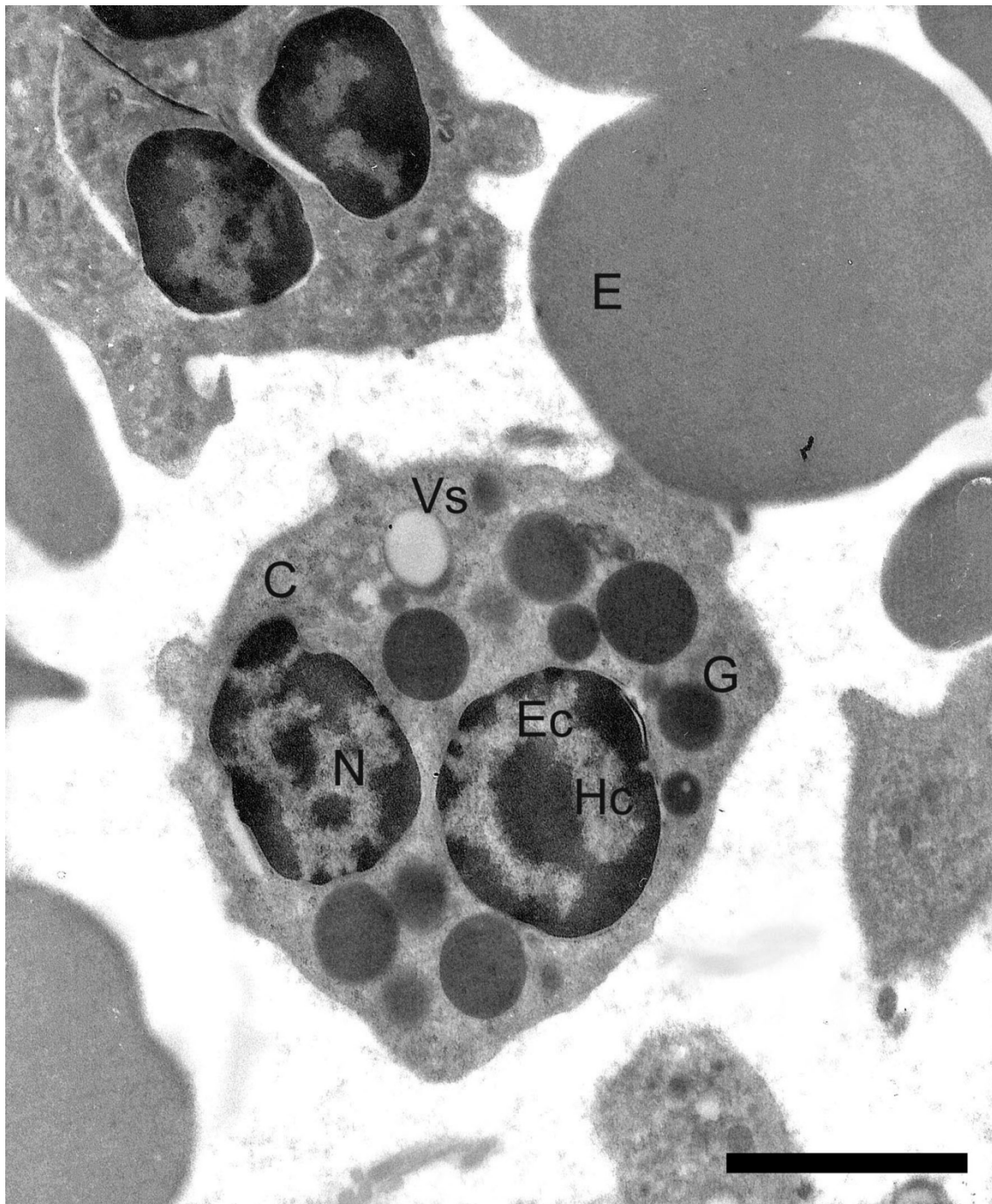


Abbildung 4.111: Basophiler Granulozyt (Hund);  
auch im Zellkern (N) des Basophilen kann das weniger elektronendichte Euchromatin (Ec) von dem elektronendichten Heterochromatin (Hc) unterschieden werden. Im Zytoplasma (C) kommen neben den spezifischen basophilen Granula (G) auch sekretorische Vesikel (Vs) vor.  
E = Erythrozyt  
SB = 2 $\mu$ m

---

### **4.3. Lymphozyten**

Die Lymphozyten haben eine typische runde Zellform mit einem charakteristischen runden Zellkern, welcher verschieden tiefe Einziehungen aufweisen kann. Aus der Zellmembran ragen unterschiedlich lange Zytoplasmaausläufer. Im Zytoplasma finden sich zahlreiche Mitochondrien in runder und länglicher Form. Ein Golgi-Apparat zeigt sich nur selten. Das Euchromatin im Zellkern wird vom Heterochromatin umgeben, welches sich der Kernmembran anlagert.

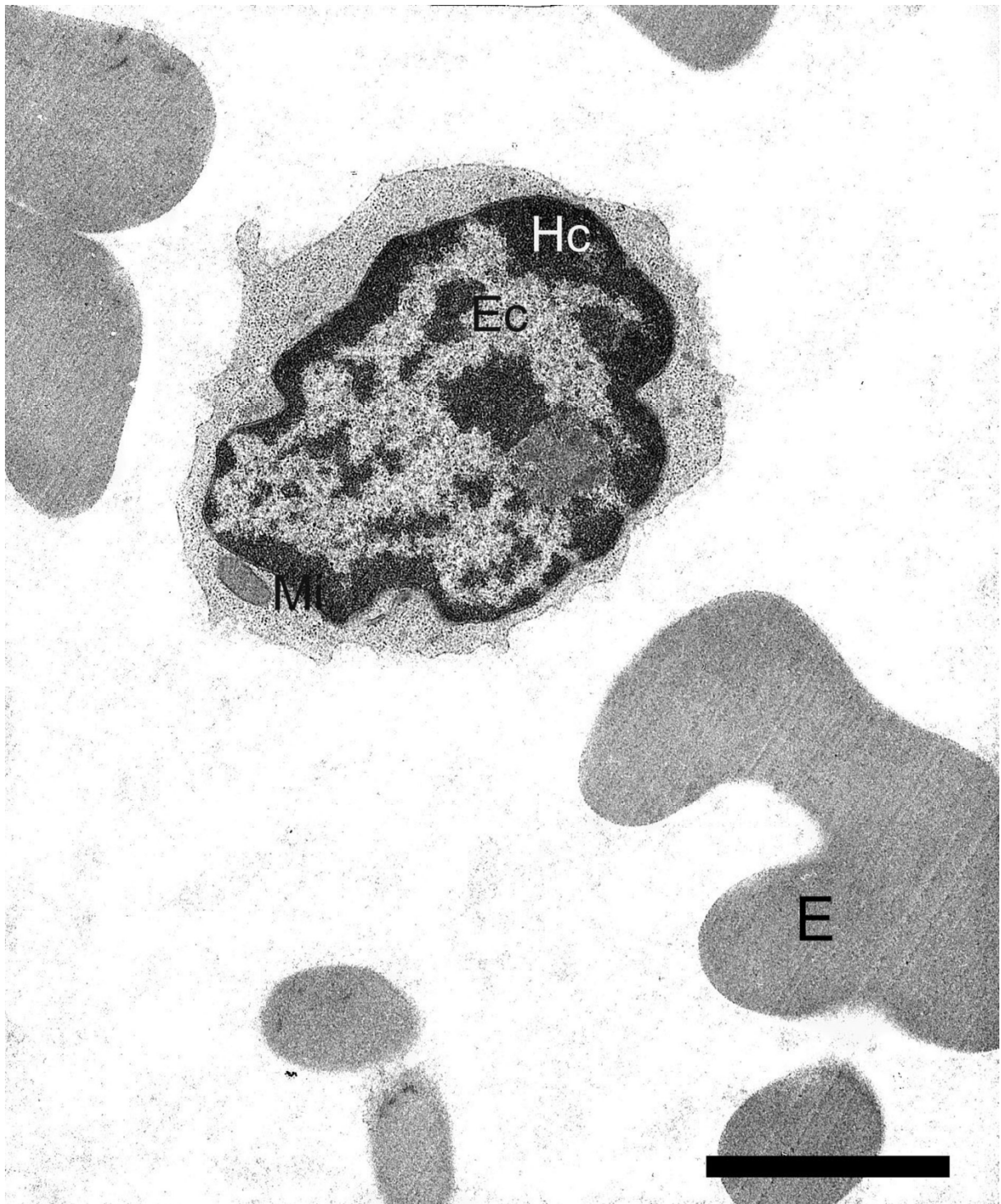


Abbildung 4.112: Lymphozyt (Hund);  
der große Zellkern des Lymphozyten, welcher aus Euchromatin (Ec) und Heterochromatin (Hc) gebildet wird, ist  
von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben. Hier findet sich ein deutlich erkennbares Mitochondrium (Mi).  
E = Erythrozyt  
SB = 2 $\mu$ m



Abbildung 4.113: Lymphozyt (Hund);  
im schmalen Zytoplasmasaum (C) des Lymphozyten finden sich Mitochondrien (Mi) und Vesikel (Vs).  
E = Erythrozyt  
Ec = Euchromatin  
Tz = Thrombozyt  
SB = 3µm

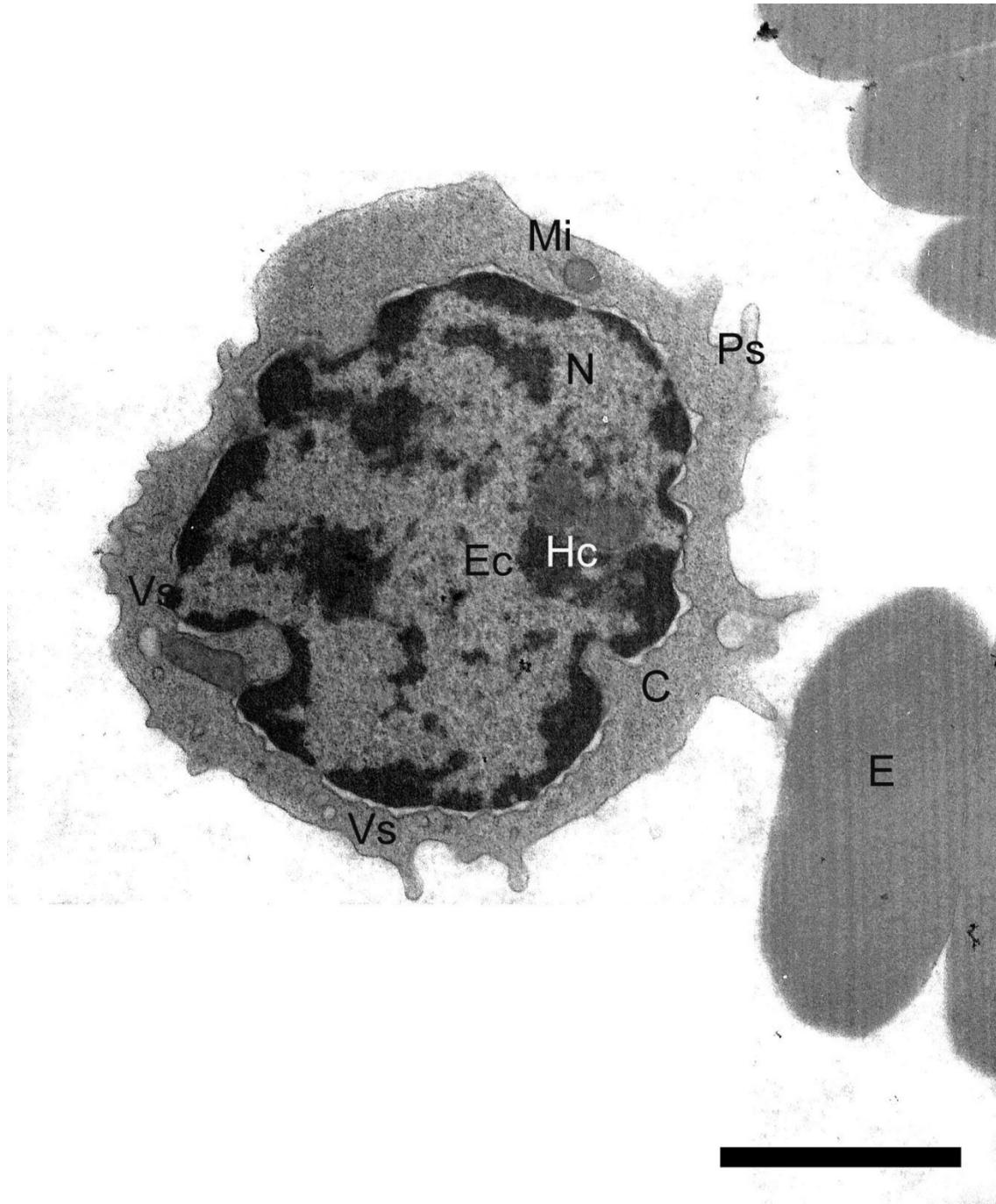


Abbildung 4.114: Lymphozyt (Hund);  
auf der Zellmembran des Lymphozyten sind mehrere Pseudopodien (Ps) ausgebildet. In dem schmalen Zytoplasmarrand (C) finden sich sekretorische Vesikel (Vs) und Mitochondrien (Mi).  
E = Erythrozyt  
Ec = Euchromatin  
Hc = Heterochromatin  
N = Zellkern  
SB = 2 $\mu$ m



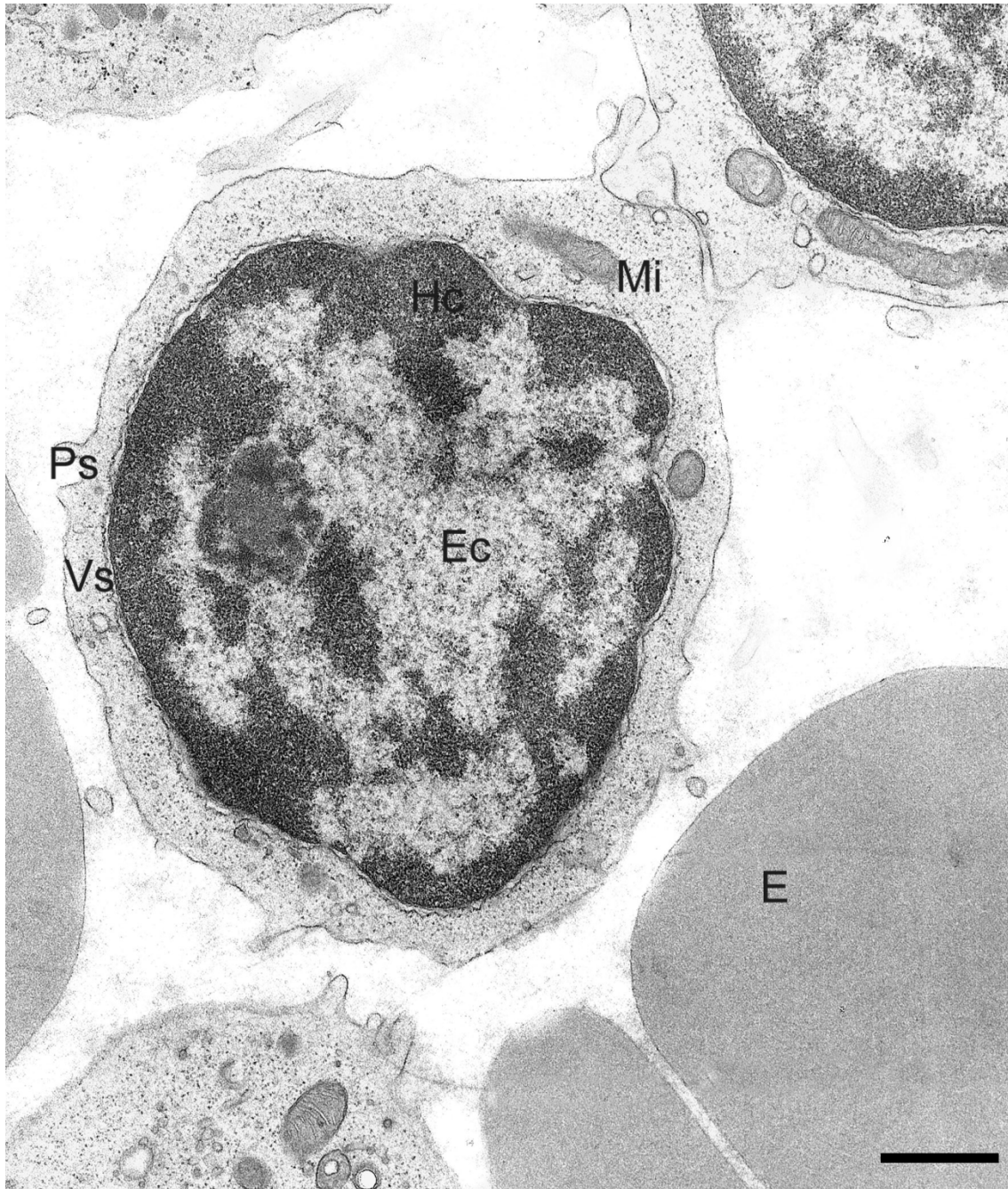


Abbildung 4.115: Lymphozyt (Hund);  
auf der Zellmembran des Lymphozyten sind Pseudopodien (Ps) ausgebildet. Im schmalen Zytoplasmasaum sind  
Mitochondrien (Mi) und Vesikel (Vs) zu erkennen.

E = Erythrozyt  
Ec = Euchromatin  
Hc = Heterochromatin  
SB = 3 $\mu$ m

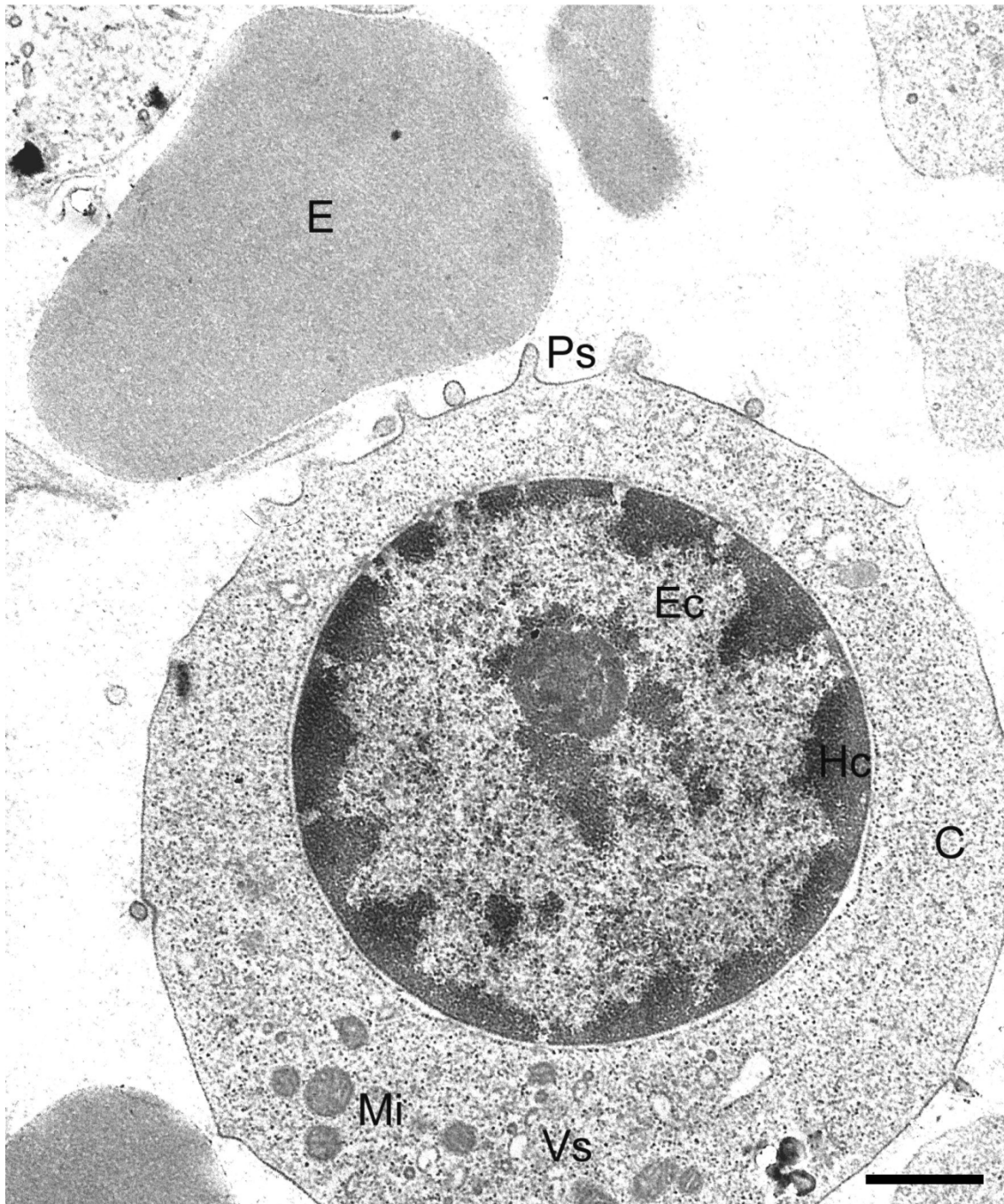


Abbildung 4.116: Lymphozyt (Hund);  
im Zellkern des Lymphozyten ist sehr gut das dunkle Heterochromatin (Hc) vom hellen Euchromatin (Ec) zu unterscheiden. Im Zytoplasma (C) liegen Mitochondrien (Mi) neben mehreren Vesikeln (Vs). Auf der Zellmembran sind Pseudopodien (Ps) ausgebildet.

E = Erythrozyt

SB = 3µm

---

#### **4.4.Monozyten**

Die Monozyten sind die größten Blutzellen des Hundes. Sie haben eine runde Zellform. Ihr Kern kann sehr vielgestaltig sein, von länglich bis Bohnen- oder U-förmig. Das Zytoplasma ist organellenreich und beinhaltet Mitochondrien und rER. Neben diesen lassen sich auch noch viele Granula finden, welche sich vor allem auf einer Kernseite sammeln. Aus der Zelloberfläche treten kurze Zytoplasmaausläufer. Das Euchromatin im Kerninneren wird vom Heterochromatin umgeben.

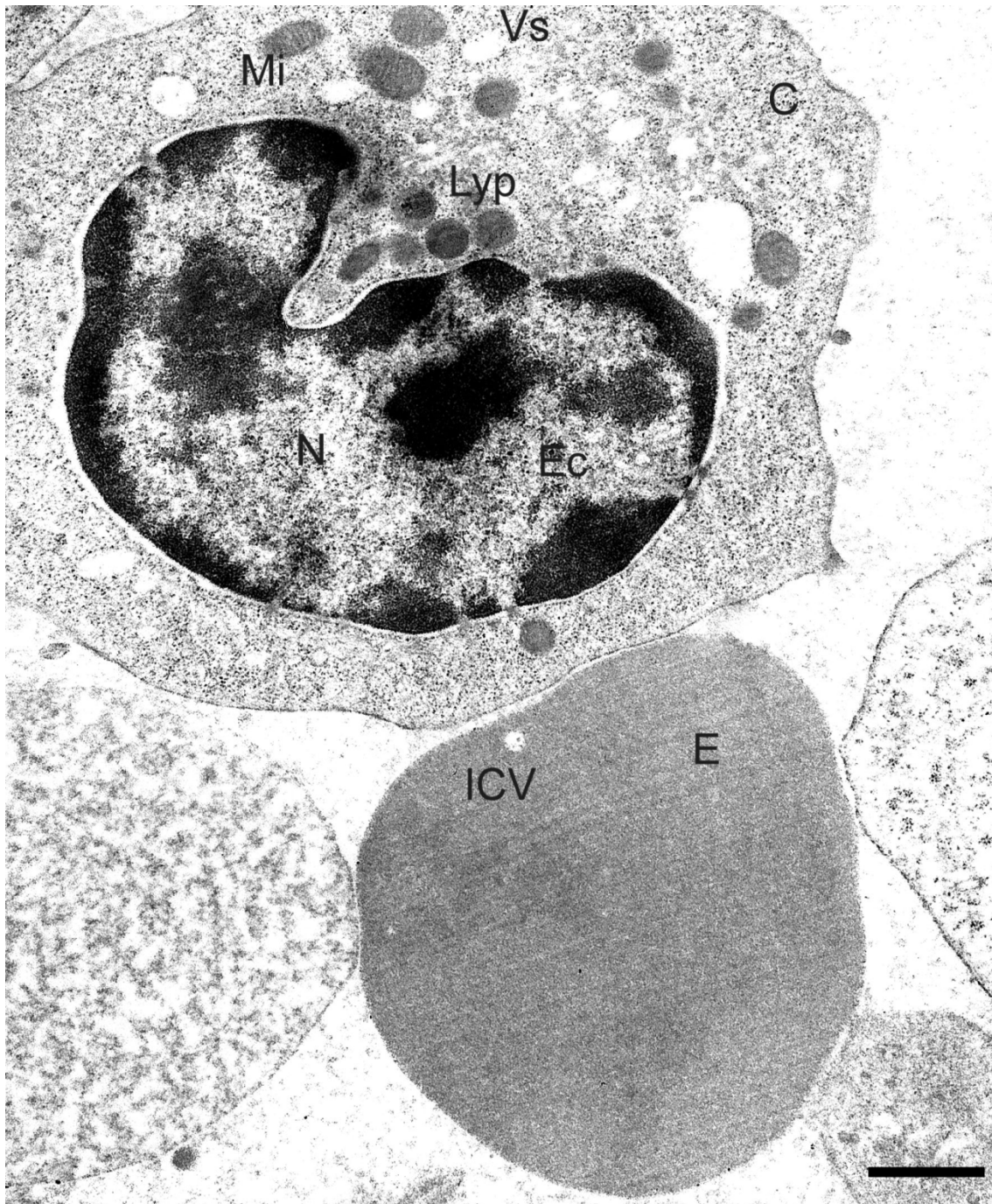


Abbildung 4.117: Monozyt (Hund);  
im Zytoplasma (C) des Monozyten finden sich mehrere Mitochondrien (Mi) und die charakteristischen Vakuolen (Vs). Auch primäre Lysosome(Lyp) sind hier gut zu erkennen.  
Im Zytoplasma des Erythrozyten (E) ist eine intrazytoplasmatische Vakuole (ICV) zu finden.  
Ec = Euchromatin  
N = Zellkern  
SB = 3 $\mu$ m

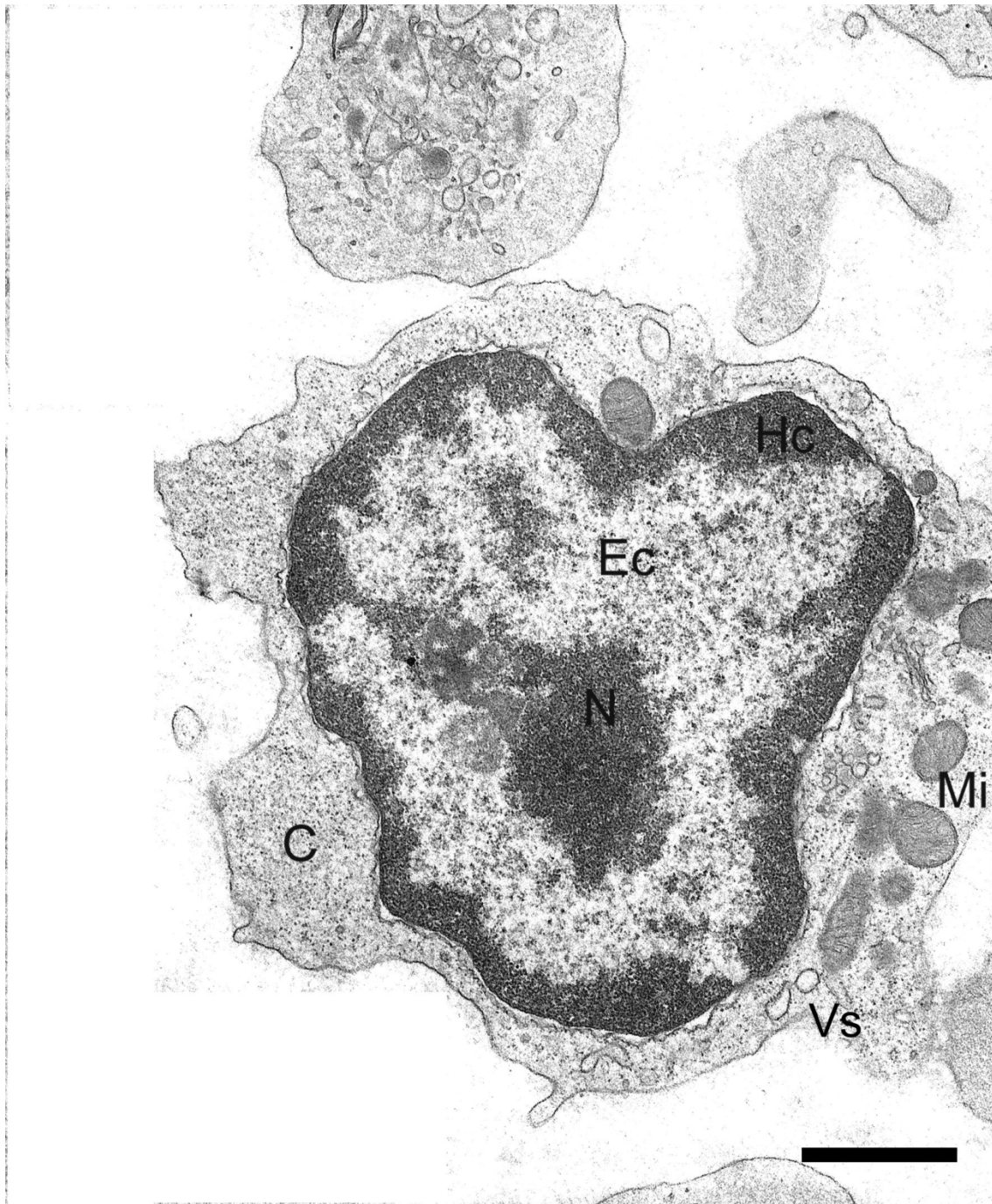


Abbildung 4.118: Monozyt (Hund);  
der Zellkern (N) des Monozyten ist von zellorganellreichen Zytoplasma (C) umgeben. Hier liegen mehrere Vesikel (Vs) neben deutlich zu erkennenden Mitochondrien (Mi)  
Ec = Euchromatin  
Hc = Heterochromatin  
SB = 3µm

---

#### **4.5. Thrombozyten**

Der Thrombozyt enthält keinen Zellkern. Meist hat er eine runde bis ovoide Form. Häufig ragen lange Zytoplasmaausläufer aus der Zellmembran. Im Zytoplasma selbst lassen sich zahlreiche Granula finden. Man unterscheidet Granula mit homogenen elektronendichten Inhalt ( $\alpha$ -Granula), die sich vor allem im Bereich des Granulomers befinden von Vakuolen mit elektronendurchlässigen Inhalt ("dense bodies"). Der häufig exzentrisch gelegene Kern dieser Granula ist von einer deutlichen Membran umgeben. Neben den Granula und Vakuolen kommen auch mehrere Mitochondrien und variable Mengen an Glykogen im Zytoplasma vor. Ebenso lassen sich Mikrotubuli und Mikrobläschen finden.

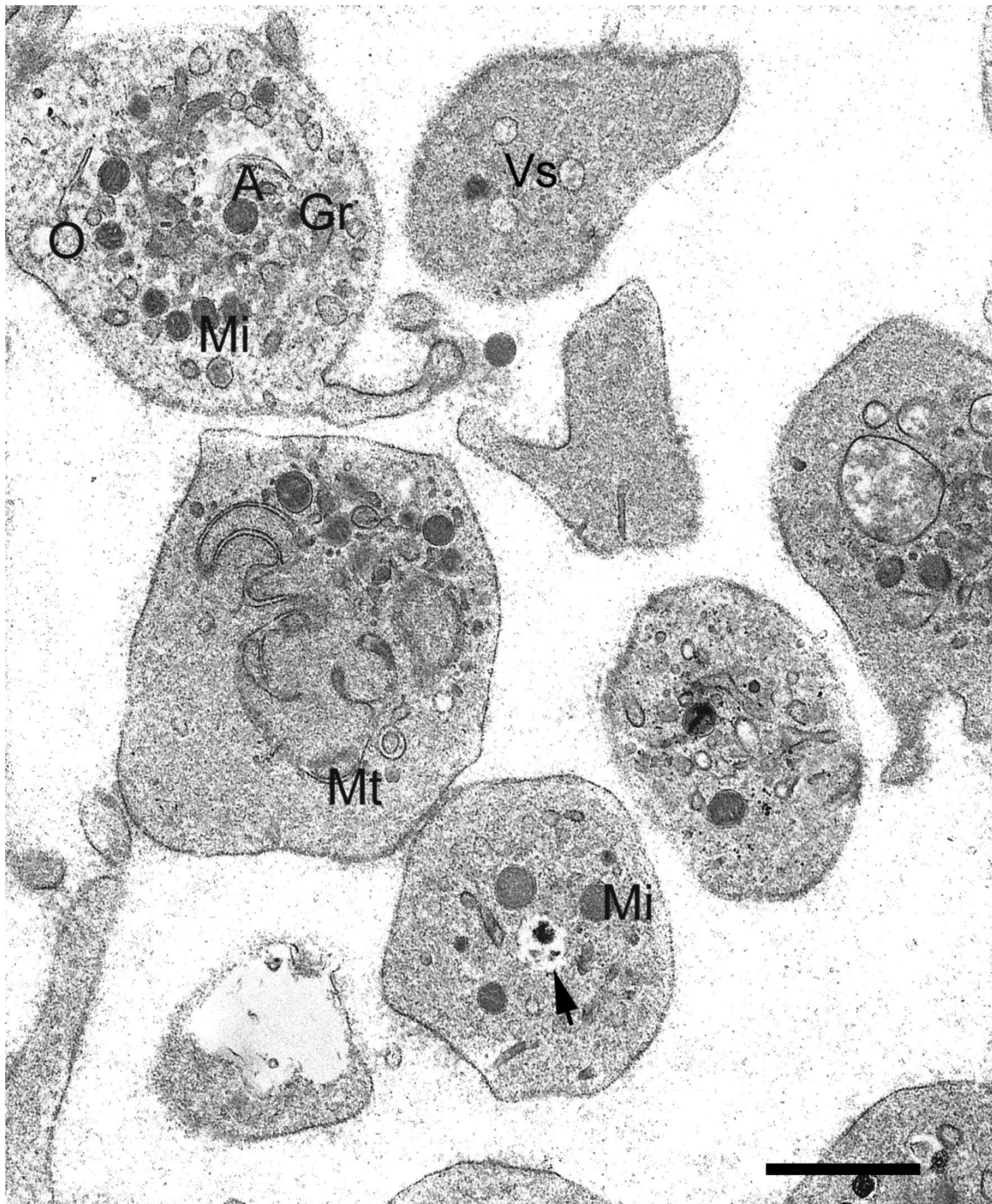


Abbildung 4.119: Thrombozyten (Hund); das relativ zellorganellenreiche Zytoplasma der Thrombozyten setzt sich aus den elektronendichten  $\alpha$ -Granula (A), Mitochondrien (Mi) und Vesikeln (Vs) zusammen. Neben den  $\alpha$ -Granula gibt es auch noch andere Granula mit elektronendichten Inhalt (Gr) und sog. "dense bodies" (Pfeil). Außerdem ist die Einstülpung der Zellmembran als offenes kanalikuläres System (O) gut zu erkennen. Die Mikrotubuli (Mt), welche vor allem im Hyalomer zu finden sind, geben der Zelle ihre Struktur.  
 SB = 3 $\mu$ m

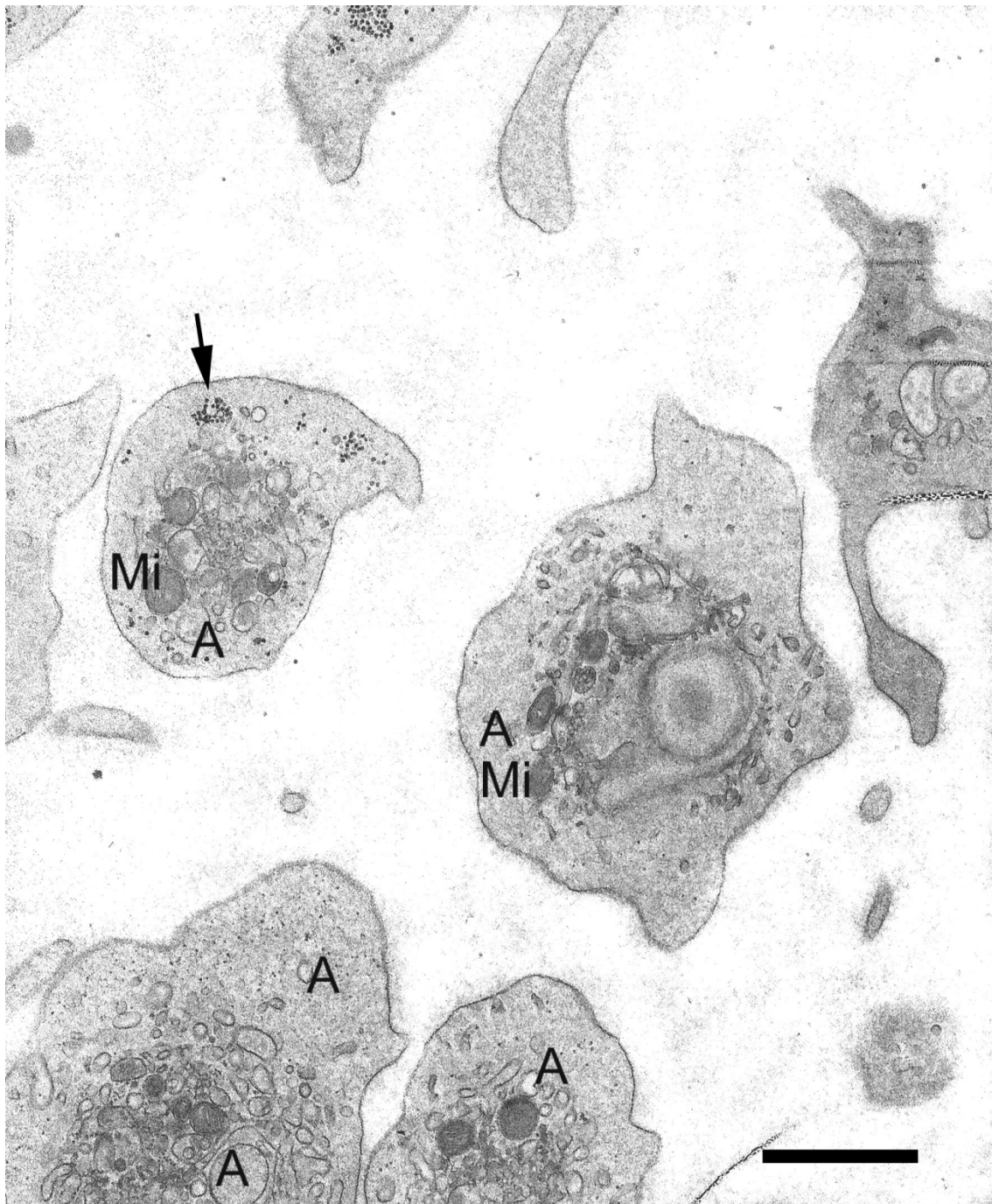


Abbildung 4.120: Thrombozyten (Hund);  
die runde bis ovoide Gestalt der Thrombozyten ist gut zu erkennen. Im Zytoplasma lassen sich die typischen  $\alpha$ -Granula (A) finden. Auch Mitochondrien (Mi) und Glykogenpartikel (Pfeil) kommen im Zytoplasma vor.  
SB = 3 $\mu$ m



---

## Kapitel V: Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist die ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchung der kaninen Blutzellen. Die Morphologie der kaninen Blutzellen wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit mittels Elektronen- und Lichtmikroskopie untersucht. Zur lichtmikroskopischen Untersuchung der hergestellten Präparate wurden unterschiedliche lichtmikroskopische Techniken genutzt und verschiedene Übersichtsfärbungen und FITC-gekoppelte bzw. biotinylierte Lektinfärbungen verwendet, um Zuckerstrukturen auf der Oberfläche der verschiedenen Blutzellen des Hundes darzustellen. Zusätzlich wurde versucht, ob mit Hilfe von drei Antikörpern gegen bestimmte CD-Antigene ( $CD4^+$  und  $CD8^+$ , B-Lymphozyten-Subpopulation) verschiedener Lymphozytenpopulationen des Hundes im Blutaussstrich unterschieden werden kann.

Die Untersuchungen wurden am Blut von 23 Hunden verschiedener Altersgruppen und beider Geschlechter durchgeführt. Die Gruppe der jüngeren Hunde war nicht älter als 5 Jahre, die Hunde mittleren Alters 5-9 Jahre und die der älteren Hunde über 10 Jahre. Bei den Blutaussstrichen und den ultrastrukturellen Untersuchungen ließen sich keine Geschlechtsunterschiede feststellen. Für einen Teil der Tiere sind Blutbilder angefertigt worden, in denen allerdings keine signifikanten Unterschiede bei den Tieren der unterschiedlichen Altersgruppen festgestellt werden konnten.

### 1. Lichtmikroskopie der kaninen Blutzellen

Für die lichtmikroskopischen Untersuchung der kaninen Blutzellen wurden zunächst verschieden histologische Übersichtsfärbungen durchgeführt. So wurden die Blutaussstriche der Giemsa-Färbung, der May-Grünwald-Färbung, der Pappenheim-Färbung und der Diff-Quick-Färbung unterzogen. Mit einer Anzahl von ca.  $6-9 \times 10^6/\mu\text{l}$  Blut (Kraft und Dürr, 2005) sind die **Erythrozyten** des Hundes die am häufigsten vorkommenden Blutzellen und in jedem Blutaussstrich zahlreich vorhanden. Sie stellen sich als typische, kernlose, bikonkave Scheiben mit einem mittleren Durchmesser von  $7\mu\text{m}$  dar und sind somit nur geringfügig kleiner als menschliche Erythrozyten, welche einen Durchmesser von 7,5 bis  $8\mu\text{m}$  haben (Kühnel, 2002; Ralston, 1983). In den meisten Blutaussstrichen der vorliegenden Arbeit lässt

---

sich eine zentrale Aufhellung der Erythrozyten erkennen. Dies erklärt sich durch den geringeren Hämoglobingehalt und die geringere Dicke in der Mitte der roten Blutkörperchen (Mischke, 2006). Die zentrale Aufhellungszone kann ein Drittel bis  $\frac{1}{2}$  des Erythrozyten ausmachen. Bei den als Sphärozyten bezeichneten roten Blutzellen fehlt die beschriebene zentrale Eindellung mit der Aufhellungszone, was zur Unterscheidung von den als Normozyten bezeichneten regulär-morphologischen roten Blutzellen dienen kann (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Sphärozyten sind kugelige Zellen ohne zentrale Aufhellung - sie sind reicher an Hämoglobin und daher intensiver gefärbt als normale Erythrozyten. Meistens erscheinen sie auch kleiner (Kraft und Dürr, 2005). Die kugelige Gestalt der Sphärozyten ist auf den Verlust eines Membranbereiches zurückzuführen, der auf einen Defekt der Erythrozytenmembran deutet. Natrium und Wasser können in die roten Blutkörperchen eindringen und quellen die Zelle somit auf (Smith, 1983). Durch an diesen Bereich angelagerte Antikörper oder Immunkomplexe kommt es zur teilweisen Phagozytose durch Makrophagen und anschließendem Verschluss des Defektes durch den Erythrozyten, ohne Verlust des Zellinhaltes (Mischke, 2006). Sphärozyten finden sich insbesondere bei immunvermittelten oder hämolytischen Anämien des Hundes (Moritz, 2007). In geringem Maße findet sich bei kaninen Erythrozyten das Phänomen der Anisozytose oder der Poikilozytose. Die Anisozytose beschreibt die Abweichung von der Normalgröße der roten Blutkörperchen innerhalb eines Ausstrichs, die Poikilozytose ist die abnorme Form von Erythrozyten, die deutlich von der normalen bikonkaven Form der Erythrozyten abweicht, wie zum Beispiel Keulen-, Hantel-, Sichel- oder Birnenform (Kraft und Dürr, 2005; Mischke, 2006; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000; Nickel et al., 1996). Im Gegensatz zur Poikilozytose konnte die Anisozytose in einigen Ausstrichen gesunder Hunde regelmäßig beobachtet werden. Zum Teil wurde in einigen Erythrozyten auch Howell-Jolly-Körperchen gefunden. Diese entsprechen unvollständig entfernten Kernresten (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000), die auch beim gesunden Hund in geringem Maße vorkommen können. Howell-Jolly-Körperchen stellen sich als kleine, dunkelblau gefärbte Kernreste innerhalb der Erythrozyten dar (Kraft und Dürr, 2005). Nach Blutungen im Regenerationsstadium, nach Splenektomien oder unter Glucocorticoidtherapie treten sie im klinischen Blutbild gehäuft auf (Kraft und Dürr, 2005; Mischke, 2006).

Retikulozyten finden sich im Blutbild des Hundes dagegen selten. Physiologischerweise kommen sie mit weniger als 1% im peripheren Blut vor. In den Blutausstrichen der vorliegenden Arbeit waren keine Retikulozyten zu finden. Als Folge eines zu langsamen

---

Trocknens der Blutausstriche bzw. infolge der präparatorisch bedingten pH-Änderung können die sogenannten Stechapfelformen oder Echinozyten Typ I der roten Blutkörperchen entstehen. Diese zeichnen sich durch charakteristische Fortsätze der Zellmembran aus (Thrall et al., 2004; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Beim Hund können sie allerdings auch beim Vorliegen eines malignen Lymphoms, bei chronischen Nierenerkrankungen, Glomerulonephritis, zytostatischen Therapien oder Elektrolytmangel vorkommen (Mischke, 2006). Echinozyten, die infolge einer Intoxikation mit dem Rattengift Dicumarol auftreten, werden als Echinozyten des Types III bezeichnet. Bei ihnen besitzt die gesamte Oberfläche Fortsätze, die ihren Ursprung in der Ausdehnung der äußeren Membranschichten nehmen (Mischke, 2006; Thrall et al., 2004). In einigen Fällen können sich sogenannte Sphäroechinozyten bilden, bei denen normal geformte Sphärozyten mit Zellausläufern gebildet werden (Thrall et al., 2004). Die Geldrollenbildung der Erythrozyten kann in geringer Ausprägung bei Hund und Katze als physiologisch angesehen werden. Tritt sie in verstärktem Maße auf, kann sie als ein Hinweis auf entzündliche oder tumoröse Grunderkrankungen interpretiert werden (Mischke, 2006). Durch Zunahme der Plasmaproteine sinkt die negative Oberflächenladung der roten Blutkörperchen und die Zellmembran verliert ihre sich gegenseitig abstoßende Wirkung, wodurch sich die Erythrozyten nun aneinander lagern können. Im Gegensatz zum Hund ist eine ausgeprägte Geldrollenbildung bei equinen Erythrozyten ein normaler Befund (Thrall et al., 2004; Mischke, 2006).

Bei den **Granulozyten** konnten alle physiologischen Formen (neutrophile, eosinophile, basophile Granulozyten) in den gefärbten Blutausstrichen gefunden werden. Der Hund weist ein neutrophiles Blutbild auf. In diesem kommen die segmentkernigen **neutrophilen Granulozyten** mit 55-75% am häufigsten vor (Kraft und Dürr, 2005; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Die Granula der Neutrophilen stellen sich in den lichtmikroskopischen Übersichtsfärbungen nur sehr schlecht bis gar nicht dar. Am besten ließen sie sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit der May-Grünwald-Färbung darstellen. Die Granula beim Geflügel, Meerschweinchen und Kaninchen stellen sich azidophil dar, sie werden auch als Pseudoeosinophile bezeichnet (Dellmann und Carithers, 1996). Im Gegensatz zum Hund sind die bovinen Granula deutlich zu erkennen (Thrall et al., 2004). Der Kern des segmentierten neutrophilen Granulozyten besteht beim Hund typischerweise aus 3-5 Segmenten. Eine erhöhte Anzahl von Kernsegmenten deutet auf eine Überalterung der Blutzelle hin oder eine verlängerte Blutzirkulation vor dem Austritt ins

---

Gewebe, was nach einer Kortikoidtherapie, Hyperadrenokortizismus oder bei einer chronischen Entzündung vorkommen kann (Mischke, 2005). Die einzelnen Kernsegmente sind über dünne Chromatinbrücken verbunden. Ein sogenannter „drumstick“ kann manchmal in den neutrophilen Granulozyten weiblicher Tiere gefunden werden. Er entspricht dem Kerngeschlecht und enthält ein inaktiviertes X-Chromosome (Smith, 2000). Mit lediglich 0-4% kommt die juvenile Form der neutrophilen Granulozyten, die stabkernigen Granulozyten, eher selten vor (Kraft und Dürr, 2005). Der Zellkern des stabkernigen Neutrophilen hat eine hufeisenförmige Gestalt und keine Einziehungen. In den Präparaten der vorliegenden Arbeit lässt sich die gebogene stabförmige Gestalt des juvenilen Neutrophilen gut erkennen. Aus ihnen entsteht durch Einschnürungen des Zellkerns mit zunehmender Reifung der segmentkernige neutrophile Granulozyt (Thrall et al., 2004; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Bei der Jugendform der Neutrophilen, den Stabkernigen, erscheint auch das Chromatin des Zellkerns aufgelockerter als bei den reifen neutrophilen Granulozyten (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Dies konnte in den Präparaten der vorliegenden Dissertationsarbeit nicht beobachtet werden. Das Zytoplasma der stabkernigen neutrophilen unterscheidet sich dagegen nicht von dem der Segmentkernigen.

**Eosinophile Granulozyten** kommen beim gesunden Hund mit ca. 0-6% aller weißen Blutzellen vor (Kraft und Dürr, 2005). Ihre Verweildauer im Blut ist nur sehr kurz und beträgt nur mehrere Stunden (Mischke, 2005). Im Zytoplasma der Eosinophilen sind zahlreiche, deutlich azidophil gefärbte Granula zu erkennen, wodurch sie leicht von den Neutrophilen zu unterscheiden sind. Die Granula lassen sich sehr gut mit verschiedenen sauren oder azidophilen Farbstoffen anfärben (Nickel et al., 1996). Hinsichtlich der Tierart gibt es deutliche Unterschiede in Gestalt, Größe und Anzahl der eosinophilen Granula, die besonders in der ultrastrukturellen Untersuchung deutlich werden. So kommen beim Pferd sehr prominente Granula vor, bei Hund und Katze lassen sich elektronenmikroskopisch lamellenartige, teilweise auch kristalloide Strukturen nachweisen, die möglicherweise der Stabilität der Granulationen dienen. Bei Pferd, Rind und Schwein fehlen vergleichbare Strukturen in den Granula völlig (Liebich, 2004). Im Gegensatz zu den eosinophilen Granulozyten des Rindes (Bitzmann, 2009), können beim Hund Anzahl und Größe der Eosinophilen deutlich variieren. Dies wurde schon von Meinkoth und Clinkenbeard, 2000 und Thrall et al., 2004 beschrieben. Die eosinophilen Granula in der vorliegenden Arbeit sind lichtmikroskopisch sehr gut zu erkennen. Sie kommen im gesamten Zytoplasma zahlreich vor und überdecken den Zellkern. Die unterschiedliche Größe der Granula dagegen lässt sich nur

---

erahnen. Bei der Katze erscheinen die Granula eher walzenförmig. Equine eosinophile Granula sind im Gegensatz zu Hund und Katze deutlich größer und heller gefärbt, sie überlagern den Zellkern.. Auch beim Rind stellen sich die Granula heller und größer dar, liegen aber vor allem im Zytoplasma (Thrall et al., 2004). Die bei Kraft et al. beschriebenen zum Teil auftretenden blau grauen Granula beim Hund konnten in den Blutausstrichen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Ein häufig beobachtetes Phänomen beim Greyhound sind zahlreiche leere Vakuolen im eosinophilen Zytoplasma, was wohl auf den Färbeprozess zurückzuführen ist (Thrall et al., 2004). Im gewissen Maße sind Vakuolen im Zytoplasma der kaninen Eosinophilen physiologisch.. Eosinophile Granulozyten sind geringradig größer als die Neutrophilen. Ihr Zellkern ist mit 2-3 Kernsegmenten meist deutlich weniger segmentiert (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Ein gehäuftes Auftreten der Eosinophilen im Blut (Eosinophilie), findet man vor allem bei Parasitenbefall, Allergien und bestimmten Tumoren. Bei verschiedenen Hunderassen, wie zum Beispiel Rottweiler und Deutscher Schäferhund, wurde ein vermehrtes Auftreten eosinophiler Granulozyten im Blut beschrieben (Mischke, 2005).

Mit weniger als 1% der weißen Blutzellen sind **basophile Granulozyten** beim Hund in Analogie zu den meisten anderen Haussäugetierarten nur sehr selten im Blut zu finden. In den Blutausstrichen der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls nur gelegentlich basophile Granulozyten gefunden werden, die wenige, dunkle Granula im Zytoplasma aufweisen. Ihr Kern ist von hufeisenförmiger Gestalt, stellt sich aber auch häufig segmentiert dar. Das Zytoplasma enthält wenige, dunkel gefärbte Granula. Im Gegensatz dazu enthalten feline Basophile mehrere und größere Granula. Bei größeren Tieren wie Pferd oder Rind ist das Zytoplasma mit zahlreichen großen basophilen Granula ausgefüllt (Thrall et al., 2004). Beim Hund sind die basophilen Granulozyten größer als die neutrophilen (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000).

Die **Thrombozyten** stellen sich bei allen Haussäugetieren als kleine, kernlose Zellfragmente dar. Sie entstehen durch Abschnürung von Megakaryozyten im Knochenmark. Mit einer Anzahl von 150 000-500 000/µl sind die kaninen Thrombozyten zahlreich im Blut vertreten und ließen sich in allen Präparaten der vorliegende Arbeit finden (Kraft et al., 2005). In ihrer Größe von 1µm-4µm ähneln sich die Blutplättchen von Hund, Mensch und Schwein. Im Gegensatz dazu sind die Thrombozyten von Pferd, Rind, Schaf, Meerschweinchen, Ratte und Maus kleiner als die kaninen Blutplättchen. Die Katze hat die größten Thrombozyten (Hees und Tschudi, 1990). Unreife bzw. junge Thrombozyten des Hundes sind größer als die

---

reifen Formen (Moritz, 2007). Lichtmikroskopisch lassen sie sich an ihnen zwei Bereiche unterscheiden, das zentrale Granulomer, in dem sich die Zellorganellen befinden und das äußere Hyalomer (Hees und Tschudi, 1990). In den Blutaussstrichen der vorliegenden Dissertationarbeit kann man diese Unterteilung nur sehr schlecht erkennen. Aktivierte Blutplättchen bilden an ihrer Zellmembran Pseudopodien aus (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). In den Blutaussstrichen der vorliegenden Arbeit lassen sich sowohl Thrombozyten mit glatter Zellmembran, als auch Blutplättchen mit Pseudopodien finden. Beim Hund erscheinen junge Thrombozyten größer als die reifen Blutplättchen. Innerhalb der kaninen Thrombozyten kommen azurophile Granula vor. Bei Aktivierung der Blutplättchen kommt es zur Freisetzung dieser Granula. Das Fehlen der Granula spricht also für aktivierte Thrombozyten (Moritz, 2007). Häufig treten die Blutplättchen in Gruppen auf.

Bei den kaninen **Lymphozyten** können lichtmikroskopisch kleine (um 10µm), mittlere und große (über 10µm) Lymphozyten unterschieden werden (Kraft et al., 2005). Alle Lymphozyten enthalten einen großen runden Kern, der die Zelle fast vollständig ausfüllt. Zum Teil kann der Kern auch auf einer Seite eingebuchtet sein. Der Gehalt an Zytoplasma, welches den Zellkern umgibt, kann variieren. Auch die Dichte des Zellkerns ändert sich je nach Lymphozytengröße. So ist das Chromatin bei den kleinen Lymphozyten noch sehr dicht gepackt, lockert sich aber bei den mittleren und großen Lymphozyten immer mehr auf. Aktivierte Lymphozyten erscheinen im Blutaussstrich größer als inaktive (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Beim Rind sind die Lymphozyten größer als bei anderen Tierarten, sie können die Größe von Neutrophilen erreichen (Thrall et al., 2004). Mit Spezialfärbungen lassen sich vereinzelt Granula im Zytoplasma der großen Lymphozyten nachweisen (Nickel et al., 1996). Aktivierte große Lymphozyten mit basophilem Zytoplasma können in geringer Anzahl beim gesunden Hund gefunden werden. Sie kommen vor allem nach Impfungen vor (Mischke, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnten keine aktivierten, großen Lymphozyten gefunden werden.

**Monozyten** sind die größten Blutzellen, die im peripheren Blut des Hundes beobachtet werden können. Mit einer Anzahl von 0-4% der weißen Blutkörperchen ist ihre Zahl im peripheren Blut relativ gering. Die Gestalt ihres Kerns ist variabel. Das Chromatin des Zellkerns erscheint aufgelockerter als das der neutrophilen Granulozyten. Typischerweise enthält das Zytoplasma der kaninen Monozyten Vakuolen (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000). Mit besonderen Färbemethoden lassen sich im Zytoplasma auch bei den Monozyten feine Granula nachweisen (Hees und Tschudi, 1990). Die Ausbildung von Pseudopodien auf

---

der Zellmembran konnte in den Präparaten der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Bei den Monozyten wurden keine größeren morphologischen Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Haustierarten beschrieben (Thrall et al., 2004).

## 2. Elektronenmikroskopie der Blutzellen des Hundes

Die **Erythrozyten** des Hundes stellen sich unter dem Elektronenmikroskop als kernlose Scheiben dar. Durch die fehlenden Zellorganellen und den hohen Hämoglobingehalt der Blutzelle weisen sie einen homogenen Zellinhalt auf. Zellkern und Zellorganellen sind während des Reifungsprozesses im Knochenmark verloren gegangen (Hees und Tschudi, 1990; Dellmann and Carithers, 1996). Die letzten Fragmente der ehemaligen Zellorganellen werden physiologischerweise innerhalb von 24 Stunden aus dem Erythrozyten entfernt (Liebich, 2004). Im Gegensatz zu den roten Blutkörperchen von Amphibien und Fischen können bei Säugetieren keine Mikrotubuli an der Zellmembran nachgewiesen werden (Bessis, 1973). Der Hauptbestandteil der roten Blutkörperchen ist das Hämoglobin, welches für den Sauerstofftransport benötigt wird. Durch Strukturproteine wird das Membranskelett gebildet, durch das sie eine gewisse Stabilität und Verformbarkeit erhalten (Hees und Tschudi, 1990, Dellmann and Carithers, 1996). Der Hund hat mit einem Durchmesser von ca. 7,3 µm nach den humanen Erythrozyten mit 7,5µm - 8µm die größten roten Blutkörperchen. Die Ziege mit nur 3,9µm Durchmesser besitzt die kleinsten Erythrozyten (Kramer, 2000; Meinkoth und Clinkenbeard, 2000; Kühnel, 2002).

Durch ihren charakteristischen Kern waren die segmentkernigen **neutrophilen Granulozyten** auch im Elektronenmikroskop leicht zu erkennen. Wie bei Bessis 1973 beschrieben, können auch in den Präparaten der vorliegenden Arbeit Kernporen nachgewiesen werden (Bessis, 1973). Das Zytoplasma ist von zahlreichen verschieden großen Granula ausgefüllt. Die verschiedenen Arten der Granula können elektronenmikroskopisch unterschieden werden, doch wären zu einer weiteren Differenzierung enzymhistochemische Untersuchungen auf ultrastrukturellem Niveau wünschenswert. Die Primärgranula stellen sich als größere (0,5 µm) und durch elektronendichtere Form dar, neben diesen kommen auch noch kleinere spezifische Granula vor (Dellman und Carithers, 1996). Beim Rind gibt es neben den primären und sekundären Granula noch eine dritte Granulaart. Im Zytoplasma der bovinen Neutrophilen finden sich deutlich mehr Granula als bei den anderen Tierarten (Smith, 2000). Im Gegensatz zu den Erythrozyten besitzen die Neutrophilen wie auch die

---

Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten Zellorganellen, welche sich elektronenmikroskopisch sehr gut erkennen lassen. In den Präparaten der vorliegenden Arbeit konnten im Zytoplasma der Neutrophilen sehr gut Mitochondrien, Golgi-Apparat und die typischen Granula identifiziert werden. Wie bei Steffens im Jahre 2000 beschrieben, erscheinen die Sekundärgranula elektronendichter und sind deutlich kleiner als die Primärgranula. Auch kleine Vesikel ohne Zellinhalt waren zu finden, sie entsprechen degranulierten Sekundärgranula, welche vor allem bei Entzündungen oder Infektionsprozessen zu beobachten sind (Steffens, 2000). Als juvenile Form der neutrophilen Granulozyten weisen die Stabkernigen aufgrund noch fehlender Immun- und Phagozytosereaktionen einen unsegmentierten, bohnenförmigen Zellkern auf (Kraft et al., 2005).

Bei den kaninen **eosinophilen Granulozyten** stellen sich lamellenartige Eiweißkristalloide in den Granula elektronenmikroskopisch sehr deutlich dar. Im Gegensatz zu Pferd, Rind oder Schwein kommen diese kristalloiden Innenkörper nur noch bei der Katze und beim Menschen vor (Hees und Tschudi, 1990). Wie bei Hung 1970 beschrieben ist der Granulainhalt elektronendicht. Zum Teil findet sich der elektronendichte Inhalt nur auf einer Seite des Granuloms und füllt es nicht vollständig aus (Hung, 1970). Neben diesen Granula mit kristalloiden Innenkörpern treten auch noch homogene Granula auf, die ohne besondere Innenstruktur sind. Die Größe der beschriebenen Granula variierte in den Ergebnissen der vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchung der kaninen Blutzellen zwischen 1µm und 2µm. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Hung. Der Zellkern der Eosinophilen ist im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten weniger segmentiert und ähnelt eher dem basophilen Zellkern (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000, Rowley und Ratcliff, 1988; Steffens, 2000). Wie bei Steffens 2000 beschrieben konnten auch in den Präparaten der vorliegende Arbeit kurze Mikrovilli auf der Zellmembran der Eosinophilen beobachtet werden (Steffens, 2000). Ein Nukleolus im Zellkern konnte, wie auch bei den Neutrphilen, bei den eigenen Untersuchungen nicht identifiziert werden.

Bei den **basophilen Granulozyten** sind die großen basophilen Granula sehr prominent. Sie ähneln den Granula der Mastzellen und enthalten auch gleiche Inhaltsstoffe (Dellmann und Carithers, 1996; Hees und Tschudi, 1990). Sie unterscheiden sich aber hinsichtlich myeloischer Entwicklung und dem Auftreten peroxidasepositiver Granula von den Mastzellen (Liebich, 2004). Die Morphologie der Granula ist tierartlich sehr unterschiedlich. So kommen beim Hund nur wenige Granula im Zytoplasma vor (Thrall et al.,



---

2004). Die Größe der basophilen Granula der für diese Arbeit verwendeten Präparate variiert zwischen 0,3µm bis 1µm. Bessis gibt die Größe der basophilen Granula mit 0,2µm bis 1µm an. Kleine Vakuolen innerhalb der Granula konnten auch beim Hund nachgewiesen werden (Bessis, 1973). Im Gegensatz zum Hund weist die Katze deutlich mehr Granula im Zytoplasma auf. Der Zellkern bei Hund und Katze besteht aus weniger Segmenten als bei den Neutrophilen (Thrall et al., 2004). Mit zunehmendem Alter der Blutzelle nehmen die Zellorganellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum ab (Steffens, 2000). Beim Menschen elektronenmikroskopisch deutliche sichtbare Mikrotubuli im Basophilen konnten beim Hund nicht nachgewiesen werden (Hastie und Chir, 1974). In dem in dieser Arbeit gefundenen Basophilen konnten lediglich basophile Granula und Vesikel im Zytoplasma gefunden werden.

Obwohl **Lymphozyten** zu den Agranulozyten gezählt werden, da lichtmikroskopisch keine Granula zu sehen sind, können elektronenmikroskopisch rar verteilte feine Zytoplasmatische Granulationen nachgewiesen werden. Der Chromatin reiche Zellkern färbt sich mit basischen Farbstoffen sehr gut an, wodurch der Nukleolus bei den verschiedenen Übersichtsfärbungen nicht dargestellt wird. In der Elektronenmikroskopie dagegen zeigt er sich deutlich (Hees und Tschudi, 1990). Steffens beschreibt 2000 lediglich bei den mittleren und großen Lymphozyten Nukleoli. In den Präparaten der vorliegende Arbeit konnten dagegen bei allen drei Lymphozytengruppen Nukleoli nachgewiesen werden. Im Zytoplasma ist eine geringe Anzahl von Zellorganellen sichtbar, wobei sich die Mitochondrien in allen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit besonders prominent darstellen.

Der **Monozyt** wird wie der Lymphozyt zu den Agranulozyten gezählt, elektronenmikroskopisch können aber durchaus vereinzelt Granula gefunden werden (Liebich, 2004; Hees und Tschudi, 1990). Beim Hund finden sich typischerweise zahlreiche Vakuolen im Zytoplasma (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000), was sich auch bei den elektronenmikroskopischen Bildern der vorliegenden Arbeit beobachten lässt. Inaktive Zellen weisen eine glatte Zellmembran auf. Aktive Monozyten bilden auf ihrer Oberfläche mehrere Pseudopodien aus (Hees und Tschudi, 1990).

Im Gegensatz zu den **Thrombozyten** der Vögel sind die Blutplättchen der Haussäugetiere und des Menschen kernlos. Sie stellen sich als kleine Zytoplasmafragmente dar, welche durch Abschnürungen aus dem Megakaryozyten entstehen (Dellmann und Carithers, 1996; Liebich, 2004). Kanine Thrombozyten sind rund bis oval, und 1µm-4µm groß. In Ausnahmefällen kommen beim Hund aber auch deutlich größere Blutplättchen vor,

---

die sogar die Größe der roten Blutkörperchen übertreffen können. Diese finden sich vor allem bei Tieren mit immunmediierter Thrombozytopenie, Neoplasien oder Entzündungsgeschehen (Meinkoth und Clinkenbeard, 2000; Weiss und Townsend, 1998). Unter dem Elektronenmikroskop ist der Unterschied zwischen Hyalomer und Granulomer gut zu erkennen. Das Hyalomer entspricht der Grundsubstanz, welche das Granulomer umgibt, in dem zahlreiche spezifische  $\alpha$ -Granula, „dense bodies“, Mitochondrien und Anschnitte des offenen kanalikulären Systems zu finden sind. In den Präparaten der vorliegenden Arbeit konnten die verschiedenen Granulaarten, Mitochondrien und Mikrotubuli sehr gut beobachtet werden. Die Mikrotubuli, welche sich vorwiegend im Hyalomer befinden, geben der Zelle Stabilität. Neben den Mikrotubuli sind auch Glykogenpartikel im Hyalomer vorhanden (Hees und Tschudi, 1990). Aktivierte Thrombozyten bilden auf ihrer Zelloberfläche Pseudopodien aus (Thrall et al. 2004). Kleinere und weniger dichte Blutplättchen mit weniger Granula entsprechen älteren Thrombozyten (Rowley und Ratcliff, 1988).

### 3. Glykohistochemie der kaninen Blutzellen

Zur Darstellung der verschiedenen Oberflächen-Glykokonjugate der kaninen Blutzellen wurden 14 verschiedene, FITC-gekoppelte Lektine verwendet (WGA, WGAs, SBA, DBA, PNA, GSL-I, RCA, SJA, UEA-1, Con A, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L). Weiterhin wurden die Blutausrichthe mit den biotinylierten Lektinen MAL-I, SNA und VAA untersucht. Zur besseren Darstellung der Kernstruktur wurde außerdem eine Kernfärbung mit Dapi vorgenommen.

Die kaninen **Erythrozyten** reagierten mit Con A, und RCA deutlich positiv, wobei bei Con A vor allem die Erythrozytenmembran deutliche Bindungsstellen aufwies. RCA dagegen zeigte sowohl mit der Zellmembran als auch mit dem Zytoplasma eine deutliche Reaktion. LCA, PSA, MAL-I, SNA und VAA banden an die meisten Erythrozyten nur schwach. UEA-1, WGA, SJA, PHA-E und PHA-L zeigten an die roten Blutkörperchen in der Regel keine Bindung. WGAs, SBA, DBA, PNA und GSL-I wiesen hingegen überhaupt keine Bindung auf. Die positive Reaktion von Con A mit den kaninen Erythrozyten stimmt mit den Ergebnissen von Sumner und Howell überein, die bereits 1936 die Reaktion von Con A mit den Blutzellen verschiedener Spezies untersucht hatten. Im Gegensatz zu den Erythrozyten von Hund, Pferd, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte reagierten die roten Blutkörperchen von Mensch und Rind mit diesem Lektin nicht (Sumner und Howell, 1936).

---

Newman und Uhlenbruck (1977) konnten nachweisen, dass eine vorangehende Behandlung mit Neuraminidase zu einer Bindung von PNA an Erythrozyten des Menschen führt. Eine erythrozytäre Bindung von PNA ließ sich mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen. Danach dürfte es im Unterschied zum Menschen beim Hund, bei dem sich an die endständige Sialinsäure anschließenden Zucker nicht um Galaktosehaltige Glykokonjugate handeln. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen aufgrund der speziellen Lektinbindungsqualitäten weiter darauf schließen, dass die Glycocalix der Zellmembran der roten Blutkörperchen des Hundes einen großen Anteil Glukose-, Mannose- und Galaktosehaltiger Zuckerstrukturen beinhaltet. Auch N-Acetylneuraminsäure konnte im Rahmen der Untersuchungen nachgewiesen werden, wohingegen Fukose-, N-Acetylglukosamin-, und N-Acetyl-Galactosaminreste sowie komplexe Kohlenhydratstrukturen (Nachweis mit PHA-E und PHA-L) kaum in größerer Menge vorhanden sein dürften.

Die **neutrophilen Granulozyten** des Hundes banden 9 der 14 eingesetzten Lektine. Lediglich DBA, PNA, SJA, MAL-I und SNA zeigten in allen untersuchten Ausstrichen keine Reaktion. Eine deutliche Reaktion des Zytoplasmas wiesen vor allem Con A, LCA, PSA, WGAs GSL-I, RCA und PHA-E auf. WGA reagierte mit dem Großteil der kaninen neutrophilen Granulozyten stark positiv. UEA-1, SBA, PHA-L und VAA dagegen zeigten dagegen kaum eine Bindung an die neutrophilen Granulozyten, nur ein geringer Teil dieser Lektine wies eine positive Bindung mit dem Zytoplasma auf. Dies lässt auf das Vorhandensein von N-Acetyl-Glukosamin-, Glukose-, Mannose-, und Galaktoseresten sowie von komplexeren Kohlenhydratstrukturen schließen, wobei N-Acetyl-Glukosamin bei den Neutrophilen des Hundes in der größten Konzentration vorhanden sein dürfte. N-Acetyl-Galactosamin und N-Acetylneuraminsäure waren dagegen in den neutrophilen Granulozyten nicht in einem nennenswerten Umfang nachweisbar. Da UEA-1 kaum eine Bindung an die neutrophilen Granulozyten aufwies, dürfte auch Fukose nur in geringem Maße auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten vorkommen. Altersunterschiede in der Lektinbindungsspezifität der neutrophilen Granulozyten des Hundes konnten mit Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden.

**Eosinophile Granulozyten** konnten aufgrund der relativ geringen Häufigkeit im Hundeblood nicht mit allen Lektinen sicher nachgewiesen werden. Aus vermutlich diesem Grund wurden unter Verwendung von WGA, RCA, LCA und PSA keine Anfärbung von eosinophilen Granulozyten beobachtet. Mit UEA-1, SJA, MAL-I, SNA und VAA konnte im Zytoplasma

---

der eosinophilen Zellgruppe eine deutliche Reaktion erzielt werden. Con A, WGAs, GSL-I, PHA-E, PHA-L und DBA wiesen nur in einem Falle eine Bindung auf. SBA-FITC und PNA-FITC führten zu keiner Bindung an die eosinophilen Granulozyten. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von denen, welche in der Literatur von verschiedenen Autoren bei den Neutrophilen erhoben wurden. Zwar binden auch hier Con A, WGAs, GSL-I und PHA-E an die Blutzelle, aber mit deutlich geringerer Intensität. UEA-1, SJA, MAL-I, SNA und VAA dagegen banden deutlich sichtbar an die eosinophilen Granulozyten. Die letztgenannten Lektine wiesen bei Neutrophilen überhaupt keine Bindung auf. Dies lässt glykochemisch auf das Vorhandensein von Fukose-, N-Acetyl-Galactosamin-, N-Acetylneuraminsäure- und Galaktoseresten in größerer Zahl bei den eosinophilen Granulozyten schließen. Auch Glukose-, Mannose-, und N-Acetyl-Glukosaminreste sowie komplexere Kohlenhydratstrukturen ließen sich bei den eosinophilen Granulozyten nachweisen. Ihre Konzentration war allerdings deutlich geringer als die der erstgenannten Lektine. Interessanterweise wurde bei menschlichen Eosinophilen eine deutliche Bindung von SBA und DBA nachgewiesen, während beide Lektine in der vorliegenden Untersuchung beim Hund nicht an diese Gruppe von Granulozyten binden konnte (Eguchi et al., 1989; Lee et al., 1987).

Auch bei den **Basophilen** konnte aufgrund des sehr seltenen Vorkommens dieser Zellspezies nicht mit jedem Lektin die Zuckerspezifität detektiert werden. Interessant war aber, dass alle gefundenen basophilen Granulozyten Bindungsstellen für Con A, UEA-1, WGA, GSL-I und VAA aufwiesen. Dies verweist auf das Vorhandensein der Monosaccharide Glukose, Mannose, N-Acetyl-Glukosamin, Galaktose und Fukose als Glykokonjugat-Bestandteil der Granula der basophilen Granulozyten.

Die **Lymphozyten** des Hundeserums banden nur wenige der eingesetzten FITC-Lektinkonjugate. So zeigten UEA-1, WGAs, DBA, PNA, GSL-I, SJA, PHA-L, MAL-I, SNA und VAA in allen untersuchten Präparaten keine Bindung. Auch die Lektine Con A, LCA, PSA, WGA, SBA, RCA und PHA-E wiesen nur bei vereinzelt Lymphozyten eine positive Bindungsreaktion auf. Diese Ergebnisse entsprechen zum Teil den Ergebnissen früherer Studien. So berichten auch Tajima et al. (1990) von der positiven Bindung von Con A an kanine und equine „non-B-Lymphozyten“. Es konnten aber zudem zahlreiche Bindungsstellen in der Zellmembran von B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Tajima et al., 1990). Auch Madewell et al. fanden in ihren Studien eine positive Reaktion von kaninen Lymphozyten mit Con A (Madewell et al., 1984). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit

---

konnten in Arbeiten von Rigal et al. erfolgreich kanine T-Lymphozyten mit PNA angefärbt werden (Rigal et al., 1983). Dieses Ergebnis wurde von Turnwald et al. 1988 bestätigt. Sie fanden, dass sich PNA als Marker für die T-Zellen des Hundes eignet. (Turnwald et al., 1988). In den vorliegenden Untersuchungen konnten dagegen in allen Präparaten keine PNA-Bindungsstellen auf den Lymphozyten nachgewiesen werden. Dies könnte eventuell an verschiedenen Fixierungs- oder Färbetechniken liegen, die bei den verschiedenen Studien vorgenommen worden sind. Das Bindungsverhalten der kaninen Lymphozyten deutet also glykochemisch auf das Vorkommen der Monosaccharide Glukose, Mannose, N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetylgalctosamin, Galaktose und komplexere Kohlenhydratstrukturen hin. Fukose und N-Acetylneuraminsäure dagegen konnten nicht nachgewiesen werden.

**Monozyten** zeigten mit LCA, UEA-1, DBA, RCA, SJA, MAL-I, SNA und VAA in allen Untersuchungen keine Reaktion. Auch PSA und SBA verhielten sich größtenteils negativ. Eine deutliche Bindung war dagegen bei WGA, WGAs, GSL-I, PHA-E und PHA-L zu beobachten. Da die Zahl der Monozyten im peripheren Hundeblut relativ gering ist, konnten sie nicht bei jeder Lektinfärbung sicher nachgewiesen werden. So ließen sich Monozyten bei den Färbungen mit PNA-FITC und Con A-FITC in allen Präparaten nicht beobachten. Das Bindungs- und Färbeergebnis der vorliegenden Untersuchungen lässt auf das regelmäßige Vorhandensein von N-Acetyl-Glukosamin-, und Galaktoseresten sowie von komplexeren Kohlenhydratstrukturen bei den Monozyten schließen. Auch Glukose-, Mannose- und N-Acetyl-Galactosaminreste dürften in den Glykokonjugaten der Monozyten in geringem Maße vorkommen. Fukose- und N-Acetylneuraminsäurereste dagegen konnten bei den Monozyten in keinem der Präparate nachgewiesen werden.

Die kaninen **Thrombozyten** färbten sich mit den meisten Lektin-FITC-Konjugaten nicht an. So war für Con A, UEA-1, WGAs, SBA, DBA, PNA, GSL-I, RCA, SJA, PHA-E, PHA-L, MAL-I, SNA und VAA keine Bindung an die Blutplättchen zu beobachten. Auch bei LCA und PSA wies der Großteil der Thrombozyten keine Anfärbung auf. Lediglich die Anwendung von WGA konnte deutliche Färbeergebnisse und damit positive Bindungsstellen aufzeigen. Damit konnten in den Ergebnissen der vorliegenden Dissertationsarbeit die Ergebnisse von Darbes et al. nicht bestätigt werden, die in ihren Studien positive Reaktionen der kaninen Thrombozyten mit LCA, PSA und PHA-L nachgewiesen hatten. Lediglich die deutlich positive Bindung mit WGA, die in der Untersuchung der Thrombozyten-Oberfläche beobachtet werden konnte, stimmt mit ihren Untersuchungen überein (Darbes et al., 1993).

---

Reisner et al. (1979) konnten mit PNA positive Bindungsstellen bei menschlichen Thrombozyten nachweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung deuten auf das Vorkommen vor allem von N-Acetyl-Glukosamin auf bzw. in der Zellmembran der kaninen Thrombozyten. In geringerer Konzentration und Verteilung kommen konjugiert auch Glukose- und Mannosereste vor.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen müssen einige Dinge berücksichtigt werden: Lektine bilden eine Gruppe pflanzlicher Eiweiße, deren Struktur physikochemischen Einflüssen unterliegt. Erhitzungen der Lektinlösung haben Veränderungen der Tertiärstruktur des Lektineiweißes zur Folge, die Einfluss auf die Bindungsspezifität haben können. Hinzu kommen pH-Abhängigkeiten der Zuckerbindung durch das Lektin. Alle in der vorliegenden Dissertationsarbeit durchgeführten Untersuchungen wurden unter standardisierten Bedingungen vorgenommen. In Vergleichsuntersuchungen aus zitierten Literaturstellen können abweichende Ergebnisse auf veränderte Untersuchungsbedingungen bei der Lektin histochemie beruhen. Die Auswertung von histologischen Färbeergebnissen in Standardtechniken und FITC-verwendenden Verfahren war nur qualitativ möglich. Allerdings wurden alle Ausstriche von mindestens zwei Untersuchern ausgewertet.

#### **4. Immunzytochemische Untersuchung der kaninen Blutzellen**

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden die T-Lymphozyten-spezifischen Antikörper gegen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> verwendet. Außerdem wurde in den Untersuchungen der B-Lymphozyten-spezifische Antikörper CADO34A eingesetzt. Alle Antikörper waren in den Untersuchungen der vorliegenden Dissertationsarbeit mit FITC-markiert. Zur besseren Differenzierung der Zellen wurden die Kerne zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gegen gefärbt. Das Blut des Hundes enthält zu ca. 80% T-Lymphozyten (Friess und Schlüns, 1990). Die T-Lymphozyten können mittels immunzytochemischer Methoden weiter in verschiedene Untergruppen unterschieden werden (Mischke, 2003; Grünbaum, 2007).

Der CD4-Antikörper zeigte mit dem Großteil der Erythrozyten schwache bis deutliche Reaktionen an der Zellmembran. Auch die neutrophilen Granulozyten und Monozyten wiesen deutlich Bindungsstellen für die CD4-Antikörper an ihrer Zellmembran auf. Bei den Lymphozyten dagegen reagierte der Großteil der Zellen negativ. Nur ein sehr geringer Teil

zeigte eine positive Reaktion mit der Zellmembran. Bindungsstellen mit eosinophilen und basophilen Granulozyten konnten nicht nachgewiesen werden. Das Vorkommen von CD4<sup>+</sup> Antigen auf kaninen T-Lymphozyten und auch auf Neutrophilen wurde bereits 1992 von Moore et al. beschrieben. Auch Rabanal et al. berichten über das Vorkommen von CD4<sup>+</sup>-Antigen auf den kaninen T-Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen (Rabanal et al., 1995). Dies kann durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, auch wenn in der Gruppe der Lymphozyten nur ein geringer Teil positive Bindungsreaktionen mit der Zellmembran aufwies. Der CD8-Antikörper zeigte bei allen Blutzellen eine deutlich schwächere Reaktion auf. So fielen die Färbeergebnisse sowohl der Thrombozyten, als auch der Lymphozyten und Monozyten negativ aus. Auch der Hauptteil der neutrophilen Granulozyten wies keine Bindungsstellen auf. Lediglich die Erythrozyten zeigten zum Teil deutlich positive Bindungsreaktionen der Zellmembran, obwohl auch bei diesen Blutzellen der Großteil der Färbungen negativ ausfiel. Rabanal et al. wiesen in ihren Untersuchungen CD8<sup>+</sup> positive Lymphozyten nach, allerdings in deutlich geringere Anzahl als CD4<sup>+</sup> positive Lymphozyten (Rabanal et al., 1995). In Übereinstimmung zu Rabanal et al. bestätigen auch Faldyna et al. die Präsenz von CD8<sup>+</sup> positiven Lymphozyten, welche vor allem nach der Geburt ansteigen (Faldyna et al., 2005). Das Vorkommen von CD8<sup>+</sup> -Antigen auf den kaninen Lymphozyten konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit des Vorkommens des CD4<sup>+</sup> -Antigens im direkten Vergleich zum CD8<sup>+</sup>-Antigen auf den Oberflächen der kaninen Lymphozytengeneration schließen. Dies bestätigen sowohl die Untersuchungen von Rabanal et al., als auch die Untersuchungen von Byrne et al., 2000, die ein durchschnittliches Vorkommen der kaninen CD4<sup>+</sup>-Lymphocyten mit 45% angeben. CD8<sup>+</sup> Antigen kommt mit nur 28,8% deutlich seltener vor (Byrne et al., 2000). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde CD8<sup>+</sup>-Antigen auf den Lymphozyten gar nicht nachgewiesen, aber auch das CD4<sup>+</sup>-Antigen konnte nur in geringem Maße auf den Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von Lorente et al., 2008, die mit monoklonalen Antikörper sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Lymphozyten beim Hund nachweisen konnten, sind durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt worden. Neutrophile Granulozyten und Monozyten dagegen reagierte mit dem CD4-Antikörper deutlich positiv. Die Erythrozyten wiesen sowohl bei CD4 als auch bei CD8 positive Bindungsstellen auf, wobei bei dem CD4-Antikörper die deutlicheren Reaktionen zu finden waren.

---

Der B-Lymphozyten spezifische Antikörper zeigte bei den Lymphozyten nur in geringem Maße positive Reaktionen. Auch die Oberflächen der Monozyten und neutrophilen Granulozyten wiesen größtenteils negative Reaktionen auf. Positive Bindungsreaktionen der Thrombozyten dagegen konnten überhaupt nicht nachgewiesen werden. Lediglich die Erythrozyten zeigten häufiger schwach bis deutlich positive Reaktionen mit diesem Antikörper. Dies lässt einen Rezeptor für CADO34A auch auf den Erythrozyten und nur in seltenen Fällen auch auf den B-Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen vermuten. Byrne et al. gibt in seinen Untersuchungen ein durchschnittliches Vorkommen der B-Lymphozyten von 12,9% an (Byrne et al., 2000).



---

## Kapitel VI: Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Struktur der roten und weißen Blutzellen sowie der Thrombozyten des Hundes unter Zuhilfenahme von lichtmikroskopischen Übersichtsfärbungen, elektronenmikroskopischen, immunhistochemischen und glykohistochemischen Untersuchungen untersucht. Das Blut von 23 Hunden verschiedener Rassen und Mischungen wurde zu diesem Zweck verwendet. Lichtmikroskopisch wurden bei Verwendung der Giemsa- und Pappenheim-Färbung besonders gute Färbeargebnisse der Hundeblutzellen erzielt. Elektronenmikroskopisch konnten die kristallinen Innenstrukturen und Größenverhältnisse der Granula innerhalb der kaninen eosinophilen Granulozyten ausdifferenziert werden. Die Granula der basophilen Granulozyten stellten sich mit einer Größe von 0,1µm bis 1µm dar. Die Thrombozyten des Hundes wiesen in allen elektronenmikroskopisch untersuchten Präparaten ein offenes kanalikuläres System auf.

In der Glykohistochemie sind die kaninen Blutzellen mit den FITC-gekoppelten Lektinen WGA, WGAs, DBA, SJA, SBA, Con A, LCA, PSA, GSL-I, PNA, RCA, UEA-I, PHA-E und PHA-L und den biotinylierten Lektinen MAL-I, SNA und VAA untersucht worden. Bei den verschiedenen Blutzellen konnte ein charakteristisches Bindungsmuster beobachtet werden.

In der lektinhistochemischen Untersuchung der Erythrozyten konnten mit ConA und RCA deutlich positive Bindungsreaktionen erzielt werden. Kanine neutrophile Granulozyten konnten besonders stark mit WGA angefärbt werden, während ConA, LCA, PSA, WGAs, GSL-I, RCA und PHA-E schwächere Bindungsergebnisse des Zytoplasmas zeigten. Eosinophile Granulozyten wurden in der vorliegenden Untersuchung besonders gut von UEA-1, SJA, MAL-1, SNA und VAA gebunden. Auf der Granulaoberfläche der basophilen Granulozyten banden ConA, UEA-1, WGA, GSL-1 und VAA deutlich. Die kaninen Lymphozyten dagegen reagierten mit keinem der verwendeten Lektine besonders deutlich. Schwach positive Reaktionen wiesen vereinzelt nur ConA, LCA, PSA, WGA, SBA, RCA und PHA-E auf. Monozyten wiesen besonders mit WGA, WGAs, GSL-1, PHA-E und PHA-L starke Bindungsreaktionen auf. Thrombozyten zeigten lediglich mit WGA deutliche Bindungsreaktionen. Die allgemein positiven Bindungsreaktionen der kaninen Blutzellen unter Verwendung von WGA lassen auf ein regelmäßiges Vorkommen von N-Acetyl-Glukosamin-Konjugaten auf der Blutzelloberfläche des Hundes schließen.

---

Bei den Immunhistochemischen Untersuchungen wurden drei verschiedene Antikörper verwendet: Der B-Lymphozyten spezifische CADO34A-Antikörper reagierte in der vorliegenden Arbeit dabei nicht mit den Lymphozyten. Der CD4-Antikörper dagegen, welcher für T-Helferzellen spezifisch ist, zeigte mit dem Großteil der Erythrozyten und den neutrophilen Granulozyten schwach bis deutlich positive Bindungsstellen an der Zellmembran. Der für zytotoxische T-Zell spezifische CD8-Antikörper wies dagegen mit Ausnahme einzelner Erythrozyten und neutrophiler Granulozyten bei allen Blutzellen eine deutlich schwächere Reaktion auf. Monozyten und Lymphozyten zeigten in allen Untersuchungen keine Reaktion, während neutrophile Granulozyten vereinzelt schwach positive Ergebnisse ergaben. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zirkulierende Lymphozytenpopulation des Hundes vor allem aus T-Lymphozyten besteht, wobei hier die zytotoxischen T-Zellen überwiegen.

Weder in den elektronenmikroskopischen noch in den glykohistochemischen oder immunhistochemischen Untersuchungen konnte ein Alters- oder Geschlechtsunterschied beobachtet werden.

---

## **Kapitel VII: Summary**

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

This dissertation examines the structure of red and white blood cells as well as thrombocytes of the dog using light microscopic, electronmicroscopic, immunohistochemical and glycohistochemical techniques. For representative results, blood samples of 23 dogs of different breeds and half-breeds have been analysed within the course of this study.

In the light microscopic examination the staining methods of Giemsa and Pappenheim have been used which offered highly differentiated light microscopic staining results of the canine blood cells.

The electronmicroscopic analysis allowed a differentiated evaluation on the inner crystalline structure and proportions of eosinophilic granulocytes. At the ultrastructural level the canine thrombocytes showed in all analysed preparations an open canalicular system.

For the glycohistochemical studies selected FITC-linked lectins (WGA, WGAs, DBA, SJA, SBA, Con A, LCA, PSA, GSL-I, PNA, RCA, UEA-I, PHA-E und PHA-L) as well as the biotinylated lectins MAL-I, SNA and VAA were used. A characteristic pattern of lectin binding was observed for the different blood cells. The erythrocytes showed the strongest staining reaction with the lectins Con A and RCA. The neutrophilic granulocytes distinctly stained with lectin WGA, whereas Con A, LCA, PSA, WGAs, GSL-I, RCA and PHA-E triggered only weak reactions. The eosinophilic granulocytes reacted the strongest with UEA-1, SJA, MAL-1, SNA und VAA while the examination of the basophil granulocytes showed that their granular surface binds distinctly with ConA, UEA-1, WGA, GSL-1 and VAA. Canine lymphocytes showed weak to no reactions with the used lectins. Only weak positive reactions were sporadically observed with the lectins ConA, LCA, PSA, WGA, SBA, RCA und PHA-E. The monocytes reacted with WGA, WGAs, GSL-1, PHA-E as well as PHA-L and the thrombocytes stained distinctly only with WGA. The fact that WGA generally showed quite strong staining reactions with the canine blood cells indicates a regular occurrence of N-Acetyl-Glucosamine-conjugates on the blood cell surface.

In the immunohistochemical studies three different antibodies were applied: Antibody CADO34A, which is specific for B-lymphocytes, did not react with the examined lymphocytes, whereas CD4, which is specific for T-helper cells, showed weak till distinct

---

binding with the cell membrane of the majority of erythrocytes and neutrophilic granulocytes examined. CD8, which is specific for cytotoxic T-cells, reacted distinctly weaker with the canine blood cells, except for some erythrocytes and neutrophilic granulocytes. In the examination of monocytes and lymphocytes no binding reactions were observed, while neutrophilic granulocytes occasionally showed weak positive reactions. These results indicate that the 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.

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	alpha Granula
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
Aqua dest.	Aqua destillata
BPA	Bauhinia purpurea Agglutinin
BSH	Bernersennenhund
C	Zytoplasma
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD	Cluster of differentiation
CG	ausgereifte Granula
Con A	Concanavalin Agglutinin
CSF	colony stimulating factor
Cyr	kristalliner Inhalt
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
DEA	Dog Erythrocyt Antigen
DSH	Deutscher Schäferhund
E	Erythrozyt
E. coli	Escherichia coli
Ec	Euchromatin
ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
EM	Elektronenmikroskopie
Eos	eosinophiler Granulozyt
Ery	Erythrozyten
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	basophile Granula
GA	Golgi-Apparat
GalNac	N-Acetylgalaktosamin
GHC	Glykohistochemie
Gi	reife Granula
GlcNac	N-Acetylglukosamin
Gr	Granula mit elektronendichtem Inhalt

---

GSL	Griffonia simplicifolia Agglutinin
Hb	Hämoglobin
Hc	Heterochromatin
HPA	Helix pomatia Agglutinin
HTK	Hämatokrit
I	unreife Granula
IHC	Immunhistochemie
ICV	intrazytoplasmatische Vakuole
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
Il 6	Interleukin 6
K	kastriert
LCA	Lens culinaris Agglutinin
Leuko	Leukozyten
LM	Lichtmikroskopie
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
Lyp	primäre Lysosomen
Lz	Lymphozyt
M	Monozyt
MAL	Makacia amurensis Agglutinin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen
MHC	major histocompatibility complex
Mi	Mitochondrium
ml	männlich
Mn <sup>2+</sup>	Mangan
MPA	Maclura pomifera Agglutinin
MPS	mononukleäre Phagozytose System
Mt	Mikrotubuli
N	Zellkern

---

NANA	N-Acetylneuraminsäure
O	offenes kanalikuläres System
OCS	offenes kanalikuläres System
PAP	Antiperoxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PCV	packed cell volume
PgE	Prostaglandin E
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
PMN	neutrophiler Granulozyt
PNA	Peanut Agglutinin
Ps	Pseudopodien
PSA	Pisum sativum Agglutinin
PWM	pokeweed mitogen
RCA	Ricinus communis Agglutinin
RER	raues Endoplasmatisches Retikulum
SBA	Soybean Agglutinin
SJA	Saphora japonica Agglutinin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
STA	Solanum tuberosum Agglutinin
Tz	Thrombozyten
UEA	Ulex europaeus Agglutinin
VAA	Viscum album Agglutinin
Vs	sektetorische Vesikel
wbl	weiblich
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
ZNS	zentrales Nervensystem

---

# Lösungen für die Elektronenmikroskopie, Lichtmikroskopie und Glykohistochemie

## 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> 35,7g

Aqua dest. ad 100ml

Bleinitrat Stock

Bleinitrat  $\text{Pb}(\text{NO}_2)_2$ <sup>1</sup> 33,1g

Aqua dest. ad 100ml

Bleicitrat-Lösung

Aqua dest. 16ml

Natriumcitrat Stock 3ml

Bleinitrat Stock 2ml

NaOH, 1M<sup>1</sup> 4ml

Aqua dest. ad 100ml

### Cacodylat-Puffer

Lösung A

Cacodylat  $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ <sup>2</sup> 8,56g

Aqua dest. ad 200ml



---

## Lösung B

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

Cacocylat-Puffer, 0,2M, pH 7,2

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

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

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

## Epon

Poly/bed 812 <sup>3</sup>	16ml
DDSA <sup>3</sup>	10ml
NMA <sup>3</sup>	9ml
DMP-30 <sup>3</sup>	0,3-0,5ml

## *Fixierlösung nach Karnovsky*

10%Paraformaldehyd-Lösung

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

Karnovsky-Stammlösung

Paraformaldehyd-Lösung	20ml
------------------------	------

---

Cacodylat-Puffer, 0,2M	50ml
Kalziumchlorid, wasserfrei <sup>4</sup>	0,05g
Karnovsky-Gebrauchslösung	
Karnovsky-Stammlösung	10ml
Glutaraldehyd, 2,5% <sup>2</sup>	1037ml

### **Kontrastierungslösung**

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

Kaliumferrocyanid-Lösung, 3%	
Kaliumferrocyanid <sup>5</sup>	0,3g
Cacodylat-Puffer, 0,1M	ad 10ml

Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%) in Cacodylat-Puffer, 0,1M	
Osmiumtetroxid-Lösung, 2%	4ml
Kaliumferrocyanid-Lösung, 3%	4ml

Lichtmikroskopie

### **Giensa-Lösung**

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

Glykohistochemie

---

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

NaCl <sup>1</sup>	42,50g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	6,35g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	1,95g
Aqua dest.	ad 5l

*Acetat-Puffer 5,0*

Die folgenden Lösungen werden im Verhältnis 141:59 gemischt

Natriumacetat-Lösungen, 0,1M

Natriumacetat <sup>6</sup>	8,2g
Aqua dest.	1000ml

Essigsäure, 0,1M

Essigsäure <sup>7</sup>	5,8ml
Aqua dest. 1000ml	1000ml

---

## Abbildungsverzeichnis

4.1. Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung.....	66
4.2. Segmentkernige neutrophile Granulozyten, Giemsa-Färbung.....	66
4.3. Segmentkerniger und stabkerniger neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung..	66
4.4. Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.....	66
4.5. Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.....	67
4.6. Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.....	67
4.7. Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung.....	67
4.8. Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.....	67
4.9. Eosinophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung.....	68
4.10. Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.....	68
4.11. Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.....	69
4.12. Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.....	69
4.13. Basophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung.....	69
4.14. Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung.....	71
4.15. Lymphozyt, Giemsa-Färbung.....	71
4.16. Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung.....	71
4.17. Lymphozyt, Pappenheim-Färbung.....	71
4.18. Monozyt, Diff-Quick-Färbung.....	72
4.19. Monozyt, Giemsa-Färbung.....	72
4.20. Basophiler Granulozyt, Con A-FITC.....	74
4.21. Lymphozyt, Con A-FITC.....	74
4.22. Neutrophiler Granulozyt, Con A-FITC.....	74
4.23. Lymphozyt, neutrophiler Granulozyt, Con A-FITC.....	74
4.24. Lymphozyt, LCA-FITC.....	76
4.25. Thrombozyten, LCA-FITC.....	76
4.26. Neutrophile Granulozyten, LCA-FITC.....	76
4.27. Neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC.....	76
4.28. Lymphozyt, neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC.....	78
4.29. Lymphozyt, PSA-FITC.....	78

---

4.30. Neutrophiler Granulozyt, PSA FITC.....	78
4.31. Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC.....	78
4.32. Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC.....	78
4.33. Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC.....	78
4.34. Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC.....	79
4.35. Lymphozyt, UEA-FITC.....	80
4.36. Lymphozyt, UEA-FITC.....	80
4.37. Neutrophiler Granulozyt, UEA-FITC.....	81
4.38. Basophiler Granulozyt, WGA-FITC.....	82
4.39. Lymphozyt, WGA-FITC.....	82
4.40. Neutrophiler Granulozyt, WGA-FITC.....	83
4.41. Lymphozyt, WGA-FITC.....	83
4.42. Lymphozyt, WGAs-FITC.....	84
4.43. Monozyt, WGAs-FITC.....	84
4.44. Neutrophile Granulozyten, WGAs-FITC.....	85
4.45. Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC.....	85
4.46. Lymphozyt, WGAs-FITC.....	85
4.47. Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC.....	85
4.48. Lymphozyt, SBA-FITC.....	86
4.49. Lymphozyt, neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC.....	86
4.50. Neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC.....	87
4.51. Neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC.....	87
4.52. Neutrophiler Granulozyt, DBA-FITC.....	88
4.53. Lymphozyt, DBA-FITC.....	88
4.54. Lymphozyt, DBA-FITC.....	88
4.55. Monozyt, DBA-FITC.....	88
4.56. Erythrozyten, DBA-FITC.....	89
4.57. Eosinophiler und neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC.....	90
4.58. Eosinophiler Granulozyt, SJA-FITC.....	90
4.59. Lymphozyt, SJA-FITC.....	90
4.60. Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC.....	90
4.61. Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC.....	91

---

4.62. Neutrophiler und eosinophiler Granulozyt, PNA-FITC.....	92
4.63. Lymphozyt, PNA-FITC.....	92
4.64. Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC.....	93
4.65. Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC.....	93
4.66. Eosinophiler Granulozyt, GSL-I-FITC.....	94
4.67. Neutrophiler Granulozyt, GSL-I-FITC.....	94
4.68. Neutrophiler Granulozyt, GSL-I-FITC.....	95
4.69. Lymphozyt, GSL-I-FITC.....	95
4.70. Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC.....	96
4.71. Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC.....	96
4.72. Monozyt, RCA-FITC.....	97
4.73. Lymphozyt, RCA-FITC.....	97
4.74. Lymphozyten, PHA-E-FITC.....	98
4.75. Neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC.....	98
4.76. Eosinophiler Granulozyt, PHA-L-FITC.....	100
4.77. Neutrophiler Granulozyt, PHA-L-FITC.....	100
4.78. Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, PHA-L-FITC.....	101
4.79. Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, PHA-L-FITC.....	101
4.80. Neutrophiler Granulozyt, MAL-I-Biotin.....	102
4.81. Neutrophile Granulozyten, MAL-I-Biotin.....	102
4.82. Neutrophiler Granulozyt, MAL-I-Biotin.....	103
4.83. Neutrophiler Granulozyt, MAL-I-Biotin.....	103
4.84. Lymphozyt, SNA-Biotin.....	104
4.85. Lmyphozyt und Monozyt., SNA-Biotin.....	104
4.86. Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin.....	105
4.87. Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin.....	105
4.88. Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, VAA-Biotin.....	106
4.89. Neutrophiler Granulozyt, VAA-Biotin.....	106
4.90. Neutrophile Granulozyten, VAA-Biotin.....	107
4.91. Lymphozyt, VAA-Biotin.....	107
4.92. Neutrophiler Granulozyt, CD4-FITC.....	108
4.93. Lymphozyt, CD4-FITC.....	108

---

4.94. Neutrophile Granulozyten, CD4-FITC.....	109
4.95. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyt, CD4-FITC.....	109
4.96. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyt, CD8-FITC.....	110
4.97. Lymphozyt, CD8-FITC.....	110
4.98. Lymphozyt, CD8-FITC.....	111
4.99. Lymphozyt, CD8-FITC.....	111
4.100 Monozyt, CADO34A-FITC.....	112
4.101. Lymphozyt, CADO34A-FITC.....	112
4.102. Neutrophiler Granulozyt, CADO34A-FITC.....	113
4.103. Neutrophiler Granulozyt, CADO34A-FITC.....	113
4.104. Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop.....	115
4.105. Stabkerniger und segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop.....	116
4.106. Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop.....	117
4.107. Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop.....	118
4.108. Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop.....	119
4.109. Eosinophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop.....	121
4.110. Eosinophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop.....	122
4.111. Basophiler Granulozyt, Elektronenmikroskop.....	124
4.112. Lymphozyt, Elektronenmikroskop.....	126
4.113. Lymphozyt, Elektronenmikroskop.....	127
4.114. Lymphozyt, Elektronenmikroskop.....	128
4.115. Lymphozyt, Elektronenmikroskop.....	129
4.116. Lymphozyt, Elektronenmikroskop.....	130
4.117. Monozyt, Elektronenmikroskop.....	132
4.118. Monozyt, Elektronenmikroskop.....	133
4.119. Thrombozyt, Elektronenmikroskop.....	135
4.120. Thrombozyt, Elektronenmikroskop.....	136

---

## Tabellenverzeichnis

2.1. Referenzbereiche hämatologischer Messgrößen bei adulten Hunden.....	34
2.2. Einteilung der Lektine.....	38
2.3. Übersicht der kaninen Blutgruppen.....	45
3.1. Übersicht der jüngeren Hunde.....	48
3.2. Übersicht der mittelalten Hunde.....	49
3.3. Übersicht der älteren Hunde.....	49
3.4. Überblick FiTC markierte Lektine.....	51
3.5. Überblick biotinylierte Lektine.....	51
3.6. Überblick Antikörper.....	52
3.7. Hemmzucker.....	58
4.1. Blutbilder der untersuchten Hunde.....	63
4.2. Lichtmikroskopische Färbungen Erythrozyten.....	64
4.3. Lichtmikroskopische Färbungen neutrophile Granulozyten.....	66
4.4. Lichtmikroskopische Färbungen eosinophile Granulozyten.....	68
4.5. Lichtmikroskopische Färbungen Thrombozyten.....	70
4.6. Lichtmikroskopische Färbungen Lymphozyten.....	70
4.7. Lichtmikroskopische Färbungen Monozyten.....	72
4.8. Auswertung Con A.....	73
4.9. Auswertung LCA.....	75
4.10. Auswertung PSA.....	77
4.11. Auswertung UEA.....	80
4.12. Auswertung WGA.....	82
4.13. Auswertung WGAs.....	84
4.14. Auswertung SBA.....	86
4.15. Auswertung DBA.....	87
4.16. Auswertung SJA.....	89
4.17. Auswertung PNA.....	92
4.18. Auswertung GSL-I.....	94



---

4.19. Auswertung RCA.....	96
4.20. Auswertung PHA-E.....	98
4.21. Auswertung PHA-L.....	100
4.22. Auswertung MAL-I.....	102
4.23. Auswertung SNA.....	104
4.24. Auswertung VAA.....	106
4.25. Auswertung CD4.....	108
4.26. Auswertung CD8.....	110
4.27. Auswertung CADO34A.....	112

---

## Literaturverzeichnis

- Agar, N. S. (Hg.) 1983. Red blood cells of domestic mammals. Amsterdam: Elsevier
- Andrews G.A., Chavey P.S. & Smith J.E. 1992. Reactivity of lichen lectins with blood typed canine erythrocytes. *Research in Veterinary Science* (3), 315–319
- Ashwell G., Morell A.G. 1974. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol. Related Areas Mol Biol* 41 (0), 99-128
- Barondes, S. H. Lectins: Their Multiple Endogenous Cellular Functions. *Annual Review of Biochemistry* 1981 (Vol. 50), 207–231
- Bell, K. 1983. The blood groups of domestic animals., in Agar, N. S. (Hg.): *Red blood cells of domestic mammals*. Amsterdam: Elsevier, 133–164
- Bessis, Marcel & Weed, Robert I. 1973. Living blood cells and their ultrastructure. Berlin: Springer
- Beuth J., Stoffel B., Pulverer G. 1996: Inhibition of bacterial adhesion and infections by lectin blocking, in Kahane I. Und Ofek I. (Hrsg.): *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 408, Plenum Press, New York, London, S. 51-56
- Bhalla V., Gaur V. & Bhatia K. 1978. Lectin studies. III. A survey of phytohemagglutinins: interaction of lectins with erythrocytes of ten vertebrate species. *Vox Sanguinis* (4), 241–247
- Bienzle D. 2000. Monocytes and Macrophages, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 318-325
- Bitzmann D. 2009. Ultrastrukturelle, immunzytochemische und histochemischen Untersuchungen am Blut des Rindes

- 
- Boyd, W. & Shapleigh, E. 1954. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* (119), 419
- Boyd, William & Reguera, Rose 1949. Hemagglutinating Substances for Human Cells in Various Plants. *Journal of Immunology* (62), 333–339
- Brooks, S. A., Leathem, A. J. & Schumacher, U. 1997. Lectin histochemistry: A concise practical handbook. Oxford: Bios Scientific Publishers. (Microscopy handbooks, 36)
- Byrne K.M., Kim H.W., Chew B.P., Reinhart G.A. Hayek M.G. 2000. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 73 (2): 167-82
- Car B.D. 2000. Erythropoiesis and Erythrokinetics, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 105-109
- Christian J.A. 2000. Red blood cell survival and destruction, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 117-124
- Christoph, Horst-Joachim, Grünbaum, Ernst-Günther & Alef, Michael (Hg.) 2007. *Klinik der Hundkrankheiten: 257 Tabellen*. 3., Aufl. Stuttgart: Enke
- Couto, C.G. 2006. Hämatologie und Immunologie. In: Nelson R.W. und Couto C.G. (Hg.) 2006. *Innere Medizin der Kleintiere*. München, Jena: Urban & Fischer
- Darbès J. et al. 1993. Demonstration of feline and canine platelet glycoproteins by immunological and lectin histochemistry. *Histochemistry* (1), 83–91
- Dellmann, Horst-Dieter & Carithers, Jeanine A. 1996. Cytology and microscopic anatomy. Baltimore: Williams & Wilkins
- Denk, H. 1987. Immunohistochemical methods for the demonstration of tumor markers. *Current Topics in Pathology* (77), 47–69

- 
- Dixon, H. B. 1981. Defining a lectin. *Nature* (292), 192
- Eguchi M., Ozawa T. Lectins for electron microscopic distinction of eosinophils from other blood cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1989 (37), 743–749
- Ehrlich, Paul 1891. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Ueber Ricin. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (17), 976–979
- Ehrlich, Paul 1891. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (17), 1218–1219
- Engelhardt, Wolfgang v. & Breves, Gerhard 2000. *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Enke
- Faldyna M., Sinkora J. 2005. Lymphatic organ development in dogs: major lymphocyte subsets and activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (104), 239–247
- Fernandez F.R. and Grindem C.B. 2000: Reticulocyte Reponse, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 110-116
- Franz, Hartmut 1988. The Ricin Story, in Franz, Hartmut (Hg.): *Advances in Lectin Research*: Springer Verlag, 10–25
- Franz, Hartmut 1990. 100 Jahre Lektinforschung - eine Bilanz. *Naturwissenschaften* (77), 103–109
- Frieß und Schlüns 1990. Das Immunsystem und die Organe der Abwehr, in Mosimann, Willy & Kohler, Toni (Hg.): *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Berlin: Parey, 114-144
- Gabius, Hans-Joachim 1997. Animal lectins. *European Journal of Biochemistry* (243), 543–576
- Gabius, Hans-Joachim & Gabius, Sigrun (Hg.) 1993. *Lectins and glycobiology*. Berlin: Springer. (Springer laboratory)

- 
- Gabius, Hans-Joachim & Gabius, Sigrun 1997. *Glycosciences: Status and perspectives*. London: Chapman & Hall
- Gabius H.J., Rüdiger H. , Uhlenbruck G.1988. Lektine. *Spektrum der Wissenschaften*, S. 50-80
- Gasper P. W. 2000. The hematopoietic system, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 63-68
- Gold, Edwin R. & Balding, Peter 1975. Receptor-specific proteins: Plant and animal lectins. Amsterdam: Excerpta Medica [u.a.]
- Goldstein, Irwin J. & Hayes, C. E. 1978. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (35), 127–340
- Goldstein, Irwin J.; Hughes R.; Colin; Monsigny, Michel; Osawa, Toshiaki; Sharon, Nathan (1980). What should be called a lectin? *Nature* (285), 66.
- Goldstein, Irwin J. & Poretz, R. D. 1986. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins, in Liener, Erwin E., Sharon, Nathan & Goldstein, Irwin J. (Hg.): *The lectins: Properties, functions, and applications in biology and medicine*. Orlando Fla.: Academic Press. (Molecular biology), 233–247
- Hale, A. S. 1995. Canine blood groups and their importance in veterinary transfusion medicine, in Kristensen, A. T. & Feldmann, B. F. (Hg.): *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice: Kanine and Feline Transfusion Medicine*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co., 1325–1333
- Hastie R, Chir B. 1974. Study of the ultrastructure of human basophil leukocytes. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* (31), 223–231

Hämatologie: 24 Tabellen. 10., Aufl. München: Urban & Fischer

Hees, Herbert 2000. Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.

2., Aufl. Köln: Deutscher Ärzte-Verl.

Hung, Kuen-Shan 1972. Electron Microscopic Observations on Eosinophil Leukocyte

Granules in Dog Blood. *The Anatomical Record* (174), 165–174

Jain, Nemi C. (Hg.) 2000. *Schalm's Veterinary hematology*. 4. ed. Philadelphia, Pa: Lea &

Febiger

Junqueira, Luiz C. & Mayerhofer, Artur 2005. Histologie: Mit 500 Abbildungen in 618

Einzeldarstellungen und 17 Tabellen. 6., Aufl. Heidelberg: Springer Medizin

(Springer-Lehrbuch)

Karlson, Peter, Doenecke, Detlef & Koolman, Jan 1994. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für

Mediziner und Naturwissenschaftler: 78 Tabellen. 14., Aufl. Stuttgart: Thieme

Kato M., u.a. 2007. A novel culture method of canine peripheral blood lymphocytes with

concanavalin a and recombinant human interleukin-2 for adoptive

immunotherapy. *Journal of veterinary medical science* (5), 481–486

Kocourek, J. 1986. Historical Background, in Liener, Erwin E., Sharon, Nathan & Goldstein,

Irwin J. (Hg.): *The lectins: Properties, functions, and applications in biology and*

*medicine*. Orlando Fla.: Academic Press. (Molecular biology), 1–32

Kohn B., Reitemeyer S. 1998. Bestimmung der Blutgruppe DEA 1.1. und deren Bedeutung

beim Hund. *Kleintierpraxis*(43), 77–86

Kolb, Gertrud M. 1990. Vergleichende Histologie: Zytologie und Mikroanatomie der Tiere.

Berlin: Springer

Kraft W., Dürr, U. M., Fülll M., Bostedt H., Heinritzi K. 2005. Klinische Labordiagnostik in

der Tiermedizin. 6., Aufl. Stuttgart: Schattauer

- 
- Kramer J.W.: 2000. Normal hematology of cattle, sheep and goats, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 1075-1084
- Kühnel, Wolfgang 2002. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11., Aufl. Stuttgart: Thieme
- Landsteiner, Karl 1902. Beobachtungen der Hämagglutination. *Wiener klinische Rundschau* (16), 774
- Lee M., Turcinov D. 1987. Lectins as markers for eosinophilic leukocytes. *Histochemistry* (86), 269–273
- Letwin, B. W. & Quimby, F. W. 1987. Effects of concanavalin A, phytohemagglutinin, pokeweed mitogen, and lipopolysaccharide on the replication and immunoglobulin synthesis of canine peripheral blood lymphocytes in vitro. *Immunology Letters* (2), 79–85
- Leven R.M. 2000. Megakaryocytes, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 443-447
- Liebich, Hans-Georg 2004. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. 4., Aufl. StuttgartSchattauer
- Liener, Erwin E., Sharon, Nathan & Goldstein, Irwin J. (Hg.) 1986. The lectins: Properties, functions, and applications in biology and medicine. Orlando Fla.: Academic Press. (Molecular biology)
- Lindhorst T.K. 2000: Wenn Zucker-Atrappen Bakterien zum Narren halten, *Spektrum der Wissenschaft*, März, 16-21
- Lis, Halina & Sharon, Nathan 1986. Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry* (55), 35–67
- Loeffler, Klaus 1994. Anatomie und Physiologie der Haustiere: 54 Tabellen. 9., Aufl.

---

Stuttgart: Ulmer

- Lorente C., Sainz A. 2008. Immunophenotype of dogs with subclinical ehrlichiosis. *Annual of the New York Academy of Science* (Dec), 114–117
- Loris, Remy 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* (1572), 198–208
- Lund, J. E. 1974. Hemoglobin Crystals in Kanine Blood. *American Journal Of Veterinary Research* (35), 575–581
- Madewell B. R., Couto C. G. & Franti C. E. 1984. Flow cytometric analysis of lectin-binding to canine blood lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (3-4), 383–392
- Meinkoth J.H., Clinkenbeard K. 2000. Normal hematology of the dog, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 1057-1063
- Mischke, Reinhard 2003. *Praktische Hämatologie bei Hund und Katze*. Hannover: Schlüter. (Vet)
- Mischke, Reinhard 2005. Interpretation von Veränderungen im Blutaussstrich - 1. Leukozyten. *Fachpraxis* (48), 4–9
- Mischke, Reinhard 2006. Interpretation von Veränderungen im Blutaussstrich - 2. Erythrozyten und Thrombozyten. *Fachpraxis* (49), 14–20
- Moore P.F., Rossito P., Danilenko D.M., Wielenga J.J., Raff R.F., Severns E., 1992  
Monoclonal antibodies specific for kanine CD4 and CD8 define functional lymphocytes T subsets and high density expression of CD4 on canine neutrophils. *Tissue Antigens* (40), 75–85
- Moritz A., Schimke E., Teske E., Rutteman G., Nagel M-L. 2007. Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, in Grünbaum E-G., Schimke E. (Hrsg.), *Klinik der Hundekrankheiten*. 3., Auflage. Stuttgart: Enke. S. 1035-1081



- 
- Mosimann, Willy & Kohler, Toni (Hg.) 1990. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Berlin: Parey
- Nelson, David & Cox, Michael 2001. Glykokonjugate, Proteoglycane und Glycolipide, in Nelson, David, u.a. (Hg.): *Lehninger Biochemie: Mit 40 Tabellen*. Berlin: Springer. (Springer-Lehrbuch), 326–333
- Ni Y. und Tizard I. 1996: Lectin-carbohydrate interaction in the immune system, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55, 205-223
- Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. 1996. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band III: Kreislaufsystem Haut und Hautorgane. Berlin
- Nultsch, Wilhelm 2001. 803 Stichworten Allgemeine Botanik: Glossarium mit. 11., Aufl. Stuttgart: Thieme
- P. Tschudi, H.H., 1990. Blut und Knochenmark, in Mosimann, Willy & Kohler, Toni (Hg.): *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Berlin: Parey. S. 98-111
- Pinkerton, P. H. 1974. Hereditary Stomatocytosis with Hemolytic Anemia in the Dog. *Blood* (44), 557–567
- Post G.S. 2000. Hemapheresis, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 869-873
- Pschyrembel, Willibald 2002. *Klinisches Wörterbuch*. 259., Aufl. Berlin: de Gruyter
- Pühler, Alfred, Römpf, Hermann & Bornscheuer, Uwe T. 2000. Römpf kompakt Lexikon Biochemie und Molekularbiologie. Stuttgart: Thieme
- Rabanal R.M., Ferrer L., Else R.W. 1995. Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues, *Vet Immunol Immunopathol.* 47 (1-2): 13-23
- Radek, Renate 1996. Lectine: Ihre Bedeutung in Natur und Wissenschaft. *Mikrokosmos* 85

- Ralston G.B. 1983. The membran of the red blood cell, in Agar, N. S. (Hg.): *Red blood cells of domestic mammals*. Amsterdam: Elsevier, 1–36
- Reagan, William J., Sanders, Teresa G. & DeNicola, Dennis B. 1998. *Veterinary hematology: Atlas of common domestic species*. London: Manson
- Rebar, Alan H. 2002. *A guide to hematology in dogs and cats*. Jackson, Wyo: Teton NewMedia
- Reisner Y., Biniaminov J. 1979. 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), 447–451
- Renkonen, K. O. 1948. Studies on hæmagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminos. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiæ Fenniae* (26), 66–72
- Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* (17), 208–212
- Rigal D. et al. 1983. Identification of canine T lymphocytes by membrane receptor to peanut agglutinin: T-lymphocyte identification in dogs with lupus-like syndrome. *American Journal Of Veterinary Research* (9), 1782–1785
- Romeis, Benno, Böck, Peter & Denk, H. 1989. *Romeis Mikroskopische Technik*. 17., Aufl. /. München: Urban & Schwarzenberg
- Rowley, A. F. 1988. *Vertebrate blood cells*. Cambridge: Cambridge Univ. Pr.
- Rüdiger, H. 1981. Lectine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. *Chemie in unserer Zeit* (5), 155–162
- Rüdiger, H. 1997. Structure and function of plant lectins, in Gabius, Hans-Joachim & Gabius, Sigrun (Hg.): *Glycosciences: Status and perspectives*. London: Chapman & Hall, 179

- Rüdiger, H., u.a. 2000. Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code: Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as Targets. *Current Medicinal Chemistry* (7), 389–416
- Rüsse, Imogen 1998. Herz- und Kreislaufsystem, in Sinowatz, Fred (Hg.): *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere/ Imogen Rüsse*; Fred Sinowatz. Berlin: Parey
- Scott M.A., Stockham S. 2000. Basophils and Mast cells, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 308-317
- Sharon, Nathan 1984. Carbohydrates as recognition determinants in phagocytosis and in lectin-mediated killing of target cells. *Biology of the Cell* (51), 239–245.
- Sharon, Nathan 1996. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease, in: Kahane I. und Ofek I. (Hrsg.): *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 408, Plenum Press, New York, London, S. 1-8
- Sharon, Nathan 1998. Glycoproteins now and then: A personal account. *Acta Anatomica* (161), 7–17
- Sharon, Nathan 1998. Lectins: From obscurity into the limelight. *Protein Science* (7), 2042–2048
- Sharon, Nathan & Lis, Halina 1989. *Lectins*. London: Chapman and Hall
- Sharon, Nathan & Lis, Halina 1990. Legume lectins--a large family of homologous proteins. *FASEB Journal* (4), 3198–3208
- Sharon, Nathan & Lis, Halina 1993. Kohlenhydrate und Zellerkennung. *Spektrum der Wissenschaft* (3), 66–76
- Sharon, Nathan & Lis, Halina 1997. Glycoproteins: structure and function, in Gabius, Hans-Joachim & Gabius, Sigrun (Hg.): *Glycosciences: Status and perspectives*. London: Chapman & Hall, 133–162

- 
- Sharon, Nathan & Lis, Halina 2004. History of Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14 (11)
- Sinowatz, Fred (Hg.) 1998. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere/ Imogen Rüsse; Fred Sinowatz. 2., Aufl. Berlin: Parey
- Smith G.S. 2000. Neutrophils, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 281-296
- Smith J.E. 1983. Erythrocyte deformability, in Agar, N. S. (Hg.): *Red blood cells of domestic mammals*. Amsterdam: Elsevier, 55–66
- Spurling N. The hematology of the dog: In: *Comparative Clinical Haematology*, Archer R.K. and Jeffcott L.B. eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977
- Steffens W.L. 2000. Ultrastructural features of leukocytes, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 326-336
- Stillmark, Hermann 1888. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Dorpat, Univ., Diss
- Sumner, James & Howell, Stacey 1936. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *Journal of Bacteriology* (32), 227–237
- Symons, M. & Bell, K. 1991. Expansion of the canine A blood group system. *Animal Genetics* (22), 227–235
- Tablin F. 2000. Platelet structure and function, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 448-452
- Tajima, M. e. 1990. The distributions of phytohemagglutinin-P and concanavalin A binding sites on equine, bovine and canine peripheral blood lymphocytes. *Zentralblatt fur Veterinärmedizin* (4), 290–296
- Thrall, Mary A. 2004. Veterinary hematology and clinical chemistry. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins

- 
- Turnwald G. H. et al. 1988. Peanut agglutinin as a surface marker for canine T lymphocytes. *American Journal Of Veterinary Research* (12), 2076–2080.
- Usui, R. e. 1994. Flow cytometric analysis of phenotypes of canine red blood cells with FITC-labeled Clerodendron trichotomum lectin. *The Journal of veterinary medical science* (3), 593–595
- Valli V.E.O., Jacobs R. 2000. Structure and function of the hemopoietic system, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 225-239
- Varki, Ajit 1999. Discovery and classification of animal lectins, in Varki, Ajit (Hg.): *Essentials of glycobiology*. New York, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, 333–343
- Varki, Ajit (Hg.) 1999. *Essentials of glycobiology*. New York, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press
- Watkins W.M., Morgan W.T. 1952: The inhibition of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. *Br J Exp Path* 34: 94-103
- Weiss, D. J. & Townsend, E. 1998. Evaluation of reticulated platelets in dogs. *Comparative Haematology International* (8), 166–170
- Young K.M. 2000. Eosinophils, in Jain, Nemi C. (Hg.): *Schalm's Veterinary hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 297-307

---

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Tieranatomie II, vor allem Christine Neumüller und Frau Dr. Barbara Schick für deren fachliche und persönliche Betreuung.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei dem Praxisteam Dr. Piacenza für die Hilfe bei der Probenentnahme.

Für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die vielen lustigen Stunden im Labor danke ich Dani Bitzmann, ohne dich hätte ich nicht so eine schöne Zeit verbracht.

Mein ganz spezieller Dank gilt meinen Freunden, die immer für mich da sind, besonders Katschi Pink, Danke dir für deine Unterstützung, Aufmunterungen und Hilfsbereitschaft !

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir in allen Lebenslagen hilfreich zur Seite steht.