

Aus dem Lehrstuhl für Tieranatomie II
insbesondere Allgemeine Anatomie, Histologie und Embryologie
des Veterinärwissenschaftlichen Departments
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**Ultrastrukturelle, immunzytochemische und
glykohistochemische Untersuchungen am Blut
des Pferdes (*Equus ferus caballus*)**

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

Von
Eva Marie Olga Brückmann
aus Rosenheim

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. J. Hirschberger

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	IX
I Einleitung	1
II Literaturübersicht	3
1. Das Blut des Pferdes	3
1.1 Zusammensetzung des Blutes	3
1.2 Besonderheiten des Pferdeblutes	4
2. Bildung der verschiedenen Blutzellen	8
3. Morphologie der einzelnen Blutzellen	10
3.1 Erythrozyten	10
3.2 Thrombozyten	12
3.3 Neutrophile Granulozyten	13
3.4 Eosinophile Granulozyten	16
3.5 Basophile Granulozyten	17
3.6 Lymphozyten	19
3.7 Monozyten	19
4. Funktion der einzelnen Blutzellen	21
4.1 Erythrozyten	21
4.2 Thrombozyten	21
4.3 Neutrophile Granulozyten	22
4.4 Eosinophile Granulozyten	23
4.5 Basophile Granulozyten	23
4.6 Lymphozyten	24

4.7	Monozyten	26
5.	Glykohistochemie	28
5.1	Entstehung und Definition des Begriffs „Lektin“	28
5.2	Kurze Geschichte wichtiger Lektine	29
5.3	Struktur und Bindungseigenschaften der Lektine	31
5.4	Funktion der Lektine in vivo	33
6.	Immunzytochemie	34
6.1	Definition und Anwendung	34
6.2	Technik	35
6.3	Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten	36
7.	Blutgruppen beim Pferd	37
III	Material und Methoden	41
1.	Untersuchungsmaterial	41
2.	Lichtmikroskopie	44
2.1	Diff-Quick-Färbung	44
2.2	Giemsa-Färbung (nach Romeis, 1989)	45
2.3	May-Grünwald-Färbung (nach Romeis, 1989)	45
2.4	Panoptische Färbung nach Pappenheim (nach Romeis, 1989)	46
3.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	47
4.	Glykohistochemie	47
4.1	FITC markierte Lektine	48
4.2	Hemmszucker	50
4.3	Biotinylierte Lektine	51
5.	Immunzytochemie	53

6.	Auswertung	55
IV	Ergebnisse	56
1.	Blut der untersuchten Pferde	56
2.	Lichtmikroskopische Routinefärbungen	58
2.1	Erythrozyten	59
2.2	Thrombozyten	60
2.3	Neutrophile Granulozyten	60
2.4.	Eosinophile Granulozyten	63
2.5.	Basophile Granulozyten	65
2.6.	Lymphozyten	65
2.7.	Monozyten	67
3.	Elektronenmikroskopie	69
3.1	Erythrozyten	69
3.2	Thrombozyten	69
3.3	Neutrophile Granulozyten	72
3.4	Eosinophile Granulozyten	77
3.5	Basophile Granulozyten	79
3.6	Lymphozyten	79
3.7	Monozyten	83
4.	Glykohistochemie	85
4.1	Bindung von Glukose/ Mannose spezifischen Lektinen	85
4.1.1	Bindung von Concanavalia Agglutinin	85
4.1.2	Bindung von Lens culinaris Agglutinin	89
4.1.3	Bindung von Pisum sativum Agglutinin	92

4.2	Bindung von Galaktose spezifischen Lektinen	96
4.2.1	Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin	96
4.2.2	Bindung von Peanut Agglutinin	99
4.2.3	Bindung von Ricinus communis Agglutinin	102
4.2.4	Bindung von Viscum album Agglutinin	105
4.3	Bindung von N-Acetylglukosamin spezifischen Lektinen	108
4.3.1	Bindung von Wheat germ Agglutinin	108
4.3.2	Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert	111
4.4	Bindung von N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektinen	114
4.4.1	Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin	114
4.4.2	Bindung von Soybean Agglutinin	117
4.4.3	Bindung von Sophora japonica Agglutinin	120
4.5	Bindung von Fukose spezifischen Lektinen	123
4.5.1	Bindung von Ulex europaeus Agglutinin 1	123
4.6	Bindung von Sialinsäure spezifischen Lektinen	126
4.6.1	Bindung von Maackia amurensis Agglutinin	126
4.6.2	Bindung von Sambucus nigra Agglutinin	129
4.7	Bindung komplexer Kohlenhydratstrukturen spezifischer Lektine	132
4.7.1	Bindung von Phaseolus vulgaris E Agglutinin	132
4.7.2	Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin	135
4.8	Ergebnisse der kompetitiven Zuckerhemmung	139
5.	Immunzytochemische Untersuchungen	139
V	Diskussion	142
1.	Blutbilder	142

2.	Lichtmikroskopie	143
3.	Elektronenmikroskopie	146
4.	Glykohistochemie	151
5.	Immunhistochemie	154
VI	Zusammenfassung	158
VII	Summary	160
VIII	Literaturverzeichnis	162
IX	Anhang	181
1.	Verzeichnis der Gebrauchslösungen	181
2.	Abbildungsverzeichnis	183
3.	Tabellenverzeichnis	187
4.	Danksagung	189

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ADP	Adenosindiphosphat
aG	alpha-Granula
AK	Akanthozyt
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation
ConA	Concanavalia Agglutinin
CTAP	Connective Tissue Activating Protein
DAPI	4`6-Diamidin-2`-phenylindoldihydrochlorid
DB	Dense Bodies
DBA	Dolichos bifloros Agglutinin
EC	Euchromatin
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EG	Eosinophiler Granulozyt
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZ	Erythrozyt
F	Filament
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Granula
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Gly	Glykogen
Go	Golgi-Apparat
GSL	Griffonia simplicifolia Agglutinin
HC	Heterochromatin
5-HT	5-Hydroxytryptamin
IFN	Interferon
IG	Immunglobulin
IGF	Insulin Growth Factor

IL	Interleukin
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LM	Lichtmikroskop
LTB4	Leukotrien B4
Ly	Lysosomen
LZ	Lymphozyt
M	Monozyt
MAA	Maackia amurensis Agglutinin
mAK	monoklonaler Antikörper
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MCV	Mean Corpuscular Volume
Mg ²⁺	Magnesium
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Proteins
MR	Microridges
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
N-FMLP	N-formylierte Peptide
NZ	Neutrophiler Granulozyt
PAF	Platelet Activating Factor
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG	primäre Granula
PHA-E	Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro
PHA-L	Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuko
PNA	Peanut Agglutinin
PS	Pseudopodien
PSA	Pisum sativum Agglutinin
R	Ribosomen
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T Expressed and Secreted
RBC	Red Bloodcell Count
RCA	Ricinus communis Agglutinin
RH	Rhesus

SBA	Soybean Agglutinin
SCF	Stem cell factor
SG	spezifische Granula
SJA	Saphora japonica Agglutinin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
T	Thrombozyt
UEA-1	Ulex europaeus Agglutinin
V	Vakuole
VAA	Viscum album Agglutinin
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
ZK	Zellkern
ZM	Zellmembran
ZP	Zytoplasma

I Einleitung

„Hätte es das Pferd nicht gegeben, so wäre es erfunden worden.“

Paolo Manili, 2005

Diese Aussage trifft sehr gut die Bedeutung der Pferde und ihren Einfluss auf das Schicksal der Menschen im Laufe der Jahrhunderte. Schon seit der Frühgeschichte des Menschen, in der das Pferd zunächst als schmackhafte Beute diente, spielte es eine große Rolle im Leben der Menschheit. Es wurde als Transportmittel, Werkzeug und Kriegsmaschine verwendet, inspirierte aber auch Maler und Bildhauer, Dichter und Musiker. Die Pferde wurden gezähmt und es entstanden zahlreiche verschiedene Rassen, von denen jede für einen bestimmten Zweck (Streitrosser, Reitpferde oder Rennpferde) geeignet war. In der heutigen Zeit ist die Arbeitskraft des Pferdes weitgehend durch Maschinen ersetzt worden. Dennoch haben die Pferde einen sehr hohen Stellenwert in der Gesellschaft: als Sport- und Freizeitkameraden sowie bei der Therapie und Rehabilitation kranker und behinderter Menschen. Auch dienen sie heute noch in schwer zugänglichen Gegenden, wie beispielsweise auf Island, als äußerst wichtiges Transportmittel.

Eine wichtige Aufgabe eines Tiermediziners ist es, Krankheiten schnell zu erkennen und richtig zu behandeln. Dabei spielt die Untersuchung des Blutes eine große Rolle, da viele Erkrankungen mit einer deutlichen Veränderung des Blutbildes einher gehen: so verändern sich die Leukozyten bei bakteriellen oder viralen Infektionen deutlich, eine Erhöhung der eosinophilen Granulozyten ist bei Allergie oder Parasitenbefall zu beobachten und bei vielen inneren Erkrankungen lassen sich Veränderungen der Werte verschiedener Komponenten des Serums, (wie beispielsweise einer Erhöhung von Bilirubin, Cholesterin oder den Gallensäuren bei Lebererkrankungen) nachweisen. Die Kenntnis der normalen Laborwerte des Blutes gesunder Tiere, insbesondere auch der Zahl und Struktur ihrer Blutzellen ist daher von großer Bedeutung. Diese Beurteilung der zellulären Bestandteile des Blutes erfolgt daher am besten an einem Blutaussstrich unter dem Lichtmikroskop, für welche eine Vielzahl differenzierter Färbemethoden auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene zur Verfügung stehen.

Auf der Oberfläche der Blutzellen befinden sich spezifische Kohlenhydratstrukturen, welche verschiedene Funktionen haben. Sie dienen einerseits der Kommunikation der Zellen untereinander, fungieren aber auch als Eintrittspforte für Viren und Mikroorganismen. Zur Lokalisation dieser Kohlenhydratreste wird die Lektin histochemie erfolgreich angewendet. Die Lektine besitzen die Fähigkeit, sich an ganz bestimmte Kohlenhydratstrukturen selektiv zu binden. In dieser Arbeit wurden daher lektin histochemische Untersuchungen am Blut von Pferden durchgeführt, um die Kohlenhydratstrukturen der verschiedenen Typen der Blutzellen genauer analysieren zu können.

Des Weiteren wurden zur Identifizierung von Antigenen der Leukozyten monoklonale Antikörper eingesetzt. Damit wurde versucht, die einzelnen Subpopulationen der Lymphozyten (B-Lymphozyten, T-Lymphozyten) zu unterscheiden.

Die Zuckerstrukturen der roten Blutzellen bestimmen weiterhin das Blutgruppensystem der Pferde. Die einzelnen Blutgruppen spielen eine Rolle bei der Behandlung von großen Blutverlusten mittels Transfusion oder bei der Therapie der neonatalen Isoerythrolyse beziehungsweise deren Vermeidung. Desweiteren sind Blutgruppen für die Abstammungskontrolle in der Pferdezucht und als genetische Markierungsfaktoren zur Charakterisierung der verschiedenen Pferderassen wichtig.

„Blut ist ein ganz besonderer Saft“

J. W. von Goethe

II Literaturübersicht

1. Das Blut des Pferdes

1.1 Zusammensetzung des Blutes

Die Gesamtblutmenge beträgt bei erwachsenen Haussäugetieren etwa 6-8 % der Körpermasse (Kraft et al., 1997). Demnach besitzt ein Pferd mit einem Gewicht von ca. 500 kg etwa 40 Liter Blut. Zwar sind im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Rassen entstanden, man kann aber grundsätzlich zwischen zwei Basistypen unterscheiden, die auch in Hinblick auf ihre Blutzusammensetzung variieren: die sogenannten Warmblüter und die Kaltblüter (Archer und Jecott, 1977). Sie unterscheiden sich vor allem in ihren Hämatokritwerten. Mit Werten von 32-53% besitzen die Warmblüter höhere Werte als die Kaltblüter mit 24-44% (Jain et al., 1986). Auch in den Werten der Erythrozyten gibt es große Unterschiede. Ein Rennpferd, also ein „heißblütiges“ Pferd, besitzt mit $9,35 \times 10^6 / \mu\text{L}$ eine deutlich höhere Zahl an roten Blutkörperchen, als ein Percheron, ein Vertreter der Kaltblüter, mit $7,39 \times 10^6 / \mu\text{L}$ (Jain et al., 1986). In den anderen Blutparametern stimmen sie weitgehend überein.

Das Blut setzt sich aus zellulären Bestandteilen, wozu Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten gezählt werden, und aus dem Blutplasma zusammen (Kraft et al., 1997). Das Blutplasma enthält Wasser, organische Bestandteile, wie Albumin, Globuline, Fibrinogen, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fette, Cholesterin, Harnstoff, Kreatinin u.a., und anorganische Bestandteile. Hierzu zählen z.B. Natrium-, Chlorid-, Kalium-, Kalzium-, Magnesium- und Eisenionen und Jod. Außerdem enthält das Blutplasma zahlreiche Hormone, Enzyme, Antikörper und Gerinnungsfaktoren.

In Abbildung 1 ist die Zusammensetzung des Blutes noch einmal dargestellt:

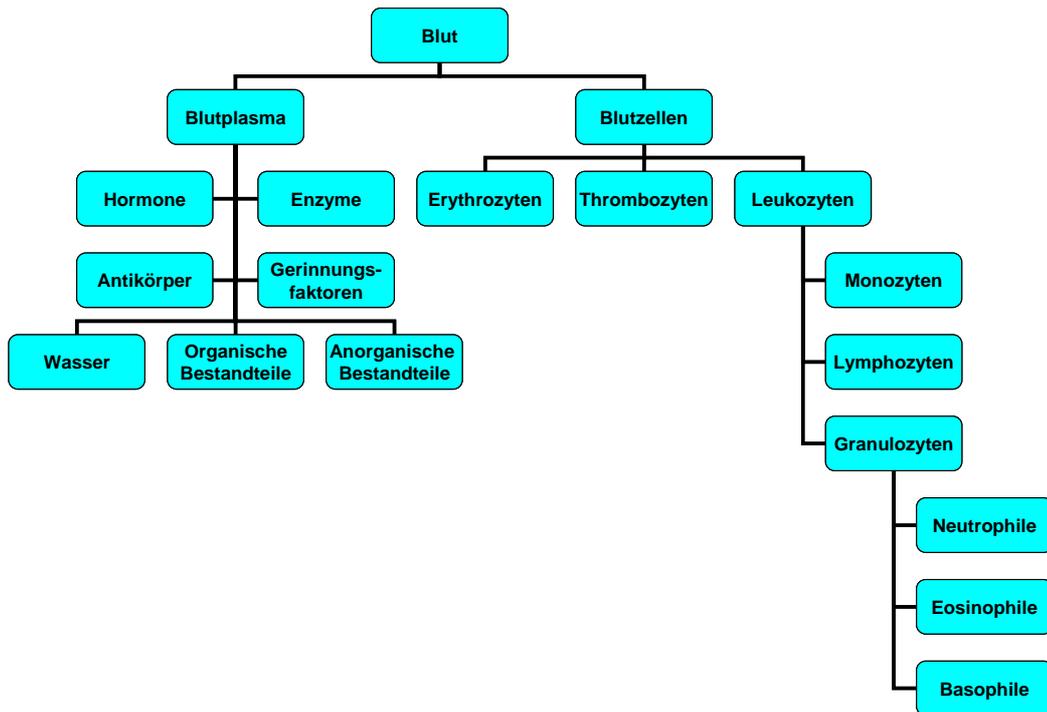


Abbildung 1: Zusammensetzung des Blutes

Die Funktionen des Blutes sind vielfältig. Sie reichen vom Stofftransport, über die Aufrechterhaltung des physiochemischen Gleichgewichts bis hin zu spezifischen und unspezifischen Abwehrfunktionen. So sorgt es etwa durch die Transvektion von Wärme für die Erhaltung einer konstanten Körpertemperatur. Blut ist das Transportmedium für Sauerstoff und Kohlensäure, Nahrungsstoffe, Stoffwechselprodukte, Hormone und viele andere Substanzen. Durch den Stoffaustausch zwischen den einzelnen Organen und Geweben sorgt das Blut für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes und des osmotischen Druckes und so für die Homöostase im Gewebe. Durch die Antikörperbildung durch Lymphozyten und Plasmazellen und die Phagozytose durch Granulozyten und Monozyten spielt das Blut eine große Rolle innerhalb der körpereigenen Abwehr.

1.2 Besonderheiten des Pferdeblutes

Beim gesunden Pferd überwiegen die neutrophilen Granulozyten innerhalb der Leukozyten deutlich. Das Verhältnis der Granulozyten zu den Lymphozyten beträgt etwa 60:40 (Schäfer, 2005). Somit besitzen Pferde, wie auch der Mensch, Hunde und Katzen ein granulozytäres Blutbild, wohingegen Wiederkäuer, Schweine, Mäuse und Ratten ein lymphozytäres Blutbild aufweisen (Lösch et al., 2000). Allerdings besteht bei Vollblutpferden eine Tendenz zur Lymphozytose.

Bei den bekannten domestizierten Pferdearten, zu denen auch der Esel und das Maultier gehören, gibt es einige hämatologische Unterschiede (Archer und Jecott, 1977). Voll-, Warm- und Kaltblut unterscheiden sich, wie bereits oben erwähnt, vor allem in ihren Hämatokritwerten.

Die Zusammensetzung des Blutes ist auch physiologischerweise innerhalb eines bestimmten Rahmens einem ständigen Wechsel unterworfen. Sie ist abhängig von verschiedenen Parametern wie Alter und Trainingszustand (Kraft et al., 1997), aber auch Rasse und Verwendungszweck (Schäfer, 2005). Zudem befinden sich beim Pferd ein Drittel der gesamten Erythrozyten als Reserve in der Milz, was bei einem plötzlichen Freisetzen zu erheblichen Veränderungen im Blutbild führt (Schäfer, 2005). So erfolgt zum Beispiel bei psychischer oder physischer Belastung, also bei einem erhöhten Sympathikotonus, eine Kontraktion der glatten Muskulatur in den Milztrabekeln (Krzywanek, 2005), welche zur Freisetzung der Blutzellen aus der Milz führt. Auch wenn generell 6-8% der Körpermasse auf das Blut entfallen, gibt es doch deutliche Unterschiede in Bezug auf die verschiedenen Pferderassen. Der Vollblüter besitzt mit 100 bis 105 ml/kg KM das größte Blutvolumen. Ein Pferd dieser Art mit einem Gewicht von 450 kg verfügt somit über 45 Liter Blut (Krzywanek, 2005).

Der Hämatokrit, also der Anteil des Volumens der Blutkörperchen am Gesamtblutvolumen, beträgt je nach Rasse 32 bis 45 Vol%. Nach maximaler Kurzzeitbelastung sind bei Pferden Werte von bis zu 60 Vol% gemessen worden, also eine Steigerung um bis zu 50%, was als eine Folge des Auspressens der Zellsuspension aus der Milz anzusehen ist. Dies wird als sog. Entspeicherungspolyglobulie bezeichnet und ist seit 1920 bekannt (Torten und Schalm, 1964). Damit wird der stark ansteigende Sauerstoffbedarf der arbeitenden Skelettmuskulatur gedeckt und der Abtransport der erhöhten Kohlendioxidmenge sicher gestellt (Krzywanek, 2005). Verursacht wird dieser extreme Anstieg der zirkulierenden roten Blutkörperchen durch eine Reaktion adrenerger Rezeptoren und eine durch Adrenalin induzierte Kontraktion der Milz (Torten und Schalm, 1964). Im Gegensatz dazu kommt es bei Gabe von Promazin, Barbituraten oder Halothan-Narkosen bei gesunden Pferden zu einem Absinken der Erythrozytenwerte bis unter die Normalwerte. Dies ist Folge einer Sequestration der roten Blutzellen in der Milz und einer Speicherung in der Milz (Jain, 1986).

Bei splenektomierten Pferden wurden diese Veränderungen nicht beobachtet (Lording, 2008). Das Ausmaß der Veränderungen aufgrund der Milzkontraktion wird von zahlreichen Faktoren, wie dem Alter, der Fitness des Pferdes und der Intensität und Härte der Arbeit, beeinflusst. Die resultierende Polyzytämie und ansteigende Sauerstofftransportkapazität wird durch die ansteigende Viskosität des Blutes und die nachfolgende Belastung des Herzens gegengerechnet (Persson, 1967). Es kann durchschnittlich 40 bis 60 Minuten aber manchmal auch mehrere Stunden dauern, bis die Normalwerte wieder erreicht werden (Jain, 1986).

Beim Auftreten einer Kolik kann der Hämatokrit innerhalb von Minuten von 40% auf 75% ansteigen, ohne dass dabei ersichtliche Anzeichen einer Veränderung des Wasserhaushaltes erkennbar wären. Auch wenn die daraus resultierende Polyzytämie die totale Sauerstoffträgerkapazität des Blutes erhöht, geht dies zu Lasten der Blutviskosität und des Herzens (Persson, 1967). Der Hämatokrit stellt im Falle einer Kolik einen wertvollen Parameter für die Prognose dar: je höher er ist, desto schlechter ist die Prognose.

Stark beanspruchte und widerspenstige Pferde haben häufig eine Hyperglykämie, Polyzytämie und Neutrophilie, gelegentlich auch eine Lymphozytosis, welche wieder Normwerte erreicht sobald sich das Pferd beruhigt hat. Diese markante Veränderung ist das Ergebnis der intravasalen Verteilung von Granulozyten und Lymphozyten (Kramer, 2000).

Beim Fohlen sind die Konzentrationen von Erythrozyten, Lymphozyten und Fibrinogen niedriger und die Serumwerte von Eisen höher als beim erwachsenen Pferd (Harvey et al., 1984). Das mittlere Erythrozyten Volumen (MCV) ist beim neugeborenen Fohlen relativ hoch und fällt dann während der ersten vier Lebensmonate ab. Die Werte des erwachsenen Pferdes werden im Alter von einem Jahr erreicht (Jain, 1986). Neonatale Hyperbilirubinämie ist als Ergebnis einer verspäteten fetalen Entwicklung der Bilirubinkonjugation der Leber nicht ungewöhnlich (Bauer et al., 1984). Eine falsch positive Diagnose der neonatalen Isoerythrolyse ist somit möglich. Neugeborene Fohlen beginnen ihr Leben mit einer Lymphozytenkonzentration von 1000/ μ L oder noch weniger. Innerhalb der ersten Lebensmonate steigt dieser Wert aber auf 4000 bis 5000/ μ L an (Harvey et al., 1984) (Becht und Semrad, 1985). Eine Lymphozytose mit Konzentrationen von 9000/mL und mehr ist bei aufgeregten, ängstlichen und widerspenstigen

Pferden physiologisch (Jain, 1986). Nach Beruhigung werden die Referenzwerte wieder rasch erreicht.

Folgende Tabellen zeigen physiologische Blutwerte des erwachsenen Pferdes (Kramer, 2005).

Tabelle 1: Physiologische Werte des roten Blutbildes beim erwachsenen Pferd (Kramer, 2005)

<i>Parameter</i>	<i>Einheit</i>	<i>Vollblut</i>	<i>Warmblut</i>	<i>Pony</i>
<i>Hämatokrit</i>	%	35-50	32-45	30-40
<i>Hämoglobin</i>	g/dL	12-18	11-14	9-13
<i>Erythrozyten</i>	10 ¹² /dL	8-12	6,5-9,0	5,5-8,5
<i>MCV</i>	fl	37-55	37-55	37-55
<i>MCH</i>	pg	13-19	13-19	13-19
<i>MCHC</i>	g/dL	31-36	31-36	31-36
<i>Thrombozyten</i>	10 ⁹ /L	90-300	90-300	90-300

Tabelle 2: Physiologische Werte des weißen Blutbildes beim erwachsenen Pferd (Kramer, 2005)

<i>Parameter</i>	<i>Einheit</i>	<i>Referenzbereich</i>
<i>Leukozytenzahl</i>	10 ⁹ /L	5-10
<i>Granulozyten, basophil</i>	%	0-1
<i>Granulozyten, eosinophil</i>	%	0-4
<i>Granulozyten, neutrophile stabkernige</i>	%	0-6
<i>Granulozyten, neutrophile segmentkernige</i>	%	45-70
<i>Lymphozyten</i>	%	20-45
<i>Monozyten</i>	%	0-5

Die Spezies Pferd besitzt zwei Hämoglobintypen, der Esel wiederum eine andere Variante. So verfügt ein Maultier bzw. ein Maulesel über alle drei Typen seiner Eltern (Kitchen und Brett, 1974; Kitchen und Bun, 1975; Mazur und Braunitzer, 1982). Aufgrund der Unterschiede in Erythrozyten- und Antigenstruktur zwischen Pferd und Esel kommt es gehäuft zum Auftreten der Isoimmunhämolytischen Anämie beim neugeborenen Maultier / Maulesel (McClure et al., 1994) (Traub-Dratz et al., 1995).

Methämoglobinbildung und die daraus resultierenden Heinz-Körperchen kommen bei Pferden vor, die mit oxidativen Medikamenten oder mit dem Anthelmintikum Phenothiazin behandelt werden (Kramer, 2000).

2. Bildung der verschiedenen Blutzellen

Beim Pferd beginnt, wie bei allen Säugetieren, die Blutbildung außerhalb des Embryos in der Wand des Dottersacks (Rüsse und Sinowatz, 2008). Die pränatale Entwicklung der Blutzellen erfolgt dabei in drei Phasen. Die mesodermale oder mesoblastische Periode findet im Mesenchym des Dottersacks sowie geringgradig im Mesoderm der Körperwand statt (Kressin und Schnorr, 2006). Dabei entwickeln sich aus den äußeren Zellen der Blutinseln das Gefäßendothel, aus den inneren Zellen die Hämozytoblasten. In dieser sogenannten primitiven Erythropoese werden nur rote Blutzellen gebildet, welche kernhaltig sind (Rüsse und Sinowatz, 2008). An die Erythropoese im Dottersack (mesoblastische Periode), schließt sich später eine Blutbildung in der Leber, teilweise auch in der Milz und letztendlich im Knochenmark an (Rüsse und Sinowatz, 2008). Die daraus entstehenden Erythrozyten sind kernlos.

An die mesoblastische Periode schließt sich die hepato-lienale Periode an. In dieser Phase übernimmt nach Rückbildung des Dottersacks hauptsächlich die Leber, ab Mitte der Embryonalzeit auch die Milz die Blutbildung (Kressin und Schnorr, 2006). Für die Differenzierung der Stammzellen, welche in der Leber extravaskulär stattfindet, müssen diese Kontakt mit den Prähepatozyten aufnehmen. Durch Diapedese wandern sie in die Lebersinusoiden ein. Für die Differenzierung in der Milz müssen die hämatopoetischen Stammzellen mit dem retikulären Bindegewebe in Kontakt treten. Es entstehen Proerythroblasten,

basophile und polychromatische Erythroblasten, sowie Normoblasten. Zu einem späteren Entwicklungsstadium werden auch neutrophile Myelozyten, kernhaltige und kernlose Erythrozyten sowie Makrophagen gebildet (Rüsse und Sinowatz, 2008). Die hauptsächliche hämatopoetische Phase der Leber findet im 3. bis 5. Graviditätsmonat statt, die der Milz von 3. bis 7. Monat (Rüsse und Sinowatz, 2008).

Mit der Ausbildung des knöchernen Skeletts beginnt die Bildung der Erythrozyten und der Leukozyten der myeloischen Reihe im Mark der Knochen, was als medulläre Blutbildung bezeichnet wird (Kressin und Schnorr, 2006). Ab dem Zeitpunkt der Geburt werden die Erythrozyten und Granulozyten fast ausschließlich im Knochenmark gebildet. Auch hier ist ein Kontakt der Stammzellen mit dem retikulären Bindegewebe für eine Differenzierung der Stammzellen notwendig (Rüsse und Sinowatz, 2008). Die in der Leber und im Knochenmark gebildeten Lymphozyten wandern in den Thymus, wo ihre Prägung zu T-Lymphozyten erfolgt (Kressin und Schnorr, 2006). Bei den Vögeln erlangen die B-Lymphozyten ihre Immunkompetenz in der Bursa Fabricii der Kloake. Deshalb werden diese Zellen B-Lymphozyten genannt. Als Bursa-Analoga der Säugetiere vermutet man die Lymphfollikel des Hüftdarms (Peyer-Platten) und das Knochenmark (Loeffler, 2002).

Die Entwicklungsreihen der verschiedenen Blutzellen sind in Abbildung 2 dargestellt.

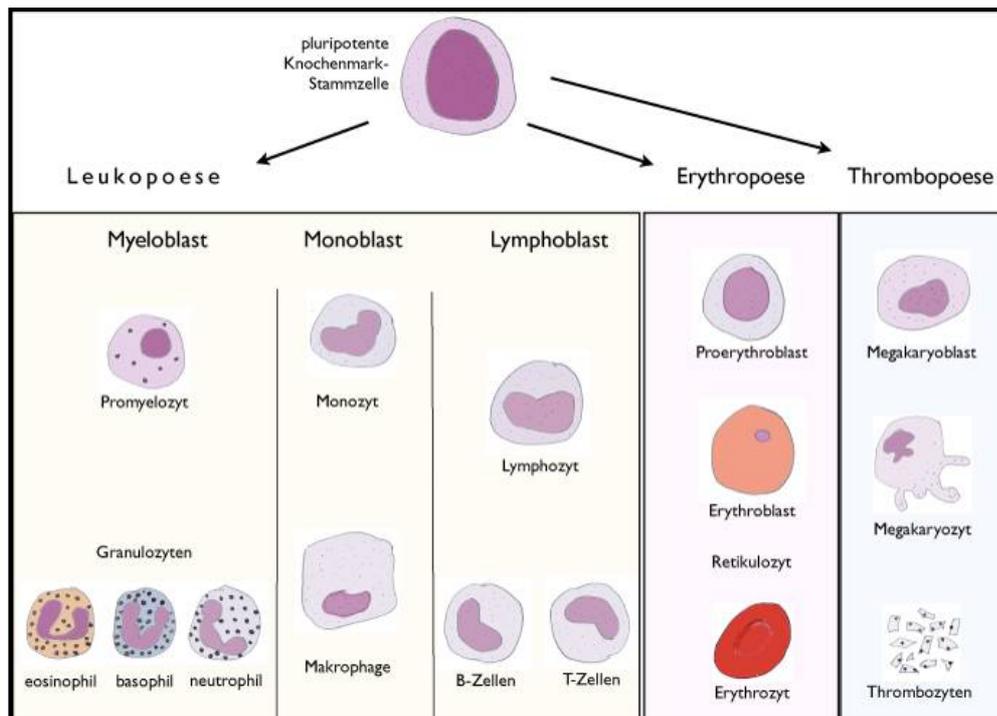


Abbildung 2: Entwicklung verschiedener Blutzellen

3. Morphologie der einzelnen Blutzellen

3.1 Erythrozyten

Wie bereits erwähnt, ist die Anzahl der Erythrozyten abhängig von zahlreichen Faktoren wie Rasse, Alter, Geschlecht und Trainingszustand. So liegt sie zum Beispiel bei einem Pferd im Ruhezustand bei $8-10 \times 10^{12}/L$. Dagegen steigt die Erythrozytenzahl nach maximaler Belastung auf Werte von $13-14 \times 10^{12}/L$ (Krzywanek, 2005). Normales Pferdeblut besitzt aufgrund der Geldrollenbildung der Erythrozyten eine schnelle Blutsenkungsgeschwindigkeit (Kramer, 2000). Dabei wurden aber wiederum erhebliche rassespezifische Unterschiede festgestellt. Die Ursache für die Geldrollenbildung ist kaum bekannt, doch scheinen Hyperfibrinogenämie, unbekannte Plasmaproteine und verschiedene Glykoproteine der Erythrozytenmembran eine Rolle dabei zu spielen (Allen, 1988, Baskurt et al., 1997). Die praktische Konsequenz dieses Phänomens ist, dass Blutproben vor ihrer Analyse gut gemischt werden müssen. Das Pferdeblut enthält viele senkungsaktive Plasmaproteine, die Agglomerine, so dass es bereits nach kurzer Zeit zu einer Zusammenballung von Zellen und damit zur Entmischung von Zellen und Blutplasma kommt. Entscheidend aber für den

Verlauf der Entmischung ist der Gehalt an Erythrozyten, der beispielsweise bei Entspeicherung der Milz drastisch erhöht und somit die Senkung stark verlangsamt ist (Krzywanek, 2005). Da das Verhältnis von Erythrozyten zu Leukozyten ca. 1000:1 beträgt, wird der Hämatokrit, also der prozentuelle Anteil von korpuskulären Bestandteilen am gesamten Blutvolumen, ganz wesentlich von den Erythrozyten beeinflusst (Lösch et al., 2000).

Die kernlosen, bikonkaven Erythrozyten des Pferdes besitzen einen Durchmesser von 5-6 μm und ein mittleres Volumen von 44-52 fL (Kramer, 2000). Ihre Überlebenszeit im zirkulierenden Blut reicht von 140 bis 150 Tagen (Carter et al., 1974). Die Erythrozytengröße steht in einem gewissen Verhältnis zur Körpergröße, wobei Tiere, die sich in großen Höhen aufhalten eine Ausnahme darstellen, da bei diesen die gesamte Oberfläche vergrößert ist, um den niedrigen Sauerstoffpartialdruck ausgleichen zu können (Lösch et al., 2000). Unter dem Elektronenmikroskop ist erkennbar, dass eine 7,5 nm dicke, glatte Zellmembran einen leicht viskösen Inhalt umschließt. Den Erythrozyten fehlen der Zellkern und sämtliche Zellorganellen. Die Zellmembran trägt außen Kohlenhydratreste, welche die Blutgruppenmerkmale bestimmen (Sinowatz und Hees, 2006). Howell-Jolly-Körperchen, welche runde, basophile Kernreste nahe der Peripherie der Erythrozyten sind, finden sich in ca. 0,1% der gesunden equinen Erythrozyten (Sonoda, 1960). Gelegentlich finden sich auch einige morphologische Abweichungen von der Normalform. Dazu gehören die Heinz-Körperchen, welche Ausfällungen von denaturiertem Hämoglobin sind und sich an der Zellmembran oder innerhalb der Zelle finden (Lassen und Swardson, 1995). Heinz-Körperchen entstehen durch Einwirkungen oxidativer Substanzen. Schistozyten sind Erythrozytenfragmente, die als Indikatoren für Störungen in der Mikrozirkulation gelten, wie sie bei der disseminierten intravasalen Gerinnung, einer Neoplasie oder einer Entzündung sehr gut durchbluteter Organe, wie der Milz, Leber oder Lunge vorkommen (Tyler et al., 1987). Die Erythrozyten des Pferdes gelangen erst nach vollständiger Reifung in die Zirkulation, weshalb Retikulozyten kaum anzutreffen sind. Über einen Anstieg der Retikulozytenzahl im Blut wurde nur bei schwerer chronischer Anämie berichtet (Collins, 1975). Die Reaktion auf eine Anämie ist beim Pferd sehr schwer zu bemessen, da nicht nur die Retikulozytenreifung ausschließlich im Knochenmark stattfindet sondern auch

die Regeneration sehr träge anläuft. Dies ist einzigartig bei den domestizierten Haussäugetieren und macht es schwer, den Erythropoesestatus des anämischen Pferdes einzuschätzen (Lassen und Swardson, 1995). Der einzige Indikator für maximal stimulierte Erythropoesis in der Routinehämatologie ist die Anisozytose der roten Blutzellen (d.h.: ansteigender RDW= red blood cell distribution width) und der Anstieg des MCV (Mean corpuscular volume) (Jain, 1986). Eine genauere Einschätzung des Erythropoesestatus ist mit der Messung der Kreatininkonzentration der Erythrozyten möglich. Diese ist in den jungen Populationen der roten Blutzellen signifikant höher (Wu et al., 1983).

3.2 Thrombozyten

Die Konzentration der equinen Blutplättchen ist eine der niedrigsten aller Säugetiere (Kramer, 2000). Sie liegt bei Werten von $90-300 \times 10^9/L$ für einen Vollblüter (Schäfer, 2005). Ratten dagegen besitzen Werte von über $2000 \times 10^9/L$ (Meyers, 1985). Ihre durchschnittliche Überlebenszeit im Blut beträgt 5-9 Tage (Kraft et al., 2005). Sie kommen im Blutausschlag einzeln oder in kleinen Gruppen vor. Manchmal findet man auch einzelne Thrombozyten, die an einen neutrophilen Granulozyten angelagert sind, was dann als „platelet satellitism“ bezeichnet wird (Hees und Tschudi, 1990).

Die Blutplättchen haben meist eine rundliche bis ovale Form. Als flache Zytoplasmascheibchen weisen sie einen Durchmesser von 1,3-4,7 μm und eine Dicke von ca. 0,5 μm auf. Sie sind kernlos, besitzen eine relativ glatte Oberfläche und eine leicht bikonvexe Kontur (Hees und Tschudi, 1990). Obwohl sie oft als "Blutplättchen" bezeichnet werden, besitzen sie die meisten für eine Zelle typischen Strukturen wie Zellmembran, Stützskelett und Organellen. Meist findet man nur ein Mitochondrium pro Thrombozyt (Meyers, 1985). Im Lichtmikroskop stellt sich eine, nach innen der Zellmembran anschließende ringförmige Zone dar, welche als Hyalomer bezeichnet wird und die sich bei den Übersichtsfärbungen der Blutausschläge homogen blaß-blau anfärben lässt. Im Zentrum der Thrombozyten liegt das Chromomer oder Granulomer, eine granuliert basophile Region, welche Organellen enthält und sich dunkel rot anfärbt (Hees und Tschudi, 1990). Es gibt zwei prominente Typen von Granula: die α -Granula und die „Dense-Granula“. Die Dense-Granula enthalten Adenin-Nukleotide, wie ATP und ADP, Amine, wie

5-Hydroxytryptamin (5-HT) und Serotonin, und zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) (Meyers, 1985). Die α -Granula sind zahlreicher zu finden. Sie sind von homogener Struktur mit einer etwas elektronendichteren Matrix. In diesen Granula befinden sich beim Pferd, wie auch beim Menschen, Affen, Schwein, Rind, Schaf, Kaninchen und der Ratte, Proteine mit antihepariner Aktivität (Fabrizi et al., 1981).

3.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, sowie Monozyten und Lymphozyten fasst man zusammen unter dem Begriff "Leukozyten", ("weiße Blutkörperchen"). Bei den neutrophilen Granulozyten kann man zwischen stabkernigen und segmentierten Granulozyten unterscheiden. Bei den Pferden, sowie auch bei den Menschen und Carnivoren beträgt der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten über 50% (Hees und Tschudi, 1990). Folgende Tabelle zeigt die hämatologischen Werte des weißen Blutbildes beim gesunden Pferd.

Tabelle 3: Weißes Blutbild des gesunden Pferdes (nach Schäfer, 2005)

<i>Parameter</i>	<i>Einheit</i>	<i>Referenzbereich</i>
Leukozytenzahl	$10^9/L$	5-10
Neutrophile Granulozyten, stabkernige	$10^9/L$	< 0,6
Neutrophile Granulozyten, segmentkernige	$10^9/L$	3,0 – 7,0
Eosinophile Granulozyten	$10^9/L$	< 0,4
Basophile Granulozyten	$10^9/L$	< 0,09
Monozyten	$10^9/L$	0 - 5
Lymphozyten	$10^9/L$	1,5 – 4,0

Bei den neutrophilen Granulozyten kann man zwischen stabkernigen und segmentkernigen Neutrophilen unterscheiden. Dabei werden die stabkernigen Granulozyten als Jugendform betrachtet. Der Grad der Reifung basiert also auf der fortschreitenden Lappung des Kerns, was das Ergebnis der Chromatinverdichtung ist (Kramer, 2000). Der Anteil der Jugendform der neutrophilen Granulozyten im Blut kann bis zu 5% betragen. Die neutrophilen Granulozyten haben einen Durchmesser von ca. 9-12 μm , besitzen eine rundliche Form und ihr Kern besteht bei den reifen Zellen aus 2 bis 5 stark basophil gefärbten Segmenten mit dichten Heterochromatinbereichen (Hees und Tschudi, 1990). Unter dem Lichtmikroskop kann man die zahlreichen neutrophilen Granula, welche Lysozym, Lactoferrin, Cobalophilin, alkalische Phosphatase und verschiedene saure Proteine enthalten, gerade noch erkennen (Sinowatz und Hees, 2006). In den Granula sind wahrscheinlich vor allem Lysosomen, welche PAS-positive Substanzen enthalten, die für die histochemische Differenzierung besonders wichtig sind (Hees und Tschudi, 1990). Bei weiblichen Tieren verschiedener Spezies kann man an den Kernen einen trommelschlegelähnlichen Kernanhang von ca. 1,5 μm Länge finden, welcher als drum-stick bezeichnet wird. Dieser enthält das inaktive, heterochromasierte zweite X-Chromosom (sex chromatin) (Hees und Tschudi, 1990).

Reife equine neutrophile Granulozyten haben einen deutlich mehrfach gelappten Kern oder scharf gezackte Kernränder mit weniger deutlicher Lappung (Smith, 2000). Abhängig von ihrer Peroxidaseaktivität sind zwei Typen von Granula zu unterscheiden. Peroxidase-positive Granula werden als azurophile oder primäre Granula bezeichnet, Peroxidase-negative Granula hingegen als spezifische oder sekundäre Granula (Smith, 2000). Die primären und sekundären Granula enthalten mikrobizide Faktoren und verdauungsaktive Enzyme. Diese töten und verdauen zusammen mit membrangebundenen und zytoplasmatischen Enzymen phagozytierte Mikroorganismen (Bertram, 1985; Jain, 1986; Ganz und Weiss, 1997). Beim Pferd scheint es, wie auch bei Schwein, Rind, Schaf, Hund, Katze, Ratte, Ziege, Kaninchen und dem Menschen, mehr als die zwei genannten Arten von Granula zu geben (Bertram und Coignoul, 1982). Defensin scheint beim Pferd, wie auch bei Maus und Schwein, zu fehlen (Ganz und Weiss, 1997). Die antibakteriellen und antiviralen Proteininhibitoren, die sogenannten Equinine, sind

in den neutrophilen Granulozyten des Pferdes vorhanden (Pellegrini et al., 1998).

Tabelle 4: Einige Inhaltsstoffe primärer und sekundärer Granula (Smith, 2000)

Primäre Granula	Sekundäre Granula
<p><i>Mikrobiozide Elemente</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Myeloperoxidase • Lysozyme • Defensin (Pferd nicht) • BPI (bactericidal permeability inducing protein) 	<p><i>Mikrobiozide Elemente</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Laktoferrin • Lysozyme • Cathelicidine
<p><i>Enzyme</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Saure Hydrolasen • Neutrale Proteasen • Elastase 	<p><i>Enzyme</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Alkalische Phosphatase • Kollagenase • Apolaktoferrin • C5a splitting Enzyme

Unter dem Elektronenmikroskop stellen sich die primären Granula als große, runde bis ovale Körperchen mit einer dichten Matrix dar. Sie haben einen Durchmesser von 0,17-0,23 µm (Bertram und Coignoul, 1982). Eine weniger dichte Matrix besitzen die sekundären Granula. Diese sind stäbchen- oder hantelförmige, gelegentlich auch runde Strukturen mit einem Durchmesser von 0,04-0,13 µm (Bertram und Coignoul, 1982).

Zu beobachten ist neben den zwei genannten Typen von Granula noch eine dritte Art, welche eine kristalline Matrix besitzt, von ovaler Gestalt ist und in der Länge 0,29-0,44 µm und in der Breite 0,11-0,23 µm misst (Bertram und Coignoul, 1982). Von den drei genannten Granula lässt sich morphologisch eine vierte Art unterscheiden. Diese Granula sind rund bis oval mit einer flockigen Matrix und

einer Länge von 0,26-0,58 μm und einer Breite von 0,14-0,26 μm (Bertram und Coignoul, 1982). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Gestalt sind die vier Arten von Granula nur schwer zu unterscheiden.

Es sei noch zu erwähnen, dass die Temperatur bei der die Neutrophilen Granulozyten des Pferdes isoliert werden, eine deutliche Auswirkung auf ihre Degranulation hat (Bertram und Coignoul, 1982).

3.4 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten sind mit einer Größe von 10-20 μm die größten Granulozyten (Hees und Tschudi, 1990). Ihre Lebensdauer liegt bei 8-12 Tagen und ihre intravasale Verweildauer bei 4-12 Stunden (Sinowatz und Hees, 2006). Der brillen- oder hantelförmige Kern ist reich an Heterochromatin und besitzt ein bis zwei Nukleoli (Hees und Tschudi, 1990). Die Granula der equinen eosinophilen Granulozyten sind groß, rund und zahlreich (Young, 2000). Mit einem Durchmesser von 2-4 μm besitzt das Pferd die größten Granula, welche eine deutliche Affinität zu sauren Farbstoffen aufweisen und sich mit Eosin orangerot färben (Hees und Tschudi, 1990). Die eosinophilen Granula des Pferdes sind so charakteristisch, dass sich allein an Hand dieses Zelltyps das Pferdeblut eindeutig identifizieren lässt. Durch die dichte Füllung der Zelle mit den großen runden Granula weist die Zelle die Form einer Maulbeere auf (Hees und Tschudi, 1990). Ultrastrukturell betrachtet kann man vier Typen von Granula unterscheiden: spezifische Granula, primäre Granula, kleine, dichte Granula und Mikrogranula. Daneben sind Zellorganellen wie Mitochondrien, freie Ribosomen, Vesikel, Lipidkörperchen, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum und Glykogenpartikel vorhanden (Dvorak et al., 1991; Bainton, 1995). Auch enthalten die Granula zum Teil dichte Innenstrukturen, denen beim Pferd ein kristallines Muster fehlt, welches bei anderen Spezies beobachtet wurde. Diese sind oft exzentrisch lokalisiert und von einer weniger dichten Matrix umgeben (Stockert et al., 1993).

3.5 Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten kommen am wenigsten oft im Blut vor. Da sie den Gewebsmastzellen sehr nahe stehen, bezeichnet man sie auch als Blutmastzellen (Hees und Tschudi, 1990). Sie stammen von CD34+ Zellen aus dem Knochenmark ab (Dvorak und Monahan, 1985; Kirshenbaum et al., 1992). Normalerweise werden sie erst nach dem vollständigen Reifeprozess aus dem Knochenmark ins Blut entlassen (Dvorak und Monahan, 1985). Dies dauert wenigstens 2,5 Tage (Murakami et al., 1969). Ihre Halbwertszeit im Blut beträgt ca. 6 Stunden, aber in vitro Studien weisen darauf hin, dass es den basophilen Granulozyten möglich ist, bis zu 2 Wochen zu überleben, wenn sie erstmal ihr Zielgewebe erreicht haben (Osgood, 1937, Yamaguchi et al., 1992; Hirai et al., 1997). Sie haben einen Durchmesser von 8-11 µm und der Zellkern ist 2-3 fach segmentiert (Hees und Tschudi, 1990). Die Granula, welche einen Durchmesser von 0,5-1,5 µm besitzen und stark basophil reagieren, enthalten Heparin und Histamin, sowie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Serotonin und verschiedene chemotaktische Faktoren (Hees und Tschudi, 1990). Der Zellkern der basophilen Granulozyten ist leicht gelappt und besitzt stark verdichtetes Chromatin. Er wird aber oft von den dunklen Granula im Zytoplasma verdeckt (Scott und Stockham, 2000). Die basophilen Granulozyten und die Mastzellen sind die einzigen Zellen der Säugetiere, von denen man weiß, dass sie Histamin synthetisieren und Rezeptoren besitzen, die eine hohe Affinität zu IgE aufweisen. Deswegen werden sie auch als Sensorzellen bezeichnet (Marone et al., 1997). Die wichtigsten Unterschiede und Eigenschaften von Mastzellen und basophilen Granulozyten sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 5: Wichtigste Eigenschaften von Mastzellen und basophilen Granulozyten (Scott und Stockham, 2000)

<i>Eigenschaften</i>	<i>Basophile Granulozyten</i>	<i>Mastzellen</i>
Pluripotente Stammzelle	CD34+	CD34+
Ort der Differenzierung	Knochenmark	Extramedulläres Gewebe
Kern	lang, variabel segmentiert	rund bis oval
Zirkulation im Blut	in niedrigen Konzentrationen	kaum anwesend
Lebenszeit im Gewebe	Tage, evtl. Monate	Wochen bis Monate
Mitosepotential	nein	Ja
Mediator für Differenzierung und Proliferation	IL-3	SCF (Stem cell factor)
Agonisten: Cytokine	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, CD40- Ligand, IFN γ , IGF-I, IGF-II, TGF- β , u.a.	IL-3, IL-4, IL-9, IL-10, NGF, GM-CSF, SCF, u.a.
Chemotaxine	IL-3, GM-CSF, IL-5, IL-8, PAF, C5a, u.a.	-
Chemokine	MCP-1, MCP-2, MCP-3 RANTES, MIP-1 α , u.a.	IL-8, CTAP-III, MCP-1 MCP-1 α , RANTES
Komplementprotein	C1, C3, C4, C5a	C3a, C5a
Zellprodukte: Biogene Amine	Histamin, Adenosin, Serotonin	Histamin, Serotonin
Enzyme	Protease, Elastase, β - Glukuronidase, Cathepsin G	A- Tryptase, β - Tryptase Chymase, Carboxy- Peptidase, Cathepsin G, Phospholipase u.a.
Proteoglykane	Chondroitinsulfat, Heparin	Chondroitinsulfat Heparin
Chloracetat- Aktivität	negativ	positive
Tryptase- Aktivität	negative	positive
Metachromsienfärbung mit basischen Farbstoffen	bei saurem pH, nicht bei neutralem	bei saurem und neutralem pH

3.6 Lymphozyten

Im Blutausstrich kann man unter dem Lichtmikroskop zwischen großen und kleinen Lymphozyten unterscheiden. Sie haben einen Durchmesser von 11-18 μm beziehungsweise 4-10 μm , besitzen kugelförmige Gestalt und eine Oberfläche, die je nach Funktionszustand glatt ist oder kurze unregelmäßige Mikrovilli trägt (Hees und Tschudi, 1990). Reife Lymphozyten sind die kleinsten Zellen der peripheren Leukozyten (Carrick und Begg, 2008). Der Zellkern ist sehr chromatinreich und färbt sich mit basischen Farbstoffen stark an, so dass der Nukleolus nur unter dem Elektronenmikroskop sichtbar ist. Der dichte große Zellkern lässt nur wenig Platz für einen schmalen Saum von Zytoplasma (Carrick und Begg, 2008). Zum Teil findet man auch größere Lymphozyten mit weniger dichtem Chromatin, einem ovalen Zellkern und einem größeren Anteil von Zytoplasma. Mit Hilfe von immunologischen Methoden kann man zwei unterschiedliche Zelltypen differenzieren; B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (Hees und Tschudi, 1990). Die Lebenszeit der Lymphozyten variiert stark von einigen Stunden bis zu Jahren, wie zum Beispiel bei den langlebigen Gedächtniszellen. Manchmal findet man nach Antigenstimulation reaktive Lymphozyten im peripheren Blut. Diese sind meist T- Lymphozyten und zeichnen sich durch scheinbar geklumpertes Chromatin und dunkelblaues Zytoplasma aus. Möglicherweise ist auch eine hellere perinukleäre Zone zu erkennen. Diese können leicht mit Monozyten verwechselt werden (Carrick und Begg, 2008).

3.7 Monozyten

Auf dem Blutausstrich scheinen die Monozyten, auf Grund ihrer Anheftungs- und Ausbreitungseigenschaften auf gläsernen Oberflächen, größer als neutrophile Granulozyten zu sein (Bienzle, 2000). In der Durchflusszytometrie tierischer Leukozyten aber zeigt sich, dass frische Monozyten tatsächlich von der gleichen Größe oder etwas kleiner als neutrophile Granulozyten, aber größer als Lymphozyten sind (Bienzle, 2000). Der Zellkern kann gefaltet, hufeisen-, schmetterlings- oder eiförmig sein (Bienzle, 2000) und liegt häufig exzentrisch (Hees und Tschudi, 1990). Die Kernränder sind scharf ausgeprägt und das Chromatinmuster ist netzartig oder filigran (Bienzle, 2000). Das Zytoplasma ist basophil und gelegentlich findet man azurophile Granula. Zytoplasmatische

Vakuolen, welche regelmäßig als ein eindeutig identifizierendes Merkmal der Monozyten bezeichnet werden, sind hauptsächlich als Artefakte anzusehen, werden aber auch als ein Zeichen von erhöhter Phagozytoseaktivität bei bestimmten Erkrankungen gedeutet (Latimer, 1995). Sind die Zellen inaktiv ist deren Oberfläche relativ glatt, im aktiven Zustand dagegen bilden sich zahlreiche kugelige und fingerförmige Ausstülpungen. In diesem Zustand ist der Monozyt nicht mehr von einem Histozyt zu unterscheiden (Hees und Tschudi, 1990).

In folgender Tabelle sind die zytochemischen Charakteritika der Monozyten verschiedener Haussäugetiere und des Menschen dargestellt.

Tabelle 6: Zytochemische Eigenschaften der Monozyten (Grindem et al., 1986; Jain, 1986; Douglas und Ho, 1995)

Zytochemischer Marker	<i>Hund</i>	<i>Katze</i>	<i>Pferd</i>	<i>Rind</i>	<i>Schaf</i>	<i>Ziege</i>	<i>Mensch</i>
<i>Saure Phosphatase</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++
<i>Alkalische Phosphatase</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chloracetat Esterase</i>	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Glykogen</i>	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Unspezifische Esterase</i>	++	++	+	+	+	+	++
<i>Peroxidase</i>	+/-	-	+/-	-	-	-	+
<i>Sudan Schwarz B</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-

Das Erscheinungsbild von Monozyten und Makrophagen unter dem Elektronenmikroskop ist eindeutig. In Korrelation zur Motilität und Phagozytosefähigkeit ist die Oberfläche extensiv gerafft (Bienzle, 2000). Das Zytoplasma enthält Vakuolen, schmale heterogene Granula, zahlreiche Mitochondrien, eine variable Zahl an Ribosomen und wenig endoplasmatisches Retikulum (Bienzle, 2000). Zum Teil befinden sich kleine Nukleoli im Zellkern. Der Golgi-Apparat ist gut entwickelt und liegt in der Nachbarschaft des Zellkerns. Die sehr zahlreich vorkommenden Lysosomen stellen sich als elektronendichte,

membrangebundene Vesikel dar, welche, verschmolzen mit Phagosomen, Phagolysosomen genannt werden. In diesen kann man aufgenommenes und verdautes Material finden (Bienzle, 2000).

4. Funktion der einzelnen Blutzellen

4.1 Erythrozyten

Die Hauptaufgabe der roten Blutkörperchen besteht im Gastransport. Dabei ist deren bikonkave Scheibenform von Vorteil, da dadurch die Zelloberfläche vergrößert wird, wodurch die Diffusion der Atemgase durch die Zellmembran erleichtert wird. Die flexible Struktur der Erythrozyten erleichtert zugleich die Passage durch die engen Kapillaren. Der Sauerstoff wird beim Transport reversibel an das intrazelluläre Hämoglobin gebunden (Lösch et al., 2000). Des Weiteren finden sich auf der Membran der Erythrozyten Kohlenhydratstrukturen, die für die Blutgruppenmerkmale verantwortlich sind, auf die noch näher eingegangen wird (Bowling, 2000).

4.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung. Sie werden im Knochenmark durch die Freisetzung von Zytoplasmafragmenten der Megakaryozyten produziert (Lassen und Swardson, 1995). Auch wenn die Thrombozyten zahlreiche Funktionen bei der Blutgerinnung besitzen, ist doch ihre größte Aufgabe die Produktion eines „Blättchenpfropfs“. Innerhalb von Sekunden nach einer Gefäßverletzung kommt es zur Adhäsion der Plättchen an subendotheliale Komponenten (Lassen und Swardson, 1995). Diese Adhäsion wird vor allem durch den von-Willebrand-Faktor, dem größten Plasmaprotein, welches aus zahlreichen, identischen Untereinheiten besteht, bewirkt. Zum Teil erfolgt die Adhäsion auch fibrinogenvermittelt. Dies geschieht vor allem in Venen, da dort niedrige Scherkräfte herrschen. Im Anschluss an die Adhäsion kommt es zur Aggregation. Zusätzliche Thrombozyten lagern sich hierbei an der Gefäßläsion an und bilden ein Thrombozytenaggregat (Lassen und Swardson, 1995). Dieser Vorgang wird durch sogenannte Agonisten gefördert. Dazu zählen Thrombin, Kollagen, ADP, Epinephrin und andere Substanzen. Durch die Anlagerung der Thrombozyten erfolgt deren Aktivierung, was die Veränderung

ihrer Form und die Freisetzung der Inhaltsstoffe aus den Granula zur Folge hat. Die dabei freigesetzten Substanzen, wie ADP, Serotonin und Thromboxan A₂, aktivieren wiederum weitere Blutplättchen. Die Sekretion dieser Substanzen führt zur irreversiblen Aggregation.

4.3 Neutrophile Granulozyten

Die wichtigste Funktion der neutrophilen Granulozyten ist die Phagozytose, weshalb sie auch als Mikrophagen bezeichnet werden (Hees und Tschudi, 1990). Darunter versteht man die Aufnahme und Zerstörung von Bakterien, Zelltrümmern und Fremdpartikeln (Lösch et al., 2000). Dieser Prozess wird von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Phagozyten genutzt, um größere Partikel (0,5 µm) aufzunehmen (Smith, 2000). Erleichtert wird dies durch die sogenannte Opsonisierung, welche die Wiedererkennungsrates von Zielmaterial und deren Aufnahme erhöht. Helfer der beteiligten Faktoren, der Opsonine, sind Immunglobuline und das Komplementsystem, vor allem die dritte Komponente des Komplements (Sengelov, 1995; Stickle, 1996).

Die neutrophilen Granulozyten können mittels Diapedese das Blut aktiv verlassen und in das Gewebe einwandern. Durch direkte Migration oder Chemotaxis gelangen sie mit Hilfe von Mediatoren oder chemischen „Anziehern“ (Chemoattractants) an den Ort der Entzündung oder Infektion (Smith, 2000). So binden beispielsweise N-formylierte Peptide (N-FMLP), C₅a, Leukotrien B₄ (LTB₄) oder Interleukin 8 (IL-8) an heptahelicale, G-Protein-gekoppelte Oberflächenzellrezeptoren auf den neutrophilen Granulozyten (Zwahlen et al., 1994; Bokoch, 1995). Als Ergebnis kommt es zur Aktivierung der Zelle, zur Umgestaltung des Zytoskeletts, zur Wanderung durch das Endothel in das Gewebe, zur Phagozytose von Mikroorganismen, zur Sekretion von Granula mit antimikrobiziden Inhaltsstoffen und zur Aktivierung der NADPH-Oxidase (Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat), um toxische Metaboliten von Sauerstoff zu generieren (Zwahlen et al., 1994; Bokoch, 1995). Oxidativen Mechanismen kommt die größte Bedeutung beim Töten von Mikroorganismen durch neutrophile Granulozyten zu (Smith, 2000). Sauerstoffunabhängige Tötungsmechanismen funktionieren sowohl bei Anwesenheit als auch bei Abwesenheit von Sauerstoff. Effektoren hierfür beinhalten kationische Proteine

und Enzyme wie Defensin, Lysozym, Hydrolasen, neutrale und saure Proteasen und Laktoferrin (Bertram, 1985).

Durch die Synthese von immunregulatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF und TGF- β (transforming growth faktor), spielen die neutrophilen Granulozyten eine aktive Rolle im Immunsystem (Fujishima, 1995).

4.4 Eosinophile Granulozyten

Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl ist relativ gering, ihre Zahl steigt aber bei allergischen und parasitären Erkrankungen stark an. Das macht deutlich, dass diese Zellen eine große Rollen bei der Kontrolle parasitärer Erkrankungen und bei der Regulierung allergischer und entzündlicher Vorgänge spielen (Hees und Tschudi, 1990). Auch die eosinophilen Granulozyten können effektiv mit Hilfe der Inhaltsstoffe ihrer Granula phagozytieren und so Mikroorganismen abtöten. Sie geben diese Stoffe (lysosomale Enzyme, reaktive Sauerstoffverbindungen) aber auch an das umgebende Gewebe ab und töten auf diese Weise extrazelluläre Parasiten wie Würmer (Lösch et al., 1999). Auch wenn sie die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen, so sind doch ihre bevorzugten Objekte (Würmer) zu groß für dieses Vorhaben. Deswegen sezernieren sie ihre Mediatoren direkt auf ihr Ziel, statt Material aufzunehmen und toxische Mediatoren in intrazelluläre Lysosomen zu sezernieren, wie es Strategie der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist (Young, 2000). Die eosinophilen Granulozyten besitzen auch eine immunsuppressive Funktion bei hypersensitiven Reaktionen. Dabei beseitigen sie Immunkomplexe und granulierte „Abfälle“ von Mastzellen, inaktivieren die von basophilen Granulozyten und Mastzellen freigesetzten Mediatoren, unterdrücken deren Degranulation und unterbinden die Bildung aktiver Metaboliten (Kroegel et al., 1994; Jandl, 1996).

4.5 Basophile Granulozyten

Über die Bedeutung der basophilen Granulozyten ist relativ wenig bekannt. Sie setzen Mediatoren für entzündliche und allergische Prozesse frei, sind einbezogen in den Triglyzerid-Metabolismus und besitzen Rezeptoren für die Immunglobuline E und G (Hees und Tschudi, 1990). So kommt es bei allergischen Prozessen zur

Bindung von Immunglobulin des IgE-Typs, dadurch zur Quervernetzung der IgE Moleküle durch das Allergen und letztendlich zur Degranulation der basophilen Granulozyten (Lösch et al., 1999). Extensive anatomische und funktionelle Studien konnten zeigen, dass den basophilen Granulozyten eine große Rolle bei allergischen Erkrankungen, wie Urtikaria, allergische Rhinitis und Konjunktivitis oder anaphylaktischen Reaktionen, verursacht durch Medikamente oder Insekten, zukommt (Bochner et al., 1994; Knol et al., 1996). Bei entzündlichen Prozessen setzen die basophilen Granulozyten das Histamin und Serotonin aus den Granula frei und beeinflussen so den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität (Lösch et al., 1999). Auch vermitteln sie eine gewisse Resistenz gegen parasitäre Infektionen, welche aber abhängig zu sein scheint von der Art der Parasiten, dem Wirt und dem Ort der Infektion (Gill, 1986; Neitz et al., 1993; Costa et al., 1997).

4.6 Lymphozyten

Immunologische Abwehrreaktionen sind ohne Beteiligung von Lymphozyten nicht möglich. B-Lymphozyten sind für die Bildung spezifischer Antikörper verantwortlich, T-Lymphozyten für die zellvermittelte Immunantwort (Craddock et al., 1971).

B-Lymphozyten machen ca. 15% der totalen zirkulierenden Lymphozytenpopulation aus und zeichnen sich durch die Expression von Immunglobulinen an ihrer Oberfläche aus. Der vorwiegende Anteil der B-Lymphozyten sind inaktive Zellen, welche IgD und IgM an ihrer Oberfläche exprimieren (Stobo, 1988; Lunn und Horohov, 2004). Für ihre weitere Differenzierung benötigen sie die Stimulation durch T-Helfer-Zellen. Dadurch werden sie zunächst zu B-Zellen, die nur einen Typ von Immunglobulinen exprimieren. Im weiteren Verlauf entstehen spezifische, Immunglobulin sezernierende Plasmazellen. Plasmazellen findet man sehr selten in der peripheren Zirkulation. Vielmehr sind sie in lymphatischen Geweben ansässig, wo auch die T-Zell vermittelte Entwicklung stattfindet (Stockham und Scott, 2002; Latimer und Prasse, 2003).

Auch wenn die Hauptaufgabe der B-Lymphozyten als Effektorzellen in der humoralen Immunantwort liegt, so haben sie doch auch Bedeutung als Regulatorzellen (Mizoguchi und Bhan, 2006). Sie produzieren Zytokine, wie

Interleukin-10, welches für eine Balance zwischen T-Helfer-1- und T-Helfer-2-Zellen sorgt und direkt die Entzündungsreaktion hemmt. Darüber hinaus produzieren sie den „transforming growth factor- β “ (TGF- β), welcher die Apoptose der T-Effektor-Zellen auslöst. Diese spezifischen B-Regulator-Zellen produzieren Antikörper, die beispielsweise Komplement- Faktoren binden, agieren als antigen- präsentierende Zellen und sind in der Lage, die Beseitigung apoptotischen Materials, welches schädliche, proinflammatorische Zusammensetzungen und Antigene freisetzen kann, zu verbessern (Carrick und Begg, 2008).

Die Funktionen der T-Lymphozyten sind sehr komplex. Eine Einteilung in verschiedene Unterklassen geschieht an Hand von Oberflächenmarkern, welche auch die jeweilige Funktion der T-Zellen widerspiegelt. Ungefähr 80% der zirkulierenden Lymphozyten sind T-Zellen, welche durch die Expression eines CD3-Komplexes charakterisiert sind. Wiederum 90% dieser Zellen exprimieren einen CD4- oder einen CD8-Komplex. CD4 positive T-Zellen besitzen Rezeptoren für MHC Klasse-II assoziierte Antigene, dahingegen CD8 positive T-Zellen Rezeptoren für MHC Klasse-I assoziierte Antigene besitzen (Carrick und Begg, 2008). CD8 positive Zellen sind vor allem zytotoxische Effektorzellen, CD4 positive werden als T-Helferzellen bezeichnet. Die T-Helferzellen sind wie erwähnt für die Differenzierung der B-Lymphozyten verantwortlich. Des Weiteren können sie auf Grund ihrer Produktion von Zytokinen in T- Helfer-1 und T-Helfer-2 Zellen unterteilt werden. T-Helfer-1-Zellen produzieren Interferon- γ und Interleukin-1 und sind damit Teil der zellvermittelten Immunität. Die Interleukine 4 und 5 der T-Helfer-2 Zellen induzieren die Produktion von Antikörpern (Carrick und Begg, 2008).

10% der verbleibenden Lymphozytenpopulation lassen sich keiner der genannten Gruppen zuordnen. Sie sind hauptsächlich für die nicht antikörperabhängige Zytotoxizität verantwortlich und sind vermutlich CD8 positiv oder CD4 und CD8 negativ. Die verbleibenden ca. 5% der zirkulierenden Lymphozyten exprimieren weder einen CD3 Komplex noch Immunglobuline an ihrer Oberfläche. Diese werden als natürliche Killerzellen und Null-Zellen bezeichnet und sind wichtige zytotoxische Zellen (Carrick und Begg, 2008).

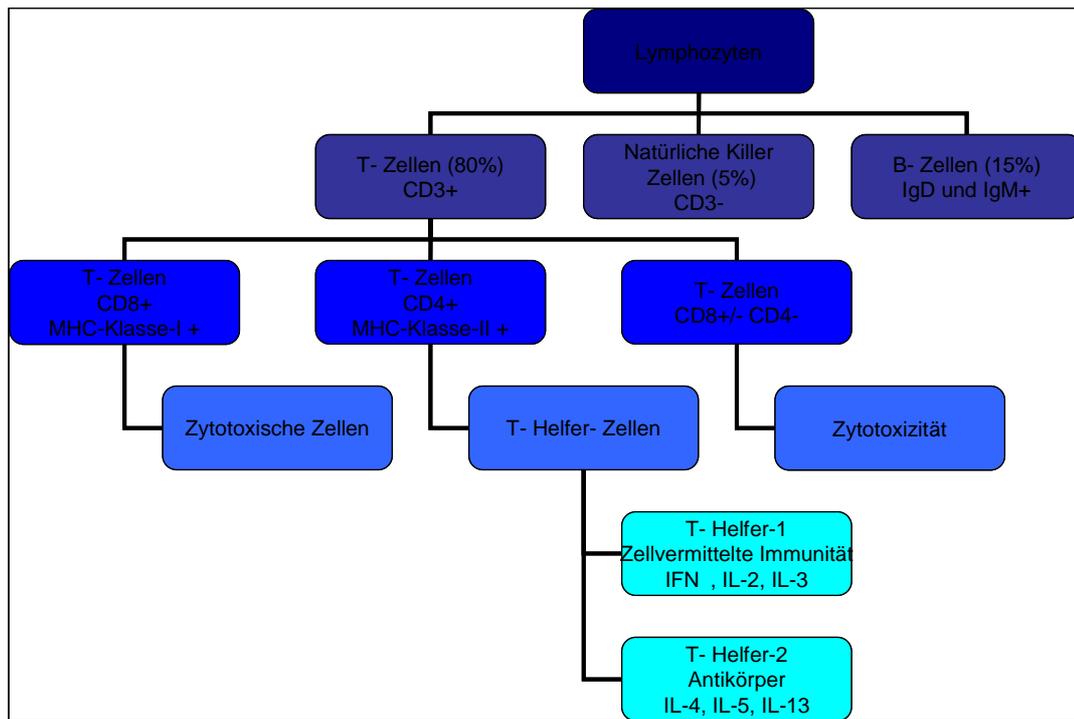


Abbildung 3: Lymphozyten

In Abbildung 3 ist die Unterteilung der Lymphozyten in die einzelnen Subpopulationen noch einmal verdeutlicht (nach Carrick und Begg, 2008).

4.7 Monozyten

Die Monozyten wandern nach einer mehrtägigen Zirkulation im Blut in das Gewebe aus. Dort kommt es unter dem Einfluss verschiedener lokaler Faktoren zu einer weiteren Differenzierung der Monozyten in Makrophagen. Diese werden in den einzelnen Lokalisationen verschieden bezeichnet.

Tabelle 7: Lokalisation und Bezeichnung der Makrophagen

Lokalisation	Bezeichnung
Knochenmark	<i>Monoblasten, Promonozyten, Monozyten, Makrophagen</i>
Blut	<i>Monozyten</i>
Leber	<i>Kupffer Sternzellen</i>
Lunge	<i>Alveolarmakrophagen</i>

Lokalisation	Bezeichnung
Bindegewebe	<i>Histiozyten</i>
Knochen	<i>Osteoklasten</i>
Haut	<i>Histiozyten, Langerhanszellen</i>
Zentrales Nervensystem	<i>Mikroglia</i>
Serosa	<i>Pleural-, Peritonealmakrophagen</i>

Die Zellen des mononukleären Phagozytensystems sind ebenso wie die Granulozyten in der Lage, Partikel zu phagozytieren und abzubauen. Im Gegensatz zu den Granulozyten können sie dies aber auch wiederholt und über einen längeren Zeitraum hinweg (Lösch et al., 2000). Sie arbeiten nach ähnlichen Mechanismen und produzieren reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, sowie lysosomale Enzyme. Die Energie für diesen Prozess gewinnen sie vor allem aus der Glykolyse. Eine Ausnahme sind hierbei die Alveolarmakrophagen, die durch oxidative Phosphorylierung ATP gewinnen (Bienzle, 2000). Monozyten und Makrophagen sind mittels kontraktiler zellulärer Proteinen wie Aktin und Myosin, beweglich (Bienzle, 2000). Zu den Substanzen, die die Chemotaxis dieser Zellen induzieren, zählen N-formylierte, bakterielle Peptide, Komplementkomponenten (C3a und C5a), Leukotrien B₄, Kollagen und Elastin, Thrombin, Plättchenfaktor 4 und PDGF (platelet-derived growth factor) und Chemokine wie MIP-1 α und MIP-1 β (macrophage inflammatory proteins) sowie RANTES (regulated upon activation, normal T expressed and secreted) (Lehrer und Ganz, 1995; Donnelly und Bucala, 1997). Desweiteren synthetisieren und sezernieren sie über 100 andere Proteine, darunter zahlreiche Zytokine, wie den Tumornekrosefaktor- α und das Interleukin-1. Damit beeinflussen sie auch das Thermoregulationszentrum im Hypothalamus und können Fieber induzieren (Lösch et al., 2000). Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des spezifischen Abwehrsystems. Nach der Spaltung phagozytierter Antigene erfolgt deren Bindung an MHC-KlasseII-Moleküle. Durch die Präsentation dieser Moleküle an der Oberfläche der Zelle erfolgt die

Antigenerkennung durch T-Helferzellen und somit die Aktivierung des spezifischen Abwehrsystems (Lösch et al., 2000).

In Abbildung 4 sind die Funktionen der Makrophagen noch einmal verdeutlicht.

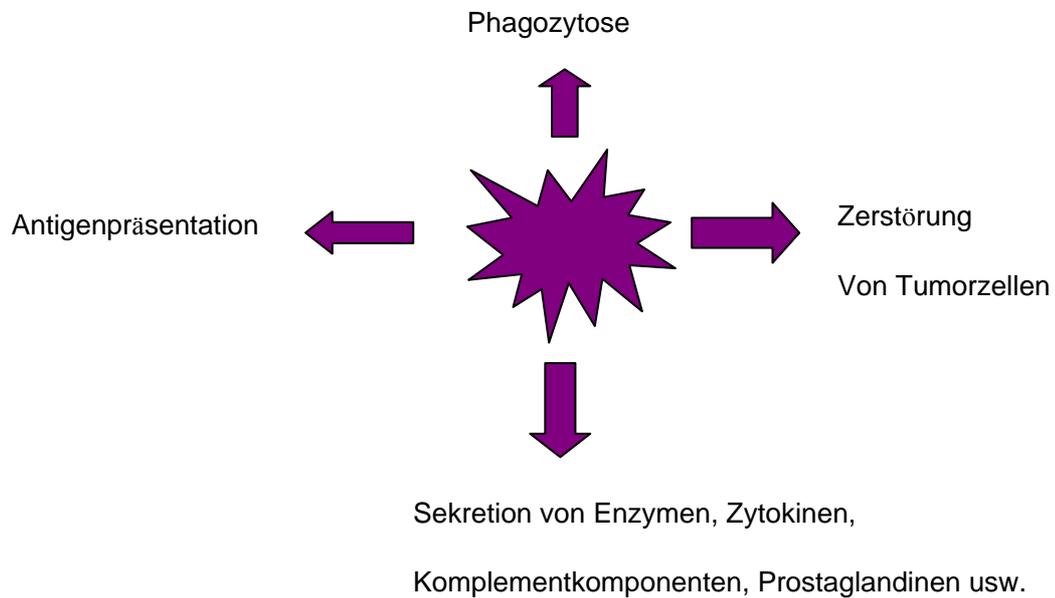


Abbildung 4: Funktionen der Makrophagen

5. Glykohistochemie

5.1 Entstehung und Definition des Begriffs „Lektin“

Eine neuere Definition des Begriffs "Lektin" geht auf Goldstein et al. (1980) zurück. Demnach sind Lektine "spezifische, ursprünglich nur in Pflanzen gefundene, kohlenhydratbindende Proteine nicht immunogener Herkunft, die die Fähigkeit besitzen, Zellen zu agglutinieren und/ oder Polysaccharide bzw. Glykokonjugate zu präzipitieren" (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry; Dixon, 1981).

Ursprünglich wurden sie aus Pflanzen isoliert und aufgrund ihrer Eigenschaft, Blutzellen zu agglutinieren als Phytohämagglutinine bezeichnet. Heute weiß man, dass sie ubiquitär vorkommen; man findet sie außer in Pflanzen auch in Tieren und Mikroorganismen. Schon sehr früh wurde in Verbindung mit der Entdeckung der Blutgruppen der Begriff Lektin eingeführt (Boyd und Slaughter, 1954). Dieser leitet sich aus dem lateinischen Wort „legere“ (auswählen) ab, was die Fähigkeit

der Lektine, bestimmte Zuckerstrukturen spezifisch auszuwählen und damit nur bestimmte Zellen zu agglutinieren, hervor heben soll. Diese Bezeichnung hat sich heute im Wesentlichen durchgesetzt und andere, meist ältere Bezeichnungen wie „Phytagglutinin“, „Phythämagglutinin“, „Phasine“, „Normal-Antikörper“, „pflanzliche Antikörper“, „natürliche Antikörper“ oder „Antikörper-ähnliche Substanzen“ verdrängt (Roth, 1978; Kokourek, 1986; Sharon, 1987).

5.2 Kurze Geschichte wichtiger Lektine

Bereits 1875 wurde erstmals eine Agglutination von Erythrozyten durch Proteine tierischen Ursprungs beschrieben (Landois, 1875). 1888 fand Peter Herman Stillmark bei den Arbeiten an seiner Doktorarbeit (Universität Dorpat, Estland) das hochgradig toxische Lektin Rizin aus den Samen von *Ricinus communis* (Rizinusbaum) und beobachtete dessen Fähigkeit, Erythrozyten zu agglutinieren (Stillmark, 1888, 1889). Er bemerkte auch, dass die Reaktionen der Erythrozyten sich bei verschiedenen Tierarten unterschieden.

Hellin beschrieb 1891 die Fähigkeit der Agglutination und Serumpräzipitation eines toxischen Extraktes aus den Samen des *Abrus precatorius* (Paternostererbse) (Hellin, 1891).

Ähnliches fand Stillmark am Toxin Crotin heraus, welches er aus den Samen des *Croton tiglium* (Krotonölbaum) isolierte. Auch konnte er eine Agglutination von Leberzellen, Epithelzellen und Leukozyten durch Zugabe von Rizin beobachten. Elfstrand konnte in seinen Versuchen das unterschiedliche Verhalten der Erythrozyten verschiedener Tierarten gegenüber dem Toxin Crotin zeigen (Elfstrand, 1897, 1898). Bei einigen Erythrozyten konnte eine Hämolyse beobachtet werden (Kaninchen, Krähen), andere agglutinierten sehr stark (Rinder, Schweine, Schafe, Hechte, Barsche und Frösche). Bei der Katze war die Agglutination nur schwach und bei den Erythrozyten des Menschen kaum vorhanden. Einige Tierarten zeigten keinerlei Reaktion bei Zugabe von Crotin (Tauben, Hunde, Ratten, Hühner, Gänse und Meerschweinchen). 15 Jahre später konnten diese Ergebnisse von Kobert bestätigt werden, der ähnlich Versuche mit Rizin, Abrin und Crotin unternahm (Kobert, 1913).

Rizin verwendete auch Ehrlich 1891 zusammen mit Abrin in seinen

Untersuchungen über das Immunsystem als Antigene und konnte damit wichtige Mechanismen bei der Bildung und über die Spezifität von Antikörpern herausfinden (Ehrlich, 1891). Kaninchen, welche er mit kleinen Mengen von Samen der Paternostererbse fütterte, entwickelten einen gewissen Grad an Immunität gegen Abrin.

Ein viertes pflanzliches Toxin isolierten Power und Cambier 1890 aus der Rinde der *Robinia pseudoacacia* (Scheinakazie), welches sie Robin nannten (Power und Cambier, 1890). Später wurde noch ein anderes Hämagglutinin aus den Samen der Scheinakazie isoliert (Mendel, 1909; Kobert, 1913).

Dass bei der Hämagglutination von der Waals-Kräfte, Londonkräfte, Wasserstoff-Brückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung bewirken und diese stets reversibel sind fand Karl Landsteiner im Jahr 1902, nach seiner Entdeckung des menschlichen ABO- Blutgruppensystems im Jahr 1900, heraus (Landsteiner, 1902).

1907 isolierten Landsteiner und Raubitschek erstmals nicht toxische Phyttagglutinine aus den Samen der Leguminosen (Hülsenfrüchtler, *Fabaceae*), sowie aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), aus Erbsen (*Pisum sativum*), Linsen (*Lens culinaris*) und Wicken (*Vicia sativa*) (Landsteiner und Raubitschek, 1907). Sie nannten sie „Phasine“. Sie beobachteten bestimmte Eigenschaften dieser Lektine, wie beispielsweise ihre Wasserlöslichkeit, ihre Thermolabilität, die Unlöslichkeit in Alkohol und eine positive Biuret- und Xanthoproteinreaktion. Landsteiner und Raubitschek erkannten auch, dass Muzin aus dem Magen der Schweine eine Deagglutination von durch Abrin, Rizin oder Bohnenextrakten agglutinierten Erythrozyten bewirkt (Landsteiner und Raubitschek, 1909).

Den Beweis für die Zuckerspezifität der Lektine lieferten Summer und Howell 1936. Sie fanden heraus, dass ConA (*Concanavalia ensiformis* Agglutinin aus der Schwertbohne) nicht nur in der Lage ist, Erythrozyten zu agglutinieren, sondern auch Hefezellen und Glykogen (Summer und Howell, 1936). Einige Jahre später stellte sich heraus, dass die Hämagglutination unterschiedlich stark in Abhängigkeit von der jeweiligen Blutgruppe ausfiel, was als Beweis für die Blutgruppenspezifität angesehen wurde (Renkonen, 1948; Boyd und Reguera, 1949).

Bei seinen Untersuchungen am Hämagglutinin aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) machte Peter C. Nowell 1960 eine wichtige Entdeckung. Er bemerkte die Fähigkeit dieses Lektins, Lymphozyten zur Mitose zu stimulieren (Nowell, 1960). Dieses Phänomen widerlegte die bis dahin geltende Meinung, Lymphozyten seien „Terminalzellen“, welche ihren Endzustand erreicht hätten und zu keiner weiteren Differenzierung mehr in der Lage wären.

Die Beobachtung, dass das Weizenkeimagglutinin (WGA) vor allem maligne Zellen bindet, machte Joseph C. Aub 1965 (Aub, 1965). Dieses Lektin wurde bereits von Ambrose zur Unterdrückung des Tumorwachstums verwendet (Ambrose et al., 1961). Aub konnte zeigen, dass dieses Lektin in der Lage ist, eine Agglutination transformierter Zelllinien zu bewirken, nicht jedoch normaler Zellen.

5.3 Struktur und Bindungseigenschaften der Lektine

Bis heute sind über 100 Lektine bekannt, von denen man weiß, dass sie zuckerhaltige Strukturen binden und so zur Agglutination von Zellen führen. Daraus kann gefolgert werden, dass jedes Lektin mindestens zwei Zuckerbindungsstellen pro Molekül besitzen muss. Man spricht von der sogenannten Multivalenz. Obwohl die Lektine den Immunglobulinen strukturell in manchem sehr ähnlich erscheinen, variieren sie doch stark in ihrem Molekulargewicht (30000-400000 Da), der Aminosäurezusammensetzung, dem Metallionenbedarf als Co-Faktor und der 3D-Struktur. Sie sind also nicht mit spezifischen Antikörpern gleich zu setzen (Sharon, 1977; Alroy, 1984; Sharon, 1987). Sie bestehen in der Regel aus zwei bis vier Untereinheiten und besitzen mehrere unterschiedliche Zuckerbindungsstellen (Sharon, 1987). Das Horseshoe crab Lektin zählt mit seinen über 20 Untereinheiten zu den größten Proteinen überhaupt. Meistens binden die Lektine an terminale Glykosylgruppen von Oligo- und Polysacchariden. ConA hingegen bindet aber auch an interne Mannosereste (Goldstein und Poretz, 1986).

Folgende Tabelle nach Goldstein und Poretz (1986) zeigt die Einteilung der Lektine nach ihrer Bindungsaffinität zu bestimmten Kohlenhydratgruppen.

Tabelle 8: Einteilung nach Goldstein und Poretz (1986)

Lektin-Gruppen	Bindungsaffinität
<i>GlcNAc- Gruppe</i>	Glukose-/N-Acetyl-Glukosamin-bindende Lektine <i>Bsp.: Triticum vulgare Agglutinin (WGA)</i>
<i>GalNAc- Gruppe</i>	Galaktose-/N-Acetyl-Galaktosamin-bindende Lektine (Bindung Mangan- und Kalzium-Ionen abhängig) <i>Bsp.: Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)</i>
<i>Fukose- Gruppe</i>	L-Fukose-bindende Lektine <i>Bsp.: Ulex europaeus Agglutinin (UEA)</i>
<i>Mannose- Gruppe</i>	Mannose-bindende Lektine (Bindung abhängig von Metallionen) <i>Bsp.: Concanavalia ensiformis Agglutinin (ConA)</i>
<i>Oligosaccharid- Gruppe</i>	Oligosaccharid-/Neuraminsäure-bindende Lektine <i>Bsp.: Limax flavus Agglutinin (LFA)</i>

Pflanzliche Lektine sind vor allem in Samenkörnern, Wurzeln, Rinden und Blättern zu finden (Rüdiger, 1998; Gabius et al., 2004). Die Ackerbohne *Vicia faba* enthält das *Favin*, welches wie ConA aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten zusammengesetzt ist. Dabei stimmen die Abschnitte 70-119 der α -Kette sowie die Abschnitte 1-69 und 120-237 der β -Kette überein. Es handelt sich um eine sogenannte zyklische Permutation der Polypeptidabschnitte (Cunningham et al., 1979). Es stellt sich die Frage, ob das Lektin ConA aus einer Fusion der zwei Polypeptidketten des *Favin* entstanden ist oder ob ConA als Vorläufer des *Favin* anzusehen ist.

Tierische Lektine besitzen sogenannte „carbohydrate recognition domains“ (CRDs), also eine Kohlenhydraterkennungsdomäne in der Tertiärstruktur, die zur Oligosaccharidbindung dient. Glykane können mit Hilfe nichtkonvalenter Komplexe gebunden werden (Toone, 1994). Aufgrund von Homologien in der

Primärstruktur können die tierischen Lektine verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Drickamer und Taylor, 1993; Crocker und Feizi, 1996; Gabius, 2009).

Tabelle 9: Einteilung der Lektine der Säugetiere (nach Gabius, 1997)

<i>Familie</i>	<i>Struktur</i>	<i>Zuckerligand</i>	<i>Beispiele</i>
C- Typ	Konservierter CRD und Ca ²⁺ -Ionen	Variabel (Mannose, Galaktose, Fukose, Heparin- Trisaccharid)	Selektine Kollektine
I- Typ	Immunglobulin-ähnlicher CRD	Variabel (Man ₆ GlcNa _{c2} , HNK-1 Epitop, Hyaluronsäure)	Siglecs
Galektine	Konservierter CRD	Galβ1,3(4)GlcNAc Basisstrukturen mit Spezies und Galektintypabhängigen Affinitätsunterschieden für die Verlängerung z. B. zu den Blutgruppenepitopen A, B oder H; Affinität auch zu Poly(<i>N</i> -Acetyl-lactosamin)-Ketten	Galektin 1- 14
Pentraxine	Diskusähnliche Aggregation zu Pentameren	4,6- Ringacetat von β-Galaktose, Galaktose, sulfatierte und phosphorylierte Monosaccharide	SAA CRP
P- Typ	Konservierter CRD	Mannose- 6- Phosphat enthaltende Glykoproteine	CD- MPR IGF- II / MPR

5.4 Funktion der Lektine in vivo

Bis heute ist die Funktion der Lektine erst teilweise geklärt. Sie scheinen in den Pflanzen eine Art unspezifisches Abwehrsystem zu bilden. So können sie zum Beispiel parasitäre Pilze und Pilzhyphen erkennen, diese binden und so deren Wachstum stoppen (Brokks et al., 1997). Sie können weiter Eiweißmoleküle in Proteinkörpern von Leguminosensamen speichern und haben so eine raum- und wassersparende Wirkung. Darüber hinaus vermitteln sie die Fixierung von

stickstoffbindenden Bakterien, wie beispielsweise des Rhizom Bakteriums aus der Gattung der *Acetobacter*, an Pflanzenwurzeln der Leguminosen (Roth, 1978) (Franz, 1990). Verschieden Lektine sind toxisch und bieten so den Pflanzen Schutz vor Fressfeinden. Ein Beispiel hierfür ist die Gartenbohne *Phaseolus vulgaris*, welche ein Lektin besitzt, welches letal ist für den Käfer *Callosobruchus maculatus*. Die Rhizinusbohne *Ricinus communis* weist das für Mensch und Tier hochgiftige Rizin (*Ricinus communis* Agglutinin) auf. Viele pflanzlichen Lektine haben deutliche mitogene Eigenschaften und wirken proliferativ auf Lymphozyten, vor allem auf T-Lymphozyten (Franz, 1990).

Daneben gibt es auch Lektine mikrobieller Herkunft, die für die Adhäsion dieser Mikroorganismen an ihre Zielzelle sorgen, also für Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich sind. Sie werden deswegen auch als „mikrobielle Adhäsine“ bezeichnet. Sie sind auch an Bindungs- und Erkennungsprozesse zwischen Bakterien und phagozytierenden Zellen (Mirelman und Ofek, 1986; Sharon und Lis, 1993; Lindhorst, 2000) beteiligt.

In den letzten Jahren wurde eine größere Zahl von Lektinen auch bei Säugetieren entdeckt. Ein bekanntes Beispiel ist das Galactose- und NANA-spezifische Lektin der Leber, das an der Eliminierung gealterter Proteine beteiligt ist. Calnexin und sein lösliches Analogon Calretikulin sind Säugerlektine, die eine Kontrollfunktion bei der Biosynthese von Glykoproteinen ausüben. Calnexin ist ein nicht glykosyliertes Membranprotein und befindet sich intrazellulär am endoplasmatischen Retikulum. Dort bindet es als Chaperon transient an terminale Glukosereste von Oligosaccharideinheiten frisch entstehender Glykoproteine und kontrolliert deren Faltung (Spiro et al., 1996).

6. Immunzytochemie

6.1 Definition und Anwendung

Unter der Immunzytochemie versteht man die Darstellung antigener Strukturen auf Zellen und Geweben in histologischen Präparaten mit Hilfe daran bindender Antikörper (Pschyrembel, 2004). Durch Koppelung verschiedener Markersubstanzen an die Antikörper, werden diese sichtbar gemacht (Sinowatz, 2000). Für die Immunzytochemie eignen sich neben polyklonalen vor allem auch

monoklonale Antikörper. Letztere werden von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie produziert und richten sich gegen ein einzelnes Epitop. Solche Antikörper binden mit sehr hoher Spezifität verschiedenste Moleküle und eignen sich somit hervorragend für Diagnostik und Forschung. Cesar Milstein, Georges Köhler und Niels Jerne publizierten 1975 das Prinzip der Herstellung monoklonaler Antikörper und erhielten dafür 1984 den Nobelpreis für Medizin (Köhler und Milstein, 1975). Bei dieser sogenannten Hybridom-Technik kommt es zu einer Verschmelzung antikörperproduzierender B-Zellen mit Zellen der Myelom-Zelllinie, wodurch hybride Zellen entstehen, die unbegrenzt Antikörper produzieren.

6.2 Technik

Es wird unterschieden zwischen einer direkten und einer indirekten Methode. Bei der direkten Methode wird der Antikörper direkt auf die histologischen Schnitte aufgetragen und bindet dort das zugehörige Antigen. Die nicht gebundenen Antikörper werden abgewaschen. Bei der indirekten Methode wird die Empfindlichkeit des Nachweises erhöht, indem zuerst ein gegen das nachzuweisende Antigen gerichteter Antikörper aufgetragen wird. Dann wird der Schnitt mit einem gegen diesen ersten Antikörper gerichteten zweiten, markierten Antikörper inkubiert (Sinowatz, 2000). Die Markierung der Antikörper kann mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC=Fluoreszeinisothiocyanat) erfolgen, welcher bei Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Dies wird als Immunfluoreszenz bezeichnet (Denk, 1989). Bei den immunenzymatischen Methoden erfolgt die Markierung mit Enzymen. Beispiele hierfür wären die alkalische Phosphatase aus *E. coli*, die Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* oder die Meerrettich-Peroxidase. Diese Enzyme bilden unter Umsetzung der entsprechenden Substrats (Bsp.: Diaminobenzidin für Peroxidase) einen farbigen Komplex (Pearse, 1980). Bei der Enzym-Antienzym-Komplex-Methode wird ein Enzym an einen entsprechenden Antikörper gebunden. Der primäre Antikörper wird durch einen Brücken-Antikörper mit dem Enzym-Antikörper verbunden. Beispiele für diese Methode sind der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (PAP-Komplex) oder der Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex (APAAP-Komplex) (Denk, 1989). Eine weitere Möglichkeit ist die Markierung mit kolloidalen Goldpartikeln, welche sich im Lichtmikroskop rötlich

darstellen (Denk, 1989). Bei der Avidin-Biotin-Methode nutzt man die hohe Affinität des Hühnereiweißproteins Avidin zu Biotin aus und verwendet hierfür biotinylierte Antikörper. Bei der ABC-Methode wird ein fertiger Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex verwendet (Denk, 1989).

6.3 Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten

Für eine erfolgreiche Immunantwort sind die Lymphozyten von großer Bedeutung. Hauptträger der humoralen Abwehr sind die B-Lymphozyten durch die Produktion von Antikörpern. Neben zahlreichen anderen Aufgaben neutralisieren diese direkt Krankheitserreger und Toxine, aktivieren die Komplementkaskade, Makrophagen und natürliche Killerzellen. T-Lymphozyten lassen sich nach der Struktur ihres T- Zellrezeptors in $\gamma\delta$ -T-Zellen und $\alpha\beta$ -T-Zellen unterteilen. Erstere reagieren gegen Hitzeschock- und Stressproteine. Die $\alpha\beta$ -T-Zellen lassen sich einteilen in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen. Sowohl bei B- als auch bei T-Lymphozyten gibt es Gedächtniszellen, die bei wiederholtem Antigenkontakt eine schnellere und spezifischere Immunantwort ermöglichen. Für die Steuerung der Immunantwort existieren regulatorische T-Lymphozyten (Tizard, 2000).

Da es abgesehen von geringen Unterschieden keine eindeutigen morphologischen Unterscheidungsmerkmale von B- und T-Lymphozyten gibt, ist erst mit Hilfe spezifisch bindender Antikörper eine Differenzierung möglich. Einen wertvollen Beitrag zur Erforschung der Oberflächenantigene der Leukozyten des Pferdes lieferte der „First Equine Leucocyte Antigen Workshop“ (ELAW I) 1991 in Cambridge, England (Kydd et al., 1994). Hierbei wurden den Antigenen EqCD2, EqCD4, EqCD5, EqCD8, EqCD11a/CD18 (LFA-1), EqCD13, EqCD44, EqMHC Klasse 1 und EqMHC Klasse 2 Antikörper zugeordnet. Es gelang weiterhin, Marker für B-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und für einige bis dahin unbekannte T-Zell-Subpopulationen zu definieren. Das Kürzel „CD“ entspricht dem für Menschen üblichen System und steht für „cluster of differentiation“. „Eq“ für equine definiert die Tierart.

Tabelle 10: Auszug der Ergebnisse des First International Workshop on Equine Leucocyte Antigens (Lunn et al., 1993):

<i>Antigen</i>	<i>Vorkommen</i>
EqCD2	T-Zellen
EqCD4	Thymozyten, T-Helfer-Zellen
EqCD5	Pan T-Zellen
EqCD8	Thymozyten, Zytotoxischen T-Zellen, T-Suppressor-Zellen
EqCD11a/18	Pan Leukozyten
EqCD13	Monozyten, Granulozyten
EqCD44	T-Zellen, Granulozyten, RBC
B29A	B-Lymphozyten
EqMHCII	B-Lymphozyten, ruhende periphere T-Zellen

Im Jahr 1995 wurden durch zahlreiche Forscher im „Second Equine Leucocyte Antigen Workshop“ (ELAW II) in Squaw Valley, Kalifornien, 113 Antikörper definiert und mit WS1 bis WS113 durchnummeriert (Lunn et al., 1998). Die „Equine Immunology“- Konferenz 2001 in Santa Fe, New Mexiko, befasste sich vor allem mit der Klassifizierung von Zytokinen des Pferdes, deren Klonierung, der Etablierung von Antikörper gegen Zytokine und dem PCR- Verfahren zum Nachweis von mRNA (Marti et al., 2003).

7. Blutgruppen beim Pferd

Die Erforschung des equinen Blutgruppensystems in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde stark beeinflusst von den umfangreichen Forschungsarbeiten am humanen ABO Blutgruppensystem durch Landsteiner (Landsteiner, 1900). Landsteiner, ein Wiener Arzt und Bakteriologe, stellte fest, dass beim Mischen von Blutproben verschiedener Menschen vielfach eine Verklumpung der roten Blutkörperchen eintritt. Als erste Entdecker der Blutgruppen beim Pferd gelten Hirszfeld und Przesmycki (Hirszfeld und Przesmycki, 1923). Sie fanden bei der

serologischen Untersuchung von 45 Tieren heraus, dass es auch beim Pferd zwei verschiedene Blutgruppen gibt. Sie nannten sie Gruppe A und B. Das Merkmal A fand sich bei 70% der untersuchten Tiere, Merkmal B bei 15%. Bei 9% der untersuchten Pferde fehlten A und B. Im Gegensatz zu den Menschen der Blutgruppe A und B, bei denen sich die entsprechenden Isoagglutinine anti-A und anti-B immer nachweisen lassen, konnte Hirszfeld bei Pferden der Gruppe A das Agglutinin anti-B nur in 10% der Tiere feststellen. Bei Tieren der Gruppe B wurde das Agglutinin in 60% der Fälle gefunden. In der Gruppe O war anti-A regelmäßig und anti-B zu 50% vorhanden. Die Befunde ließen sich durch Absorptionsuntersuchungen bestätigen. Pionierarbeit bei der Isolierung der Pferdeblutgruppen leisteten Schermer und seine Schüler an der Universität Göttingen (Schermer, 1928; Schermer et al., 1932; Schermer et al., 1934/35; Schermer und Kaempffer, 1933; Schermer und Kaempffer, 1936) sowie Lehnert am Nationalinstitut für Veterinär bakteriologie in Stockholm (Lehnert, 1939). Schermer und seine Mitarbeiter nahmen das Vorkommen von zwei Hauptfaktoren A und B, sowie von vier sekundären Faktoren C, D, E und F an, wobei die Blutkörpereigenschaften A, B, C, D und F jeweils als durch ein Genpaar bestimmt angesehen wurden. Lehnert unterschied mit Hilfe von Isoimmunseren die Faktoren O, A, B und AB mit sechs partiellen Rezeptoren für A, drei für B, drei Lysinogene und ein Autoisoagglutinin I. Nach Lehnert erfolgt die Vererbung dieser Faktoren wie bei den menschlichen Blutgruppen. Während Schermer den Nachweis der Blutgruppenfaktoren beim Pferd mit Normalantikörpern, welche als normale Bestandteile im Serum von Pferden enthalten sind, durchführte, setzte Lehnert Isoimmunantikörper zur Untersuchung ein. Diese gewann er durch Vorbehandlung von Pferden mit dem Blut anderer Pferde.

Landsteiner und Wiener beobachteten im Jahr 1940, dass die Rh-Antigene für das Auftreten der beim neugeborenen Fohlen gefürchteten foetalen Erythroblastose verantwortlich sind (Landsteiner und Wiener, 1940). Dies gab der Blutgruppenforschung einen weiteren entscheidenden Impuls.

Eyquem und Mitarbeiter untersuchten die Blutgruppen und ihre antigenen Beziehungen bei Pferd, Maultier und Esel (Eyquem et al., 1956). Dabei stellten sie fest, dass die Untersuchung der Pferdeblutgruppen mit Isoimmunseren schwierig ist. Bei Verwendung von Eselserum und absorbiertem Mauleselserum

fand die Gruppe der französischen Forscher fünf Hauptantigene. Beim Maultier ließen sich fünf Antigene A, C, D, E und F nachweisen, die vom Pferd stammten. Antigen B wurde als eselspezifisch erkannt. Bei der Untersuchung der 412 Pferde ergab sich folgende Verteilung der fünf Blutgruppenantigene:

A= 72,3% C= 84% D= 15,8% E= 30,6% F= 78%

Bei den 32 möglichen Genkombinationen gehörten 2% der Pferde der Blutgruppe 0 an. Ein Fall wurde beobachtet, in dem das Agglutinogen E eine Isoimmunisierung auslöste. Das betroffene Saugfohlen erkrankte an einem hämolytischen Ikterus.

Podilachouk wies mit Hilfe von Isoagglutininen, die im Normalserum von Pferd und Maultier festgestellt wurden, und mit bestimmten Heteroagglutininen, die im Normalserum von Eseln zu finden sind, im Hämagglutinationsverfahren 10 verschiedene Erythrozytenantigene nach (Podilachouk und Wroblewski, 1958).

Stormont und Mitarbeiter gewannen in Kalifornien, unabhängig von den Ergebnissen europäischer und japanischer Forscher, Blutgruppentestseren zum Nachweis von 16 verschiedenen Blutgruppenantigenen (Stormont und Suzuki, 1963; Stormont et al., 1963; Stormont und Suzuki, 1964; Stormont et al., 1964). Der Vergleich dieser Seren mit denen von Podliachouk und Hesselholt (Podliachouk und Hesselholt, 1962) ergab, dass sechs Seren in ihren Reaktionsspektren übereinstimmten und 10 Seren Erythrozytenantigene erfassten, die in Europa und Asien zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt waren. Dabei handelt es sich um die pferdespezifischen Antigene A₂, A', P₁, P₂, P', Q, R, S, T und U.

Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um die Erythrozyten der Pferde in Bezug auf natürlich vorkommende Isoagglutination zu klassifizieren (Podliachouk, 1957; Hesselholt, 1961). Podliachouk isolierte hierbei 13 spezifische Agglutinine, welche zu den Blutgruppenfaktoren A bis M korrespondieren. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die hämolytische Erkrankung des neugeborenen Fohlens (Neonatale Isoerythrolyse) auf transplazentale Isoimmunisation der Stute während der Trächtigkeit zurückzuführen ist, die auf einer Unverträglichkeit der roten Blutzellen von Stute und Fohlen beruht (Bruner et al., 1948; Coombs et al., 1948). Diese Erkrankung

war schon relativ lange bekannt und wurde als hämolytischer Ikterus des Saugfohlens bezeichnet (Chicoli, 1861). Aus dem Serum betroffener Stuten wurden 11 Blutreagenzien, anti 1 bis anti 11, isoliert. Dabei zeigten sich nahe Verbindungen zwischen den Genen 1, 2, 5, 8 und 11 und zwischen den Genen 6 und 10, welche identisch sind mit Podliachouks A und F Genen (Franks, 1959, 1962).

Im Jahr 1961 wurde am Pasteurinstitut in Paris eine Nomenklatur für die Blutgruppen der Pferde erstellt, welche auch die Ergebnisse dänischer Studien berücksichtigt (Podliachouk und Hesselholt, 1962 a). Sie ist in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 11: Nomenklatur der Blutgruppen nach Podliachouk und Hesselholt, 1962:

<i>Frankreich</i>	A	B	C	D	E	F	-	H	-	J	-	L	M
<i>Dänemark</i>	B	-	A	D	-	-	C	E	G	-	F	-	-
<i>Nomencl.</i>	A2	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M

In einer Studie über die Blutgruppen des Shetland Ponys und Warmblütern identifizierten Stormont und Suzuki (1964) 16 Blutgruppenfaktoren und erstellten damit die Basis des heutigen equinen Blutgruppensystems (Bowling, 2000).

Weitere Untersuchungen führten dann zur Definition von 34 Blutgruppenfaktoren und sieben Blutgruppen beim Pferd, nämlich EAA, EAC, EAD, EAK, EAP, EAQ und EAU (Bowling, 2000). Anderen Angaben zufolge gibt es beim Pferd acht Blutgruppen, A, B, C, D, K, P, Q und U mit ebenfalls 34 Blutgruppenfaktoren (Gasthuys und De Moor, 2005). Die Blutgruppen Aa und Qa sind hauptsächlich für die neonatale Isoerythrolyse verantwortlich und kommen beim Shetlandpony und Trabern nur in sehr geringer Frequenz vor. Die Allelfrequenzen für die einzelnen Blutgruppen variieren zwischen den verschiedenen Rassen deutlich (Bowling und Clark, 1985). Auch wenn bisher noch keine detaillierten biochemischen Studien durchgeführt wurden, ist doch anzunehmen, dass die Blutgruppenantigene des Pferdes Glykolipide oder -proteine sind (Bowling, 2000).

III Material und Methoden

1. Untersuchungsmaterial

Zur Durchführung der Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurde insgesamt bei 42 Pferden Blut entnommen. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Tiere in Bezug auf Alter und Geschlecht geachtet (Siehe Tabelle 12 und Tabelle 13). Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis mittels sterilem Vakutainer System der Firma Synlab.vet Augsburg nach vorangegangener Desinfektion mit Alkohol. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt. Von der Firma Synlab.vet, Augsburg, wurde ein Blutbild von jedem Pferd erstellt.

Von jedem Pferd wurden 40 Blutaussstriche auf SuperFrost® Objektträgern angefertigt, die nach Trocknung an der Luft bei Raumtemperatur in dafür vorgesehenen Behältnissen aufbewahrt wurden.

In folgender Tabelle sind die Pferde hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts, ihrer Rasse und ihrer Verwendung in der vorliegenden Dissertation zusammengefasst.

Tabelle 12: Übersicht über die für die lichtmikroskopischen und glykohistochemischen Untersuchungen verwendeten Pferde

Name	Nummer in der Dissertation	Alter	Geschlecht	Rasse
Kjàni	1	1 Jahr	Hengst	Isländer
Fjalli	2	1 Jahr	Hengst	Isländer
Brellir	3	1 Jahr	Hengst	Isländer
Vindstjarni	4	3 Jahre	Hengst	Isländer
Elite	5	6 Jahre	Hengst	PRE
Frechdachs	6	6 Jahre	Wallach	Pony

Name	Nummer in der Dissertation	Alter	Geschlecht	Rasse
Katla	7	6 Jahre	Stute	Isländer
Diva	8	6 Jahre	Stute	Traber
Stigandi	9	8 Jahre	Wallach	Isländer
Gymir	10	9 Jahre	Wallach	Isländer
Isenburg	11	10 Jahre	Wallach	Trakehner
Tjörvi	12	11 Jahre	Wallach	Isländer
Gàski	13	12 Jahre	Wallach	Isländer
Gordino	14	13 Jahre	Wallach	Warmblut
Trölli	15	16 Jahre	Wallach	Isländer
Trausti	16	16 Jahre	Wallach	Isländer
Fönix	17	16 Jahre	Wallach	Isländer
Glotti	18	16 Jahre	Wallach	Isländer
Mökkur	19	18 Jahre	Wallach	Isländer
Skålm	20	20 Jahre	Stute	Isländer
Lady	21	26 Jahre	Stute	Connemara
Nökkvi	22	28 Jahre	Wallach	Isländer

Tabelle 13: Übersicht über die für die Immunzytochemie verwendeten Pferde

Name	Nummer in der Dissertation	Alter	Geschlecht	Rasse
Felix	23	6 Monate	Stute	Warmblut
Chilly	24	1 Jahr	Stute	Paint Horse
Spesia	25	1 Jahr	Stute	Isländer
La Fe	26	2 Jahre	Stute	Warmblut
Bonsai	27	2 Jahre	Stute	New Forrest
Gina	28	3 Jahre	Stute	Vollblut
Karri	29	5 Jahr	Hengst	Isländer
Korando	30	5 Jahre	Wallach	Vollblut
Frami	31	7 Jahre	Hengst	Isländer
Litfrid	32	7 Jahre	Stute	Isländer
Blökk	33	7 Jahre	Stute	Isländer
Sif	34	8 Jahre	Stute	Isländer
Gäski	35	8 Jahre	Wallach	Isländer
Burggraf	36	8 Jahre	Wallach	Warmblut
Noslotta	37	12 Jahre	Stute	Isländer
Gyllir	38	13 Jahre	Hengst	Isländer
Eva	39	20 Jahre	Stute	Isländer
Dreamgirl	40	22 Jahre	Stute	Dt. Reitpony
Rosi	41	23 Jahre	Stute	Warmblut
Tamiro	42	23 Jahre	Wallach	Warmblut

2. Lichtmikroskopie

Für eine bessere Differenzierung der einzelnen Zellen wurden die Blutausstriche vier unterschiedlichen lichtmikroskopischen Färbungen unterzogen, eingedeckelt mit einem Tropfen Eukitt®- Kunststoff und anschließend mit dem Aristoplan Lichtmikroskop der Firma Leitz (Wetzlar) ausgewertet. Die Aufnahme der Fotos erfolgte mit einer Canon-Powershot A 95-Digitalkamera.

2.1 Diff-Quick-Färbung

Die Diff-Quick® Färbung besteht aus drei gebrauchsfertig gelieferten Reagenzien (Labor + Technik, Berlin) und ist eine sogenannte Schnellfärbemethode, die hauptsächlich der Differenzierung der einzelnen Leukozyten dient. Sie setzt sich zusammen aus einer Fixierlösung, dem Xanthen-Farbstoff (Färbelösung 1) und dem Thiazin-Farbstoff (Färbelösung 2). Hierbei färben sich die Zellkerne dunkelblau an, die Granula der basophilen Granulozyten violett bis schwarz, die der eosinophilen Granulozyten rot bis orange und die der neutrophilen Granulozyten pink bis violett. Monozyten besitzen einen violetten Kern und ein hellblaues Zytoplasma. Thrombozyten stellen sich violett dar.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. *Objektträger 5 mal je 1 Sekunde lang in die Fixierlösung eintauchen und abtropfen lassen.*
2. *Objektträger 5 mal je 1 Sekunde lang in die Färbelösung 1 eintauchen und abtropfen lassen.*
3. *Objektträger 5 mal je 1 Sekunde lang in die Färbelösung 2 eintauchen und abtropfen lassen.*
4. *Objektträger in destilliertem Wasser spülen.*
5. *Objektträger an der Luft trocknen lassen und anschließen unter dem Lichtmikroskop auswerten.*

2.2 Giemsa-Färbung (nach Romeis, 1989)

Die Giemsa-Lösung ist als fertige Lösung (Firma Merck, Darmstadt) erhältlich und enthält Eosin, Methylenblau, Methylenazur und Methylenviolett. Als Lösungsmittel werden Methanol und Glycerin verwendet. Für das korrekte Ausführen der Färbung muss die Giemsa-Stammlösung verdünnt werden, indem man zu je 10 ml gepuffertem Aqua dest. je 3ml Stammlösung zutropft. Bei dieser Methode färben sich die Zellkerne rot (Romanowsky-Effekt), die Granula der eosinophilen Granulozyten rötlich-braun, die der basophilen blau und die der neutrophilen rötlich bis violett. Das Plasma der Lymphozyten und Monozyten stellt sich blau dar. Erythrozyten erscheinen blaßrot und Thrombozyten blau mit violetterm Innenkörper (Romeis, 1989).

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. *Luftgetrocknete Ausstriche 10 min in Methanol fixieren.*
2. *Nach Trocknung an der Luft verdünnte Giemsa-Lösung auftröpfeln.*
3. *Färbezeit 30-45 min*
4. *Abgießen der Färbelösung und Spülen mit gepuffertem Aqua dest..*
5. *Lufttrocknung und Auswertung unter dem Mikroskop.*

2.3 May-Grünwald-Färbung (nach Romeis, 1989)

Die Färbung nach May-Grünwald ist eine Färbetechnik mit eosinsaurem Methylenblau. Dabei reichern saure Granula Eosin an und erscheinen damit leuchtend rot. Basophile Granula erscheinen durch die Anfärbung mit Methylenblau tiefblau bis violett. Um die Ergebnisse zu standardisieren wurde eine industriell hergestellte Farbstofflösung verwendet. Hierbei erscheinen die Zellkerne blau, die Granula der eosinophilen Granulozyten leuchtend rot, die der neutrophilen hellrot und die der basophilen tiefblau. Die Blutplättchen färben sich hellblau und die Erythrozyten hellrot.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. *Blutausstriche für 30 min mit Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren.*
2. *Luftgetrocknete Ausstriche mit unverdünnter Farbstofflösung (Merck, Darmstadt) für 3-5 min bedecken.*
3. *Verdünnen der Farbstofflösung durch Zusatz der gleichen Menge Aqua dest. und 5-10 min weiter färben lassen.*
4. *Abgießen der Färbelösung und kurzes Eintauchen in Aqua dest..*
5. *Lufttrocknen lassen und unter dem Lichtmikroskop auswerten.*

2.4 Panoptische Färbung nach Pappenheim (nach Romeis, 1989)

Die panoptische Färbung nach Pappenheim ist eine Kombination aus Giemsa- und May-Grünwald-Färbung. Sie enthält demnach als basische Komponente Methylenblau und als saure Eosin. In wässriger Lösung bildet das basische Methylenblau Ionen mit positiver Ladung, welche Zellteile mit negativer Ladung bläulich färben. Das saure Eosin zerfällt in Ionen mit negativer Ladung, welche wiederum positive Zellbestandteile rötlich färben. Demnach stellen sich Zellkerne rötlich-violett dar, das Zytoplasma von Lymphozyten und Monozyten bläulich und die Erythrozyten hellrosa. Neutrophile Granula färben sich rosa, eosinophile leuchtend rot und basophile dunkelviolett.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. *Die unfixierten, luftgetrockneten Ausstriche für ca. 3 min mit May-Grünwald Färbelösung überschichten.*
2. *Die gleiche Menge Aqua dest. mit pH 7 hinzufügen, 1 min weiter färben.*
3. *Abgießen der Färbelösung*
4. *Ausstriche mit verdünnter Giemsa-Lösung für 15-20 min überschichten. Dafür 0,3 ml Stammlösung mit 10 ml Aqua dest. von pH 7 verdünnen.*
5. *Abspülen mit Aqua dest.*
6. *Abpressen mit Filterpapier, lufttrocknen lassen und unter dem Lichtmikroskop auswerten.*

3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Proben von 5 Tieren wie folgt behandelt: Zuerst wurde das EDTA-Blut 15 Minuten lang bei 2000 U/min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des überstehenden Plasmas wurde zum Fixieren der Probe das gleiche Volumen an Karnovsky-Fixierungslösung auf den Leukozytensaum aufgetragen. Hierauf folgte eine Fixierung der Probe bei 4°C für eine Stunde. Anschließend wurde das entstandene Zellpellet in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,7) gespült, um noch anhaftendes Blut zu entfernen. Das Pellet wurde über Nacht noch einmal in Karnovsky-Lösung eingebracht. Am nächsten Tag wurden Blöcke von 1 mm Seitenlänge geschnitten und wiederum in Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7,2) dreimal gewaschen. Die Proben wurden anschließend in 1%igem Osmiumtetroxid und 1,5%igem Kaliumferrozyanid für zwei Stunden bei 4°C kontrastiert und danach nochmals dreimal für je 20 Minuten mit Natrium-Cacodylat-Puffer gewaschen. Nach der Fixierung der Proben erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90% je 30 Minuten, 30 Minuten absolutes Ethanol) und die schrittweise Einbettung in Epon (Propylenoxid (Merck, Darmstadt) zweimal je 15 Minuten, Propylenoxid-Epon-Gemisch 2:1 eine Stunde, Propylenoxid-Epon-Gemisch 1:1 über Nacht, reines Epon eine Stunde). Anschließend wurden die Blöcke in Gelatine kapseln (Plannet, Wetzlar) für 24 Stunden bei 60°C polymerisiert. An einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte für die erste Übersicht geschnitten und nach Richardson gefärbt. Danach wurden Ultradünnschnitte (60 nm) von ausgewählten Blöcken angefertigt. Diese wurden dann auf Kupfer-Grids (200 Mesh) aufgezogen und mit gesättigtem Uranylacetat und einer Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (1963) nachkontrastiert.

4. Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)-markierte Lektine verwendet. Die Spezifität der Bindung der deutlich positiv reagierenden Lektine wurde in Kontrolluntersuchungen durch Zugabe von Hemmzuckern überprüft. Für einige

Zuckernachweise wurden biotinylierte Lektine (VAA, MAA-1 und SNA) verwendet.

4.1 FITC markierte Lektine

Jeweils 22 Blutausschriebe wurden auf die Bindung der in der folgenden Tabelle aufgelisteten Lektine untersucht. Dafür wurden 14 FITC gekoppelte Lektine (LINARIS, Wertheim) verwendet, welche in Tabelle 14 mit ihrer jeweiligen Herkunft und Zuckerspezifität aufgelistet sind.

Tabelle 14: FITC markierte Lektine

	<i>Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Zuckerspezifität</i>
1	Wheat germ Agglutinin	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	N-Acetyl-Glukosamin, Chitin
2	Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	N-Acetyl-Glukosamin
3	Concanavalin Agglutinin	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)	Glukose, Mannose
4	Ricinus communis Agglutinin	RCA	<i>Ricinus communis</i> (Kastorbohne)	Galaktose
5	Lens culinaris Agglutinin	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)	Glukose, Mannose
6	Saphora japonica Agglutinin	SJA	<i>Saphora japonica</i> (Chinesischer Schnurbaum)	N-Acetyl- Galaktosamin

	<i>Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Zuckerspezifität</i>
7	Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikanische Pferdebohne)	N-Acetyl- Galaktosamin
8	Pisum sativum Agglutinin	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	Glukose, Mannose
9	Ulex europaeus Agglutinin	UEA-1	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	α -L-Fukose
10	Phaseolus vulgaris Agglutinin- Leuco	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	Komplexe Kohlenhydratstrukturen
11	Phaseolus vulgaris Agglutinin- Erythro	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	Komplexe Kohlenhydratstrukturen
12	Griffonia simplicifolia Agglutinin	GSL	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)	Galaktose
13	Peanut Agglutinin	PNA	<i>Arachis hypogea</i> (Erdnuss)	Galaktose
14	Soybean Agglutinin	SBA	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	N-Acetyl- Galaktosamin

Die Blutausrichthe wurden zunächst für 10 min in Küvetten mit Methanol (MERCK, Darmstadt) fixiert. Danach folgte ein dreimaliges Waschen der Objektträger in PBS-Puffer (pH 7,4-7,6) für jeweils fünf Minuten. Das FITC gekoppelte Lektin wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml und einer Menge von 300 µl pro Schnitt auf die Objektträger mittels einer Pipette aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei Raumtemperatur. Um das lichtempfindliche FITC vor zu schützen, geschah dies in einer mit Aluminiumfolie abgedunkelten feuchten Kammer. Auch in den folgenden Schritten wurde darauf geachtet, die Blutausrichthe keiner unnötigen Lichteinwirkung auszusetzen. Nach der Inkubationszeit der Lektine wurden die Objektträger wiederum dreimal für je fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Um die Kerne der einzelnen Blutzellen besser darstellen zu können, wurde anschließend eine Kernfärbung mit DAPI-Lösung (4'6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (ROCHE, Mannheim) vorgenommen. Die DAPI-Stammlösung in einer Konzentration von 1 mg/ml wurde hierfür 1:7500 verdünnt. In dieser Lösung wurden die Blutausrichthe für 10 Minuten bei Raumtemperatur in abgedunkelten Küvetten inkubiert. Zum Abschluss wurden die Objektträger je zweimal für fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen und je zweimal für fünf Minuten in destilliertem Wasser. Eingedeckt wurden die Blutausrichthe mit einem selbsthergestellten PVA Mounting Medium, welches um einem Ausbleichen vorzubeugen mit DABCO (DAKO, Hamburg) versehen wurde. Die Aufbewahrung erfolgte bei 7°C im Kühlschrank unter Schutz vor Lichteinwirkung.

4.2 Hemmzucker

Bei den deutlich positiv reagierenden Lektinen wurde untersucht, ob sich deren Bindung mittels des für sie spezifischen Zuckers/Kohlenhydrates vermindern oder hemmen lässt. Dafür wurde das entsprechende Lektin vor dem Färbevorgang mit dem jeweiligen Hemmzucker eine Stunde bzw. 30 Minuten vorinkubiert. Die Inhibitoren wurden in einer 0,4 molaren Lösung zu den in PBS-Puffer gelösten Lektinen dazugegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die mit dem Hemmstoff versehenen Lektine auf je zwei Objektträger aufgetragen. Die weitere Vorgehensweise entsprach der in 4.1.beschriebenen Technik. Als Positivkontrolle wurde auf je einen Ausstrich nur das Lektin aufgetragen. Tabelle 15 zeigt die verwendeten Lektine mit ihren entsprechenden Hemmzuckern, deren

Konzentrationen und Inkubationszeit.

Tabelle 15: Hemmzucker

<i>Lektin</i>	<i>Hemmzucker</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Inkubationszeit</i>
WGA	N-Acetyl-Galaktosamin	36,67 µg/ml	30 Minuten
WGAs	N-Acetyl-Galaktosamin	36,67 µg/ml	30 Minuten
ConA	Methyl- α -Mannopyranoside	84,8 mg/ml	1 Stunde
LCA	Methyl- α -Mannopyranoside	84,8 mg/ml	1 Stunde
PSA	Methyl- α -Mannopyranoside	84,8 mg/ml	1 Stunde
GSL	N-Acetyl-Galaktosamin	172,4 mg/ml	1 Stunde
PHA-E	Essigsäure	24 µl/ml	1 Stunde

Das N-Acetyl-Galaktosamin stammte von der Firma SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen, die Essigsäure von ROTH aus Karlsruhe und die Methyl- α -Mannopyranoside von E-Y LABS, San Mateo, USA.

4.3 Biotinylierte Lektine

Mit der Streptavidin-Biotin-Methode wurden die Lektine *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA-1) (Biozol, Eching), *Sambucus nigra* Agglutinin SNA (Biozol, Eching) und *Viscum album* agglutinin (VAA) (Lehrstuhl für physiologische Chemie, Tierärztliche Fakultät der LMU München, München) nachgewiesen. Streptavidin stammt von *Streptomyces avidinii* und weist eine hohe Bindungsaffinität zu dem Vitamin Biotin auf. Bei dieser direkten Methode ist an das Lektin, welches an seine spezifische Kohlenhydratstruktur bindet, Biotin

gekoppelt. Nach Zugabe eines Streptavidin-FITC-Komplexes zu dem mit einem biotinyliertem Lektin inkubiertem Ausstrich, bindet das Streptavidin mit hoher Affinität an das Biotin. Die Auswertung erfolgte mit Fluoreszenzmikroskop Dialux 20 (Leitz, Wetzlar). In Tabelle 16 sind die hierbei verwendeten biotinylierten Lektine mit ihren Eigenschaften aufgelistet.

Tabelle 16: Biotinylierte Lektine

<i>Name</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Zuckerspezifität</i>
Maackia amurensis Agglutinin	MAA-1	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)	N-Acetyl-Neuraminsäure
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	Sambucus nigra (Schwarzer Holunder)	N-Acetyl-Neuraminsäure
Viscum album Agglutinin	VAA	Viscum album (Mistel)	Galaktose

Für diese Methode wurden 10 Schnitte pro Lektin verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden dargestellt:

1. *Schnitte für 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren.*
2. *Anschließend 3mal für je 5 min in PBS- Puffer (pH 7,4) waschen.*
3. *Objekträger vorsichtig mit fusselfreien Kimwipes trocknen und mit Dako Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) (reduziert Hintergrundfärbung) bedecken. 10 min inkubieren.*
4. *Biotinylierte Lektine (in PBS- Puffer gelöst) in einer Konzentration von 5 µg/ml und einer Menge von 300 µl pro Schnitt auftragen. 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubieren.*
5. *3mal für je 5 Minuten in PBS- Puffer waschen.*
6. *Objekträger vorsichtig trocknen und aufgetauten Streptavidin-FITC-Komplex (Dako, Hamburg) in einer Konzentration von 1:1500, verdünnt mit PBS- Puffer (pH), hinzufügen. Es wurden 100 µl pro Schnitt aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.*

7. *3mal für je 5 min in PBS- Puffer waschen.*
8. *Dapi-Kernfärbung (Roche, Mannheim) (siehe Punkt 4.1.) für 10 min bei Raumtemperatur auftragen.*
9. *Waschen in PBS- Puffer*
10. *Abwaschen unter fließendem Leitungswasser*
11. *Schnitte in Aqua dest. stellen*
12. *Eindeckeln mit selbst hergestelltem PVA Mounting Medium und Aufbewahrung im Kühlschrank.*

5. Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden Blutaussstriche von 20 Tieren unterschiedlichen Alters hergestellt und diese auf ihre Bindung von Antikörpern untersucht. Die Tiere mit den Nummern 23 bis 42 sind in Tabelle 13 im Abschnitt III 1. aufgelistet. Von Herrn Prof. Dr. Göbel, Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, wurden in dankenswerter Weise monoklonale Antikörper gegen equine Leukozyten zur Verfügung gestellt (Umlauf, 2004).

Nach den Untersuchungen von Umlauf, 2004, binden die monoklonalen Antikörper mAk 4-13, mAk 4-58 und mAk 5-50 spezifisch an equine T- Zellen, mAk 1-19, mAk 2-52, mAk 4-36, mAk 4-55 und mAk 6-39 hingegen können als B- Zell- spezifisch bezeichnet werden. Bei den Antikörpern handelt es sich um monoklonale Maus-anti-Pferd-Antikörper.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden dargestellt.

1. *10 minütiges Fixieren der Objektträger in Methanol (MERCK, Darmstadt)*
2. *3mal für je 5 Minuten in PBS-Puffer waschen*
3. *Dako Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg) auf die Objektträger auftragen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren*
4. *Pro Objektträger 200µl Antikörperlösung (in Antikörper-Diluent von DAKO, Hamburg) aufpipettieren*

5. Über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubieren
6. Morgens 3mal für je 5 Minuten in PBS-Puffer waschen
7. Pro Objektträger 200µl verdünnte Sekundär- Antikörperlösung (Anti-Maus-FITC vom Kaninchen, DAKO, Hamburg) auftragen
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
9. 3mal je 5 Minuten in PBS-Puffer waschen
10. Kernfärbung DAPI (siehe Punkt 4.1.) auftragen

Abbildung 5 soll die Arbeitsschritte der Immunhistochemie verdeutlichen.

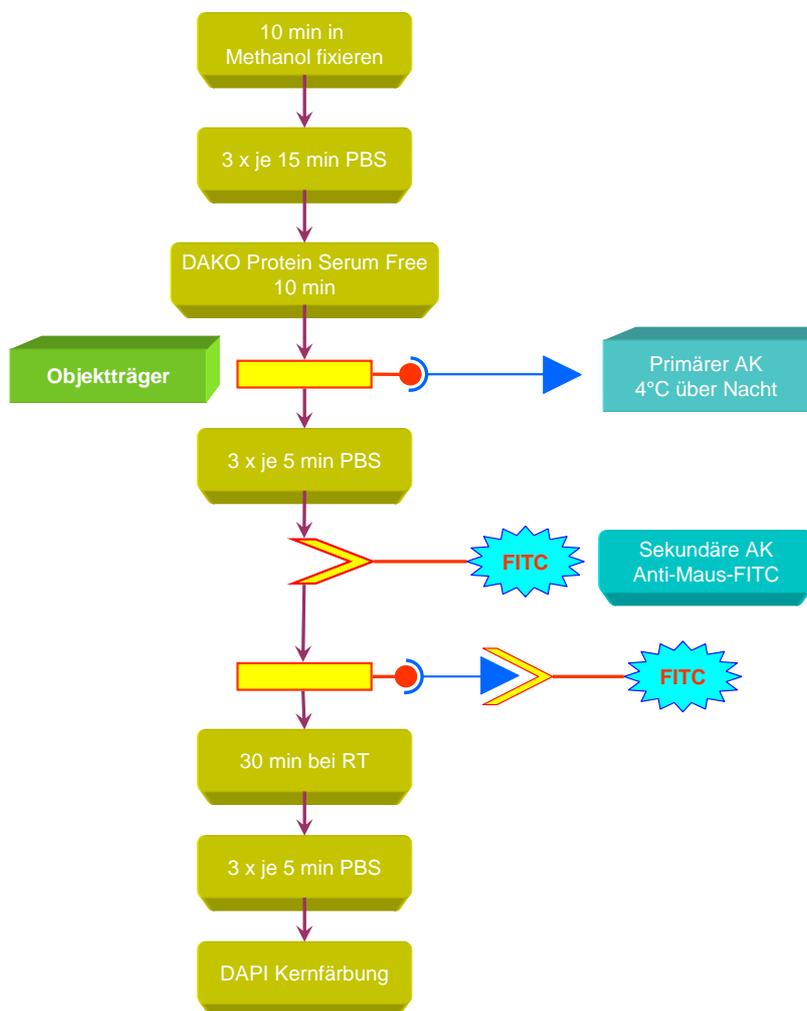


Abbildung 5: Flussdiagramm Immunhistochemie

6. Auswertung

Die Auswertung der lichtmikroskopischen Präparate erfolgte mit dem Lichtmikroskop Aristoplan der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar). Diejenigen Schnitte, die mit FITC markierten Lektinen inkubiert worden waren wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Dialux 20 der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar) ausgewertet. Für die fotografischen Aufnahmen wurde hier die Fotokamera Progress®CF cool verwendet. Beurteilung und fotografische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Präparate fand mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 der Firma Zeiss (Zeiss, Oberkochen) statt.

IV Ergebnisse

1. Blut der untersuchten Pferde

Von allen Pferden wurde ein kleines Blutbild erstellt. Auffallend war hierbei, dass bei fast allen jungen Pferden eine erhöhte Leukozytenzahl zu finden war (blau markiert). Desweiteren zeigte sich, dass vor allem bei den Islandpferden die Zahl der Thrombozyten erhöht war (rot markiert). Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Blutwerte aller Probanden, wobei in Klammern der jeweilige Referenzbereich der Werte angegeben ist.

Tabelle 17: Übersicht über die Blutbilder der untersuchten Pferde

<i>Pferd</i>	<i>Leukozyten</i> (Ref.: 5,0-10,0 G/l)	<i>Erythrozyten</i> (Ref.: 6,0-12,0 T/l)	<i>Hämatokrit</i> (Ref.: 0,30-0,45 l/l)	<i>Hämoglobin</i> (Ref.: 110-170 g/l)	<i>Thrombozyten</i> (Ref.: 100-300 G/l)
1	12,3	7,56	0,35	122	456
2	14,0	7,71	0,28	107	267
3	17,8	9,23	0,35	123	496
4	13,0	7,49	0,26	97	251
5	8,0	8,78	0,35	133	118
6	6,6	8,20	0,35	130	115
7	11,7	8,05	0,37	127	419
8	6,0	7,66	0,34	126	101
9	7,7	7,60	0,37	126	275
10	8,1	8,36	0,36	127	344
11	7,1	7,61	0,35	130	143
12	4,9	6,27	0,31	101	456
13	9,9	7,83	0,34	115	533

Pferd	<i>Leukozyten (Ref.: 5,0- 10,0 G/l)</i>	<i>Erythrozyten (Ref.: 6,0- 12,0 T/l)</i>	<i>Hämatokrit (Ref.: 0,30- 0,45 l/l)</i>	<i>Hämoglobin (Ref.: 110- 170 g/l)</i>	<i>Thrombozyten (Ref.: 100- 300 G/l)</i>
14	7,2	8,26	0,37	137	142
15	5,5	7,18	0,31	112	206
16	6,5	7,46	0,34	120	429
17	5,7	7,00	0,33	113	598
18	7,1	6,33	0,33	110	581
19	9,3	7,17	0,36	121	387
20	8,1	6,99	0,35	113	1268
21	11,8	8,05	0,37	137	98
22	6,1	8,67	0,41	138	340
23	11,7	9,91	0,30	119	207
24	9,6	8,05	0,30	112	167
25	10,7	8,49	0,32	120	282
26	9,6	8,44	0,33	124	140
27	9,1	8,76	0,33	124	158
28	7,7	7,87	0,34	123	136
29	7,8	7,20	0,33	121	128
30	8,4	8,90	0,37	134	100
31	6,6	7,81	0,35	126	194
32	7,9	7,99	0,35	125	190
33	7,8	6,87	0,30	107	175
34	6,6	7,94	0,33	122	179

Pferd	<i>Leukozyten</i> (Ref.: 5,0-10,0 G/l)	<i>Erythrozyten</i> (Ref.: 6,0-12,0 T/l)	<i>Hämatokrit</i> (Ref.: 0,30-0,45 l/l)	<i>Hämoglobin</i> (Ref.: 110-170 g/l)	<i>Thrombozyten</i> (Ref.: 100-300 G/l)
35	5,6	6,66	0,31	110	178
36	7,1	7,72	0,33	117	111
37	6,3	6,19	0,31	109	200
38	5,2	7,63	0,38	131	238
39	7,6	7,57	0,38	139	159
40	8,2	6,87	0,33	117	78
41	7,7	7,60	0,33	120	140
42	5,6	6,86	0,33	116	92

2. Lichtmikroskopische Routinefärbungen

Für eine bessere Differenzierung der einzelnen Blutzellen wurden die Blutausstriche vier verschiedenen Färbungen unterzogen und anschließend mit dem Lichtmikroskop Aristoplan (Leitz, Wetzlar) ausgewertet.

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Färbungen und die jeweilige Anfärbung der einzelnen zellulären Strukturen.

Tabelle 18: Lichtmikroskopische Übersichtsfärbungen

<i>Blutzellen</i>	<i>Diff Quick</i>	<i>Giemsa</i>	<i>May-Grünwald</i>	<i>Pappenheim</i>
<i>Erythrozyten:</i>				
Zytoplasma	braun-rot	blass-rot	hellrot	hellrosa
<i>Thrombozyten:</i>				
Zytoplasma	violett-lila	Blau	blass-blau	bläulich
<i>Lymphozyten:</i>				
Zytoplasma	blau	blau	blau	licht-blau
Zellkern	lila	rot-violett	blau	rötlich
<i>Neutrophile Granulozyten:</i>				
Zellkern	dunkelblau	rot-violett	blau	rötlich
Granula	hellrosa	rot-violett	hellrot-purpurfarben	bläulich-rosa
<i>Eosinophile Granulozyten:</i>				
Zellkern	dunkelblau	rot-violett	blau	rötlich-violett
Granula	rot-orange	rot-braun	ziegelrot	orange-rot
<i>Basophile Granulozyten:</i>				
Zellkern	dunkelblau	rot-violett	blau	rötlich-violett
Granula	dunkellila	blau	tiefblau	ultramarin
<i>Monozyten:</i>				
Zytoplasma	hellblau	blau	hellblau	violett
Zellkern	violett	rot-violett	blau	rötlich-violett

2.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten des Pferdes stellen sich unter dem Lichtmikroskop als ca. 5- 6 µm große, rundliche, kernlose Zellen dar, deren Zytoplasma hellrötlich gefärbt ist. In der Regel wird das Hämoglobin in den Zellen angefärbt. In Folge ihrer bikonkaven Scheibenform mit einer Eindellung in der Mitte erscheinen die

Erythrozyten einheitlich gefärbt, ohne Innenstruktur und mit zentraler Aufhellung. Die Zellmembran ist bis auf einige Ausnahmen glatt. Diese Erythrozyten weisen teilweise Stechapfelform auf, welche durch zu langsames Trocknen besonders bei zu dicken Ausstrichen zustande kommt. Die als Howell-Jolly-Körperchen bezeichneten Kernreste sind in einigen Ausstrichen sichtbar. Bei einigen Ausstrichen ist zudem die sogenannte Geldrollenbildung der Erythrozyten gut zu beobachten.

2.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten sind ebenfalls kernlose, sehr kleine Zellen. Ihre Durchmesser beträgt nur ca. 1,3-4,7 μm und ihre Dicke ca. 0,5 μm . Ihre Form ist rund, zum Teil oval. Häufig findet man sie zu Gruppen zusammen gelagert. Zu unterscheiden sind ein dunkleres Granulomer, in welchem sich die Zellorganellen und Granula befinden, und ein helleres Hyalomer mit Zytoplasma.

2.3 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten besitzen je nach Färbung ein hellrosa Zytoplasma, einen rötlich-bläulichen Zellkern und violette Granula (siehe Tabelle 18). Anhand des Zellkerns lassen sich verschiedene Reifungsformen unterscheiden. Die stabkernigen neutrophilen Granulozyten sind ca. 9-12 μm groß und ihr Kern weist eine Stabform auf und ist nicht segmentiert. Die segmentkernigen Granulozyten besitzen die gleiche Größe, ihr Kern ist in einzelne Kernabschnitte geteilt, welche fadenförmig durch Chromatinbrücken miteinander verbunden sind. Treten mehr als vier solcher Segmente auf, spricht man von einer übersegmentierten Zelle. Vorläufer der Granulozyten (Metamyelozyten), ca. 11-16 μm große Zellen mit nierenförmig eingebuchtetem Kern, konnte ich in meinem Material nicht beobachten.

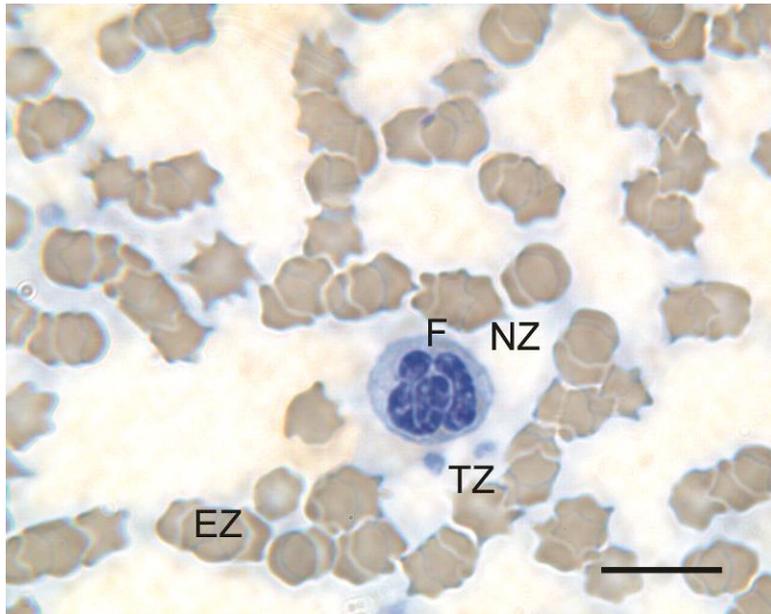


Abbildung 6: Segmentierter Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten (Kjàni)

Färbung: May- Grünwald

NZ= Neutrophiler Granulozyt

EZ= Erythrozyt

TZ= Thrombozyt

F= Filament

SB= 10µm

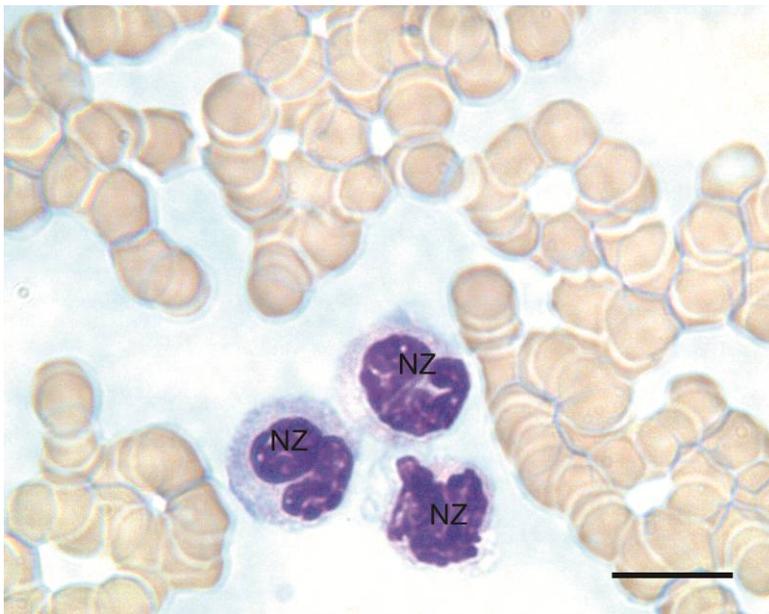


Abbildung 7: Neutrophile Granulozyten (Lady)

Färbung: Giemsa

NZ= Neutrophiler Granulozyt

SB= 10µm

Gut zu sehen ist die Geldrollen-Formation der Erythrozyten.



Abbildung 8: Stabkerniger Neutrophiler Granulozyt (Fjalli)

Färbung: Diff-Quick

EZ= Erythrozyt

TZ= Thrombozyt

SB= 10 μ m

ZP= Zytoplasma

ZK= Zellkern



Abbildung 9: Segmentierter neutrophiler Granulozyt (Fjalli)

Färbung: Diff-Quick

NZ= Neutrophiler Granulozyt

AK= Akanthozyt

F= Filament

SB= 10 μ m

ZK= Zellkern

EZ= Erythrozyt

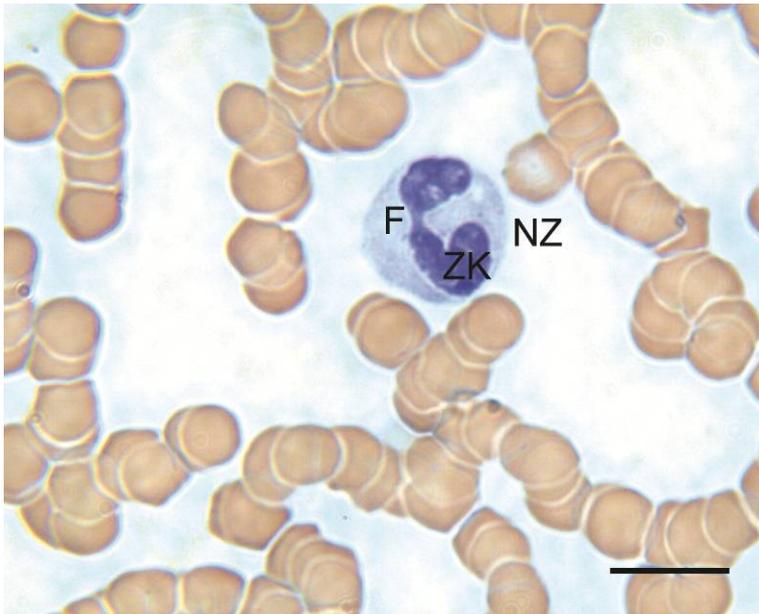


Abbildung 10: Neutrophiler Granulozyt (Lady)

Färbung: May-Grünwald

NZ= Neutrophiler Granulozyt ZK= Zellkern

F= Filament

SB= 10 μ m

2.4. Eosinophile Granulozyten

Die leuchtend rot gefärbten Granula sind charakteristisch für diese Zellen. Die Größe der Granula beträgt 3-4 μ m. Die eosinophilen Granulozyten sind mit 10-20 μ m die größten unter den Granulozyten, ihr Kern ist meistens zweigelappt und brillenähnlich. Zum Teil ist der Kern auf Grund der für Pferde typischen großen runden Granula, welche die Zelle ausfüllen, größtenteils verdeckt.

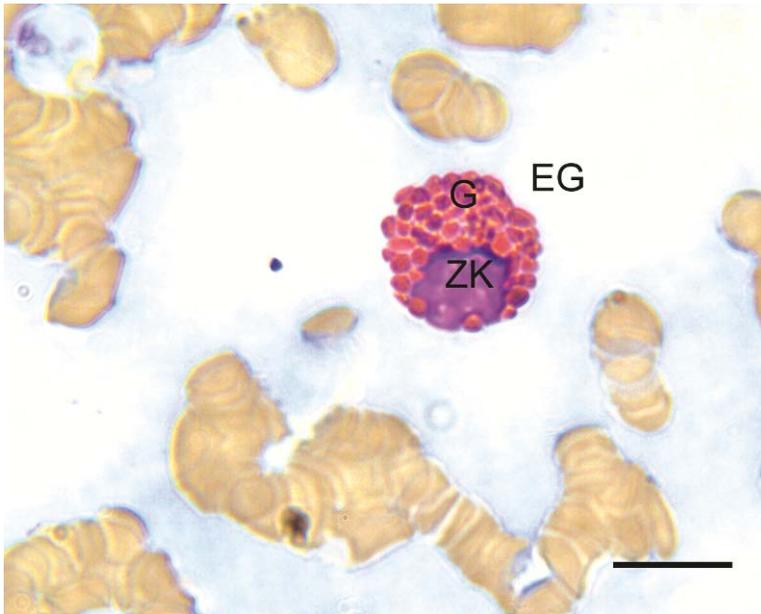


Abbildung 11: Eosinophiler Granulozyt (Skålm)

Färbung: Giemsa

EG= Eosinophiler Granulozyt ZK= Zellkern

G= Granula

SB= 10 μ m

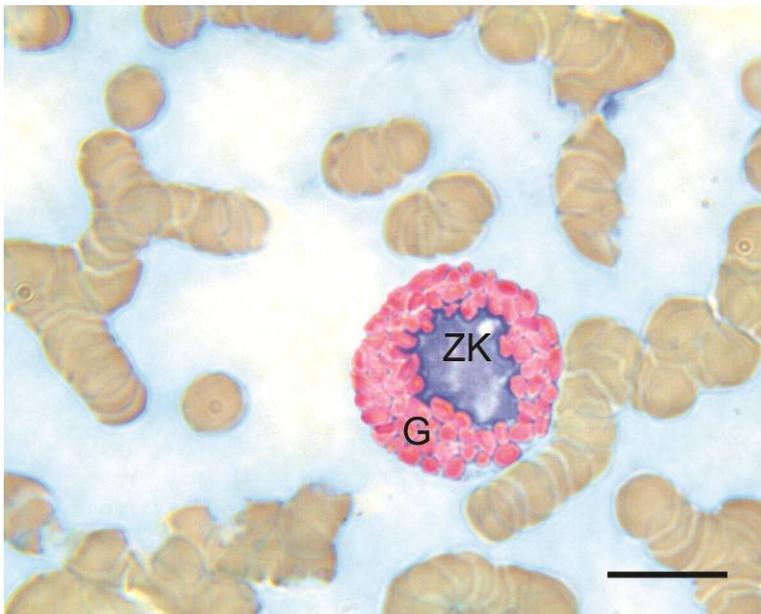


Abbildung 12: Eosinophiler Granulozyt (Skålm)

Färbung: May-Grünwald

ZK= Zellkern

G= Granula

SB= 10 μ m

2.5. Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten sind im Blut der Pferde kaum vorhanden. Sie stellen sich als relativ große, runde Zellen mit einem Durchmesser von ca. 10 µm dar. Die basophilen Granula sind sehr zahlreich vorhanden und violett gefärbt. Sie sind mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm sehr klein. Der Zellkern ist mehrfach gelappt. Durch die vielen Granula, welche die Zelle zu einem Großteil ausfüllen, wird die Lappung des Kerns aber häufig weitgehend maskiert.

2.6. Lymphozyten

Die Lymphozyten stellten sich als runde Zellen von unterschiedlicher Größe dar, mit bläulich gefärbtem Zytoplasma und rundem, violettem Zellkern. Meist lag ihr durchschnittlicher Durchmesser zwischen 8 und 13 µm. Der Kern füllte meist die Zelle fast vollständig aus. Vereinzelt waren feine Azurgranula festzustellen, die sich vor allem im Zytoplasmasaum fanden.



Abbildung 13: Lymphozyt (Trölli)

Färbung: Diff-Quick

ZK= Zellkern

ZP= Zytoplasma

SB= 10 μ m

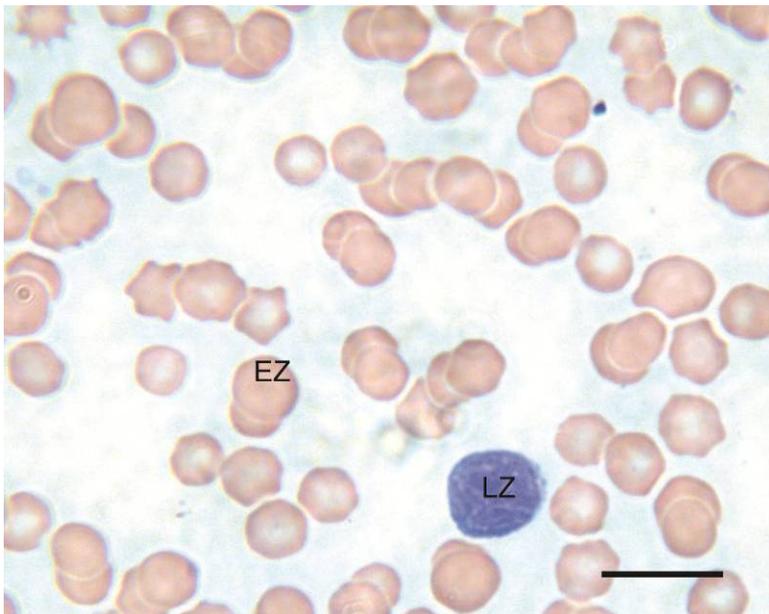


Abbildung 14: Lymphozyt (Vindstjarni)

Färbung: May-Grünwald

LZ= Lymphozyt

EZ= Erythrozyten

SB= 10 μ m

2.7. Monozyten

Mit einem Durchmesser von 11-14 μm sind die Monozyten die größten Zellen, die man im Blutaussstrich zu finden kann. Da sie wie die Lymphozyten zu den Agranulozyten unter den Leukozyten gehören, weisen sie keine spezifischen Granula auf. Ihr Kern ist groß, nierenförmig gebogen und füllt die Zelle meist zum großen Teil aus. Das Zytoplasma ist grau-bläulich, der Zellkern rötlich-violett gefärbt. Typisch sind die Vakuolen, die sich in Nähe des Zellkerns befinden. Aktive Monozyten besitzen an ihrer Zellmembran feine Ausstülpungen, welche im inaktiven Zustand fehlen.

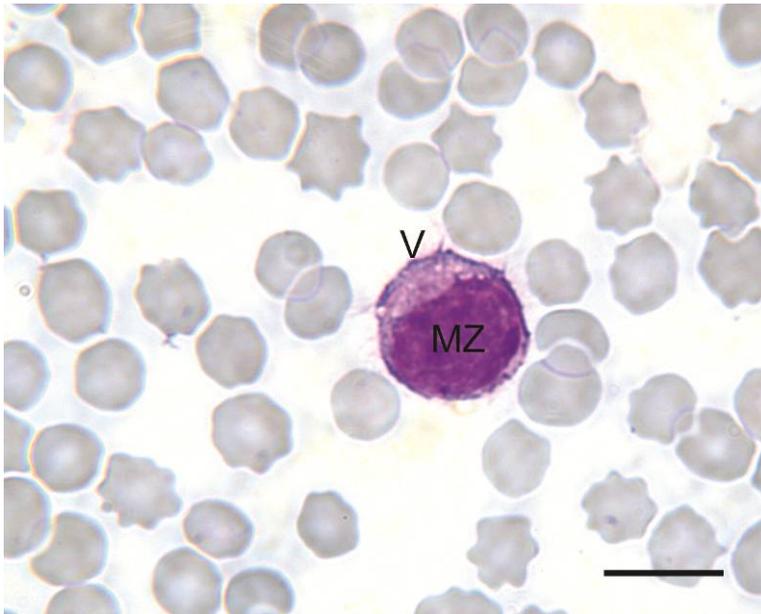


Abbildung 15: Monozyt (Katla)

Färbung: Giemsa

MZ= Monozyt

V= Vakuolen

SB= 10µm

Beachte die feinen Ausstülpungen an der Zellmembran dieses aktiven Monozyten.

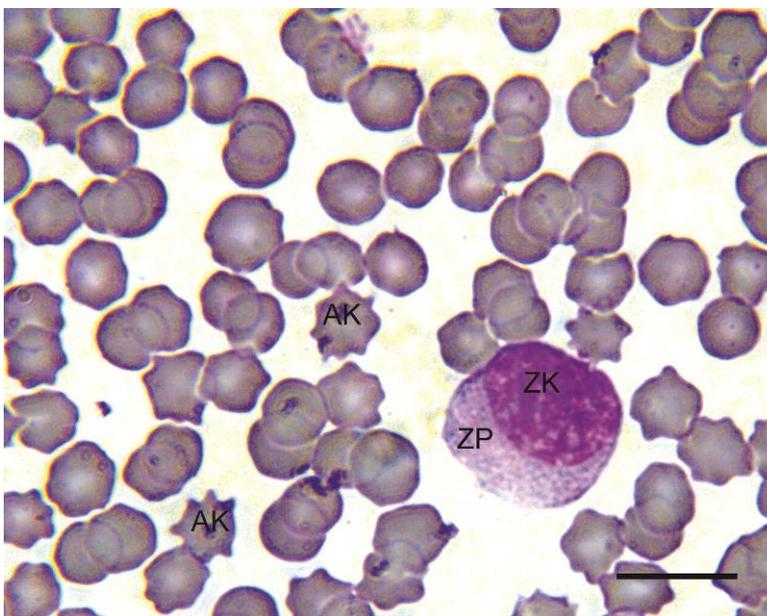


Abbildung 16: Monozyt (Vindstjarni)

Färbung: Diff-Quick

ZP= Zytoplasma

ZK= Zellkern

AK= Akantozysten

SB= 10µm

Beachte die zahlreichen Vakuolen im Zytoplasma des Monozyten.

3. Elektronenmikroskopie

3.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten stellen sich unter dem Elektronenmikroskop als Zellen unterschiedlicher Größe und Gestalt dar. Dies ist durch die sehr dünne Schnittführung bedingt. Sie sind von einer glatten Zellmembran umgeben und weisen einen homogenen, mäßig elektronendichten Inhalt auf, der dem Hämoglobin entspricht. Zellorganellen fehlen in der Regel vollständig.

3.2 Thrombozyten

Die Blutplättchen sind oft in Gruppen zusammengelagert und weisen unterschiedliche Formen auf. Es sind sowohl stäbchenförmige als auch rundliche Thrombozyten zu beobachten. Im Zytoplasma finden sich homogene Granula, die alpha-Granula, sowie die üblichen Zellorganellen. Ein Zellkern fehlt. Als elektronendichte Strukturen stellen sich die sogenannten „dense bodies“ dar. Diese sind Granula mit extrem elektronendichtem Kern. Zum Teil finden sich Vakuolen und in den Thrombozyten gespeichertes Glykogen.

In Abbildung 17 ist ein Semidünnschnitt zu sehen, der einen Überblick über die verschiedenen Blutzellen geben soll.

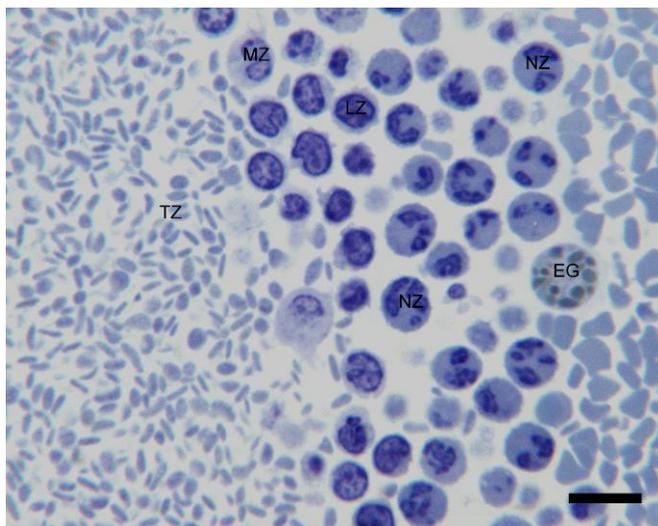


Abbildung 17: Semidünnschnitt

EG= Eosinophiler Granulozyt
 NZ= Neutrophiler Granulozyt
 SB= 10µm

LZ= Lymphozyt
 MZ= Monozyt

TZ= Thrombozyt

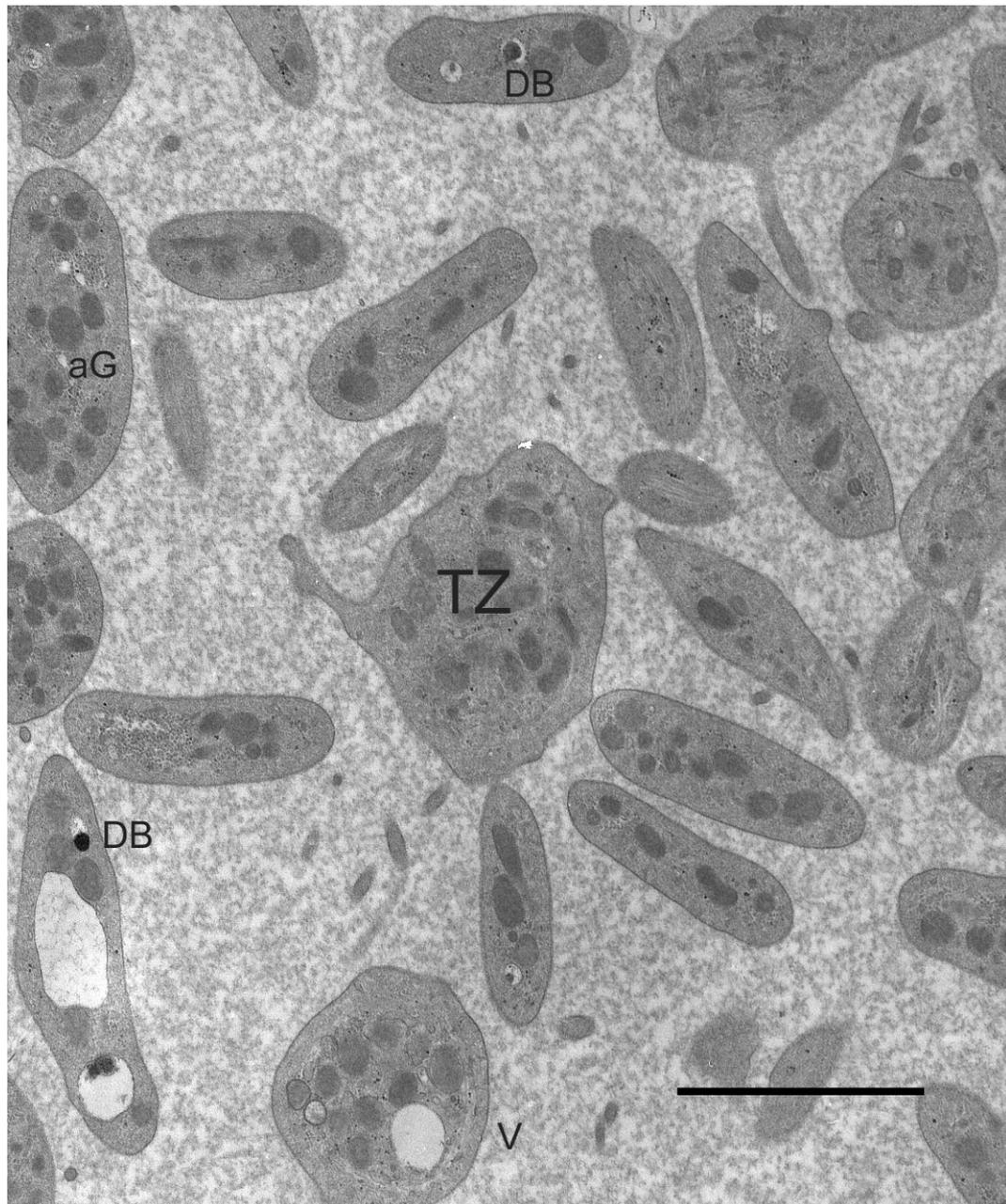


Abbildung 18: Thrombozyten (Tjörvi)

Auffällig sind die unterschiedlichen Formen und Größen der Blutplättchen. Gut zu sehen sind die stark elektronendichten „Dense Bodies“.

TZ= Thrombozyt
aG= alpha-Granula
SB= 2 μ m

V= Vakuole
DB= Dense Bodies

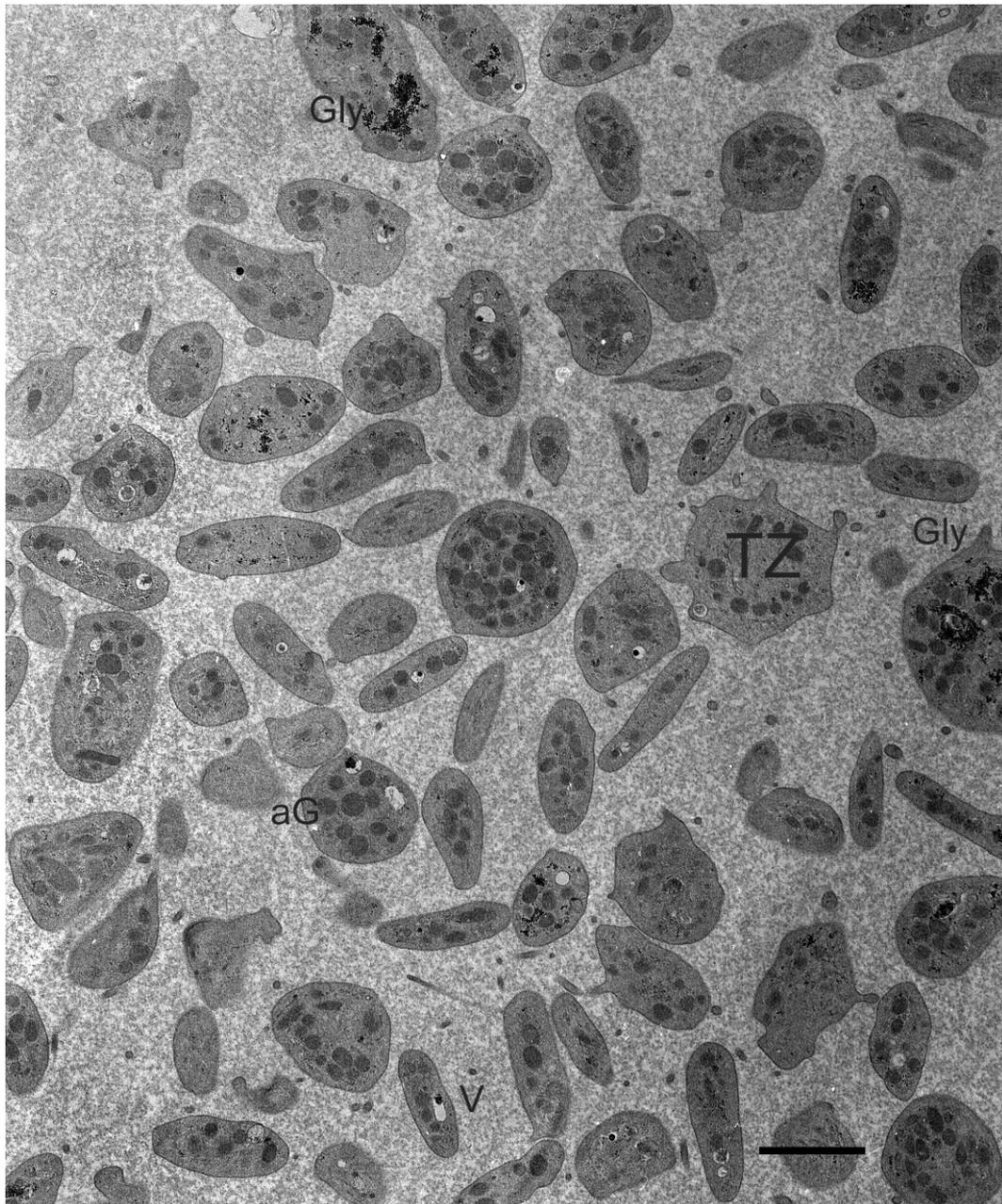


Abbildung 19: Thrombozyt (Tjörvi)

In den Thrombozyten ist Glykogen eingelagert. Gut zu erkennen sind auch Vakuolen und alpha-Granula.

TZ= Thrombozyt
Gly= Glykogen
SB= 2 μ m

aG= alpha-Granula
V= Vakuole

3.3 Neutrophile Granulozyten

Bei den neutrophilen Granulozyten lässt sich wiederum anhand der Gestalt des Kerns zwischen stabkernigen und segmentierten Granulozyten unterscheiden. Diese Zellen sind von rundlicher Gestalt und besitzen eine Größe von 9- 12 μm . Der Zellkern weist unerschiedlich elektronendichte Strukturen auf. So findet man stets einen helleren innen liegenden Bereich, das Euchromatin, welcher von elektronendichterem, dunklerem Heterochromatin umgeben ist. Die einzelnen Kernsegmente sind durch brückenartige Chromatinstreifen (Filament) verbunden. Im Zytoplasma finden sich zahlreiche Organellen, wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und Vakuolen. Die Granula lassen sich unterteilen in primäre, längliche Granula und spezifische, rundliche Granula. Die Zellmembran ist glatt und weist unterschiedlich stark ausgeprägte Pseudopodien auf.

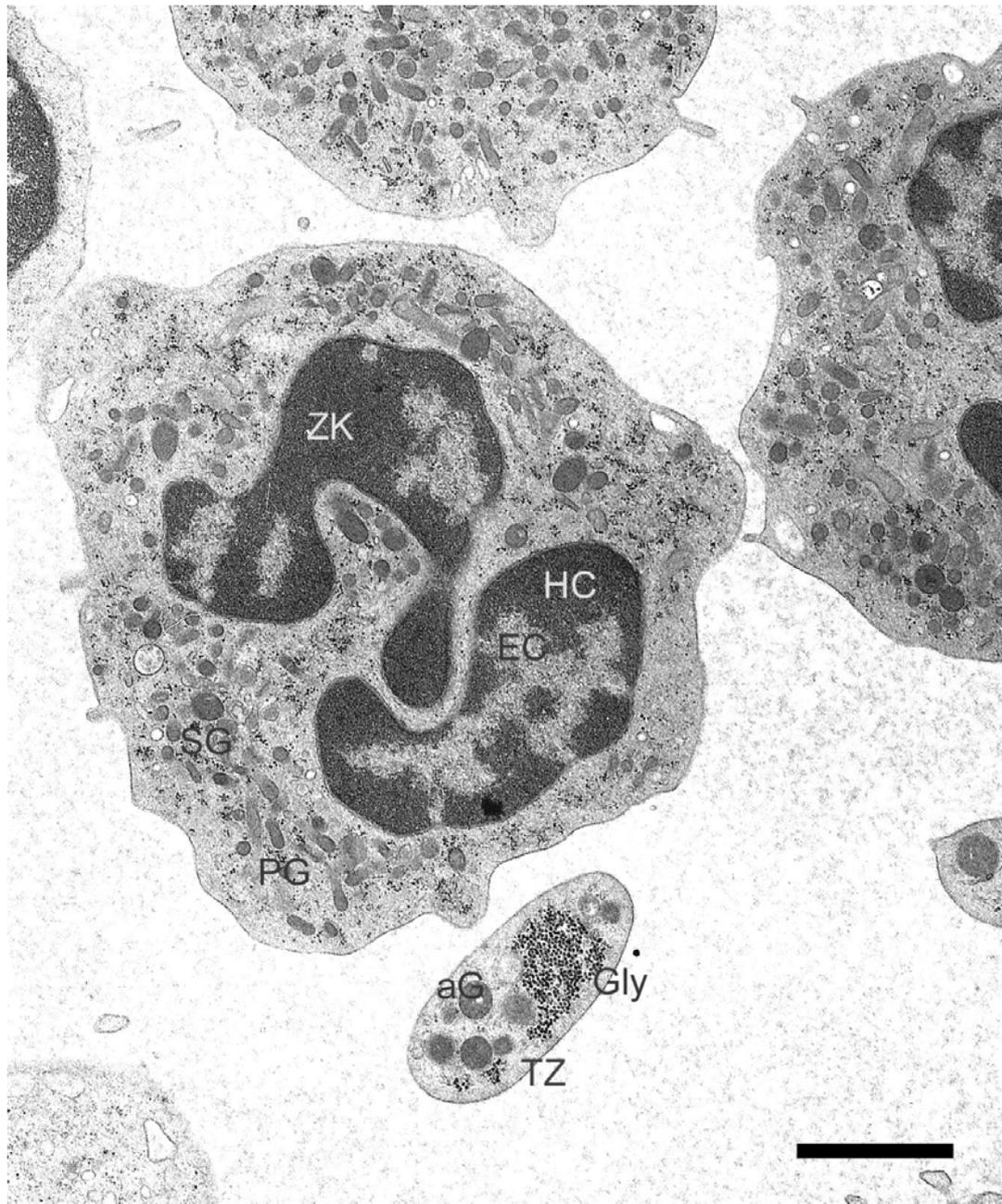


Abbildung 20: Segmentierter neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt (Tjörvi)

Der segmentierte Zellkern, welcher in einen dunkleren Heterochromatin- und einen helleren Euchromatinbereich unterteilt ist, stellt sich gut dar. Gut zu unterscheiden sind die primären länglichen Granula von den spezifischen runden Granula.

ZK= Zellkern

PG= Primäre Granula

Gly= Glykogen

SB= 2 μ m

HC= Heterochromatin

SG= Spezifische Granula

aG= alpha-Granula

EC= Euchromatin

TZ= Thrombozyt

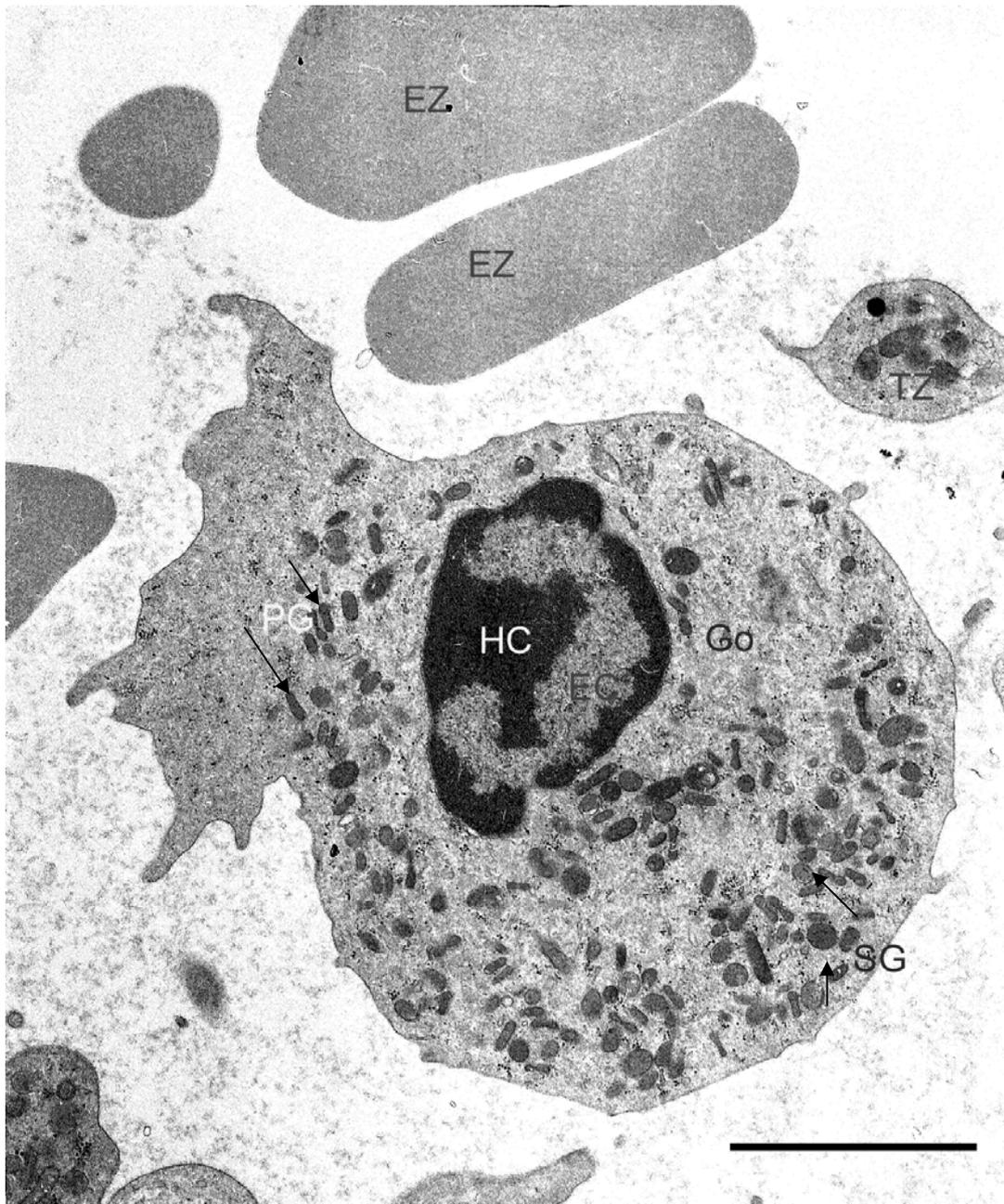


Abbildung 21: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Kjani)

Dieser neutrophile Granulozyt besitzt zahlreiche Granula (Pfeile).

EZ= Erythrozyt

EC= Euchromatin

Go= Golgi-Apparat

SB= 2 μ m

TZ= Thrombozyt

PG= primäre Granula

HC= Heterochromatin

SG= spezifische Granula

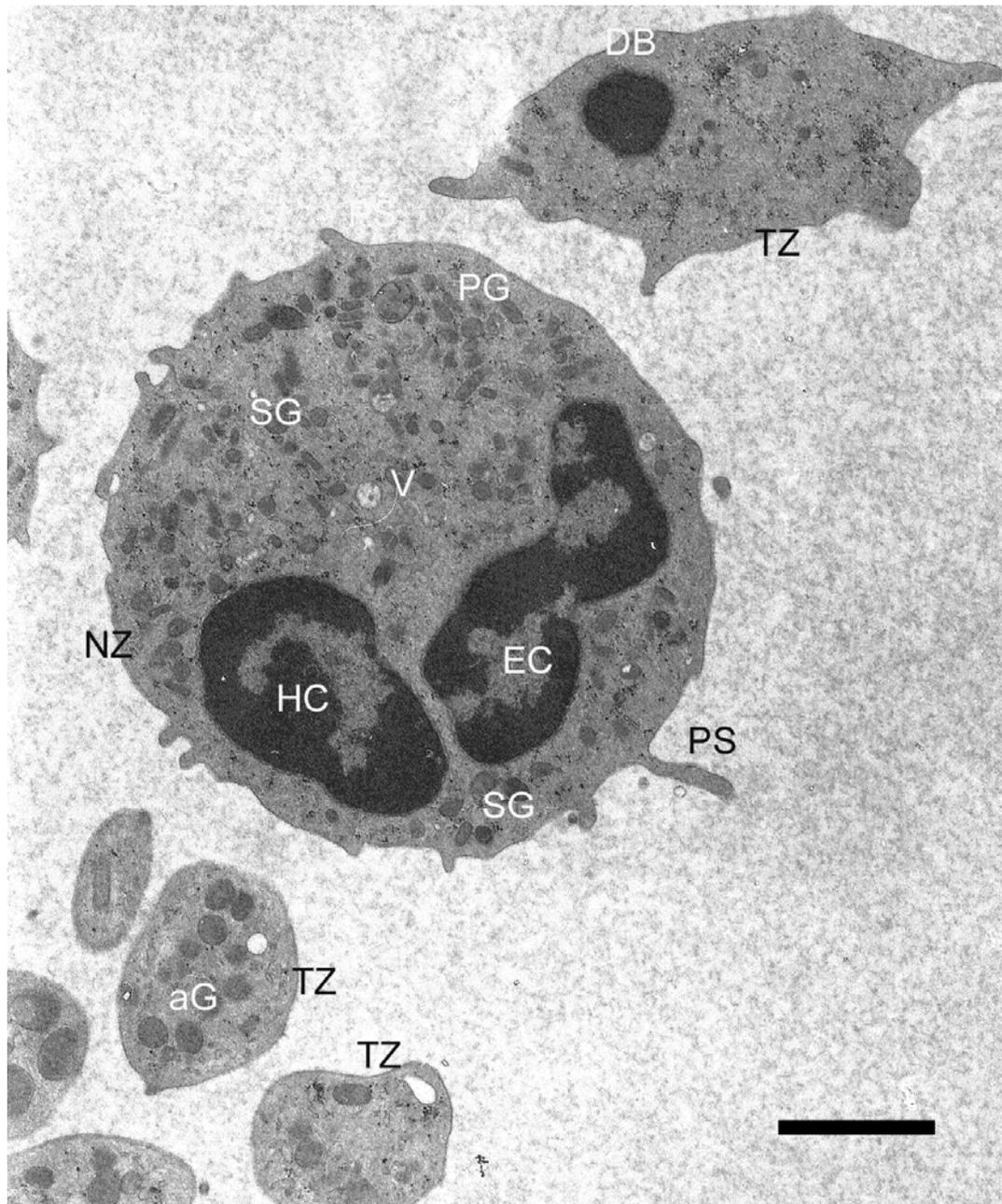


Abbildung 22: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten (Kjani)

Im Thrombozyten oben rechts ist ein „Dense Body“ stark ausgeprägt und sehr deutlich erkennbar.

NZ= Neutrophiler Granulozyt

EC= Euchromatin

SG= Sekundäre Granula

TZ= Thrombozyt

SB= 2 μ m

HC= Heterochromatin

PG= Primäre Granula

PS= Pseudopodien V= Vakuolen

aG= alpha-Granula DB= Dense Bodies

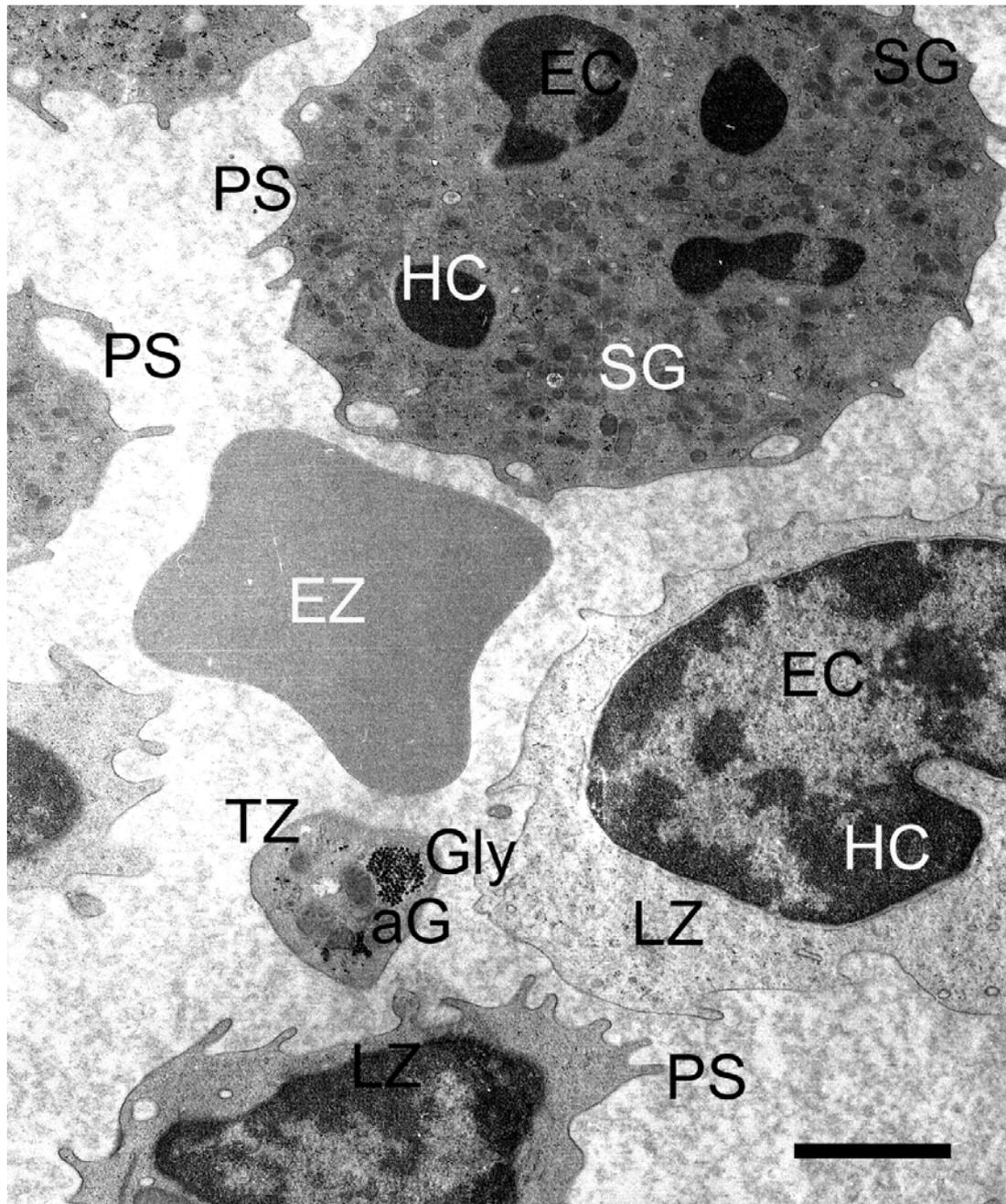


Abbildung 23: Segmentierter neutrophiler Granulozyt und Lymphozyten (Tjörvi)
 Im Lymphozyten sind im Gegensatz zum neutrophilen Granulozyten keine Granula vorhanden. Der Zellkern des neutrophilen Granulozyten ist stark segmentiert.

EZ= Erythrozyt
 NZ= Neutrophiler Granulozyt
 aG= alpha-Granula
 SG= Sekundäre Granula
 SB= 2 μ m

TZ= Thrombozyt
 PS= Pseudopodien
 EC= Euchromatin

LZ= Lymphozyt
 Gly= Glykogen
 HC= Heterochromatin

3.4 Eosinophile Granulozyten

Equine eosinophile Granulozyten zeichnen sich in erster Linie durch ihre großen, einheitlich elektronendichten, membrangebundenen Granula aus. Der Zellkern ist segmentiert und die typischen Zellorganellen, wie Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Vesikel und Mitochondrien, sind im Zytoplasma zu finden. An der Zytoplasmamembran finden sich kleine Ausstülpungen, welche sich wie feine Gräten darstellen und deswegen als engl. Microridges bezeichnet werden.

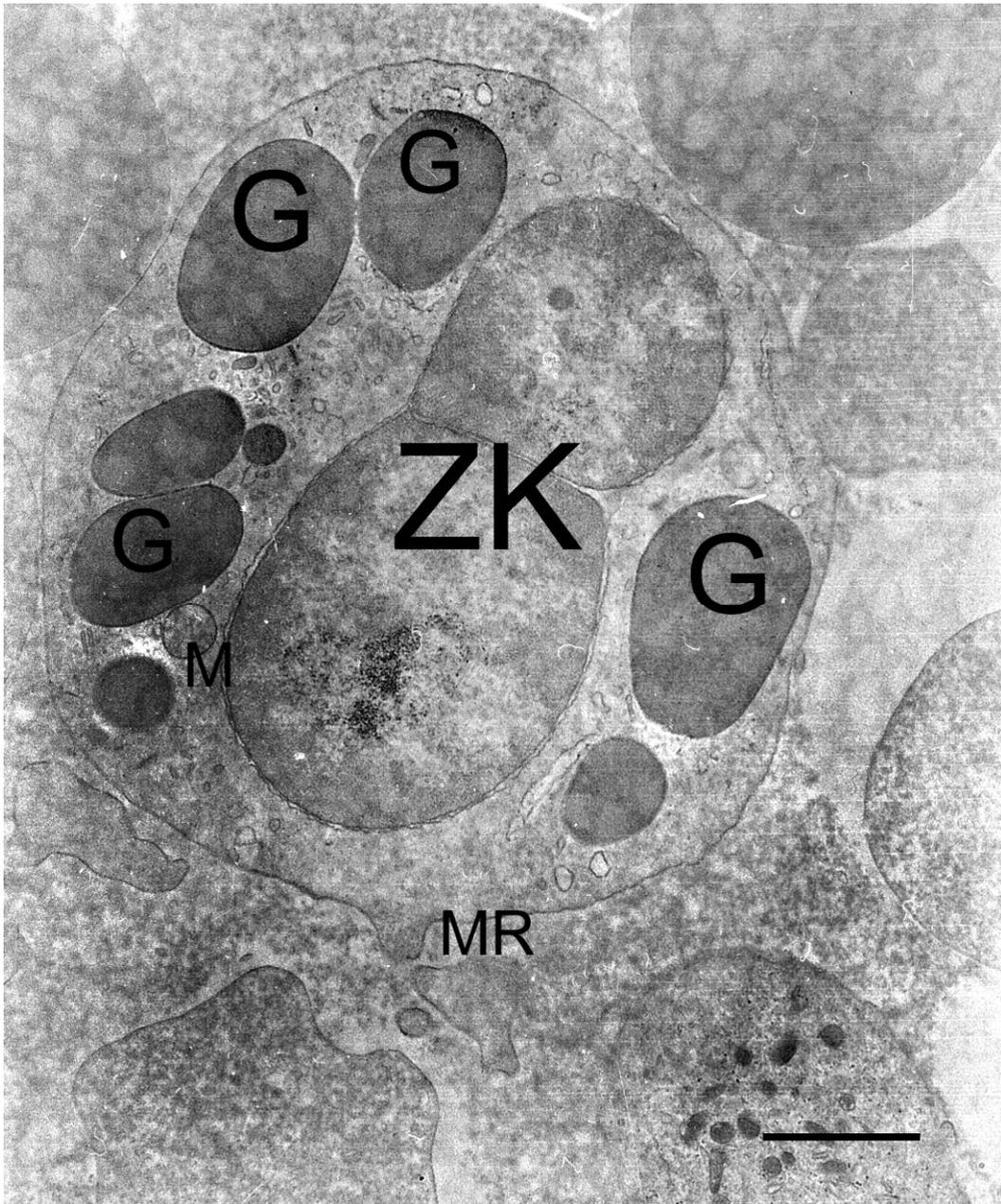


Abbildung 24: Eosinophiler Granulozyt (Tjörvi)

Der eosinophile Granulozyt enthält die, für diese Zellart typischen, sehr großen (bis 2 μm) einheitlich elektronendichten Granula. Zum Teil weisen die Granula eine kristalline Innenstruktur auf.

ZK= Zellkern

G= Granula

M= Mitochondrium

MR= Microridges (Membranausstülpung)

SB= 2 μm

3.5 Basophile Granulozyten

Ein basophiler Granulozyt konnte unter dem Elektronenmikroskop nicht eindeutig identifiziert werden

3.6 Lymphozyten

Die rundlichen Lymphozyten sind zahlreich anzutreffen. Der Zellkern weist ebenfalls einen inneren hellen Euchromatinbereich auf, welcher von dunklem Heterochromatin umgeben ist. Im Zytoplasma befinden sich Zellorganellen, wie endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Vakuolen. Auf der Zellmembran finden sich zahlreiche mikrovilli-artige Ausstülpungen.

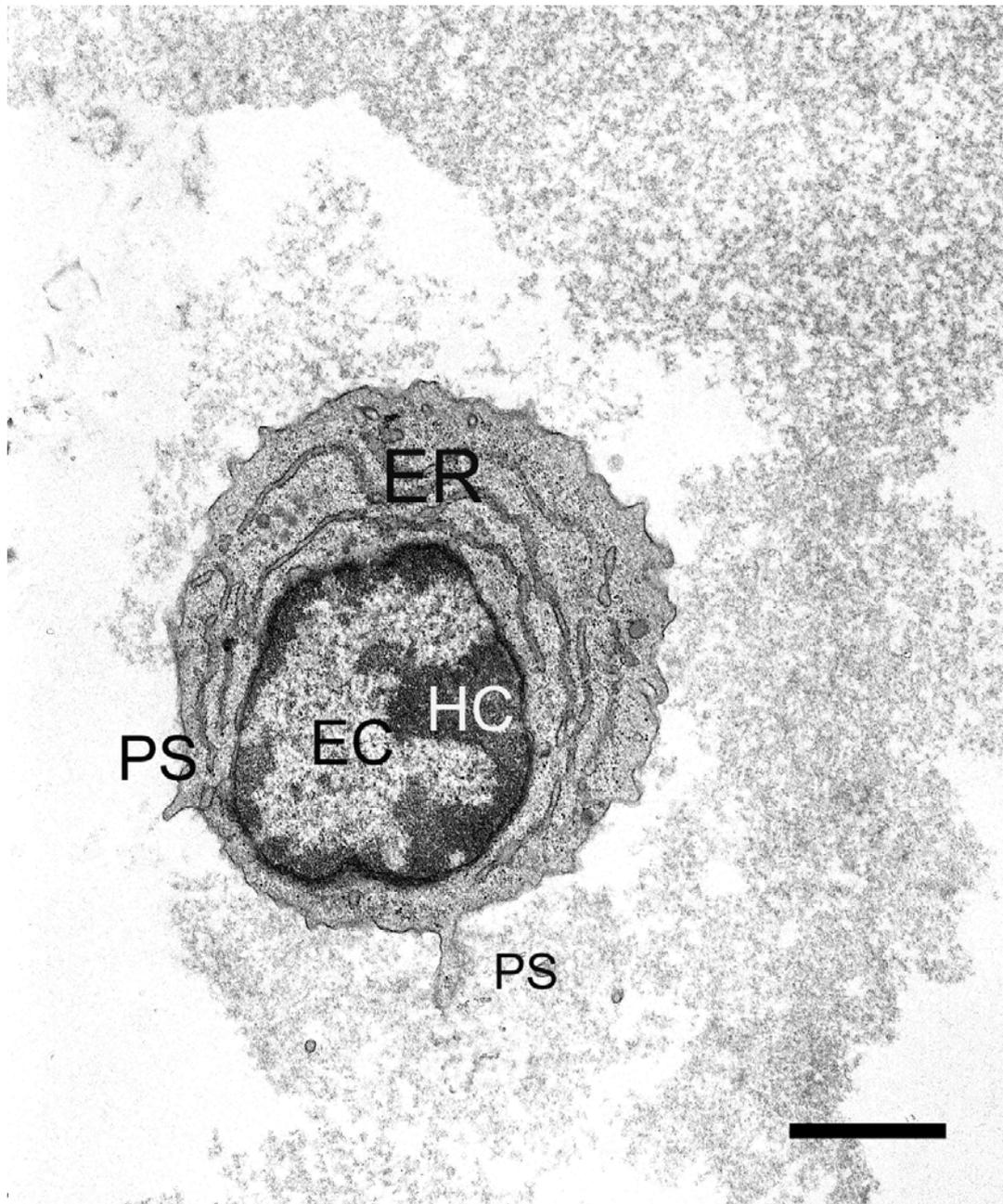


Abbildung 25: Lymphozyt (Trausti)

Beachte: Aktivierter B-Lymphozyt mit gut entwickeltem endoplasmatischem Retikulum.

LZ= Lymphozyt

HC= Heterochromatin

EC= Euchromatin

ER= Endoplasmatisches Retikulum

SB= 2 μ m

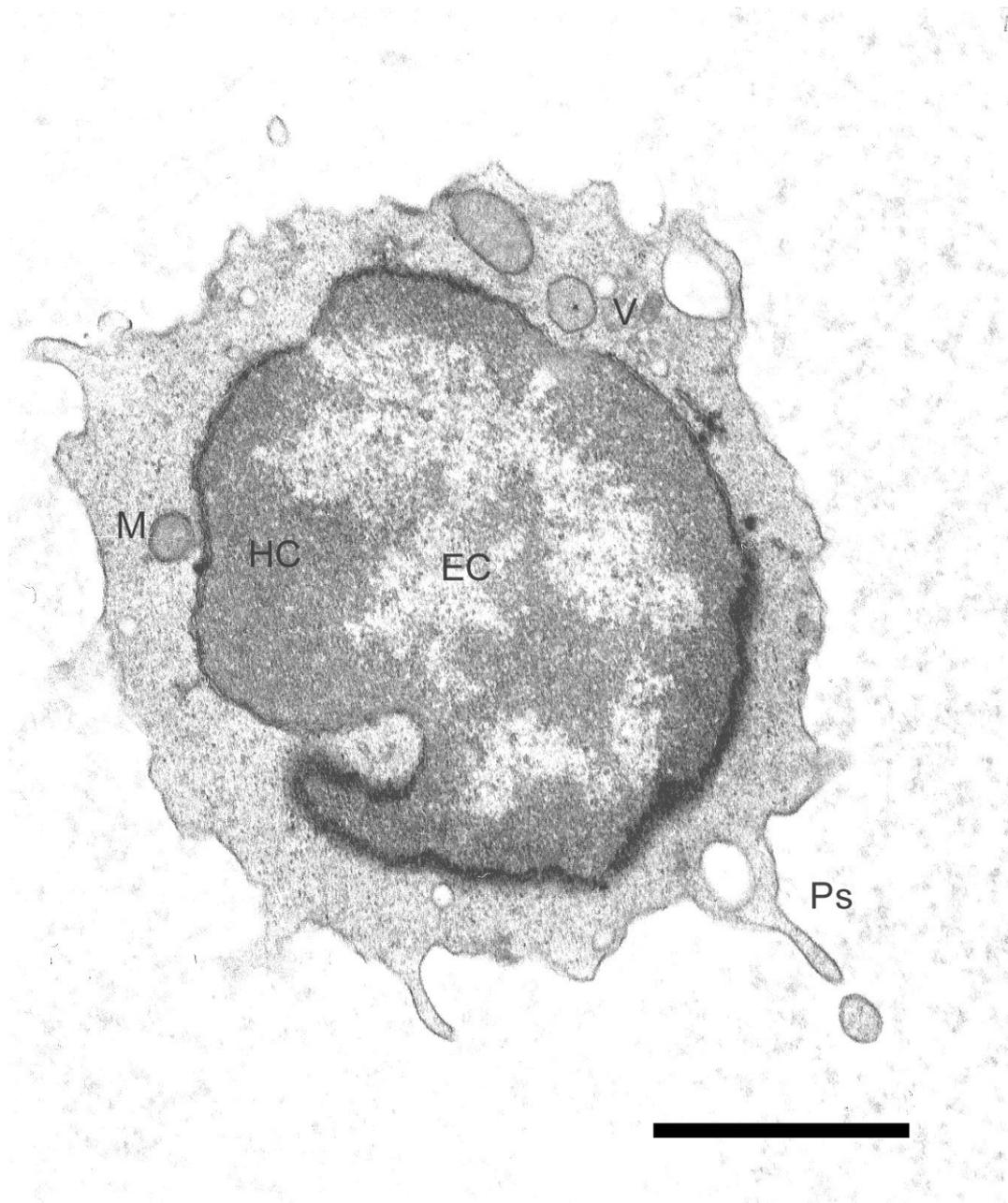


Abbildung 26: Lymphozyt (Trausti)

Dieser Lymphozyt besitzt an der Zellmembran gut ausgebildete Pseudopodien. Im Zytoplasma sind Mitochondrien gut zu erkennen.

HC= Heterochromatin

EC= Euchromatin

Ps= Pseudopodien

M= Mitochondrien

V= Vakuole

SB= 2 μ m

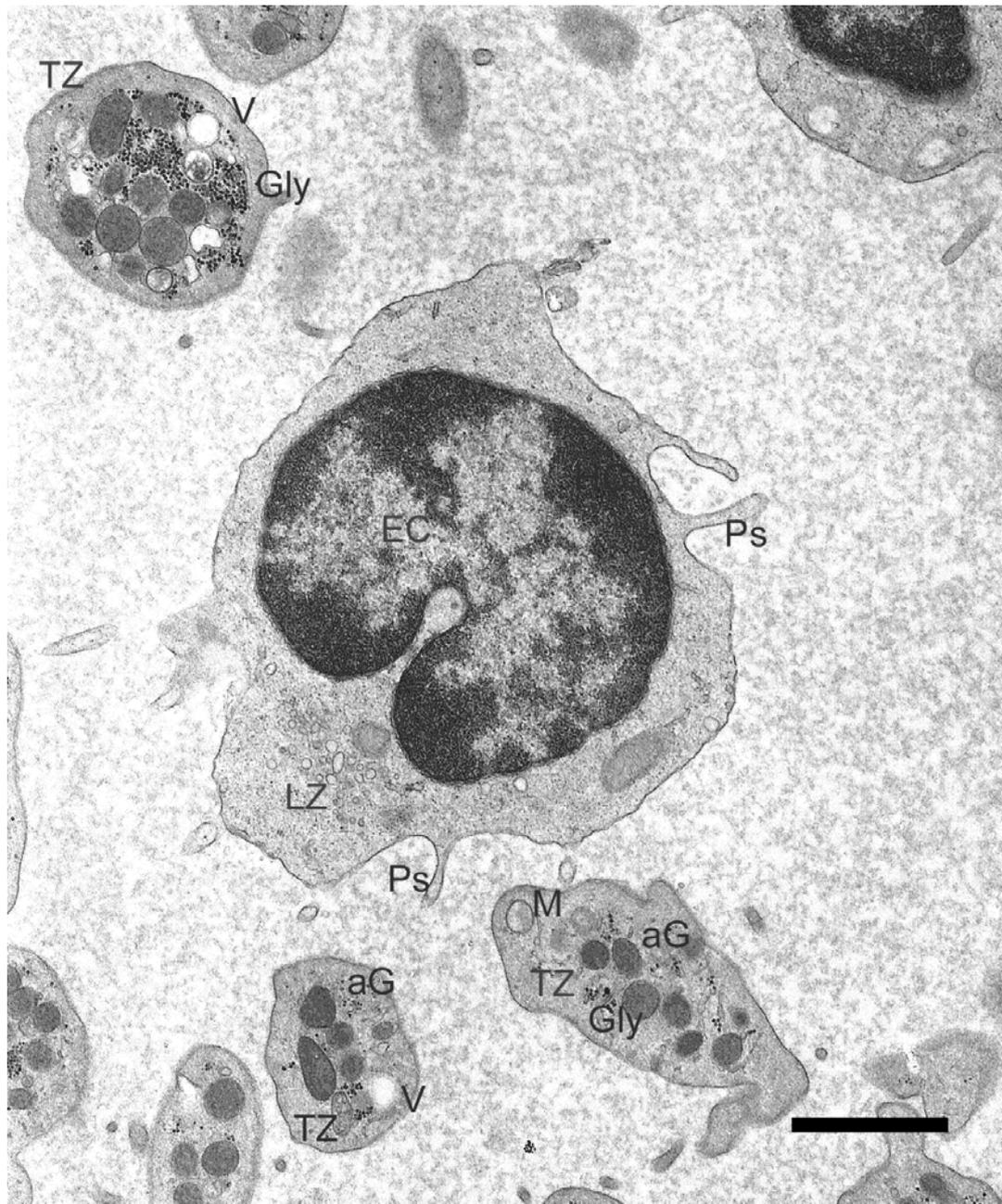


Abbildung 27: Lymphozyt und Thrombozyten (Tjörvi)

Im Zellkern des Lymphozyten ist der helle Euchromatinbereich von elektronendichtem Heterochromatin umgeben.

LZ= Lymphozyt
 M= Mitochondrium
 Gly= Glykogen
 SB= 2 μ m

TZ= Thrombozyt
 aG= alpha-Granula
 V= Vakuole

PS= Pseudopodien
 EC= Euchromatin

3.7 Monozyten

Der Zellkern dieser großen Zellen ist oftmals bohnenförmig gebogen und besitzt die üblichen Euchromatin- und Heterochromatinbereiche. Auf der Zellmembran befinden sich mehr oder weniger stark ausgeprägte Pseudopodien, als Zeichen einer vorhandenen Aktivität. Im Zytoplasma befinden sich Vakuolen, kleine Granula und vereinzelt Mitochondrien. Die Lysosomen stellen sich als elektronendichte, Membran gebundenen Vesikel dar, die nahe der Zellmembran liegen.

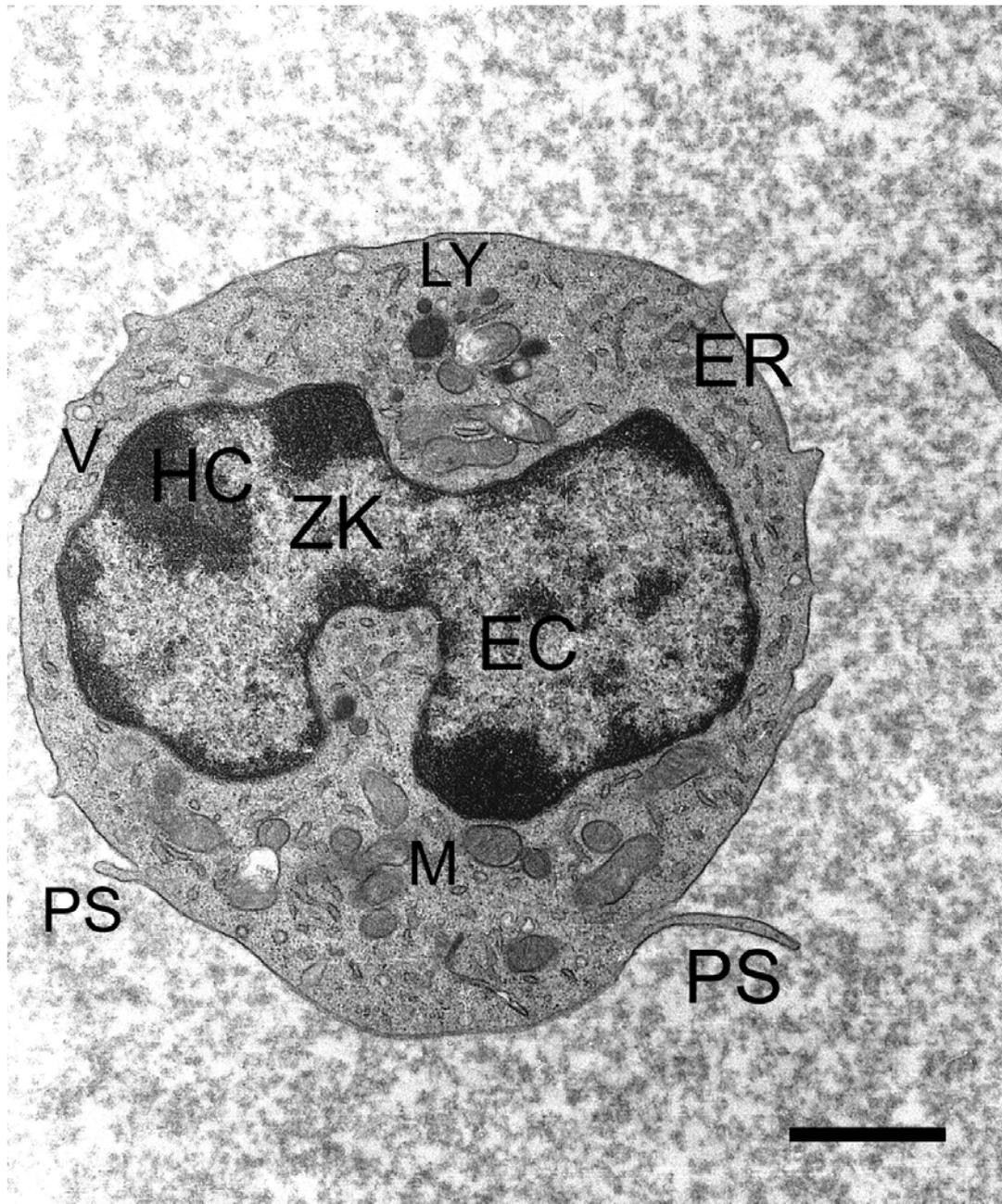


Abbildung 28: Monozyt (Tjörvi)

Der Zellkern des Monozyten besitzt die typische Hantelform. Im Zytoplasma sind Mitochondrien, Lysosomen, das endoplasmatische Retikulum und Vakuolen gut zu erkennen. Als Zeichen seiner Aktivität sind die Pseudopodien anzusehen.

ZK= Zellkern	HC= Heterochromatin	EC= Euchromatin
V= Vakuole	M= Mitochondrium	LY= Lysosomen
PS= Pseudopodien	ER= Endoplasmatisches Retikulum	
SB= 2 μ m		

4. Glykohistochemie

4.1 Bindung von Glukose/ Mannose spezifischen Lektinen

4.1.1 Bindung von Concanavalia Agglutinin

Bei allen Präparaten konnte eine deutlich positive Reaktion der Erythrozyten mit dem Concanavalia Agglutinin festgestellt werden. Dabei färbte sich in allen Ausstrichen die Zellmembran sehr stark an. Das Zytoplasma reagierte vor allem im zentralen Bereich positiv. Auch bei den Blutplättchen konnte eine Färbung mit ConA-FITC, vor allem des Zytoplasmas, festgestellt werden. Die Lymphozyten reagierten nur schwach. Sie zeigten teilweise eine geringe positive Reaktion des Zytoplasmas und der Zellmembran. Bei den Granulozyten färbten sich sowohl bei den neutrophilen also auch bei den eosinophilen Granulozyten in erster Linie die Granula. Auch das Zytoplasma und die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten reagierten positiv, jedoch nur von geringer Stärke. Die Granula hingegen färbten sich in allen Präparaten stark an. Bei den eosinophilen Granulozyten zeigte sich nur eine geringgradige Reaktion der Granula.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Auswertung der Bindung von Concanavalia Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	-	-	6	16	100%
- Zytoplasma	5	9	8	-	77,3%
Thrombozyten					
- Membran	14	4	4	-	36,7%
- Zytoplasma	2	20	-	-	90,9%
Lymphozyten					
-Membran	7	15	-	-	68,2%
- Zytoplasma	12	10	-	-	45,5%
Neutrophile					
- Membran	-	14	8	-	100%
- Zytoplasma	-	20	2	-	100%
- Granula	-	-	2	20	100%
Eosinophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	15	7	-	-	31,8%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 19:

- 0 keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

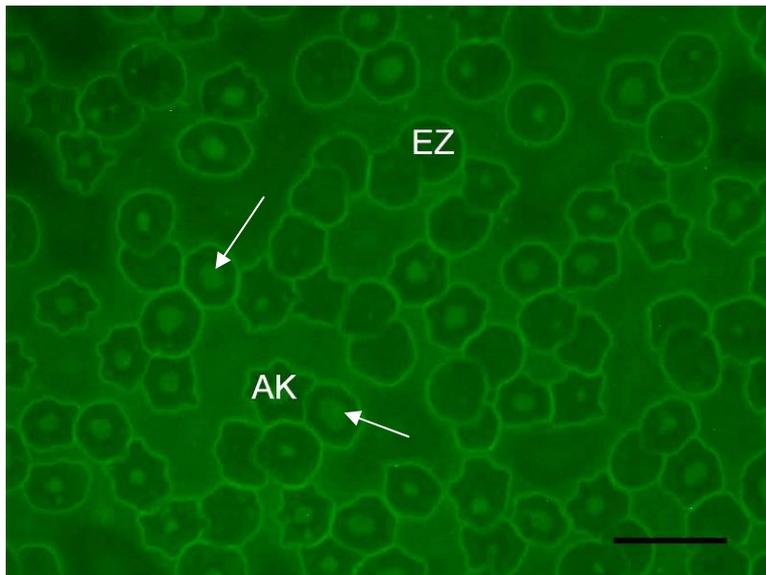


Abbildung 29: Erythrozyten (Brellir, ConA-FITC)

EZ= Erythrozyten AZ= Akanthozyten

Vor allem die Zellmembran der Erythrozyten wurde vom Lektin gebunden.

Auch die, durch die bikonkave Scheibenform bedingte zentrale Eindellung des Zytoplasmas hat das Lektin teilweise gebunden (Pfeile). Beachte die sternförmigen, als Akanthozyten bezeichneten Erythrozyten (Artefakte).

SB= 10µm

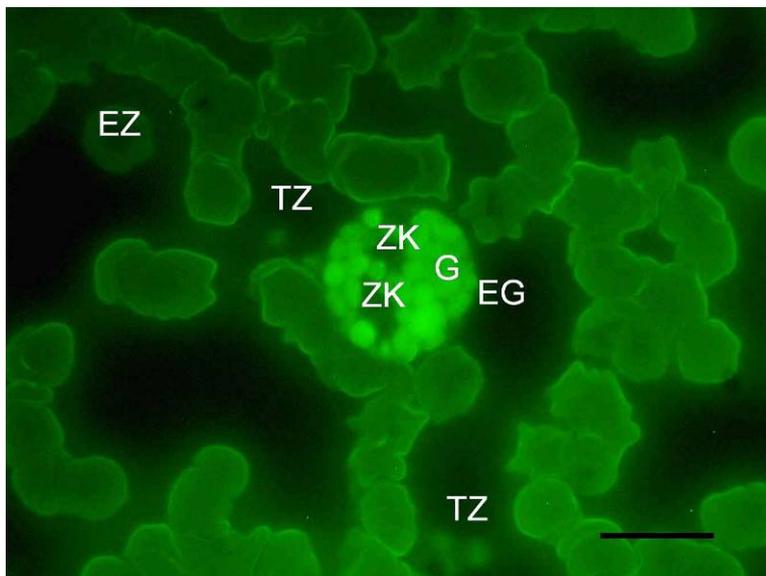


Abbildung 30: Eosinophiler Granulozyt (Mökkur, ConA-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt

G= Granula

EZ= Erythrozyt

TZ= Thrombozyt

ZK= Zellkern

Die Granula des eosinophilen Granulozyten haben das Lektin gebunden.

Auch die Thrombozyten und die Membran der Erythrozyten zeigen eine Bindung mit ConA-FITC.

SB= 10µm

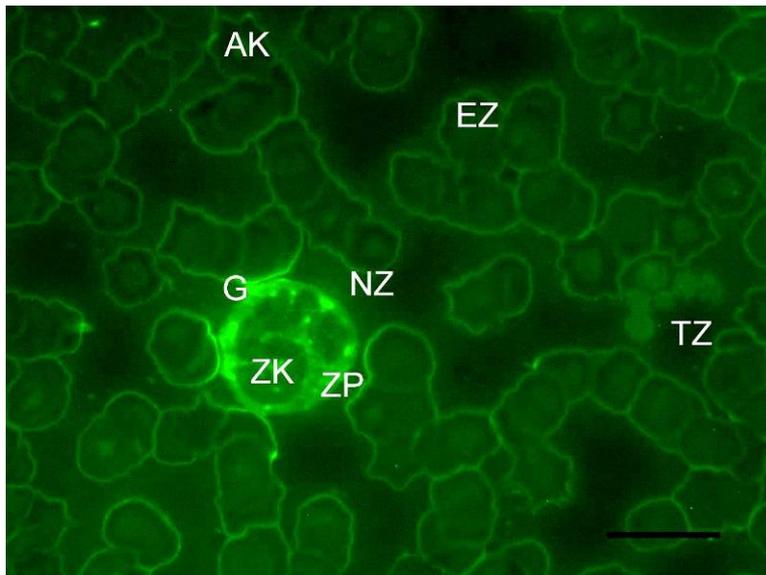


Abbildung 31: Neutrophiler Granulozyt mit Thrombozyten (Brellir, ConA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt ZK= Zellkern ZP= Zytoplasma
 G= Granula EZ= Erythrozyten TZ= Thrombozyten AZ= Akanthozyten
 Die Granula des neutrophilen Granulozyten zeigen eine starke Bindung des Lektins (grüne Fluoreszenz). Das Zytoplasma hat das Lektin ebenfalls gebunden, sowie auch die Thrombozyten und die Zellmembran der Erythrozyten.
 SB= 10µm



Abbildung 32: Lymphozyt mit Thrombozyten (Fönix, ConA-FITC)

LZ= Lymphozyt TZ= Thrombozyt EZ= Erythrozyt
 Nur an der Zellmembran des Lymphozyten (Pfeil) und an den Thrombozyten ist eine leichte Bindung von ConA-FITC zu erkennen.
 SB= 10µm

4.1.2 Bindung von *Lens culinaris* Agglutinin

Bei den Versuchen mit dem *Lens culinaris* Agglutinin reagierten die Erythrozyten aller Tiere deutlich positiv an ihrer Zellmembran. Auch die Zellmembran und das Zytoplasma der Thrombozyten färbten sich mit LCA-FITC an. Vor allem die Reaktion des Zytoplasmas fiel hierbei deutlich positiv aus. Bei den Lymphozyten färbte sich nur bei einem Tier die Membran leicht an. Die neutrophilen Granulozyten zeigten teilweise eine leichte Reaktion der Zellmembran, die Anfärbung der Granula aber war in allen Fällen sehr stark ausgeprägt. Bei den eosinophilen Granulozyten waren nur die Granula deutlich positiv.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Auswertung der Bindung von *Lens culinaris* Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	-	-	5	17	100%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Thrombozyten					
- Membran	17	2	2	1	22,7%
- Zytoplasma	2	15	5	-	90,9%
Lymphozyten					
-Membran	21	1	-	-	4,5%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Neutrophile					
- Membran	18	4	-	-	18,2%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	5	17	100%
Eosinophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	10	5	4	3	54,5%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 20:

0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

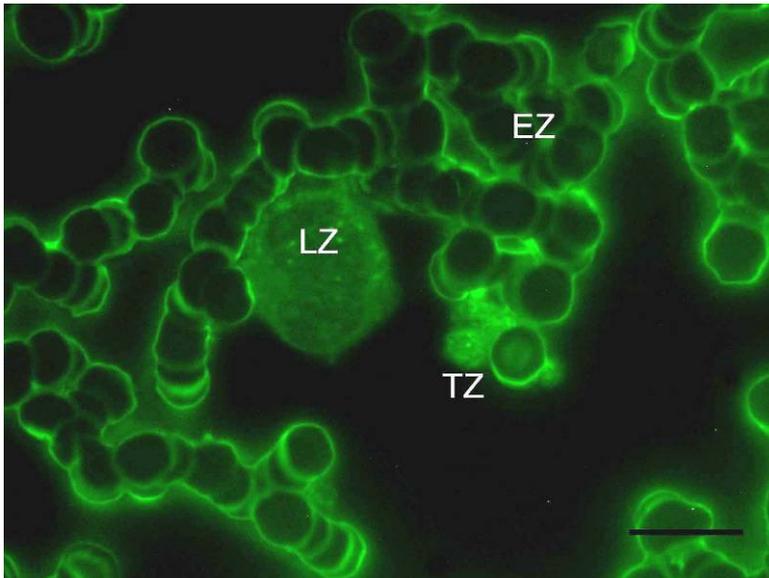


Abbildung 33 Lymphozyt mit Thrombozyten (Vindstjarni, LCA-FITC)

LZ= Lymphozyt EZ= Erythrozyt TZ= Thrombozyt

An die Zellmembran der Erythrozyten und an die Thrombozyten hat das Lektin deutlich gebunden. Eine leichte Bindung zeigt auch das Zytoplasma des Lymphozyten.

SB= 10 μ m

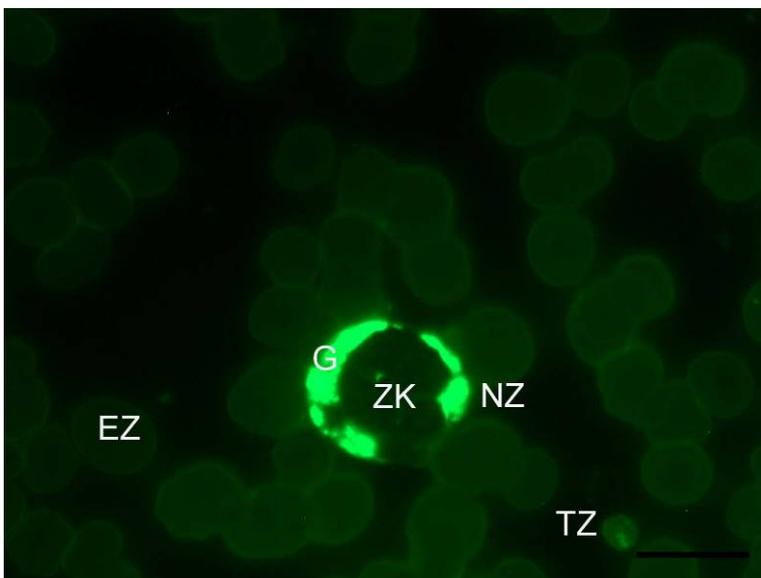


Abbildung 34: Neutrophiler Granulozyt (Fönix, LCA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt ZK= Zellkern
G= Granula TZ= Thrombozyten

Gut ist die starke Bindung von LCA-FITC an die Granula des neutrophilen Granulozyten erkennbar. Auch an das Zytoplasma des Thrombozyten und die Zellmembran der Erythrozyten hat das Lektin gebunden.

SB= 10 μ m

4.1.3 Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin

Bei der Färbung mit PSA-FITC zeigte die Zellmembran eines Großteils der roten Blutkörperchen eine deutlich positive Reaktion, hingegen konnte keine Anfärbung des Zytoplasmas festgestellt werden. Die Thrombozyten waren sowohl in Bezug auf ihr Zytoplasma als auch auf die Zellmembran bei fast allen Tieren positiv. Die Lymphozyten färbten sich nur bei wenigen Tieren an, hierbei auch nur die Zellmembran. Eine Bindung des Lektins an die neutrophilen Granulozyten zeigte sich vor allem an den Granula und der Zellmembran. Dabei fiel die Reaktion der Granula stark positiv aus. Bei den eosinophilen Granulozyten reagierten sowohl die Zellmembran als auch Zytoplasma und Granula. Die stärkste Reaktion zeigten aber die Granula.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Auswertung der Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	3	7	12	-	86,4%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Thrombozyten					
- Membran	5	7	10	-	77,3%
- Zytoplasma	5	7	10	-	77,3%
Lymphozyten					
-Membran	18	2	2	-	18,2%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Neutrophile					
- Membran	4	18	-	-	81,8%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	9	13	100%
Eosinophile					
- Membran	8	10	4	-	63,6%
- Zytoplasma	10	12	-	-	54,5%
- Granula	3	15	4	-	86,4%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 21:

0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

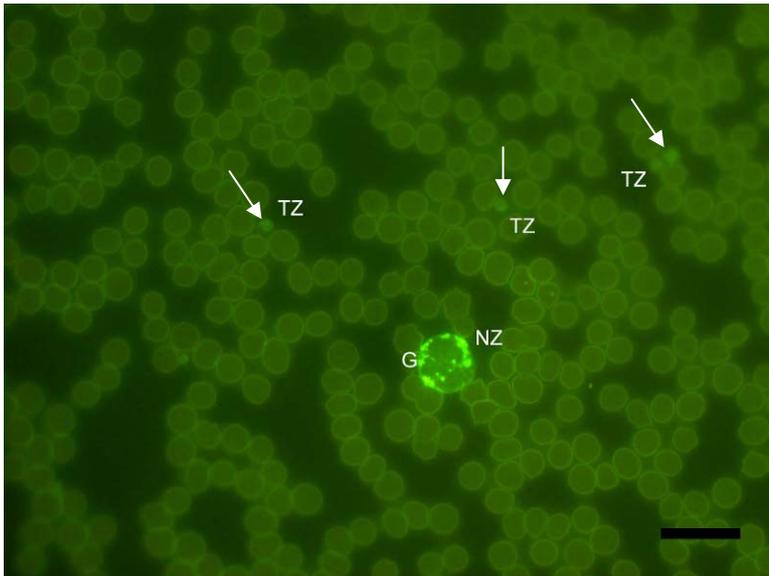


Abbildung 35: Neutrophiler Granulozyt (Kjani, PSA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt TZ= Thrombozyt G= Granula
 An die Zellmembran der Erythrozyten, an die Thrombozyten (Pfeile) und an die Granula des neutrophilen Granulozyten hat das Lektin PSA-FITC stark gebunden.
 SB= 10 μ m

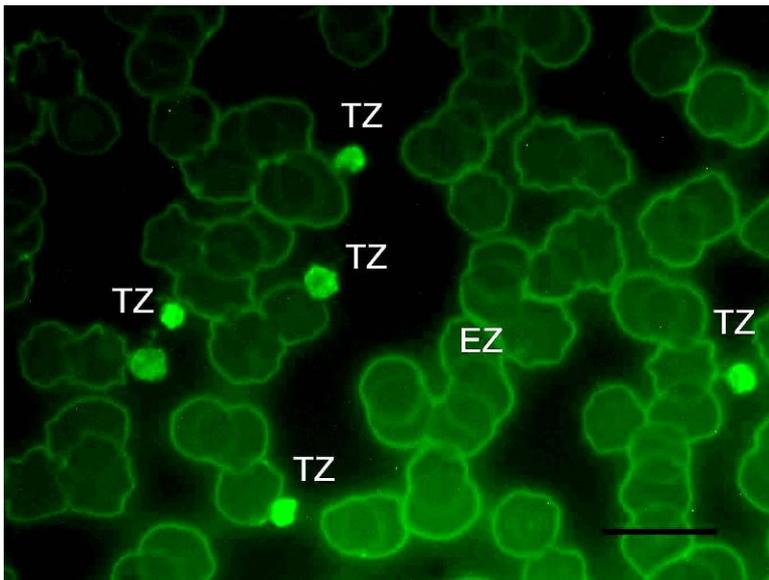


Abbildung 36: Erythrozyten und Thrombozyten (Isenburg, PSA-FITC)

TZ= Thrombozyten EZ= Erythrozyten
 Gut zu sehen ist die Bindung von PSA-FITC an die Thrombozyten und die Erythrozytenmembran.
 SB= 10 μ m

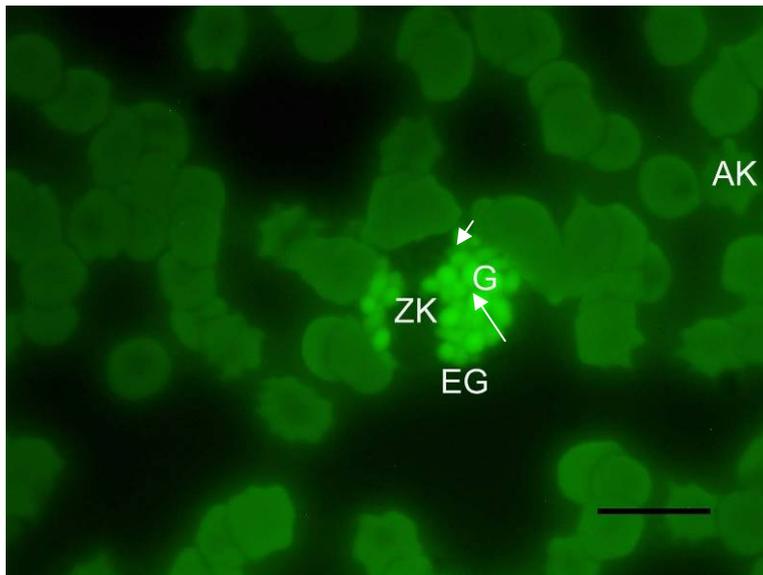


Abbildung 37: Eosinophiler Granulozyt und Erythrozyten (Mökkur, PSA-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt

ZK= Zellkern

G= Granula

AK= Akanthozyt

Vor allem an die Granula des eosinophilen Granulozyten hat das Lektin PSA-FITC gebunden (Pfeile). Auch auf dem Bild zu sehen sind die sternförmigen Akanthozyten, in der Form veränderte Erythrozyten, welche durch zu langsames Trocknen der Blutausstriche entstehen.

SB= 10 μ m

4.2 Bindung von Galaktose spezifischen Lektinen

4.2.1 Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin

Bei den Erythrozyten zeigte nur die Membran eine positive Reaktion. Das Lektin GSL färbte diese bei allen Tieren deutlich an. Auch bei den Thrombozyten war keine Bindung an das Zytoplasma der Zellen zu beobachten. Die Zellmembran reagierte bei zwei Tieren schwach positiv. Bei den übrigen war auch hier keine Bindung zu erkennen. Auch die Lymphozyten zeigten nur im Bereich ihrer Zellmembran bei einigen Tieren eine schwache Bindung des Lektins. Das Zytoplasma zeigte keinerlei Reaktion. Bei den Granulozyten reagierten die Granula der neutrophilen und der eosinophilen Granulozyten zu 100% positiv mit GSL. Die Membran der neutrophilen Granulozyten war nur bei einem Teil der Tiere schwach positiv. Der andere Teil zeigte keine Bindung. Das Zytoplasma wurde bis auf zwei Ausnahmen nicht vom Lektin angefärbt. Auch das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten färbte sich nicht an. Eine schwach positive Reaktion mit der Zellmembran der eosinophilen Granulozyten konnte nur bei zwei Tieren beobachtet werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Auswertung der Bindung von *Griffonia simplicifolia* Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	-	12	10	-	100%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Thrombozyten					
- Membran	20	2	-	-	9,1%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Lymphozyten					
-Membran	18	4	-	-	18,2%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Neutrophile					
- Membran	12	10	-	-	45,5%
- Zytoplasma	20	2	-	-	9,1%
- Granula	-	9	9	4	100%
Eosinophile					
- Membran	20	2	-	-	9,1%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	2	3	17	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 22:

0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

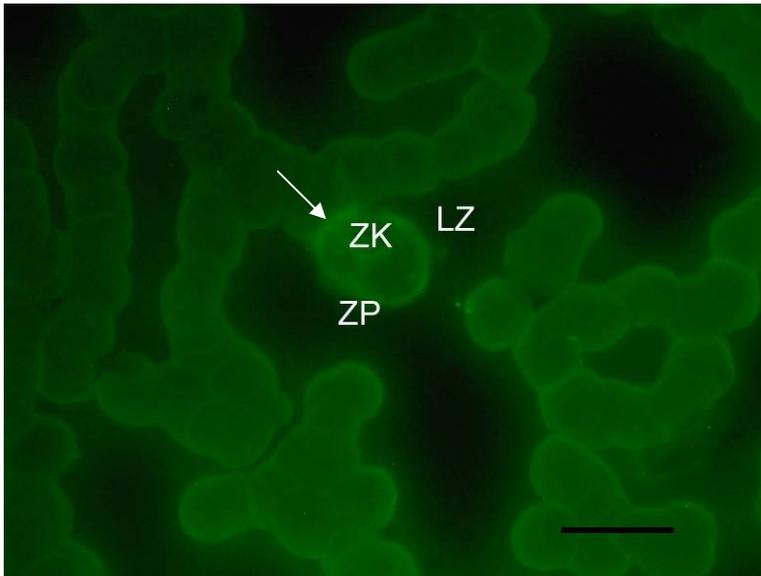


Abbildung 38: Lymphozyt (Lady, GSL-FITC)

LZ= Lymphozyt ZK= Zellkern ZP= Zytoplasma

GSL-FITC hat leicht an das Zytoplasma des Lymphozyten gebunden (Pfeil). Die Zellmembran der Erythrozyten zeigt zum Teil eine leichte Bindung.

SB= 10µm

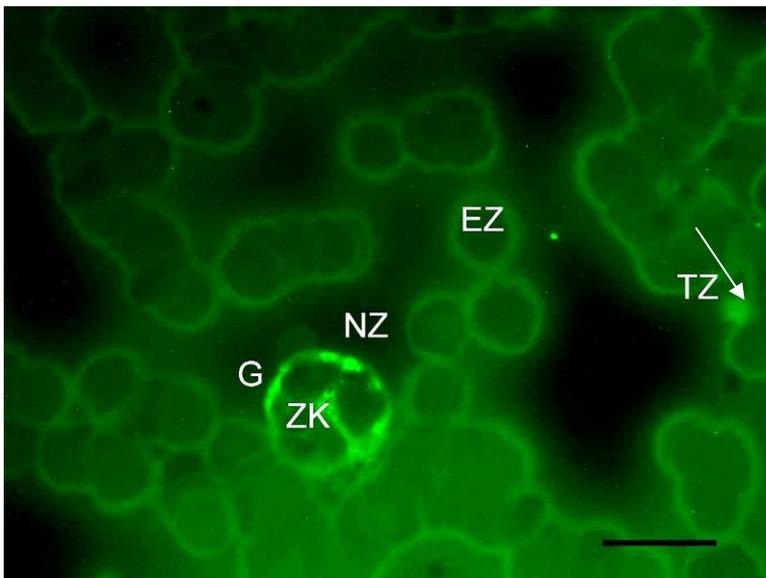


Abbildung 39: Segmentierter Neutrophiler Granulozyt (Skålm, GSL-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt ZK= Zellkern G= Granula

EZ= Erythrozyt TZ= Thrombozyt

Die Granula des neutrophilen Granulozyten wurden stark vom Lektin gebunden. Auch der Thrombozyt (Pfeil) und die Membran der Erythrozyten zeigen eine Bindung von GSL-FITC.

SB= 10µm

4.2.2 Bindung von Peanut Agglutinin

Die Erythrozyten reagierten bei der Färbung mit PNA-FITC kaum positiv. Nur bei zwei Tieren konnte eine schwache Bindung an die Zellmembran und bei einem Tier an das Zytoplasma festgestellt werden. Die Blutplättchen färbten sich alle schwach an. Es konnte nur bei einigen Tieren eine Bindung des Lektins an das Zytoplasma der Lymphozyten festgestellt werden. Die Granula der neutrophilen und der eosinophilen Granulozyten reagierten in allen Fällen deutlich positiv, eine Färbung des Zytoplasmas hingegen zeigte sich lediglich bei den neutrophilen Granulozyten. Die Membran reagierte nur in wenigen Fällen leicht positiv.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Auswertung der Bindung von Peanut Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	20	2	-	-	9,1%
- Zytoplasma	21	1	-	-	4,5%
Thrombozyten					
- Membran	-	22	-	-	100%
- Zytoplasma	1	21	-	-	95,5%
Lymphozyten					
-Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	19	2	1	-	13,6%
Neutrophile					
- Membran	19	3	-	-	13,6%
- Zytoplasma	20	2	-	-	9,1%
- Granula	-	14	6	2	100%
Eosinophile					
- Membran	20	2	-	-	9,1%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	1	18	3	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 23:

0 keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

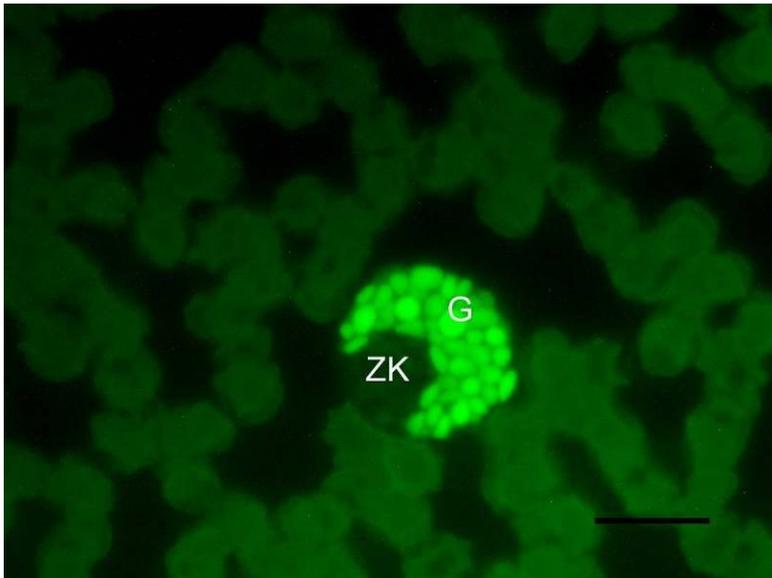


Abbildung 40: Eosinophiler Granulozyt (Gaski, PNA-FITC)

ZK= Zellkern G= Granula

Die Granula des eosinophilen Granulozyten zeigen eine deutliche Bindung von PNA-FITC.

SB= 10 μ m

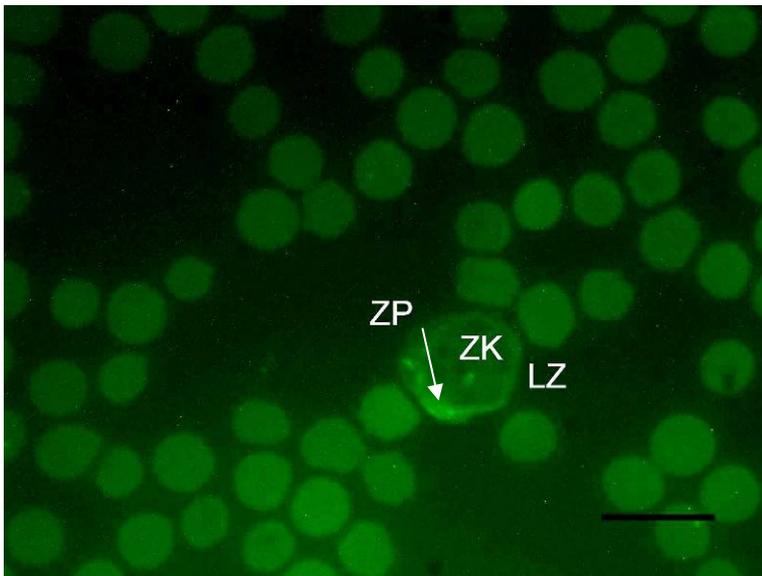


Abbildung 41: Lymphozyt (Vindstjarni, PNA-FITC)

PNA= Lymphozyt ZK= Zellkern ZP= Zytoplasma

An das Zytoplasma des Lymphozyten hat das Lektin PNA-FITC leicht gebunden (Pfeil).

SB= 10 μ m

4.2.3 Bindung von *Ricinus communis* Agglutinin

Das Lektin RCA färbte die Membran der Erythrozyten bis auf eine Ausnahme deutlich an. Das Zytoplasma zeigte keine Reaktion. Eine Bindung an Thrombozyten und Lymphozyten konnte nicht beobachtet werden. Die Granula der neutrophilen und der eosinophilen Granulozyten reagierten bei allen Tieren deutlich positiv mit dem Lektin. Dahingegen fiel die Reaktion mit Zellmembran und Zytoplasma dieser Granulozyten nur in wenigen Fällen schwach positiv aus.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Auswertung der Bindung von Ricinus communis Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	1	8	12	1	95,5%
- Zytoplasma	19	3	-	-	13,7%
Thrombozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Lymphozyten					
-Membran	17	5	-	-	22,7%
- Zytoplasma	17	5	-	-	22,7%
Neutrophile					
- Membran	14	8	-	-	36,4%
- Zytoplasma	16	6	-	-	27,3%
- Granula	-	5	7	10	100%
Eosinophile					
- Membran	18	4	-	-	18,2%
- Zytoplasma	20	2	-	-	9,1%
- Granula	-	14	6	2	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 24:

0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

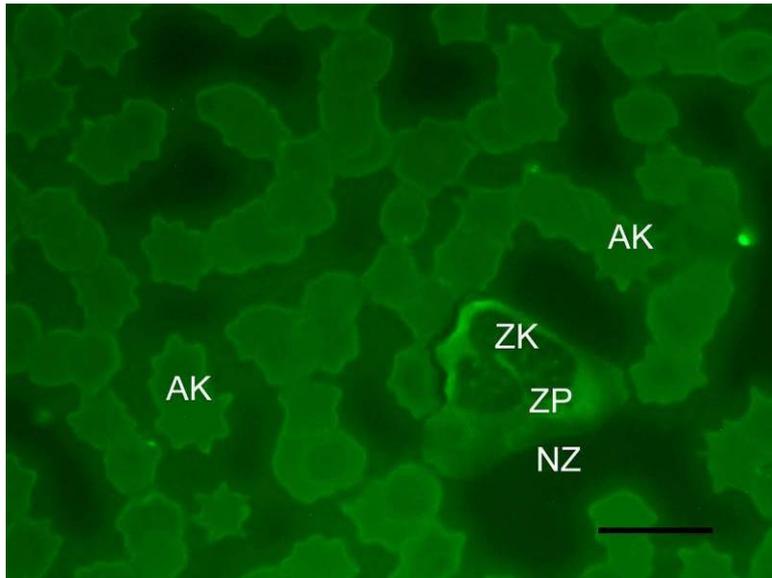


Abbildung 42: Segmentierter neutrophiler Granulozyt (Stigandi, RCA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt

AK= Akanthozyt

ZK= Zellkern

ZP= Zytoplasma

Die Zellmembran der Erythrozyten wurde von RCA-FITC deutlich gefärbt. Das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten zeigt eine deutliche Bindung des Lektins.

SB= 10 μ m

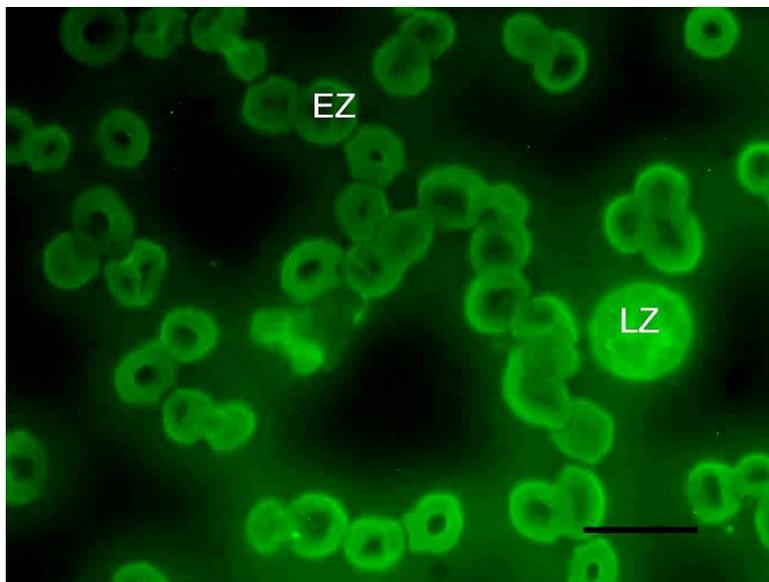


Abbildung 43: Lymphozyt (Lady, RCA-FITC)

LZ= Lymphozyt EZ= Erythrozyt

Die Erythrozyten zeigen sowohl eine deutliche Bindung des Lektins an der Zellmembran wie auch teilweise im Zytoplasma. Auch der Lymphozyt zeigt eine schwache Bindung von RCA-FITC.

SB= 10 μ m

4.2.4 Bindung von *Viscum album* Agglutinin

Die Bindung des biotinylierten Lektins VAA an die Erythrozyten erfolgte zu einem Teil sowohl im Zytoplasma als auch an die Zellmembran. Bei einem Teil der Erythrozyten war keine Bindung nachzuweisen. Bei den positiven Erythrozyten war die Fluoreszenz nur gering ausgeprägt. Eine Bindung an die Thrombozyten konnte nicht festgestellt werden. Nur bei einem der getesteten Tier konnte eine schwache Bindung an die Lymphozyten beobachtet werden. Das Zytoplasma und die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten wurden bei ca. der Hälfte der Probanden leicht angefärbt. Die Granula der neutrophilen Granulozyten reagierten bei zwei der Tier schwach positiv. Die Granula der eosinophilen Granulozyten waren bei allen Ausstrichen stark positiv, wohingegen keine Reaktion an Zytoplasma und Membran festgestellt werden konnte.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Auswertung der Bindung von *Viscum album* Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	4	6	-	-	60%
- Zytoplasma	4	6	-	-	60%
Thrombozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Lymphozyten					
-Membran	9	1	-	-	10%
- Zytoplasma	9	1	-	-	10%
Neutrophile					
- Membran	5	5	-	-	50%
- Zytoplasma	5	5	-	-	50%
- Granula	8	2	-	-	20%
Eosinophile					
- Membran	10	-	-	-	0%
- Zytoplasma	10	-	-	-	0%
- Granula	-	-	-	10	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 25:

0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

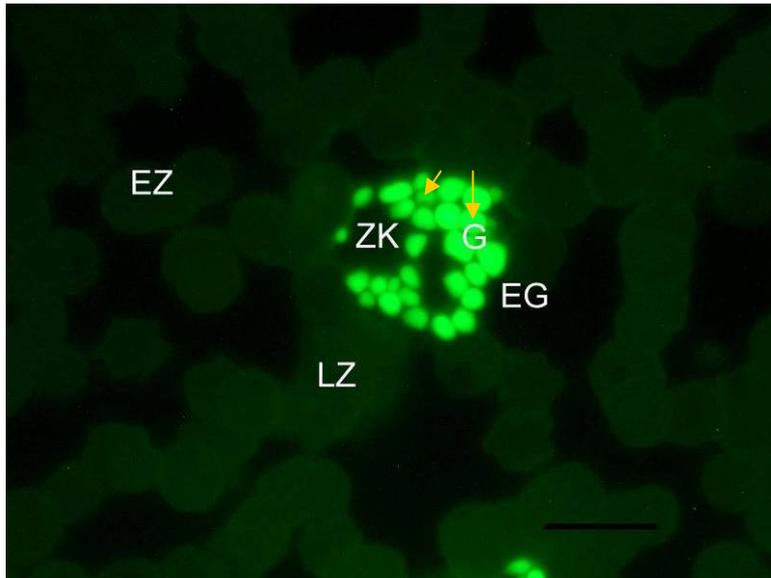


Abbildung 44: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt (Katla, VAA-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt

LZ= Lymphozyt

EZ= Erythrozyt

ZK= Zellkern

G= Granula

Eine starke Bindung des Lektins VAA ist an den Granula des eosinophilen Granulozyten zu sehen (Pfeile). Der Lymphozyt hat das Lektin nicht gebunden.

SB= 10µm

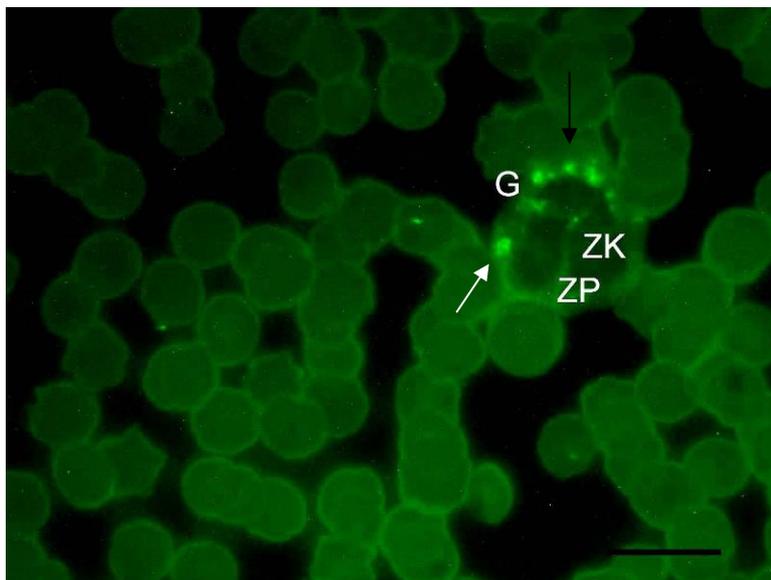


Abbildung 45: Segmentierter Neutrophiler Granulozyt (Katla, VAA-FITC)

ZK= Zellkern

ZP= Zytoplasma

G= Granula

Die Membran der Erythrozyten wurde leicht vom Lektin gefärbt. Deutlich sind einzelne Granula im Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten angefärbt (Pfeile).

SB= 10µm

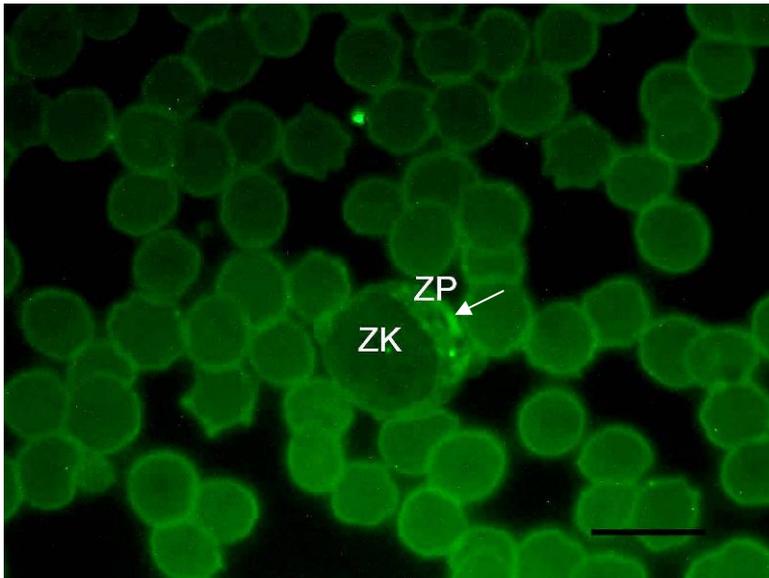


Abbildung 46: Lymphozyt (Brellir, VAA-FITC)

ZK= Zellkern

ZP= Zytoplasma

Gebunden hat das Lektin VAA-FITC geringgradig im Zytoplasma des Lymphozyten (Pfeil) und an der Zellmembran der Erythrozyten.

SB= 10 μ m

4.3 Bindung von N-Acetylglukosamin spezifischen Lektinen

4.3.1 Bindung von Wheat germ Agglutinin

Bei den Versuchen mit dem Lektin WGA-FITC konnte bei allen Präparaten eine deutliche Bindung an die Membran der Erythrozyten festgestellt werden. Im Zytoplasma wurde das Lektin in nur einem Fall gebunden. Auch die Thrombozyten wurden alle vom Lektin sehr deutlich gefärbt. Bei den Lymphozyten reagierten nur einige Ausstriche positiv mit WGA. Sehr deutlich hingegen war die Bindung des Lektins an die Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Das Zytoplasma der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wurde zu ca. 45% gefärbt. Die Zellmembran dieser zwei Granulozytentypen reagierte nur bei wenigen Ausnahmen schwach positiv.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Auswertung der Bindung von Wheat germ Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	-	9	12	1	100%
- Zytoplasma	21	1	-	-	4,5%
Thrombozyten					
- Membran	-	8	10	4	100%
- Zytoplasma	-	5	15	2	100%
Lymphozyten					
-Membran	20	2	-	-	9,1%
- Zytoplasma	16	4	2	-	27,3%
Neutrophile					
- Membran	19	3	-	-	13,6%
- Zytoplasma	12	10	-	-	45,5%
- Granula	-	5	5	12	100%
Eosinophile					
- Membran	20	2	-	-	9,1%
- Zytoplasma	12	10	-	-	45,5%
- Granula	-	12	10	-	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 26:

0 keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

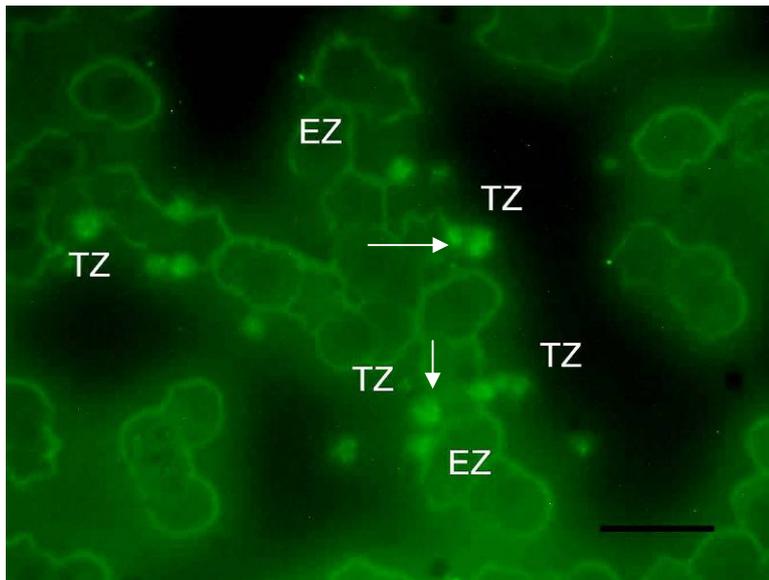


Abbildung 47: Erythrozyten und Thrombozyten (Mökkur, WGA-FITC)

EZ= Erythrozyten TZ= Thrombozyten

Sehr deutlich ist die Bindung des Lektins an die Zellmembran der Erythrozyten und an die Thrombozyten (Pfeile) zu erkennen.

SB= 10 μ m

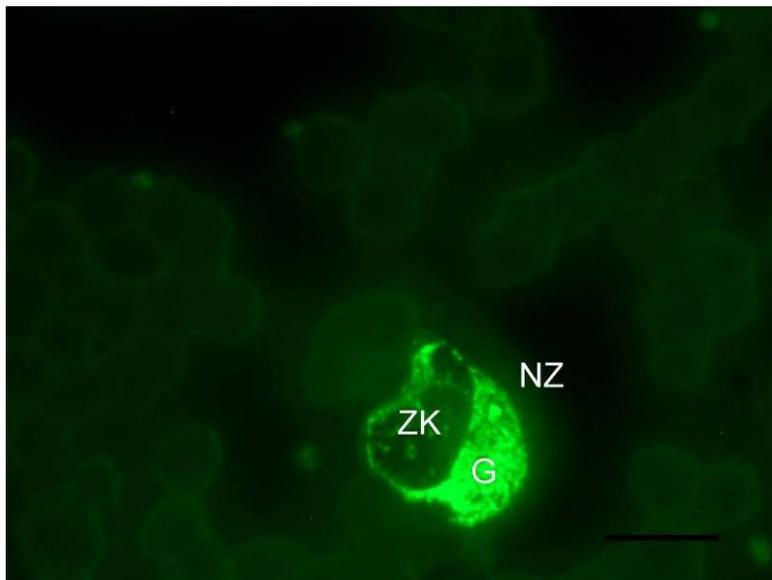


Abbildung 48: Neutrophiler Granulozyt (Fönix, WGA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt ZK= Zellkern G= Granula

Gut zu sehen ist die starke Bindung an die Granula des neutrophilen Granulozyten.

SB= 10 μ m

4.3.2 Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert

Bei den Versuchen mit dem Lektin WGAs war die Bindung des Lektins an die Erythrozytenmembran in allen Fällen stark positiv ausgeprägt. Dahingegen zeigte sich keine Anfärbung im Zytoplasma. Bei einem Großteil der Thrombozyten war keine Bindung feststellbar. Nur in wenigen Fällen wurden die Zellmembran und das Zytoplasma leicht angefärbt. Nur bei wenigen Probanden war eine Bindung von WGAs-FITC an die Lymphozyten feststellbar. Dagegen war die Reaktion der Granula der neutrophilen Granulozyten stark positiv ausgeprägt. Membran und Zytoplasma banden nur in vereinzelt Fällen das Lektin. Die Bindung an die Granula der eosinophilen Granulozyten war ebenso stark zu beobachten. Auch hier war die Reaktion von Zellmembran und Zytoplasma nur in wenigen Fällen schwach zu sehen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Auswertung der Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der</i> <i>positiven</i> <i>Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	-	-	12	10	100%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Thrombozyten					
- Membran	18	4	-	-	18,2%
- Zytoplasma	16	6	-	-	27,3%
Lymphozyten					
-Membran	19	3	-	-	13,6%
- Zytoplasma	19	3	-	-	13,6%
Neutrophile					
- Membran	16	6	-	-	27,3%
- Zytoplasma	19	3	-	-	13,6%
- Granula	-	2	1	19	100%
Eosinophile					
- Membran	19	3	-	-	13,6%
- Zytoplasma	21	1	-	-	4,5%
- Granula	-	8	8	6	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 27:

0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

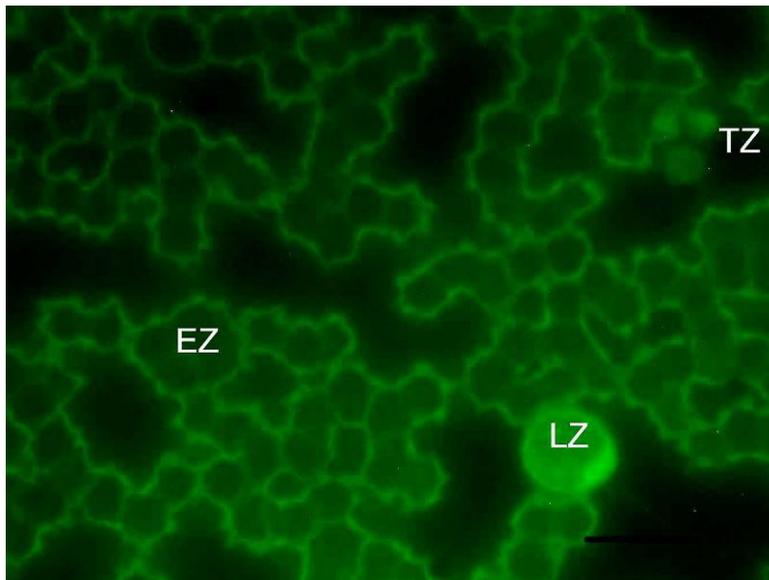


Abbildung 49: Lymphozyt (Brellir, WGAs-FITC)

EZ= Erythrozyt LZ= Lymphozyt TZ= Thrombozyt

Am Zytoplasma des Lymphozyten, an der Membran der Erythrozyten und an den Thrombozyten hat das Lektin WGAs-FITC deutlich gebunden.

Beachte die sternförmigen Erythrozyten (Artefakte auf Grund zu langsamen Trocknens).

SB= 10µm

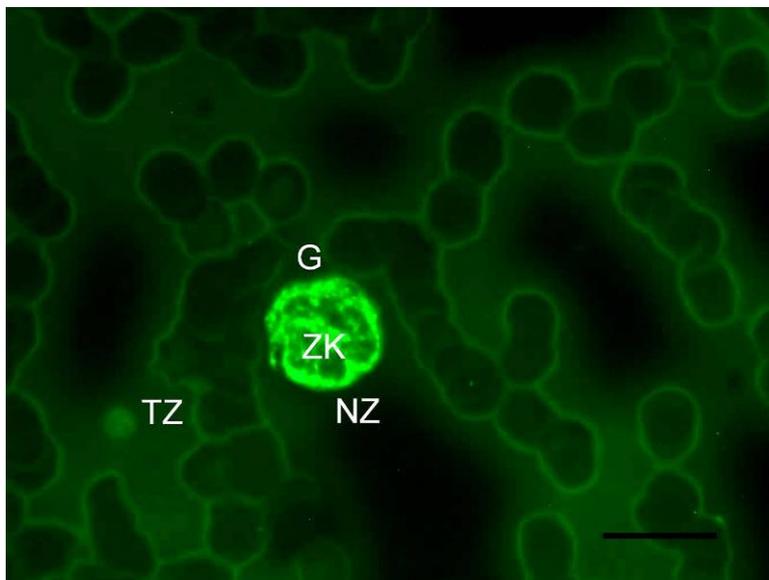


Abbildung 50: Neutrophiler Granulozyt (Katla, WGAs-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt G= Granula
TZ= Thrombozyt ZK= Zellkern

Vor allem die Granula des neutrophilen Granulozyten zeigen eine starke Bindung des Lektins. Auch die Zellmembran der roten Blutkörperchen und der Thrombozyt haben das Lektin gebunden.

SB= 10µm

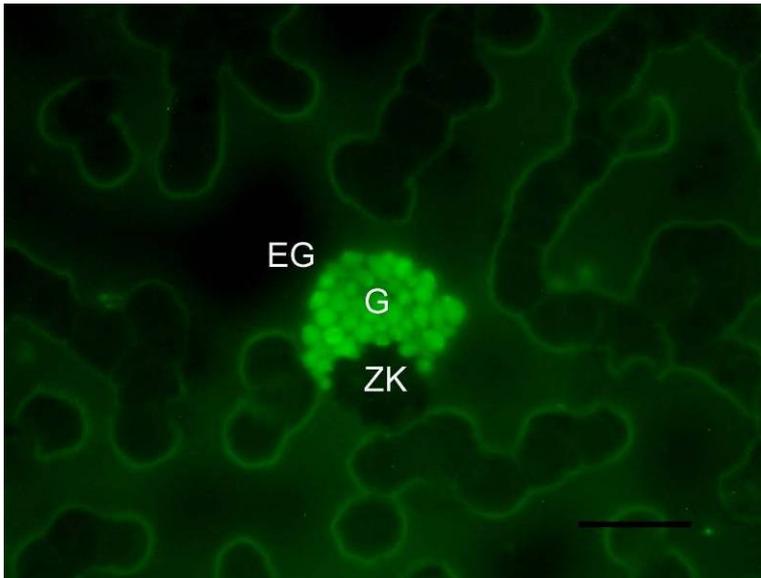


Abbildung 51: Eosinophiler Granulozyt (Skålm, WGAs-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt ZK= Zellkern G= Granula
Deutlich ist die starke Bindung des Lektins WGAs-FITC an die Granula des eosinophilen Granulozyten zu sehen.
SB= 10 μ m

4.4 Bindung von N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektinen

4.4.1 Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin

Das Lektin DBA zeigte bei allen Tieren eine deutliche Bindung an die Zellmembran der Erythrozyten. Das Zytoplasma der roten Blutkörperchen reagierte unterschiedlich. Zwar war vereinzelt eine stark positive Anfärbung feststellbar, der Großteil aber zeigte keine Reaktion. Eine Bindung an die Thrombozyten konnte nicht beobachtet werden. DBA band auch nicht im Zytoplasma der Lymphozyten, lediglich die Zellmembran war bei einigen Ausstrichen schwach positiv. Eine schwach positive Bindung war sowohl im Zytoplasma wie auch an der Zellmembran der neutrophilen Granulozyten bei über 60% der untersuchten Tiere zu sehen. Bei den Granula verhielt es sich ähnlich. Hier war eine deutliche bis starke Bindung des Lektins bei über 70% der Tiere zu beobachten. Bei den eosinophilen Granulozyten waren nur die Granula deutliche DBA-positiv.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Auswertung der Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	-	8	11	3	100%
- Zytoplasma	13	4	3	2	40,9%
Thrombozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Lymphozyten					
-Membran	14	8	-	-	36,4%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Neutrophile					
- Membran	8	14	-	-	63,6%
- Zytoplasma	8	14	-	-	63,6%
- Granula	6	14	2	-	72,7%
Eosinophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	0	0	9	13	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 28:

0 keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

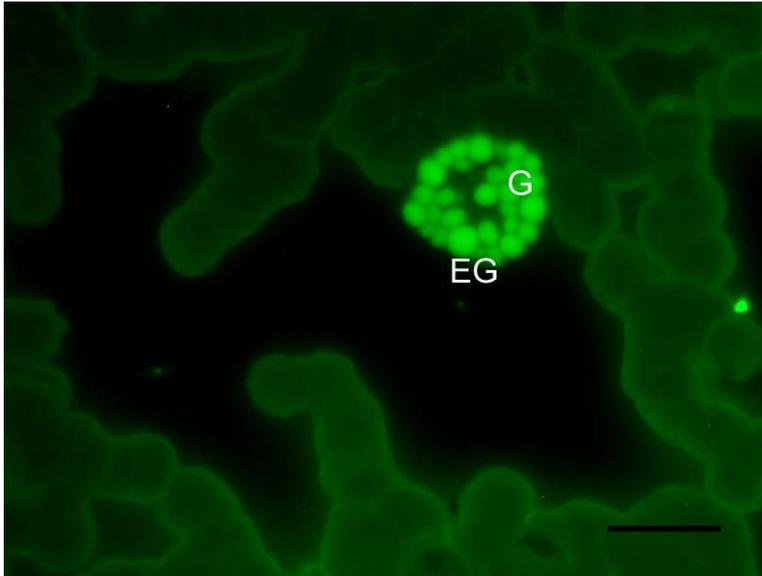


Abbildung 52: Eosinophiler Granulozyt (Gäski, DBA-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt

G= Granula

Die Granula des eosinophilen Granulozyten haben das Lektin stark gebunden.
Auch die Erythrozyten wurden leicht von DBA-FITC gefärbt.

SB= 10µm

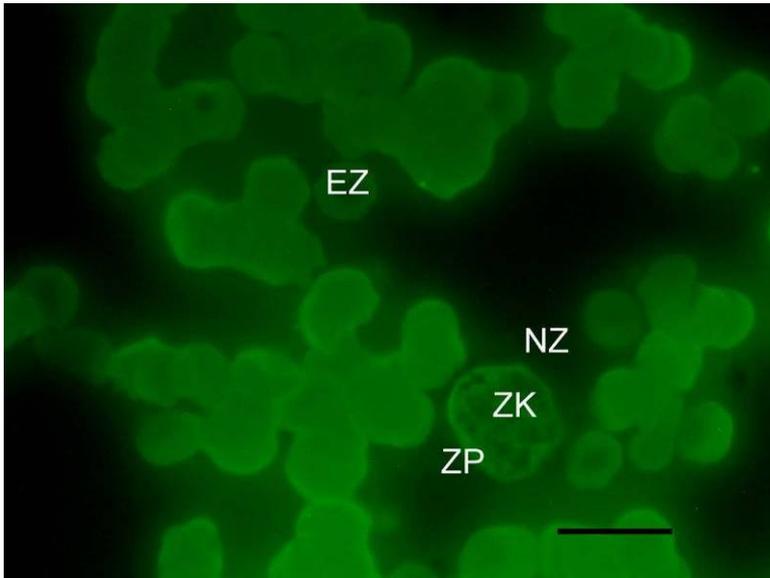


Abbildung 53: Neutrophiler Granulozyt (Trausti, DBA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt

ZK= Zellkern

ZP= Zytoplasma

EZ= Erythrozyt

Das Lektin hat leicht an das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten und an die Erythrozyten gebunden.

SB=10µm

4.4.2 Bindung von Soybean Agglutinin

Bei den Untersuchungen mit dem Agglutinin aus der Sojabohne (SBA) konnte sowohl bei den Lymphozyten als auch bei den Thrombozyten nur eine leichte Bindung festgestellt werden. Die Erythrozyten reagierten dagegen überwiegend positiv. Sowohl im Zytoplasma wie auch an der Zellmembran konnte eine schwach positive Anfärbung beobachtet werden. Die Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wiesen eine deutliche Bindung von DBA auf. Das Zytoplasma dieser beiden Granulozytenarten zeigte keine Anfärbung und auch die Zellmembran dieser Zellen war nur bei einigen wenigen Ausstrichen schwach positiv.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Auswertung der Bindung von Soybean Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der</i> <i>positiven</i> <i>Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	5	15	2	-	77,3%
- Zytoplasma	4	18	-	-	81,8%
Thrombozyten					
- Membran	4	18	-	-	81,8%
- Zytoplasma	4	18	-	-	81,8%
Lymphozyten					
-Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	17	5	-	-	22,7%
Neutrophile					
- Membran	17	5	-	-	22,7%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	14	8	-	100%
Eosinophile					
- Membran	19	3	-	-	13,6%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	12	2	8	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 29:

0 keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

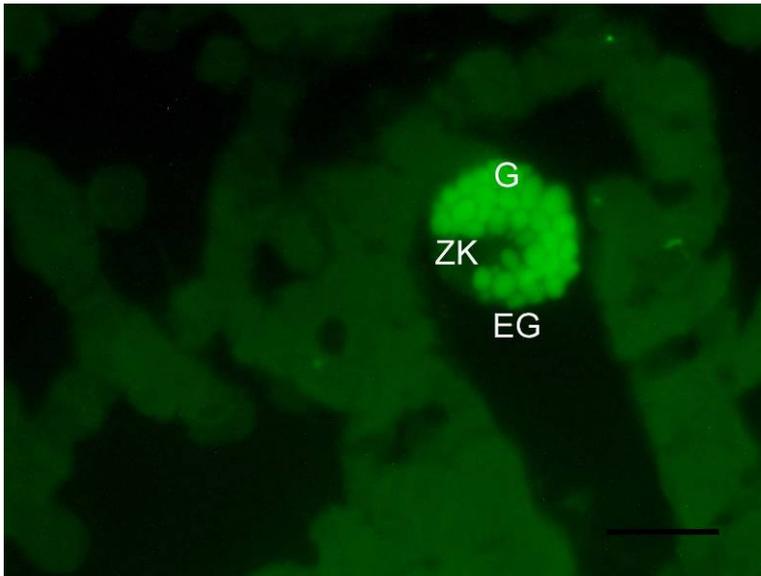


Abbildung 54: Eosinophiler Granulozyt (Gaski, SBA-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt ZK= Zellkern G= Granula
 Die Granula des eosinophilen Granulozyten wurden stark vom Lektin SBA-FITC
 gefärbt.
 SB= 10µm

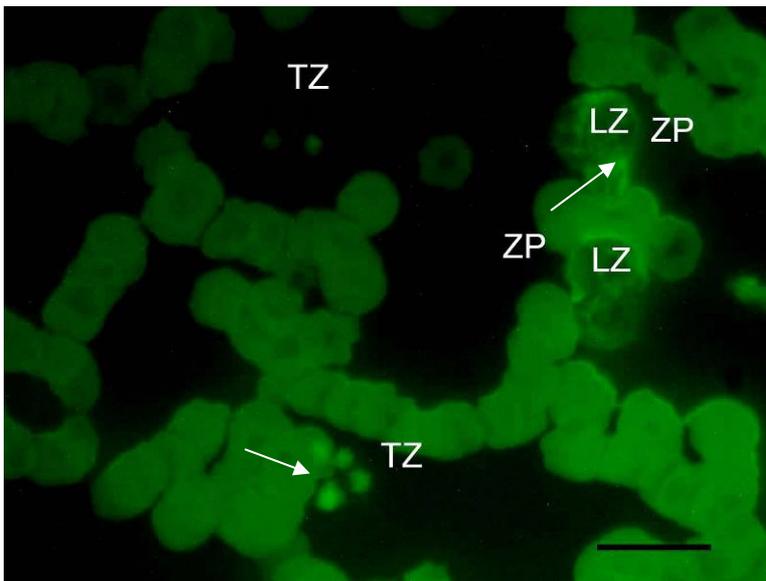


Abbildung 55: Lymphozyten und Thrombozyten (Isenburg, SBA-FITC)

LZ= Lymphozyt TZ= Thrombozyt ZP= Zytoplasma
 An die Thrombozyten und im Zytoplasma der Lymphozyten hat das Lektin leicht
 gebunden (Pfeile).
 SB= 10 µm

4.4.3 Bindung von *Sophora japonica* Agglutinin

Bei mehr als dreiviertel aller Erythrozyten war im Bereich der Zellmembran eine deutliche Anfärbung erkennbar. Eine Bindung im Zytoplasma der roten Blutkörperchen fand nicht statt. Auch die Thrombozyten färbten sich mit dem Lektin SJA-FITC nicht an. Die Membran der Lymphozyten war bei drei Tieren schwach positiv. Ansonsten fand keine Bindung statt. Auch das Zytoplasma färbte sich nicht an. Eine deutliche Bindung des Lektins erfolgte an die Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Die Zellmembran und das Zytoplasma dieser beiden Leukozytentypen waren bis auf einige wenige Ausnahmen negativ.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Auswertung der Bindung von *Sophora japonica* Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	5	12	5	-	77,3%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Thrombozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Lymphozyten					
-Membran	19	3	-	-	13,6%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Neutrophile					
- Membran	18	4	-	-	18,2%
- Zytoplasma	20	2	-	-	9,1%
- Granula	-	8	14	-	100%
Eosinophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	18	4	-	-	18,2%
- Granula	-	3	16	3	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 30:

- 0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

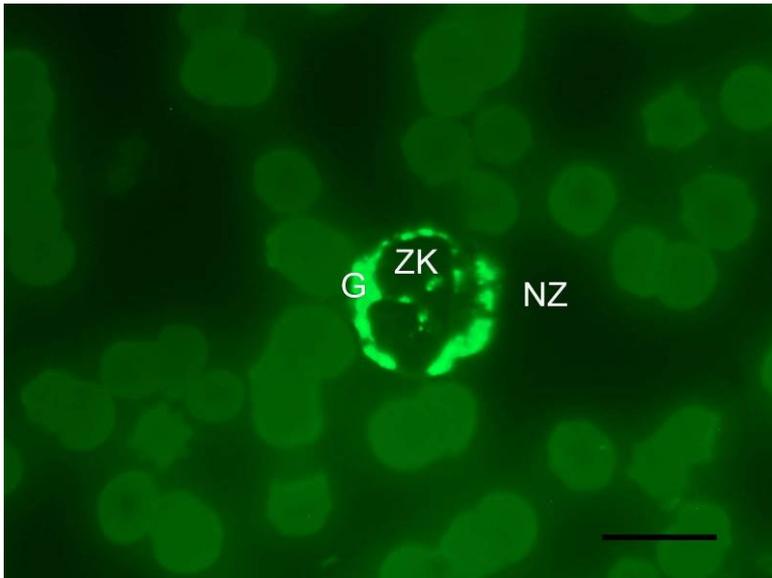


Abbildung 56: Neutrophiler Granulozyt (Skålm, SJA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt ZK= Zellkern G= Granula
 Gut zu erkennen ist die starke Bindung des Lektins SJA an die Granula des
 neutrophilen Granulozyten.
 SB= 10µm

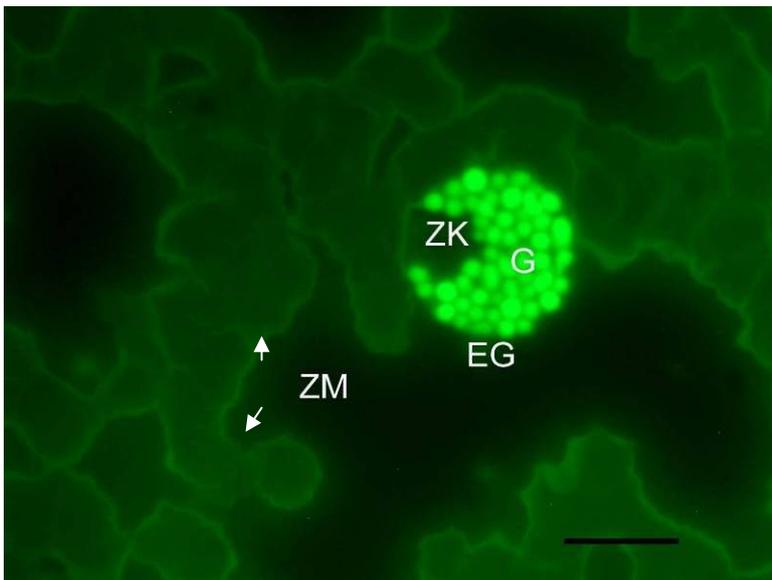


Abbildung 57: Eosinophiler Granulozyt (Frechdachs, SJA-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt ZK= Zellkern
 G= Granula ZM=Zellmembran
 Eine stark positive Reaktion mit dem Lektin ist an den Granula des eosinophilen
 Granulozyten und an der Zellmembran der Erythrozyten (Pfeile) zu sehen.
 SB= 10µm

4.5 Bindung von Fukose spezifischen Lektinen

4.5.1 Bindung von Ulex europaeus Agglutinin 1

UEA-1-FITC färbte sowohl die Zellmembran als auch das Zytoplasma der Erythrozyten deutlich an. Dagegen konnte keine Bindung an die Thrombozyten festgestellt werden. Auch das Zytoplasma der Lymphozyten wurde nicht gefärbt. Bei einigen Tieren war eine schwach positive Anfärbung der Zellmembran der Lymphozyten zu beobachten. Die Membran der neutrophilen Granulozyten wurde bei der Mehrzahl der Tier gering angefärbt, während das Zytoplasma nicht mit dem Lektin reagierte. Die Granula der neutrophilen Granulozyten zeigten unterschiedliche Reaktionen. Bei der Mehrheit der Ausstriche konnte eine, wenn auch nur gering positive, Färbung der Granula beobachtet werden. Das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten ließ sich nicht anfärben und auch die Zellmembran zeigte bis auf zwei Ausnahmen keine Bindung mit dem Lektin. Sehr unterschiedlich waren die Reaktionen der Granula der eosinophilen Granulozyten. Diese färbten sich zum Teil sowohl sehr stark an wie auch überhaupt nicht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tabelle 31: Auswertung der Bindung von *Ulex europaeus* Agglutinin-1

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	-	4	12	6	100%
- Zytoplasma	-	4	12	6	100%
Thrombozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Lymphozyten					
-Membran	13	9	-	-	40,9%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Neutrophile					
- Membran	6	16	-	-	72,7%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	4	14	4	-	81,8%
Eosinophile					
- Membran	20	2	-	-	9,1%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	7	3	8	4	68,2%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 31:

0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

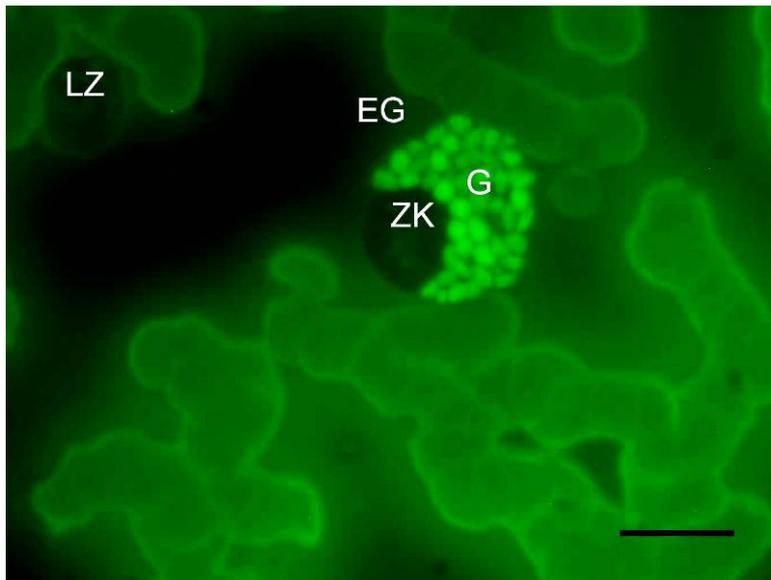


Abbildung 58: Eosinophiler Granulozyt (Skålm, UEA-1-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt LZ= Lymphozyt
 ZK= Zellkern G= Granula

Das Lektin hat vor allem die Granula des eosinophilen Granulozyten gebunden. Auch die Membran der Erythrozyten wurde vom Lektin angefärbt. Der Lymphozyt zeigt lediglich eine sehr geringe positive Reaktion an der Zellmembran.

SB= 10µm

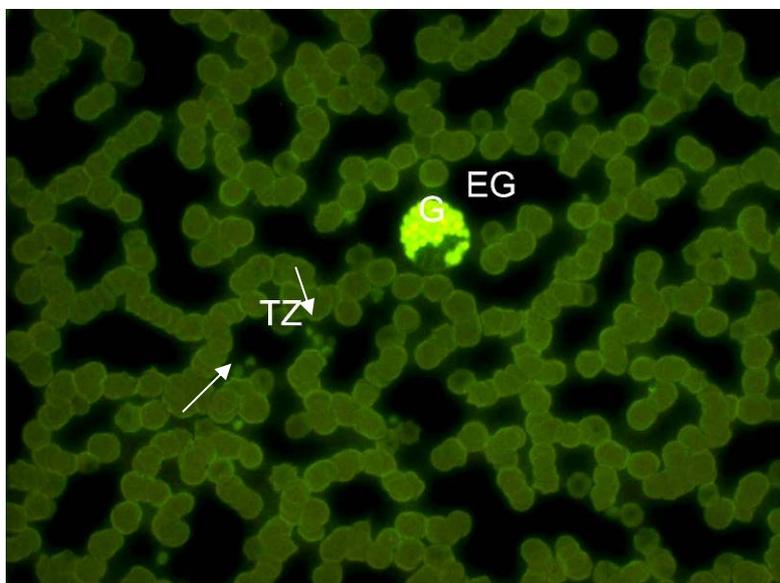


Abbildung 59: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten (Kjàni, UEA-1-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt TZ= Thrombozyten
 ZK= Zellkern G= Granula

Beachte die Bindung des Lektins an die Granula des eosinophilen Granulozyten, die Thrombozyten (Pfeile) und an die Zellmembran der Erythrozyten.

SB= 10 μ m

4.6 Bindung von Sialinsäure spezifischen Lektinen

4.6.1 Bindung von *Maackia amurensis* Agglutinin

Bei den Untersuchungen mit dem biotinylierten Lektin MAA konnte nur bei einem Tier eine Bindung des Lektins an die Erythrozytenmembran festgestellt werden. Bei allen anderen Ausstrichen zeigte sich keine positive Reaktion der Erythrozyten. Eine Bindung an die Blutplättchen war bei etwa einem Drittel der Tiere zu beobachten. Ebenfalls in 30% der Fälle reagierte die Membran der Lymphozyten schwach positiv. Eine Anfärbung des Zytoplasmas zeigte sich nur bei einem Tier. Bei den neutrophilen Granulozyten war teilweise eine schwache Bindung feststellbar. Bei drei Tieren färbte sich sowohl das Zytoplasma als auch die Zellmembran an. Bei einem Tier war auch eine Bindung an die Granula zu sehen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Auswertung der Bindung von Maackia amurensis Agglutinin

	<i>Stärke</i>	<i>der</i>	<i>positiven</i>	<i>Reaktion</i>	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	9	1	-	-	10%
- Zytoplasma	10	-	-	-	0%
Thrombozyten					
- Membran	7	3	-	-	30%
- Zytoplasma	7	3	-	-	30%
Lymphozyten					
-Membran	7	3	-	-	30%
- Zytoplasma	9	1	-	-	10%
Neutrophile					
- Membran	7	3	-	-	30%
- Zytoplasma	7	3	-	-	30%
- Granula	9	1	-	-	10%
Eosinophile					
- Membran	10	-	-	-	0%
- Zytoplasma	10	-	-	-	0%
- Granula	10	-	-	-	0%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 32:

0 keine Reaktion
 + schwache Reaktion
 ++ deutliche Reaktion
 +++ starke Reaktion

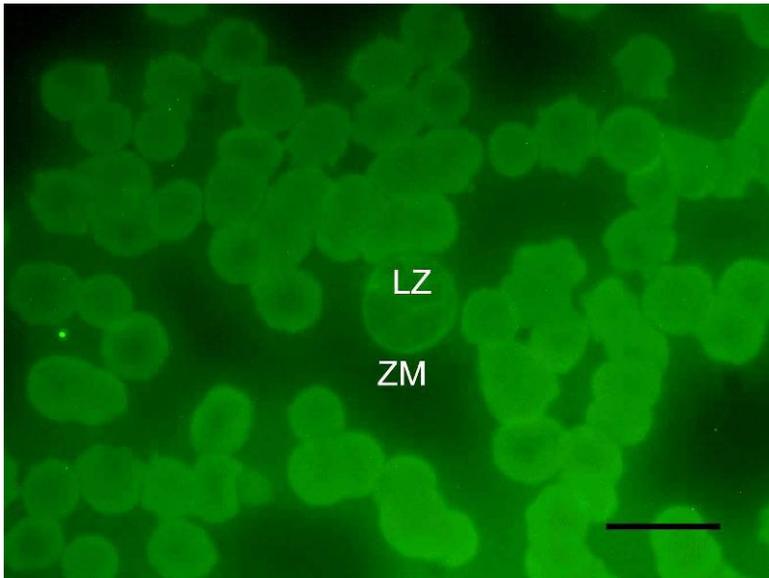


Abbildung 60: Lymphozyt (Tjörvi, MAA-FITC)

LZ= Lymphozyt ZM= Zellmembran

Es zeigt sich eine leichte Bindung des Lektins an die Zellmembran des Lymphozyten.

SB= 10µm

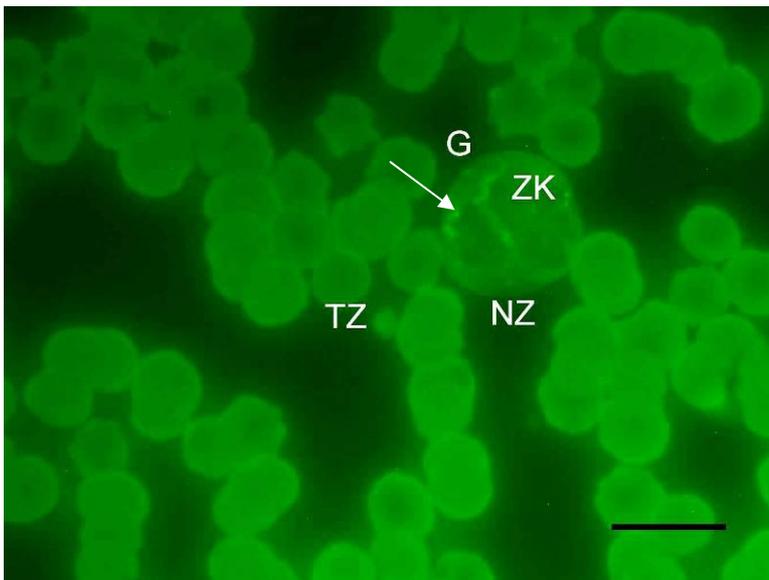


Abbildung 61: Neutrophiler Granulozyt (Trausti, MAA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt ZK= Zellkern

G= Granula TZ= Thrombozyt

Die Membran der Erythrozyten und der Thrombozyt wurden leicht vom Lektin gefärbt. Deutlicher ist die Bindung des Lektins an die Granula des neutrophilen Granulozyten (Pfeil).

SB= 10µm

4.6.2 Bindung von Sambucus nigra Agglutinin

Sowohl die Zellmembran als auch das Zytoplasma der roten Blutkörperchen färbte sich schwach bis deutlich positiv an, während die Thrombozyten immer ungefärbt blieben. Bei den Lymphozyten zeigte sich bei 40% und bei den neutrophilen Granulozyten bei 60% der Tiere eine schwache Bindung an das Zytoplasma und die Zellmembran. Bei zwei Ausstrichen konnte eine geringe positive Anfärbung der Granula der neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Eine Bindung des Lektins an die eosinophilen Granulozyten war nicht erkennbar.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Auswertung der Bindung von Sambucus nigra Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der</i> <i>positiven</i> <i>Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	-	7	3	-	100%
- Zytoplasma	-	7	3	-	100%
Thrombozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Lymphozyten					
-Membran	6	4	-	-	40%
- Zytoplasma	6	4	-	-	40%
Neutrophile					
- Membran	4	6	-	-	60%
- Zytoplasma	4	6	-	-	60%
- Granula	8	2	-	-	20%
Eosinophile					
- Membran	10	-	-	-	100%
- Zytoplasma	10	-	-	-	100%
- Granula	10	-	-	-	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 33:

0 keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

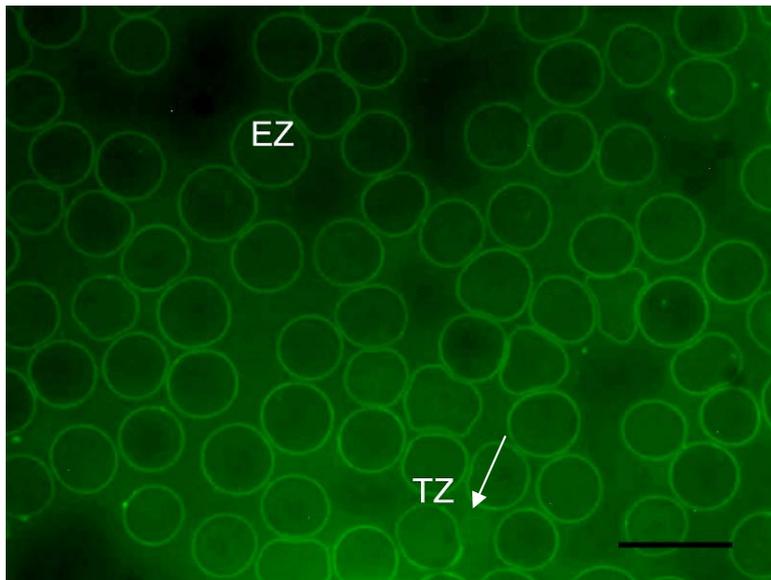


Abbildung 62: Erythrozyten und Thrombozyt (Katla, SNA-FITC)

EZ= Erythrozyt TZ= Thrombozyt

Sehr gut zu sehen ist die starke Bindung an die Zellmembran der Erythrozyten.
Der Thrombozyt (Pfeil) hat das Lektin nicht gebunden.

SB= 10µm

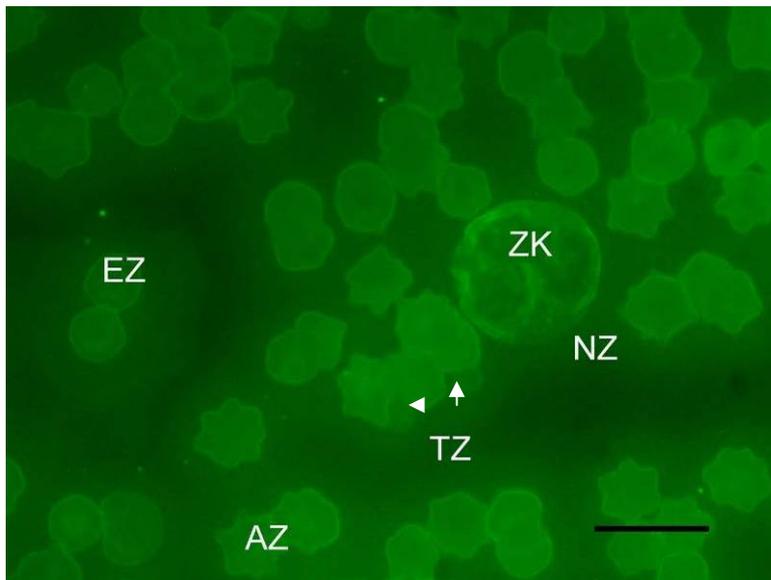


Abbildung 63: Neutrophiler Granulozyt (Kjàni, SNA-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt EZ= Erythrozyt TZ= Thrombozyt

AK= Akanthozyt ZK= Zellkern

Das Lektin SNA hat im Zytoplasma und an den Granula des neutrophilen Granulozyten gebunden. Eine leichte Bindung ist auch an der Zellmembran der Erythrozyten zu erkennen. Die Thrombozyten haben das Lektin nicht gebunden (Pfeile).

SB= 10µm

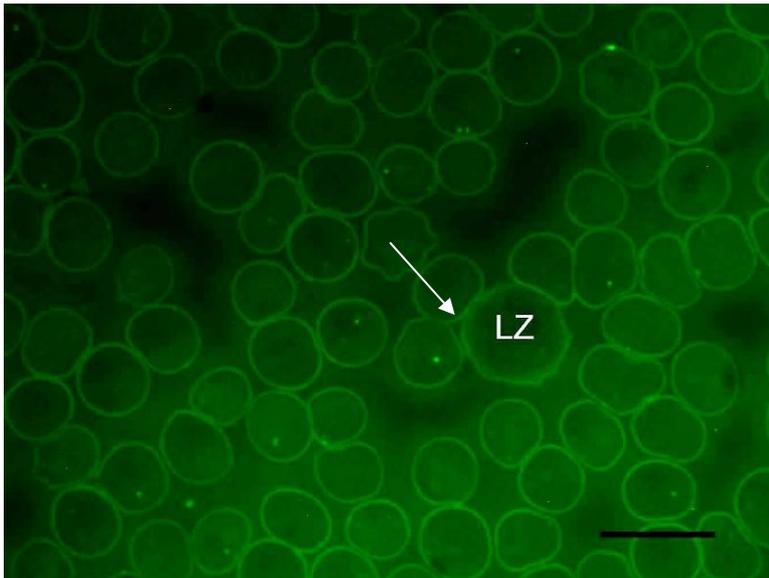


Abbildung 64: Lymphozyt (Katla, SNA-FITC)

LZ= Lymphozyt

Gut stellt sich die Bindung des Lektins SNA-FITC an die Zellmembran des Lymphozyten (Pfeil) und der Erythrozyten dar.

SB= 10µm

4.7 Bindung komplexer Kohlenhydratstrukturen spezifischer Lektine

4.7.1 Bindung von Phaseolus vulgaris E Agglutinin

Bei ca. der Hälfte der Erythrozyten konnte eine schwache Bindung des Lektins PHA-E an die Zellmembran festgestellt werden. Das Zytoplasma der roten Blutkörperchen färbte sich nicht an. Auch Thrombozyten zeigten keine Anfärbung. Bei einigen Lymphozyten konnte eine geringe Färbung von Membran und Zytoplasma durch das Lektin beobachtet werden. Bei den neutrophilen Granulozyten wurde die Zellmembran knapp der Hälfte der Tiere leicht gefärbt, wohingegen das Zytoplasma ungefärbt blieb. Die Granula der neutrophilen Granulozyten waren bei einem Großteil der Ausstriche deutlich positiv, nur einige wenige färbten sich nicht an. Auch die verschiedenen zellulären Komponenten der eosinophilen Granulozyten reagierten nicht einheitlich. Die Zellmembran färbte sich bei zahlreichen Tieren leicht positiv. Das Zytoplasma wiederum zeigte keinerlei Bindung des Lektins. Auch bei den Granula fand bei einem Teil der Tiere eine Bindung statt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 zusammengefasst.

Tabelle 34: Auswertung der Bindung von Phaseolus vulgaris E

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	12	7	3	-	45,5%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Thrombozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
Lymphozyten					
-Membran	18	4	-	-	18,2%
- Zytoplasma	18	4	-	-	18,2%
Neutrophile					
- Membran	12	7	3	-	45,5%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	5	7	8	2	77,3%
Eosinophile					
- Membran	8	14	-	-	63,6%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	7	5	10	-	68,2%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 34:

0 keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

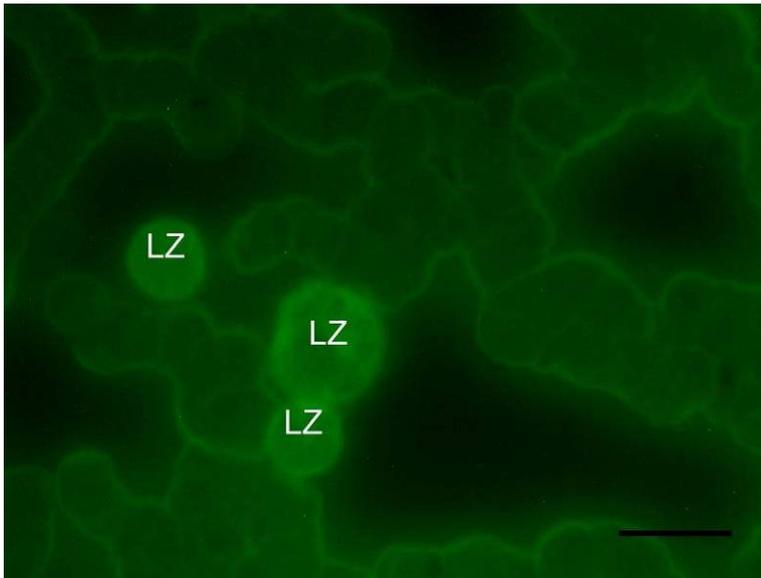


Abbildung 65: Lymphozyten (Gàski, PHA-E-FITC)

LZ= Lymphozyten

Gut zu sehen ist die Bindung des Lektins an die Zellmembran der Erythrozyten sowie im Zytoplasma und an die Zellmembran der Lymphozyten.

SB= 10µm

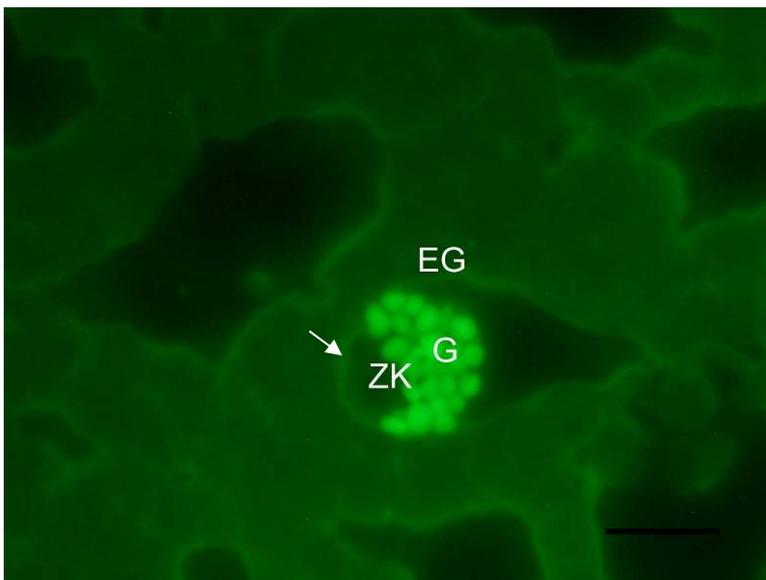


Abbildung 66: Eosinophiler Granulozyt (Stigandi, PHA-E-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt ZK= Zellkern G= Granula

Die Granula des eosinophilen Granulozyten wurden stark vom Lektin PHA-E-FITC gefärbt. Eine leichte Färbung ist auch an der Zellmembran des Granulozyten feststellbar (Pfeil).

SB= 10µm

4.7.2 Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin

Nach Inkubation mit dem Lektin PHA-L färbte sich bei über 80% der Tiere die Zellmembran der Erythrozyten deutlich an. Das Zytoplasma zeigte nur bei einigen Ausstrichen eine schwache Bindung. Bei den Thrombozyten war keine Anfärbung zu beobachten. Eine Bindung war dagegen bei knapp der Hälfte der Tiere an der Zellmembran der Lymphozyten zu beobachten. Das Zytoplasma der Lymphozyten war nur bei zwei Tieren schwach angefärbt. Die Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten banden bis auf eine Ausnahme PHA-L. Auch hinsichtlich der Bindung an die Zellmembran reagierten diese beiden Granulozytenarten gleich. Jeweils bei fast der Hälfte der Tiere war eine schwache Bindung feststellbar. Das Zytoplasma zeigte keine Anfärbung mit dem Lektin.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 zusammengefasst.

Tabelle 35: Auswertung der Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin

	<i>Stärke</i> 0	<i>der</i> +	<i>positiven</i> ++	<i>Reaktion</i> +++	<i>Anzahl der positiven Zellen (%)</i>
Erythrozyten					
- Membran	4	12	6	-	81,8%
- Zytoplasma	19	3	-	-	13,6%
Thrombozyten					
- Membran	12	10	-	-	45,5%
- Zytoplasma	12	10	-	-	45,5%
Lymphozyten					
-Membran	13	7	2	-	40,9%
- Zytoplasma	20	2	-	-	9,1%
Neutrophile					
- Membran	12	10	-	-	45,5%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	1	9	12	-	95,5%
Eosinophile					
- Membran	12	10	-	-	45,5%
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	9	10	4	100%
Basophile					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-
Monozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-

Legende zur Tabelle 35:

0 keine Reaktion
+ schwache Reaktion
++ deutliche Reaktion
+++ starke Reaktion

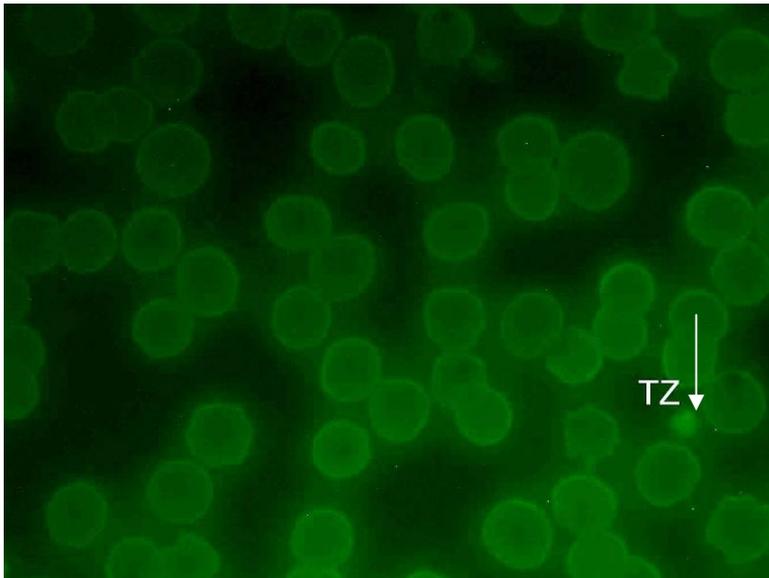


Abbildung 67: Erythrozyten und Thrombozyt (Trausti, PHA-L-FITC)

TZ= Thrombozyt

Das Lektin PHA-L-FITC hat sich an die Zellmembran der roten Blutkörperchen und an die Thrombozyten gebunden (Pfeil).

SB= 10µm

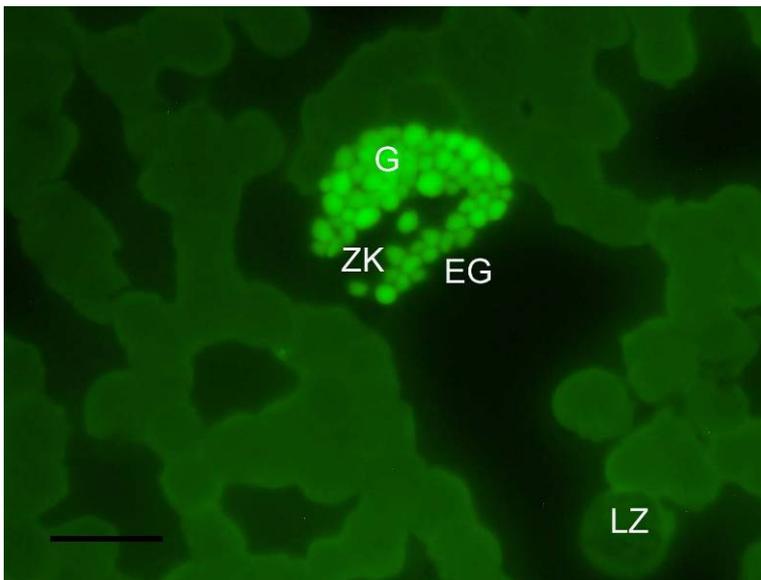


Abbildung 68: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt (Nökkvi, PHA-L-FITC)

EG= Eosinophiler Granulozyt

LZ= Lymphozyt

G= Granula

ZK= Zellkern

Beachte die starke positive Reaktion des Lektins mit den Granula des eosinophilen Granulozyten. Auch an der Membran des Lymphozyten ist das Lektin gebunden.

SB= 10µm

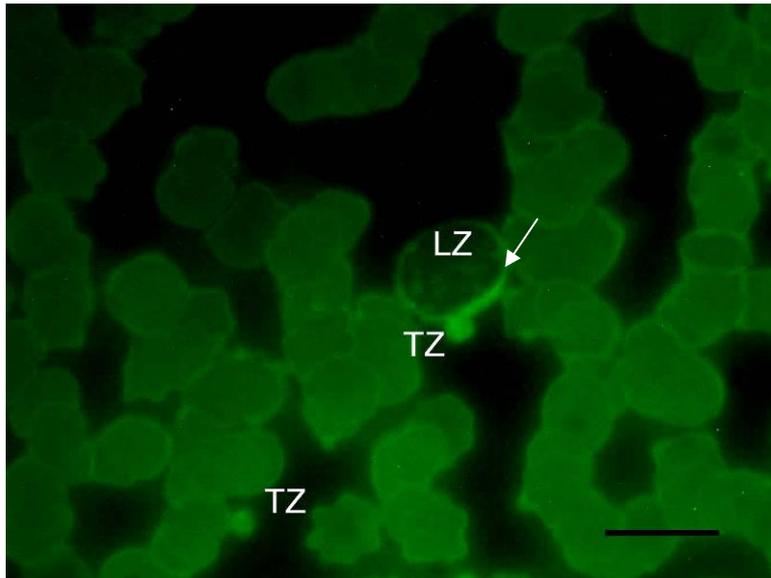


Abbildung 69: Lymphozyt und Thrombozyten (Stigandi, PHA-L-FITC)

LZ= Lymphozyt TZ= Thrombozyten

Sehr gut ist die Bindung des Lektins an die Zellmembran des Lymphozyten zu erkennen (Pfeil). Auch die zwei Thrombozyten im Bild haben das Lektin gebunden.

SB= 10 μ m

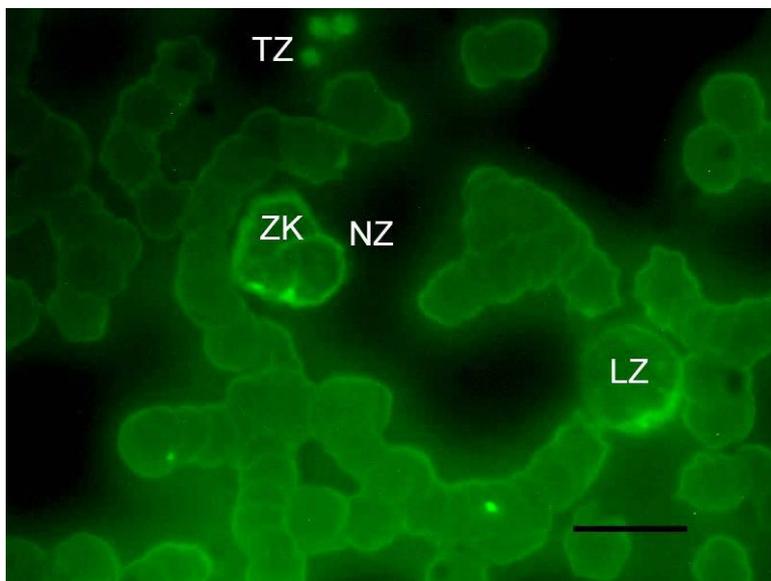


Abbildung 70: Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt und Thrombozyten
(Brellir, PHA-L-FITC)

NZ= Neutrophiler Granulozyt LZ= Lymphozyt

TZ= Thrombozyt ZK= Zellkern

Sowohl die Zellmembran und die Granula des neutrophilen Granulozyten als auch die Membran des Lymphozyten und die Thrombozyten zeigen eine deutliche Bindung des Lektins.

SB= 10 μ m

4.8 Ergebnisse der kompetitiven Zuckerhemmung

Bei den deutlich positiv reagierenden Lektinen WGA, WGAs, ConA, LCA, PSA, GSL und PHA-E wurde untersucht, ob sich deren Bindung durch die Zugabe des jeweils spezifischen Hemmzuckers verhindern lässt. Bei allen dafür verwendeten Ausstrichen unterblieb die Bindung des Lektins und es konnte somit eine spezifische Hemmung der Bindung durch Zugabe des jeweiligen Zuckers gezeigt werden.

5. Immunzytochemische Untersuchungen

Von den für T-Lymphozyten spezifischen monoklonalen Antikörpern mAk 4-13, mAk 4-58 und mAk 5-50 zeigte keiner eine positive Reaktion. Es konnte keine Bindung des jeweiligen Antikörpers an eine Zelle festgestellt werden.

Als für B-Lymphozyten spezifische Antikörper wurden mAk 1-19, mAk 2-52, mAk 4-36, mAk 4-55 und mAk 6-39 verwendet. Eine Reaktion mit den Blutzellen konnte nur bei den Antikörpern 1-19 und 2-52 beobachtet werden. Bei den anderen Antikörpern konnte keinerlei Färbung festgestellt werden. Der Antikörper 1-19 reagierte neben den Lymphozyten auch mit den neutrophilen Granulozyten und zum Teil auch mit den Erythrozyten. Der Antikörper 2-52 zeigte eine deutliche Färbung der Zellmembran der Lymphozyten. Auch reagierte er mit den Erythrozyten und den neutrophilen Granulozyten. An den Thrombozyten konnte keine Anfärbung festgestellt werden.

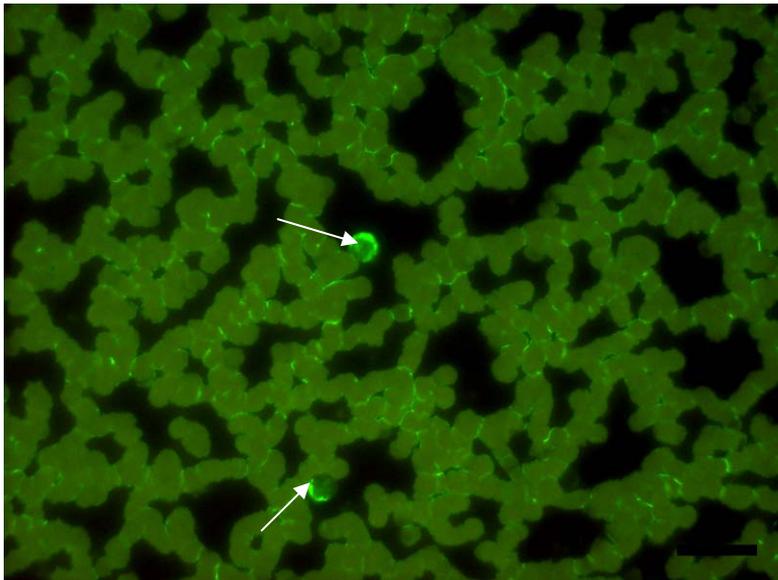


Abbildung 71: B-Lymphozyten, Antikörper 1-19, Gina

SB= 10 μ m

Der Antikörper 1-19-FITC hat deutlich an die Lymphozyten (Pfeile) gebunden, die somit als B-Lymphozyten charakterisiert werden können. Ebenso hat der Antikörper auch an die Erythrozytenmembran gebunden.

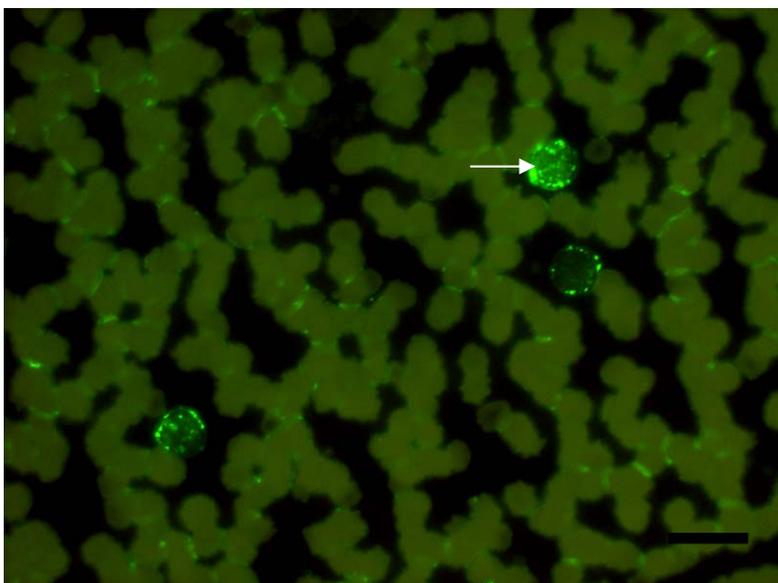


Abbildung 72: Neutrophile Granulozyten, Antikörper 1-19, Felix

SB= 10 μ m

Der Antikörper 1-19-FITC hat die neutrophilen Granulozyten vor allem im Bereich ihres Zytoplasmas und der Granula gebunden (Pfeil).

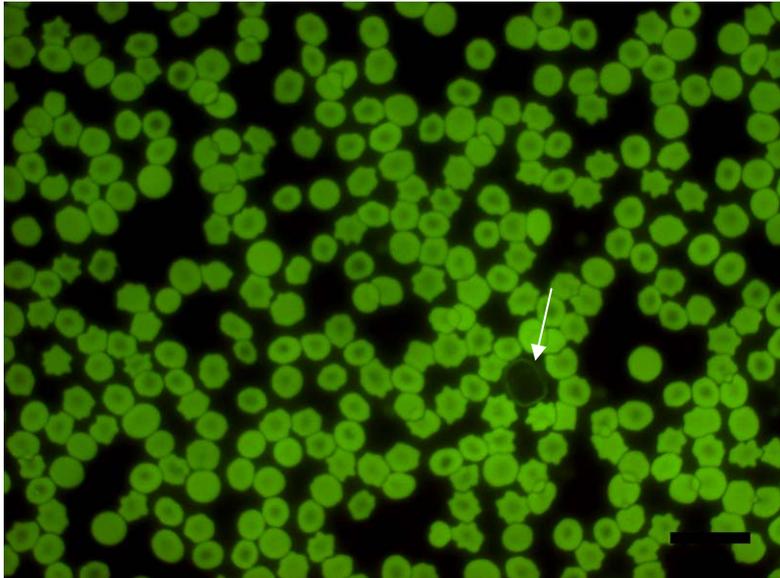


Abbildung 73: B-Lymphozyt, Antikörper 2-52, Karri

SB= 10 μm

Der Antikörper 2-52-FITC hat den Lymphozyten (Pfeil) im Bild schwach gefärbt. Stärker ist die Reaktion mit den Erythrozyten.

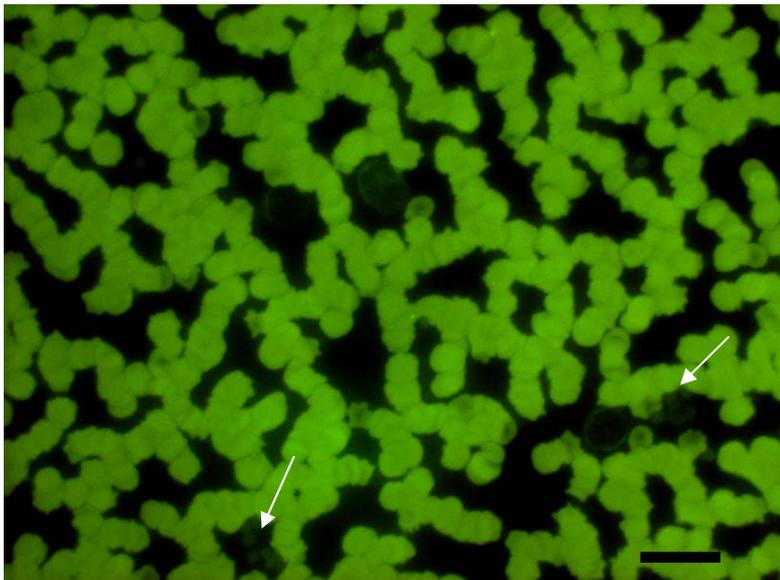


Abbildung 74: B-Lymphozyt, Antikörper 2-52, Karri

SB= 10 μm

Die Reaktion der B-Lymphozyten mit dem Antikörper 2-52 ist schwach zu erkennen. Die Thrombozyten (Pfeile) scheinen nicht vom Antikörper gefärbt worden zu sein. Sehr gut erkennbar ist die deutliche Reaktion mit den Erythrozyten.

V Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Blut der Pferde vor allem in Hinblick auf seine Morphologie und Histochemie näher zu untersuchen. Mit Hilfe von Licht- und Elektronenmikroskop konnte die Morphologie der einzelnen Blutzelltypen im Detail differenziert werden. Durch die Anwendung verschiedener pflanzlicher Lektine wurden die Zuckerstrukturen der equinen Blutzellen näher charakterisiert. Des Weiteren wurden monoklonale Antikörper zur Differenzierung von B- und T-Lymphozyten eingesetzt.

1. Blutbilder

Insgesamt wurde von 42 Pferden ein kleines Blutbild erstellt. Darunter waren 8 Hengste, 17 Stuten und 17 Wallache. In Bezug auf ihre Rasse verteilten sich die 42 Tier folgendermaßen: 26 Islandpferde, 6 Warmblüter, 2 Vollblüter und jeweils ein Vertreter der Rassen Traber, Trakehner, Connemara, PRE (Pura raza espanol), Pony, Deutsches Reitpony, Paint Horse und New Forrest.

Auffallend war die erhöhte Leukozytenzahl bei fast allen jungen gesunden Tieren. Diese Beobachtungen stimmen mit denen zahlreicher Autoren überein (Rossdale et al., 1982; Rose et al, 1983; Jain, 1986). Eine physiologische Leukozytose bei Pferden wird in erster Linie verursacht durch ansteigende Werte von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten (Rossdale et al., 1982; Rose et al., 1983). Bei Angst, Aufregung oder Anstrengung steigen Blutdruck und Herzfrequenz an. Ebenso kommt es zur Kontraktion der Milz. All dies erzeugt ansteigende Leukozytenwerte. Adrenalin scheint hierbei ein wichtiger Mediator zu sein (Snow et al., 1983). Vor allem bei jungen gesunden Pferden sind Leukozytenwerte von bis zu 26000/ μ L und Lymphozytenwerte von bis zu 14000/ μ L als physiologisch anzusehen (Jain, 1986). Schon minimale Manipulationen bei der Punktion der Vene können bei sichtbar nervösen und gestressten Pferden innerhalb von Sekunden zu stark ansteigenden Leukozytenwerten führen (Steward et al., 1977). Der ansteigende Blutdruck verursacht eine Verlagerung der neutrophilen Granulozyten vom marginalen Pool in den zirkulierenden Pool, und so steigende Leukozytenwerte (Revington, 1983). Diese als physiologisch anzusehende Leukozytose ist ein vorübergehendes Phänomen. Die Normalwerte werden 20 bis

30 Minuten nach Beruhigung erreicht (Rossdale, 1982).

Die für vollblütige Pferde oft beschriebenen hohen Hämatokritwerte (Jain et al., 1986) konnten bei den in dieser Arbeit untersuchten Vertretern dieser Art (zwei Vollblüter, ein Trakehner) nicht beobachtet werden.

2. Lichtmikroskopie

Um die Ausstriche unter dem Lichtmikroskop betrachten und differenzieren zu können, wurden diese zuvor mit vier verschiedenen Färbungen behandelt. Hierbei kamen die Diff-Quick-Färbung, die Färbungen nach Giemsa und May-Grünwald, sowie die panoptische Färbung nach Pappenheim zum Einsatz. Gemeinsam ist diesen Färbungen das Vorhandensein sowohl eines sauren als auch eines basischen Bestandteils. Methyleneblau dient dabei meist als basische und Eosin als saure Komponente. In wässriger Lösung bildet der basische Stoff Ionen mit positiver Ladung und bindet sich somit an Zellteile mit negativer Ladung. Umgekehrt verhält es sich beim sauren Eosin. Dieses bildet Ionen mit negativer Ladung und bindet somit an Zellteile mit positiver Ladung.

Die equinen Erythrozyten waren durchschnittlich 5-6 µm im Durchmesser und von diskoider, bikonkaver Form (Lassen und Swardson, 1995). Zum Teil unterschieden sich die Erythrozyten aber auch erheblich in ihrer Größe. Dieses Phänomen wird als Anisozytose bezeichnet (Lording, 2008). Auch die für Pferde typische Geldrollenbildung zeigte sich häufig (Jain, 1993). Sie kommt auch bei Schweinen, Hunden und Katzen vor, ist aber kaum bei Rindern zu beobachten. Durch diese Formation wird es den Erythrozyten ermöglicht auch durch kleinste Kapillaren zu kommen (Banks, 1986). Die als Akanthozyten bezeichneten stechapelförmigen Erythrozyten entstehen durch zu langsames Trocknen der Ausstriche (Hees und Tschudi, 1990; Kraft et al., 1997). Auch dieses Phänomen wurde oft beobachtet. Retikulozyten konnten bei den Pferden im Blutausstrich nicht gefunden werden, da die Erythrozyten erst nach vollständiger Reifung aus dem Knochenmark ins Blut entlassen werden (Lassen und Swardson, 1995).

Thrombozyten waren vor allem in der May-Grünwald-Färbung gut erkennbar. Dort stellten sie sich als bläulich gefärbte, 1-3 µm große runde bis ovale Gebilde dar. Die ultrastrukturell beschriebenen Regionen Hyalomer und Granulomer

konnte ich in meinen Ausstrichen unter dem Lichtmikroskop nicht differenzieren. Das dunklere Granulomer enthält Zellorganellen und Granula, das hellere Hyalomer Zytoplasma und Mikrotubuli (Banks, 1986). Unter den Haussäugetieren besitzen die Pferde zusammen mit den Schafen und Rindern die kleinsten Thrombozyten, die Katzen die größten. Pferde haben die geringste Anzahl an Blutplättchen, Rinder die höchste (Jain, 1993).

Die Lymphozyten des Pferdes stellten sich in meinen Ausstrichen als relative große, runde Zellen mit einem Durchmesser von 8-13 μm dar. Der runde, chromatinreiche Kern füllt die Zelle fast vollständig aus, so dass nur wenig Zytoplasma zu sehen ist. Dies deckt sich mit den Aussagen von Carrick und Begg (Carrick und Begg, 2008). Eine eindeutige Unterteilung in große Lymphozyten mit einem Durchmesser von 11-18 μm und kleine Lymphozyten mit einem Durchmesser von 4-10 μm (Hees und Tschudi, 1990) konnte ich nicht feststellen. Zusammen mit den Monozyten werden die Lymphozyten häufig in die Gruppe der Agranulozyten eingeteilt (Kolb, 1991), doch besitzen auch sie teilweise feine Azurgranula im Zytoplasma (Hees und Tschudi, 1990). Diese waren in meinen Untersuchungen kaum zu erkennen. Auch die je nach Funktionszustand mehr oder weniger stark ausgeprägten kurzen Fortsätze an der Oberfläche der Zelle (Hees und Tschudi, 1990) waren unter dem Lichtmikroskop nur sehr schwer zu identifizieren. Die Unterteilung in B- und T-Lymphozyten ist, wie bereits erwähnt nur mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden möglich.

Unter dem Lichtmikroskop waren sowohl stabkernige als auch segmentierte neutrophile Granulozyten zu sehen. Da die neutrophilen Granulozyten beim gesunden Pferd 50-70% der gesamten Leukozyten ausmachen, waren sie leicht zu finden und gut zu identifizieren (Carrick und Begg, 2008). Stabkernige neutrophile Granulozyten werden auch als Jugendform bezeichnet und kommen bis zu 5% im peripheren Blut vor. Die deutlich mehrfach gelappte Form des Zellkerns der segmentierten neutrophilen Granulozyten ist das Ergebnis der Chromatinverdichtung und stellt somit den Grad der Reifung der Zelle dar (Kramer, 2000; Smith, 2000). Vor allem in der Diff Quick-Färbung waren die neutrophilen Granulozyten gut erkennbar. Dort stellten sie sich als 9-12 μm große runde Zellen dar, mit blau-lila gefärbtem Zytoplasma und dunkelblauem Zellkern. Die einzelnen Segmente des Zellkerns waren durch Chromatinbrücken, den

sogenannten Filamenten verbunden. Manchmal scheint die Kernmembran der neutrophilen Granulozyten der Pferde sehr viel unregelmäßiger zu sein als bei anderen Tierarten. Dies verleiht ihnen eine ungewöhnlich multilobuläre Struktur, darf aber nicht als Hypersegmentation missverstanden werden (Lassen und Swardson, 1995). Die azurophilen Granula waren unter dem Lichtmikroskop nur zu erahnen. Studien von Bertram und Coignoul (1982) zeigten, dass die Temperatur, bei der die neutrophilen Granulozyten isoliert werden, entscheidend für den Grad der Degranulation ist. Bei einer Isolierung bei 4°C zeigte sich eine Minderung der Degranulation um 3,5%, bei 22°C sogar um 21 % (Bertram und Coignoul, 1982).

Die eosinophilen Granulozyten sind beim Pferd besonders charakteristisch ausgebildet. Vor allem in den Färbungen Giemsa und Diff Quick waren die typischen, großen, pink gefärbten Granula der reifen eosinophilen Granulozyten gut zu sehen. Unreife Eosinophile sind im Blutausschrieb praktisch nie anzutreffen (Carrick und Begg, 2008). Ihre Granula erreichten Durchmesser von 2-4 µm, was mit den Aussagen in der Literatur übereinstimmt (Carrick und Begg, 2008). Da sich die Kernmembran der Form der Granula anpasst, erschienen diese Zellen in der Form einer Maulbeere (Hees und Tschudi, 1990). Außer den Granula waren auch Teile des Zellkerns zu sehen. Dass der Zellkern auch bei den eosinophilen Granulozyten wenig lobuliert ist, wurde von den großen Granula weitgehend maskiert (Kramer, 2005). Diese großen runden, meist orange bis pink gefärbten Granula sind einzigartig und charakteristisch für die Tierart Pferd. Bei den Wiederkäuern sind die Granula recht klein, die Katze besitzt zahlreiche stäbchenförmige Granula und die der Hunde variieren stark in Zahl und Größe (Young, 2005). Beim Greyhound beispielsweise befinden sich neben den wenig prominenten Granula extensive Vakuolen im Zytoplasma (Young, 2005).

Dass die basophilen Granulozyten nur zu 0-1% im Blut vorkommen, mag einer der Gründe gewesen sein, warum diese unter dem Lichtmikroskop nur sehr schwer zu identifizieren waren (Kramer, 2005). Dieser Zellart eigen sind die zahlreichen kleinen, basophilen Granula, welche auch hier mitunter den segmentierten Kern maskierten (Kramer, 2005).

Die größten Zellen im Blutausschrieb waren die Monozyten. Diese großen, runden Zellen erreichten Durchmesser von 13-15µm. Sehr charakteristisch für diesen

Zelltyp sind die zahlreichen Vakuolen, welche im blaßblauen Zytoplasma zu finden waren (Latimer, 1995). Der bläulich bis dunkellila gefärbte Zellkern ist meist hufeisenförmig, was mit den Aussagen der Literatur übereinstimmt (Bienzle, 2000). Auffallend ist auch die dunkelblau gefärbte Zellmembran, welche zum Teil deutliche Ausstülpungen aufwies. Dies ist als Zeichen für die Aktivität der jeweiligen Zelle anzusehen (Hees und Tschudi, 1990).

3. Elektronenmikroskopie

Die Untersuchung des Blutes mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden ist zu einem immer wichtigeren Bestandteil der Diagnostik geworden. Unter dem Elektronenmikroskop ist eine Differenzierung der einzelnen Blutzellen im Hinblick darauf möglich, ob das Tier, von dem das Blut entnommen wurde, gesund ist oder sich unter dem Einfluss einer Krankheit befindet (Sonoda und Kobayashi, 1966).

Elektronenmikroskopisch betrachtet stellen sich die Erythrozyten als Zellen von unterschiedlicher Größe und Gestalt mit homogenem Inhalt dar, welche keinerlei Zellorganellen besitzen. Dass sich diese Zellen in unterschiedlicher Größe präsentieren, hängt mit ihrer bikonkaven Scheibenform zusammen, die ihnen zu einer hohen Verformbarkeit verhilft (Banks, 1986). Durch ihr Membranskelett, welches das Strukturprotein Spektrin enthält, behalten sie dennoch eine typische Form (Hees und Tschudi, 1990). Bis zu 95% der Trockensubstanz der Erythrozyten besteht aus Hämoglobin (Liebich, 2004). Das Hämoglobin stellt sich unter dem Elektronenmikroskop als homogene Masse dar und ist auf Grund seines hohen Eisengehalts elektronendicht (Kolb, 1991). Das Hämoglobin wird im Golgi-Apparat und endoplasmatischen Retikulum der Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen gebildet. Bei der Differenzierung der Erythrozyten werden sämtliche Zellorganellen und der Zellkern abgestoßen (Kolb, 1991).

Die Blutplättchen lagen häufig in kleineren Gruppen angeordnet. Sie weisen eine stäbchenförmige oder rundliche Gestalt auf und besitzen eine Größe von 1-1,5 µm. Im Zytoplasma waren zahlreiche homogene Granula sichtbar. Diese sogenannten alpha-Granula waren etwas dunkler als das umgebende Zytoplasma. Außerdem waren die „Dense Bodies“ zu finden, etwas elektronendichtere Granula

mit extrem elektronendichtem Kern. Des Weiteren enthalten die Thrombozyten Glykogengranula und vereinzelte Vakuolen.

Ultrastrukturell können die neutrophilen von den basophilen und eosinophilen Granulozyten durch das Fehlen einer kristallinen Struktur innerhalb ihrer Granula unterschieden werden (Steffens, 2000). Auch unter dem Elektronenmikroskop ließ sich zwischen stäbchenförmigen und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten unterscheiden. Der Zellkern dieser 9-12 µm großen neutrophilen Granulozyten war in einen helleren Euchromatinbereich und einen dunkleren Heterochromatinbereich geteilt. Im gesunden Tier dominiert das dunkle Heterochromatin den Zellkern. Im Zentrum des Kerns erscheinen kleinere Euchromatinbereiche (Steffens, 2000). Bei verschiedenen Infektionen, wie zum Beispiel der Leptospirose, wurde über eine ansteigende Euchromatisierung des Zellkerns berichtet (Avdeeva et al., 1997), die mit der Aktivierung der Zelle in Zusammenhang stehen dürfte. Ein Nukleolus ist oft nicht deutlich erkennbar (Steffens, 2000). In Abhängigkeit von der Schnittform können häufig mehrere, nicht selten mehr als vier, Kernsegmente in der Elektronenmikroskopie beobachtet werden. Es sind aber auch Zellen ohne angeschnittene Kernsegmente, die nur Zytoplasma aufweisen, zu beobachten (Sonoda und Kobayashi, 1966). Im Zytoplasma meiner Präparate fanden sich die typischen Zellorganellen, wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum und Vakuolen, sowie primäre, längliche Granula und spezifische, runde Granula. Die dünnen und länglichen Mitochondrien sind in den neutrophilen Granulozyten nur relativ selten anzutreffen (Steffens, 2000). Golgi-Apparat und andere Organellen sind gleichfalls oft nur schwach ausgebildet und hauptsächlich in unreifen Zellen besser zu sehen (Steffens, 2000). Watanabe beschrieb, dass die Mitochondrien von humanen neutrophilen Granulozyten meist weniger als 0,15 µm groß und damit kleiner als die spezifischen Granula sind und zahlreich vorkommen (Watanabe, 1964). Equine Mitochondrien dagegen sind oft ebenso groß oder größer als die spezifischen Granula (Sonoda und Kobayashi, 1966). Auch wenn der Golgi-Apparat im EM-Schnitt nicht immer getroffen ist, dürfte er doch regelmäßig vorhanden sein. Da sich diese Zellorganelle häufig im Zentrum der Zelle befindet, wird sie je nach Schnittführung durch das Präparat nicht immer erfasst (Sonoda und Kobayashi, 1966). Die im humanen Golgi-Apparat gut zu

sehenden Vakuolen, Lamellen und Granula, welche eine eindeutige Identifizierung dieser Organelle ermöglichen, sind im mäßig entwickelten Golgi-Apparat der neutrophilen Granulozyten des Pferdes nicht vorhanden (Sonoda und Kobayashi, 1966). Die runden oder ovalen Vakuolen, welche beim Pferd in unterschiedlicher Größe im Zytoplasma verstreut zu finden sind, können zum Teil dem endoplasmatischen Retikulum zugeordnet werden (Sonoda und Kobayashi, 1966). Bessis und Thiery stellten 1961 für die beim Menschen zu findenden Vakuolen fünf verschiedene Möglichkeiten bezüglich ihrer Herkunft bzw. Entstehung auf. Sie bezeichneten diese Vakuolen zum einen als Ergebnis der Pinozytose, zum anderen als Teil des endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi-Apparat. Möglicherweise können sie aber auch „Überbleibsel“ bei der Entwicklung der Granula oder Areale darstellen, wo ursprünglich Glykogen gelagert war, welches bei der Fixation oder Einbettung heraus gelöst wurde (Bessis und Thiery, 1961). Die größeren azurophilen Granula sind im Durchmesser ca. 0,5 µm groß und teilweise weniger elektronendicht als die spezifischen Granula (Steffens, 2000). Bei Granulozyten, die Material phagozytiert haben, kann man manchmal die Fusion der primären Granula mit phagozytierenden Vakuolen beobachten (Steffens, 2000). Die spezifischen Granula sind zahlreicher anzutreffen und sind in etwa halb so groß wie die primären Granula (Steffens, 2000). Auf der Zellmembran der neutrophilen Granulozyten waren zum Teil Membranausstülpungen, die sogenannten Pseudopodien, zu erkennen. Während ihrer Wanderung vom Blutkreislauf in den extravaskulären Raum erlangen die neutrophilen Granulozyten ihre Phagozytosefähigkeit und werden dabei etwas länglicher mit Pseudopodien an der Zellmembran (Steffens, 2000).

Bei den Säugetieren stellen die eosinophilen Granulozyten die am zweithäufigsten anzutreffenden Granulozytenart dar (Steffens, 2000). Trotzdem waren sie in meinen Präparaten unter dem Elektronenmikroskop selten identifizierbar. Vielleicht mag das daran gelegen haben, dass diese Zellen als zerbrechlich gelten und während des Handlings und den Vorbereitungen für die Elektronenmikroskopie leicht kaputt gehen können (Steffens, 2000). Auf Grund ihrer besonderen Granula lassen sich diese Zellen auch ultrastrukturell leicht identifizieren. Sie sind mit einem Durchmesser von 10-15 µm die größten Zellen

unter den Granulozyten. Die Zellmembran weist gelegentlich kleine Vorstülpungen („Microridges“) auf (Steffens, 2000). Die eosinophilen Granulozyten besitzen einen zweifach gelappten Zellkern, welcher morphologisch dem der basophilen Granulozyten sehr ähnlich ist. Bardenstein et al. beschreiben einen Kernpolymorphismus als Antwort auf bestimmte Infektionen, der eine eindeutige Identifizierung der eosinophilen Granulozyten dann nur an Hand der Granula möglich macht (Bardenstein et al., 1997). Nukleoli, welche im normalen Blutausschlag kaum sichtbar sind, werden für gewöhnlich unter dem Elektronenmikroskop gut erkennbar. Mitochondrien, Golgi-Apparat, Ribosomen, Glykogenpartikel, sowie Anteile des Endoplasmatischen Retikulums sind häufiger zu finden als bei den basophilen und neutrophilen Granulozyten (Steffens, 2000). Die eosinophilen Granula werden vom Golgi-Apparat produziert und erreichen Durchmesser von 1 μm und mehr (Steffens, 2000). In der Literatur wird berichtet, dass bei Rind und Pferd bei den eosinophilen Granulozyten lediglich homogene Granula vorkommen, während beim Mensch, Hund und der Katze auch kristalline Einschlüsse zu finden sind (Brown, 1987; Hees und Tschudi, 1990; Liebich, 2004). Die Granula dürften sich von Lysosomen ableiten. Neben der Peroxidase und zahlreichen hydrolytischen Enzymen wurden noch weitere Proteine mit Hilfe biochemischer Methoden identifiziert. Dazu gehören das Charcot-Leyden Kristallprotein, die Urokinase und das Major-Basic-Protein (Dvorak et al., 1994; Calafat et al., 1997; Mabilat-Pragnon et al., 1997). Auch bei den eosinophilen Granulozyten wurden zahlreiche Arten der intrazellulären Degranulation beschrieben. Wie bei den neutrophilen Granulozyten kommt es zur Fusion mit zur Phagozytose befähigten Vakuolen und damit zur Bildung eines Lysosoms. Daneben kommt es wohl bei den eosinophilen Granulozyten noch durch Exozytose (Weiler et al, 1996), durch explosive Degranulation, welche zur Lyse der Zelle führt, und durch das Freilassen des Granulainhalts über feine Kanäle in der Zellmembran in das umgebende Gewebe zur Degranulation (Cheng et al., 1997; Persson und Erjefalt I, 1997; Persson und Erjefalt II, 1997).

Nur ca. 0,5% aller Leukozyten sind basophile Granulozyten. Sie sind somit die am seltensten anzutreffende Zellart. Nur bei einigen Vögeln und Reptilien, sowie beim Kaninchen kommen sie häufiger vor (Lösch et al., 2000). In meinen Präparaten war ein equiner basophiler Granulozyt nicht identifizierbar. Ein Grund

dafür, dass basophile Granulozyten kaum zu finden sind, mag die Wasserlöslichkeit der Granula sein, welche zu einer beträchtliche Veränderung ihrer Ultrastruktur führen kann (Steffens, 2000). Diese Zellen sind für gewöhnlich rund und besitzen Durchmesser von 8-12 μm . Die Zellmembran ist gut definiert und mit zahlreichen oberflächlichen Falten und Mikrovilli versehen (Galli et al., 1981). Neben den charakteristischen Granula sind im Zytoplasma Ribosomen, Polyribosomen und Glykogenpartikel zu finden. Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat sind für gewöhnlich auch regelmäßig nachweisbar. Diese Zellorganellen entwickeln sich aber mit fortschreitender Reifung der Zelle zurück (Steffens, 2000). Aktin und intermediäre Filamente sind im Zytoskelett vorhanden und scheinen eine regulatorische Funktion bei der Degranulation zu besitzen (Hastie und Chir, 1974; Grant et al., 1977).

Die zwei immunologisch unterscheidbaren Hauptklassen von Lymphozyten, die vom Thymus stammenden T-Lymphozyten und die aus dem Knochenmark stammenden B-Lymphozyten, sind auch ultrastrukturell nicht zu differenzieren. Einzig allein die antigenstimulierte B-Zelle, welche begonnen hat sich zur Plasmazelle zu transformieren, zeigt einige Besonderheiten. Solche Zelle konnte ich in meinen Präparaten gelegentlich identifizieren. In dieser Zelle dominiert im Zytoplasma das raue Endoplasmatische Retikulum, welches feines, dunkles, granuliertes Material enthält (Steffens, 2000). Auch wenn die Lymphozyten als Agranulozyten unter den Leukozyten bezeichnet werden, enthalten einige von ihnen feine mäßig elektronendichte Granula, die den lichtmikroskopisch erkennbaren azurophilen Granula entsprechen dürften. Über die Funktion dieser Granula ist noch kaum etwas bekannt (Steffens, 2000).

Die Monozyten, welche mit einem Durchmesser von bis zu 15 μm die größten unter den zirkulierenden Leukozyten sind, entwickeln sich im Knochenmark, setzen ihre Reifung im Blutkreislauf fort und wandern schließlich als Makrophagen in das Gewebe. Wie auch in der Literatur beschrieben, stellten sich die Monozyten in meinen Präparaten als große runde Zellen dar (Bienzle, 2000). Der Zellkern war meist bohnen- oder hufeisenförmig. Die übliche Einteilung des Zellkerns in einen Heterochromatin- und einen Euchromatinbereich war auch bei diesen Zellen gut zu sehen. Die Granula der Monozyten werden nach Fusion mit

der Zellmembran nach außen abgegeben. Dies findet in der Regel erst nach der Differenzierung zu Makrophagen statt (Steffens, 2000). Im Zytoplasma waren bei einem Teil der Monozyten zahlreiche Vakuolen zu sehen. Bei ihnen dürfte es sich um Lysosomen handeln, wie sie für reife Monozyten typisch sind. Auf der Zellmembran waren Ausstülpungen, die sogenannten Pseudopodien zu beobachten, welche im aktiven Zustand des Monozyten gebildet werden (Hees und Tschudi, 1990).

4. Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden 17 Lektine pflanzlichen Ursprungs verwendet. Die Lektine ConA, LCA, PSA, GSL, PNA, RCA, WGA, WGAs, DBA, SJA, SBA, UEA-1, PHA-E und PHA-L waren dabei an den Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) gekoppelt. Die Lektine VAA, MAA und SNA wurden mit der Streptavidin-Biotin-Methode untersucht, bei der die Lektine biotinyliert sind. Um die einzelnen Blutzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop unterscheiden zu können, wurde eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt.

Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Tieren bzw. zwischen jungen und adulten Tieren konnten bei den glykohistochemischen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Die Erythrozyten des Pferdes reagierten vor allem im Bereich ihrer Zellmembran deutlich positiv. So war in meinen Präparaten bei den Lektinen ConA, LCA, PSA, GSL, RCA, WGA, WGAs, DBA, UEA-1, SNA und PHA-L die Reaktion der Erythrozyten nahezu bei 100% stark positiv. Die Lektine VAA, SBA, SJA und PHA-E zeigten bei 45 bis 70% eine positive Reaktion. Lediglich bei den Lektinen PNA und MAA war die Reaktion sehr schwach ausgeprägt. Dieses Lektinbindungsmuster zeigt das Vorhandensein von Glukose-, Mannose-, Galaktose-, N-Acetylglukosamin-, N-Acetylgalaktosamin-, Fukose- und Sialinsäureresten in der Erythrozytenmembran an. Wie bei Erythrozyten des Rindes (Newman und Uhlenbruck, 1977) war bei den Pferdeerythrozyten eine deutliche Bindung des Lektins WGA und eine negative Reaktion mit PNA zu beobachten. Newman und Uhlenbruck beobachteten weiter, dass die Reaktion humaner Erythrozyten mit PNA erst nach Vorbehandlung mit Neuraminidase positiv war (Newman und Uhlenbruck, 1977).

Die Neuraminidase spaltet von verschiedenen Glykoproteinen die endständige Sialinsäure ab und macht so die Bindung der Lektine an subterminale Kohlenhydratreste möglich. Positive Reaktionen bei humanen Erythrozyten werden von verschiedenen Autoren auch bei den Lektinen PHA-E, LCA, RCA und WGA beschrieben (Emerson und Kornfeld, 1976; Newman und Uhlenbruck, 1977). Jedoch konnten diese Autoren keine positive Reaktion mit ConA feststellen, was für die Erythrozyten des Pferdes nicht zutrifft, die in der Regel immer eine deutliche Bindung dieses Glukose-/Mannose-spezifischen Lektins zeigten. Die Lektine SNA und UEA-1 gelten beim Menschen als spezifisch für die Blutgruppe H, das Lektin GSL als spezifisch für die Blutgruppe B. Diese drei Lektine reagierten in meinen Untersuchungen in allen Ausstrichen stark positiv mit der Membran der roten Blutkörperchen, so dass man annehmen kann, dass die Erythrozyten des Pferdes ähnliche Kohlenhydratstrukturen in ihrer Zellmembran aufweisen, wie die humanen roten Blutkörperchen diese beiden Blutgruppen.

Bei den equinen Blutplättchen war die Reaktion mit den Lektinen ConA, LCA, PSA, PNA, WGA und SBA deutlich positiv. Die Lektine MAA, PHA-L und WGAs reagierten weniger stark und nur teilweise mit den Thrombozyten. Bei den Lektinen GSL, RCA, VAA, DBA, SJA, UEA-1, SNA und PHA-E war keine Bindung an die Thrombozyten feststellbar. Somit kann man auf das Vorhandensein von Glukose-, Mannose-, Galaktose-, N-Acetylglukosamin- und N-Acetylgalaktosaminresten schließen. Sialinsäure scheint nur in geringen Mengen vorhanden zu sein, ebenso wie komplexe Kohlenhydratstrukturen. Fukosereste ließen sich auf den equinen Thrombozyten nicht nachweisen.

Vor allem die Granula der neutrophilen Granulozyten reagierten bei allen Lektinen außer bei den Sialinsäure-spezifischen Lektinen (MAA, VAA, SNA) stets stark positiv. Bei letzteren, die allerdings mit einer etwas anderen Technik untersucht wurden (biotinylierte Lektine mit nachfolgender Inkubation mit Streptavidin-FITC) war die Reaktion der Granula mit jedem dieser Lektine nur zu je 20% positiv. Auch die Zellmembran und das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten reagierten mit diesen drei Lektinen nur zu 30 bis 60% positiv. Glykoproteine mit endständiger Sialinsäure scheinen bei den neutrophilen Granulozyten der Pferde im geringen Maße vorhanden zu sein. Hingegen sind nach meinen Untersuchungen zahlreiche andere Kohlenhydratreste (Glukose-,

Mannose-, Galaktose-, N-Acetylglukosamin-, N-Acetylgalaktosamin und Fukosereste) sowie komplexe Kohlenhydratstrukturen, die sich mit PHA-E und PHA-L nachweisen lassen, in großer Zahl in den Glykoproteinen der equinen neutrophilen Granulozyten vorhanden.

Bei den eosinophilen Granulozyten reagierten ähnlich wie bei den neutrophilen Granulozyten vor allem die Granula deutlich positiv. Eine starke Bindung an die Granula erfolgte bei den Lektinen GSL, PNA, RCA, WGA, WGAs, DBA, SBA und SJA. Die für komplexe Kohlenhydratstrukturen spezifische Lektine PHA-E und PHA-L reagierten dagegen unterschiedlich häufig positiv (bei 45 bis 100% der eosinophilen Granulozyten). Keinerlei Reaktion zeigten die eosinophilen Granulozyten nach Inkubation mit den Sialinsäure-spezifischen Lektinen MAA und SNA. Daraus kann man schließen, dass die Granula der equinen eosinophilen Granulozyten keine oder nur sehr wenig Sialinsäure in den Glykoproteinen ihrer Granula enthalten. Eine positive Reaktion mit den Lektinen SBA und DBA wurden auch in früheren Untersuchungen gefunden (Eguchi et al, 1988; Lee et al, 1987). Lee et al. (1987) empfahlen, diese beiden Lektine bei fluoreszenzmikroskopischen histochemischen Untersuchungen als Marker zu benutzen, die eine Unterscheidung von eosinophilen und basophilen Granulozyten erlauben. Dies könnte auch für das Pferd zutreffen, allerdings ist für die geringe Zahl an basophilen Granulozyten, die ich im Pferdeblut auswerten konnte, eine solche Aussage noch nicht möglich.

Beim Lektin LCA war die Reaktion mit den Lymphozyten fast vollständig negativ. Alle anderen Lektine reagierten mit den Lymphozyten der Pferde positiv, wenn auch in den meisten Fällen nur schwach. Meist war die Bindung nur bei einem Teil der Lymphozyten (ca. 30%) zu beobachten. Die interessante Frage, ob diese Reaktion sich einer bestimmten Subpopulation zuordnen lässt, konnte ich leider nicht klären, da die Untersuchungen mit verschiedenen Antikörpern gegen CD-Antigene nicht die erhoffte eindeutige Zuordnung ermöglichte. Eine negative Reaktion von LCA mit Lymphozyten stellten auch Newman und Uhlenbruck bei humanen Lymphozyten fest (Newman und Uhlenbruck, 1977). Wie beim Pferd beobachteten sie beim Menschen eine positive Reaktion der Lymphozyten nach Inkubation mit den Lektinen PHA-E und RCA. Reisner et al. fanden 1979 heraus, dass nur wenige reife T-Lymphozyten mit PNA reagieren, wohingegen unreife

Lymphozytenformen immer eine positive Reaktion zeigen. Bei Vorbehandlung mit Neuraminidase war die Reaktion auch bei den reifen T-Lymphozyten zu 100% positiv. Daraus lässt sich schließen, dass der PNA-Rezeptor der T-Lymphozyten während der Zelldifferenzierung mit Sialinsäure maskiert wird. Eine Unterscheidung der akuten Leukämie, bei der vor allem unreife T-Lymphozytenstadien vorkommen, von der chronischen Leukämie, bei der höher differenzierte T-Lymphozyten vorherrschen, sollte daher lektinhistochemisch möglich sein (Reisner et al, 1979). Damit wäre auch ein therapeutischer Ansatz, welcher gezielt auf den PNA-Rezeptor der unreifen T-Lymphozyten gerichtet ist, nach Ansicht dieser Autoren (Reisner et al., 1979) zur Behandlung der akuten Leukämie denkbar. Mèrant et al entdeckten bei ihren Studien, dass PNA-bindende Glykoproteine in hohem Maße auf reifen und unreifen equinen T-Lymphozyten und zum Teil auch auf B-Lymphozyten exprimiert werden (Mèrant et al., 2005). Dies wird auch durch meine Untersuchungen, die eine Bindung von PNA an die Lymphozyten des Pferdeblutes zeigen, bestätigt.

Die Monozyten und basophilen Granulozyten waren in meinen Ausstrichen unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht eindeutig identifizierbar, so dass keine sichere Aussage in Bezug über das Verhalten dieser Blutzellen bei Anfärbung mit Lektinen möglich ist.

Auffallend war das unterschiedliche Reaktionsmuster nach Inkubation mit den Sialinsäure-spezifischen Lektinen MAA und SNA, welche die Erythrozyten sehr unterschiedlich gefärbt haben. Das Lektin MAA färbte nur zu 10% der Erythrozyten, während durch das Lektin SNA die Zellmembran der roten Blutkörperchen bei allen Ausstrichen stark gefärbt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass nur ein relativ geringer Anteil von equinen Erythrozyten Sialinsäure in ihrer Zellmembran enthält, die in α -2,6-Bindung an die nachfolgenden Kohlenhydratreste gebunden ist.

5. Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde das Blut von 20 Tieren unterschiedlichen Alters auf die Bindung von spezifischen monoklonalen Antikörpern untersucht. Hierfür wurden die monoklonalen Antikörper mAk 4-13,

mAk 4-58 und mAk 5-50, welche als spezifisch für T-Lymphozyten gelten, so wie die für B-Lymphozyten spezifischen Antikörper mAk 1-19, mAk 2-52, mAk 4-36, mAk 4-55 und mAk 6-39 verwendet. Es handelt sich hierbei um monoklonale Maus-anti-Pferd-Antikörper (Umlauf, 2004), die im Rahmen einer Doktorarbeit am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der LMU München hergestellt wurden. Der Antikörper mAk 4-13 bindet laut Umlauf (2004) nach Analysen im FACScan 73% aller peripheren Blutlymphozyten und 6% aller Granulozyten. Er gehört zur Immunglobulinsubklasse IgG1. Der Antikörper mAk 4-58, welcher zur Immunglobulinsubklasse IgG2a gehört, bindet 78% aller peripheren Blutlymphozyten und 5% der Granulozyten. Des Weiteren bindet der Antikörper mAk 4-58, welcher zur Immunglobulinklasse IgG1 gehört, in zytometrischen Untersuchungen an 50% der peripheren Blutlymphozyten und an 5% der Granulozyten. Der Antikörper mAk 1-19 reagiert mit 23% aller Blutlymphozyten und 13% der Granulozyten. Er gehört zur Immunglobulinklasse IgG1. Der Antikörper mAk 2-52 bindet nach den Ergebnissen von Umlauf (2004) die mittels Cytoflow ermittelt wurden, 23% aller Blutlymphozyten und 6% der Granulozyten. Er gehört zur Immunglobulinklasse IgG2b. Kontrolliert wurden die Ergebnisse durch Umlauf (2004) mit dem Anti-Ig-Pferd-FITC-Antikörper. Der Antikörper mAk 1-19 reagiert allerdings weiter mit dem Darmepithel der Pferde und der Antikörper mAk 2-52 mit der equinen Milz. Mit dem monoklonalen Antikörper 4-36, der der Immunglobulinsubklasse IgG1 angehört, können in der Durchflusszytometrie 25% aller peripheren Blutlymphozyten und 16% der Granulozyten markiert werden. Durch den monoklonalen Antikörper mAk 4-55 (Immunglobulinsubklasse IgG2a) werden durchschnittlich 15% der peripheren Blutlymphozyten und 3% der Granulozyten gebunden. Bei zytometrischen Analysen im FACScan bindet der Antikörper 6-39 28% der peripheren Blutlymphozyten und 5% der Granulozyten. Er reagierte auch zu 86% mit den intestinalen Epithelzellen. Dieser Antikörper gehört zur Immunglobulinsubklasse IgG2a (Umlauf, 2004). Bisher fehlen Daten über die Molekulargewichte der gebundenen Strukturen, so dass die Identität der Antigene ungeklärt bleibt.

Die Antikörper waren durchwegs FITC-markiert. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurde DAPI zur Kernfärbung verwendet. Bei den T-Zell-

spezifischen Antikörpern mAk 4-13, mAk 4-58 und mAk 5-50 konnte keine Bindung beobachtet werden. Dagegen reagierten die Antikörper 1-19 und 2-52 mit den equinen Lymphozyten. Zusätzlich war auch eine Bindung dieser beiden Antikörper an die Erythrozyten und an die neutrophilen Granulozyten zu beobachten.

Eine Unterscheidung der T-Lymphozyten des Pferdeblutes anhand ihrer CD-Antigene in CD4+ T-Helferzellen und CD8+ Zytotoxische Zellen (Tizard, 2000) war nicht möglich, da eine Reaktion der Zellen mit den T-Zell-spezifischen Antikörpern unterblieb.

Die Ergebnisse meiner immunhistochemischen Untersuchungen zeigen deutlich, wie schwierig es ist, die Strukturen des equinen Immunsystems genauer zu differenzieren. Um die physiologischen und pathologischen Vorgänge zahlreicher Erkrankungen aufzuklären, ist es somit wichtig, die Methoden und Werkzeuge der Immunhistochemie noch weiter zu verbessern, da mit ihrer Hilfe nicht nur Aufschlüsse über die verschiedenen Zellsubpopulationen im Blut gesunder Pferde gewonnen werden können, sondern auch wichtige Ergebnisse über pathophysiologische Mechanismen wichtiger Erkrankungen des Pferdes zu erwarten sind. Beispielsweise könnten spezifische Antikörper gegen Leukozytenantigene einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung der „Equinen Rezidivierenden Uveitis“ („Mondblindheit“, „Iridocyclochorioditis“) leisten. Bei dieser schubweise verlaufenden Erkrankung sind bis heute Ätiologie und Pathogenese nicht vollständig geklärt. Ähnlich der Pathogenese der Uveitis des Menschen scheint jedoch ein autoimmunes Geschehen mitverantwortlich zu sein (Deeg et al., 2002). Bei der „Schweren kombinierten Immundefizienz“ („Severe combined Immunodeficiency“, SCID) der Araberpferde, einer autosomal rezessiven Erbkrankheit, werden die Tiere in der Regel auf Grund einer kombinierten Defizienz von B- und T-Lymphozyten meist nicht älter als 5 Monate (McGuire und Poppie, 1973). Grund dafür ist ein Defekt in einem Gen, welches für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängige Protein Kinase kodiert. Diese Erkrankung dient als ein Modell für die Erforschung von Immundefizienzen beim Menschen (Shin et al., 1997). Eine sehr häufig vorkommende Erkrankung ist die „Chronische Obstruktive Bronchitis“ (COB) der Pferde, auch als „Recurrent Airway Obstruction“ (RAO) oder „Chronic

Obstructive Pulmonary Disease“ (COPD) bezeichnet (Robinson, 2001). Da sich dabei bei der Untersuchung der Bronchoalveolarflüssigkeit große Mengen IgE finden, handelt es sich möglicherweise um eine Typ-I Hypersensibilität. Auch zeichnet sich die Bronchoalveolarflüssigkeit durch zahlreiche neutrophile Granulozyten aus. Diese Ansammlung neutrophiler Granulozyten wird durch IL-8 ausgelöst (Nevalainen et al., 2002). Für den Bronchospasmus sind Mastzellen verantwortlich, welche Histamin, Serotonin und Leukotrien D4 freisetzen. Diese Substanzen stimulieren den Parasympathikus und bewirken dadurch eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur (Olszewski et al., 1999). In der Humanmedizin gelang es 1998 Moleküle zu isolieren, zu analysieren und herzustellen, welche IgE binden. Es gelang somit Unterschiede in der Pathogenese von IgE-mediertem Asthma und der Aspergillose des Menschen zu klären (Cramer et al., 1998). Um ein besseres Verständnis der chronischen Atemwegserkrankungen der Pferde zu erlangen, wären spezifische Antikörper gegen Zytokine und IgE dringend erforderlich (Bowles et al., 2002).

VI Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, detaillierte Informationen über die funktionelle Morphologie der Blutzellen des Pferdes zu erlangen. Hierfür wurde Blut von 42 Pferden unterschiedlichen Alters, Geschlechts und verschiedener Rassen entnommen. Mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Methoden wurden die equinen Blutzellen hinsichtlich ihrer Struktur charakterisiert. Durch den Einsatz von Lektinen wurden die Zuckerstrukturen der Blutzellen dargestellt. Mittels Immunhistochemie wurde versucht, Subpopulationen von Lymphozyten zu differenzieren.

Mit allen vier angewandten lichtmikroskopischen Routinefärbungen (Diff-Quick, Giemsa, May-Grünwald und Pappenheim) ließen sich alle Blutzelltypen gut darstellen. Die kleinen Granula der neutrophilen Granulozyten waren nur schwach angefärbt. Sehr deutlich stellten sich die für die Tierart Pferd typischen großen Granula der eosinophilen Granulozyten dar. Diese waren vor allem in der Färbung nach May-Grünwald sehr gut als Einzelstrukturen zu erkennen. Diese rötlich-pinken Granula füllen das Zytoplasma nahezu vollständig aus und geben der Zelle die Gestalt einer Maulbeere. Auch die einfach und sehr schnell durchzuführende Diff-Quick Färbung eignet sich gut zur Charakterisierung der equinen Blutzellen, da alle Zellen gut angefärbt werden und sich dadurch leicht identifizieren lassen.

Die Ultrastruktur der equinen Blutzellen wurde an Ultradünnschnitten von Epon eingebetteten Blutzellpellet untersucht. Dabei zeichneten sich die Thrombozyten durch das Vorkommen von α -Granula, den stark elektronendichten „dense bodies“, Vakuolen und gespeichertem Glykogen im Zytoplasma aus. Bei den neutrophilen Granulozyten war der Zellkern meist stark segmentiert und in einen elektronendichten Heterochromatinbereich und einen hellen Euchromatinbereich unterteilt. Charakteristisch für diesen Zelltyp sind die länglichen, primären Granula und die rundlichen, spezifischen Granula. Die eosinophilen Granulozyten zeichneten sich unter dem Elektronenmikroskop durch ihre bis zu 2 μm großen, einheitlich elektronendichten Granula aus, die nur teilweise elektronendichte kristalloide Innenstrukturen aufwiesen. Die Lymphozyten wiesen je nach Funktionszustand mehr oder weniger stark ausgeprägte Pseudopodien auf. Ihr Zellkern ist rundlich, heterochromatinreich und es sind keine Granula zu finden.

Im Unterschied zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen lassen sich relativ oft Nukleoli nachweisen. Monozyten konnten an Hand ihrer Größe, dem typischen nieren- oder hantelförmigen Kern und den zahlreichen Vakuolen sowie lysosomalen Einschlüssen identifiziert werden.

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden die FITC-markierten Lektine Concanavalia Agglutinin, Dolichos biflorus Agglutinin, Griffonia simplicifolia Agglutinin, Lens culinaris Agglutinin, Maackia amurensis Agglutinin, Phaseolus vulgaris E Agglutinin, Phaseolus vulgaris L Agglutinin, Peanut Agglutinin, Pisum sativum Agglutinin, Ricinus communis Agglutinin, Soybean Agglutinin, Sophora japonica Agglutinin, Sambucus nigra Agglutinin, Ulex europaeus Agglutinin, Viscum album Agglutinin, Wheat germ Agglutinin und Wheat germ Agglutinin succinyliert verwendet. Am stärksten reagierten stets die Granula der eosinophilen Granulozyten. Lediglich bei den für Sialinsäure spezifischen Lektinen MAA und SNA war keine Färbung der Granula zu beobachten. Die Glukose-, Mannose- und N-Acetylglukosaminreste kommen auf Grund meiner Ergebnisse am häufigsten in Glykostrukturen der equinen Blutzellen vor.

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen kamen acht monoklonale Antikörper gegen equine Lymphozyten zum Einsatz. Die Antikörper mAK 4-13, mAK 4-58 und mAK 5-50 gelten als spezifisch für T-Lymphozyten, mAK 1-19, mAK 2-52, mAK 4-36, mAK 4-55 und mAK 6-39 als spezifisch für B-Lymphozyten. Bei meinen Untersuchungen an Blutaussstrichen des Pferdes zeigten lediglich die Antikörper 1-19 und 2-52 zeigten eine Bindung an die equinen Lymphozyten, welche somit als B-Lymphozyten identifiziert werden konnten. Abschließend ist festzuhalten, dass bei allen licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen kein Unterschied zwischen jungen und alten beziehungsweise zwischen männlichen und weiblichen Pferden beobachtet werden konnte.

VII Summary

Ultrastructural, glycohistochemical and immunohistochemical studies of equine blood cells

The aim of the present study was to obtain detailed informations about the functional morphology of equine blood cells. Blood samples of 42 horses of different age, sex and breeding were taken. Fixed and unfixed blood smears were stained using different conventional staining techniques. Carbohydrate residues of the equine blood cells were investigated using a set of FITC labelled lectins. The different subpopulations of lymphocytes have been distinguished by immunohistochemical methods. The ultrastructure of the blood cells has been evaluated using transmission electron microscopy.

All common blood cell types could be clearly distinguished using conventional staining techniques (Diff-Quick, Giemsa, May-Grünwald and Pappenheim). The small granules of the neutrophilic granulocytes could be clearly seen and the large (2 μm) granules of the eosinophilic granulocytes, which are characteristic for the horse, were easily discerned in all slides. Although all staining techniques gave adequate results, in our hand the staining technique according May-Grünwald appeared to be especially useful for blood smears of the horse.

After fixation with Karnosky's fluid and embedding in Epon, the ultra structure of the equine blood cells was studied in ultrathin sections using a Zeiss EM 901 electron microscope. Thrombocytes displayed α -granules, highly electron-dense "dense bodies", vacuoles and glycogen stored in the cytoplasm. The nucleus of the neutrophilic granulocytes was usually segmented and contained electron-dense heterochromatin areas as well as a light euchromatin areas. Neutrophilic granulocytes possessed elongated, primary granules and roundish, specific granules. The eosinophilic granulocytes are characterized by their homogeneous and electron-dense granules with size up to 2 μm , which sometimes contain a modest electron-dense, crystalloid inner structure. Depending on their functional state the lymphocytes showed more or less pronounced pseudopodias or microvilli. The nucleus of the lymphocytes is round and rich in heterochromatin. Also at the ultrastructural level granules are not detectable in the cytoplasm.

Contrary to light microscopy nucleoli are quite frequently seen in the electron microscope. Monocytes could be identified due to their size, the typical bean-shaped nucleus, the numerous vacuoles and numerous lysosomes.

The FITC-labelled lectins (Concanavalia agglutinin, Dolichos biflorus agglutinin, Griffonia simplicifolia agglutinin, Lens culinaris agglutinin, Maackia amurensis agglutinin, Phaseolus vulgaris E agglutinin, Phaseolus vulgaris L agglutinin, Peanut agglutinin, Pisum sativum agglutinin, Ricinus communis agglutinin, Soybean agglutinin, Sophora japonica agglutinin, Sambucus nigra agglutinin, Ulex europaeus agglutinin, Viscum album agglutinin, Wheat germ agglutinin and Wheat germ agglutinin succinylated) were used for the glycohistochemical studies. The granules of the eosinophilic granulocytes were distinctly stained with most of the lectins. Only Maackia amurensis agglutinin and Sambucus nigra agglutinin, specific for neuraminic acid, did not stain the granules of the eosinophilic granulocytes. These results suggest that glucose-, mannose- and N-acetylglucosamin-residues are most common components of the glycoproteins of equine blood cells.

In my immunohistochemical studies eight monoclonal antibodies against equine lymphocytes were applied. In previous studies using cytoflow techniques, the antibodies mAk 4-13, mAk 4-58 and mAk 5-50 have been shown to be specific for T-lymphocytes, while mAk 1-19, mAk 2-52, mAk 4-36, mAk 4-55 and mAk 6-39 are specific for B-lymphocytes. In my studies using formalin fixed blood smears only the antibodies mAk 1-19 and mAk 2-52 bound to a subset of equine lymphocytes, which could be therefore characterized as B-lymphocytes.

VIII Literaturverzeichnis

Allen, B.V. (1988):

Relationships between the erythrocyte sedimentation rate, plasma proteins and viscosity, and leukocyte counts in thoroughbred racehorses

Vet Rec 122: 329-332

Alroy, J., Ucci, A.A., Pereira, M.E.A. (1984):

Lectins. Histochemical probes for specific carbohydrate residues.

In: Delellis, R.A. (Hrsg.): *Advances in immunohistochemistry.* Masson Publishing USA, New York, Paris, S.67-88

Archer, R.K., Jeffcott, L.B. (1977):

Comparative clinical haematology

1st ed. Oxford, Blackwell Scientific; 161

Aub, J.C., Sanford, B.H., Cote, M.N. (1965):

Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 54: 396-399

Avdeeva, M.G., Evglevskii, A.A., Moissova, D.L., Shubich, M.G. (1997):

Leukocyte chromatin anisotropy in patients with leptospirosis

Klin Lab Diagn 11: 36-39

Bailey E., Albright DG., Henney PJ. (1988):

Equine neonatal isoerythrolysis: evidence for prevention by maternal antibodies to the Ca blood group antigen.

Am J Vet Res; 49:1218-1222

Bainton, D.F. (1995):

Morphology of neutrophils, eosinophils and basophils.

In: Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T., eds. *Williams's haematology.* 5th ed. New York: McGraw-Hill; 753-765

Banks, W.J. (1986):

Applied Veterinary Histology

Williams&Wilkins, Baltimore

Bardenstein, D.S., Lass, J.H., Kazura, J.W., Pearlman, E. (1997):

Pleomorphism of stromal eosinophils in murine experimental onchocercal keratitis

Ocul Immunol Inflamm 5: 157-163

- Baskurt, O.K., Farley, R.A., Meiselman, H.J. (1997):
Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horses, human, and rat: a comparative study
Am J Physiol 273: H2604-H2612
- Bauer, J.E., Harvey, J.W., Asquith, R.L., et al (1984):
Clinical chemistry reference values of foals during the first year of life.
Equine Vet J; 16: 361-363
- Becht, J.L., Semrad, S.D. (1985):
Haematology, blood typing and immunology of the neonatal foal.
Vet Clin North Am Equine Pract; 1: 91-116
- Bertram, T.A. (1985):
Neutrophilic leukocytes structure and function in domestic animals.
Adv Vet Sci Comp Med; 26: 91-129
- Bessis, M., Thiery, J. (1961):
Int Rev Cytol 12:199
- Bertram, T.A., Coignoul, F.L. (1982):
Morphology of equine neutrophils isolated at different temperatures.
Vet Pathol; 19: 534-543
- Bienzle, D. (2000):
Monocytes and Macrophages.
In: Schalm`s Veterinary Haematology. 5th ed: Lippincott Williams&Wilkins; 318-325
- Bochner, B.S., Sterbinsky, S.A., Knol, E.F., Katz, B.J., Lichtenstein, L.M.,
MacGlashan, D.W. Jr., Schleimer, R.P. (1994):
Function and expression of adhesion molecules on human basophils.
J Allerg Clin Immunol; 94: 1157-1162
- Bokoch, G.M. (1995):
Chemo attractant signaling and leukocyte activation.
Blood; 86: 1649-1660
- Bowles, K.S., Beadle, R.E., Mouch S., Pourciau, S.S., Littlefield-Chabaud, M.A.,
LeBlanc, C., Mistic, L., Fermaglich, D., Horohov, D.W. (2002):
A novel model of equine recurrent airway obstruction
Vet Immunol Immunopathol 76: 285-389
- Bowling AT. (1996):
Horse Genetics. Wallingford, UK: CAB International

- Bowling AT., Clarks RS. (1985):
Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States.
Anim Blood Groups and Biochemical Genetics; 16:93-108
- Bowling AT., Millon I.V, Eggleston-Stott ML. (1996):
Linkage mapping using equine half-sib families.
Anim Genet; 27 (suppl 2):73
- Boyd, W.C., Reguera, R.M. (1949):
Hemagglutinating substances in various plants.
J. Immunol. 62: 333-339. zit. nach Koucourek, J. (1986)
- Boyd, W.C., Shapleigh, E. (1954):
Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins).
Science; 119: 419
- Brooks, S.A., Leathem, A.J.C., Schumacher, U. (1997):
Lectin Histochemistry, a Concise Practical Handbook.
Bios scientific Publishers, S. 8-12, 16-17, 45-98
- Brown, E.M. (1987):
Blood and bone marrow
In: Dellmann, H.D. (Hrsg.), Brown, E.M. (Hrsg.): Textbook Of Veterinary Histology
Lea&Febiger
- Bruner, D.W., Hull, E.F., Doll, E.R. (1948).
The relationship of blood factor to icterus in foals
Amer J vet Res, 9: 237-242
- Calafat, J., Janssen, H., Knol, E.F., Weller, P.F., Egesten, A. (1997):
Ultrastructural localization of Charcot-Leyden crystal protein in human eosinophils and basophils
Eur J Haematol 58: 56-66
- Carrick, J.B., Begg, A.P. (2008):
Peripheral blood leukocytes
Vet Clin Equine; 24: 239-259
- Carter, E.I., Valli, V.E., Mc Sherry, B.J. et al (1974):
The kinetics of haematopoiesis in the light horse. 1.: The lifespan of the peripheral blood cells into the normal horse.
Can J Comp Med; 38: 303-313

Cheng, J.F., Ott, N.L., Peterson, E.A., George, T.J., Hukee, M.J., Gleich, G.J., Leiferman, K.M. (1997):
Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration
J Allergy Clin Immunol 99: 683-692

Chicoli N. G. (1861):
Med. Vet. Prat. 10: 84

Collins, J.D. (1975):
Autoimmune haemolytic anaemia in the horse.
In: Proceedings of the First International Symposium on Equine Haematology.
Sponsored by the American Association of Equine Practitioners, East Lansing, MI,
p.342

Coombs R. R. A., Crowhurst R. C., Day F. T., Heard P. H., Hinde I. T., Hoogstraten J., Parry H. B. (1948):
Haemolytic disease of newborn foals due to isoimmunisation of pregnancy.
J. Hyg. (London), 46: 403-418

Costa, J.J., Weller, P.F., Galli, S.J. (1997):
The cells of the allergic response: mast cells, basophils and eosinophils. JAMA; 278:
1815-1822

Craddock, C.G., Longmire, R., McMillian, R.I. (1971):
Lymphocytes and the immune response.
New England J. Med. 285, 378-384

Cramer, R. (1998):
Recombinant Aspergillus fumigatus allergens: from the nucleotide sequence to clinical applications
Int Archiv Allergy Immunol 115: 99-114

Deeg, C.A., Thurau, S.R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G., Kaspers, B. (2002):
Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding proteins is similar to the spontaneous disease
Eur J Immunol 77: 243-256

Denk, H. (1989):
Immunhistochemische Färbemethode
in: Böck, P. (Hrsg.): Mikroskopische Techniken
Urban&Schwarzenberg

Dietz, O., Huskamp, B.:
Handbuch der Pferdepraxis.
3. Ausgabe. 2005

Dixon, H.B.F. (1981):

Defining a lectin.

Nature (London);292: 192

Donnelly, S.C., Bucala, R. (1997):

Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease.

Mol Med Today; 3: 502-507

Douglas, S.D., Ho, W.Z. (1995):

Morphology of monocytes ad macrophages.

In: Beutler, E., Lichtman, M.A., Coler, B.S., Kipps, T.J., eds. Williams's haematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 861-868

Dvorak, A.M., Furitsu, T., Estrella, P., Letourneau, L., Ishizaka, T., Ackerman, S.J. (1994):

Ultrastructural localization of major basic protein in the human eosinophils lineage in vitro

J Histochem Cytochem 42: 1443-1451

Dvorak, A.M., Monahan, R.A. (1985):

Guinea pig bone marrow basophilopoiesis.

J Exp Pathol; 2: 13-24

Eguchi, M., Ozawa, T., Suda, J., Sugita, K., Furukawa, T. (1989):

Lectins for electron microscopic distinction of eosinophils from other blood cells

J Histochem Cytochem 37: 743-749

Ehrlich, P. (1891):

Experimentelle Untersuchungen über die Immunität. I. Über Ricin.

Dtsch. Med. Wschr. 17: 976-979. zit. nach Koucourek, J. (1986)

Ehrlich, P. (1891):

Experimentelle Untersuchungen über die Immunität. II. Über Abrin. Dtsch. Med.

Wschr. 17: 1218-1219. zit. nach Koucourek, J. (1986)

Emerson, W.E., Kornfeld, S. (1976):

Characterisation of the oligosaccharide units of the bovine erythrocyte membrane glycoproteins

Biochem 15: 1697-1703

Engelhardt W.v., Breves G. (1999):

Physiologie der Haustiere.

1. Auflage

- Eyquem, A., Podliachouk, L., Millot, P. (1956).
Les groups sanguins des animaux domestiques et leur interet pour l'elevage.
Bericht zum Intern. Tierzuchtkongress Madrid. Thema 2- 125
- Fabrizi, P., Barbarulli, G., Castellani, M., Tarli, P. (1981):
Thromb. Res, 21, 165-168
- Franks D. (1959):
The red cell antigens of the horse. Antigens defined by immune isoantibodies.
J. comp. Path., 69: 353-366
- Franks D. (1962):
Horse blood groups and haemolytic disease of the newborn foal.
Ann N.Y. Acad. Sci, 97 (1): 235-250
- Franz, H. (1990):
100 Jahre Lektinforschung- eine Bilanz.
Naturwissenschaften 77: 103-109
- Fujishima, S., Aikawa, N. (1995):
Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation.
Intensiv Care Med; 21: 277-285
- Gabius, H.J. (1997):
Animal lectins
Eur J Biochem 243: 543-576
- Gabius, H.J., Siebert, H.C., Andrè, S., Jimenez-Barbero, J., Rudiger, H. (2004):
Chemicalbiology of the sugar code
Chemobiochem 5: 740-764
- Gabius, H.J. (2009):
The sugar code: Fundamentals of glycosciences
Wiley-VCH Verlag GmbH & CoKGaA, Weinheim
- Galli, S.J., Dvorak, A.M., Hammond, M.E., Morgan, E., Galli, A.S., Dvorak, H.F.
(1981):
*Guinea pig basophils morphology in vitro. I. Ultrastructure of uropod-bearing (motile)
basophils and modulation of motile structures by serum and substrate effects*
J Immunol 126: 1066-1074
- Ganz, T., Weiss, J. (1997):
Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia.
Semin Hematol; 34: 343-354

Gill, H.S. (1986):

Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at Hyalomma anatolicum anatolicum feeding sites on cattle and the acquisition of resistance.

Parasitology; 93: 305-315

Goldstein, I.J., Hughes, M., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980):

What should be called a lectin?

Nature; 285, 66

Goldstein, I.J., Poretz, R.D. (1986):

Isolation, physicochemical and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (Hrsg.): *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine.* Academic Press, Orlando, San Diego; S. 33-247

Graetzer M. A., Hesselholt M., Moustgaard J., Thymann M. (1965):

Studies on protein polymorphism in pigs, horses and cattle. Blood groups of animals.

Proc. 9th Europ. Anim. Blood Group Conf., Prague: 279-293

Grant, J.A., Dupree, E., Thueson, D.O. (1977):

Complement-mediated release of histamine from human basophils. III. Possible regulatory role of microtubules and microfilaments

J Allergy Clin Immunol 60: 306-311

Grindem, C.B., Stevens, J.B., Perman, V. (1986):

Cytochemical reactions in cells from leukemic dogs.

Vet Pathol; 23: 103-109

Harvey, J.W., Asquith R.L., McNulty, P.K., Kivipelto, J., Bauer, J.E. (1984):

Hematology of foals up to one year old.

Equine Vet J; 16: 347-353

Hastie, R., Chir, B. (1974):

Study of the ultrastructure of human basophil leukocytes

Clin Lab Invest 31: 223-231

Hees, H., Tschudi, P. (1990):

Blut und Knochenmark

In: Mosimann, W. (Hrsg.), Kohler, T.(Hrsg.): *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*

Verlag Paul Parey

Hesselholt M. (1966):

Studies on the blood and serum types of the icelandic horse

Acta. Vet. Scand. 7, 206

- Hesselholt M., Larsen B., Nielsen P. B., Palludan B. (1965):
Studies on blood groups in cattle, horses and pigs. Blood groups of animals.
Proc. 9th Europ. Anim. Blood Group Conf., Prague: 49-61
- Hirai, K., Miyamasu, M., Takaishi, T., Morita, Y. (1997):
Regulation of the function of eosinophils and basophils.
Crit Rev Immunol; 17: 325-352
- Hirszfeld L., Przesmycki F. (1923):
Isoagglutination des globules rouges chez les chevaux.
Compt. Rend. soc. Biol. 89, 1360
- Jain, N.C. (1986):
Schalm's Veterinary Hematology.
4th ed. Philadelphia: Lea&Febiger; 140
- Jain, N.C. (1986):
The horse: normal hematology with comments on response to disease.
In: Schalm's Veterinary Hematology. 4th edition. Philadelphia: Lea&Febiger. 140-177
- Jain, N.C. (1986):
The neutrophils.
In: Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea&Febiger; 677-730
- Jain, N.C. (1993):
Essentials of Veterinary Hematology
Lea&Febiger. Philadelphia
- Jandl, J.H. (1996):
Granulocytes.
In: *Blood. Textbook of Hematology. 2nd ed. Boston: Little, Brown and Co; 618-622*
- Kirshenbaum, A.S., Goff, J.P., Kessler, S.W., Mican, J.M., Zsebo, K.M., Metcalfe, D.D. (1992):
Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells.
J Immunol; 148: 772-777
- Kitchen, H., Brett, I. (1974):
Embryonic and fetal hemoglobin in animals.
Ann N Y Acad Sci; 241: 653-671
- Kitchen, H., Bun, H.F. (1975):
Ontogeny of equine hemoglobins.
J Reprod Fertil Suppl; 23: 595-598

Knol, E.F., Mul, F.J., Lie, W.J., Verhoeven, A.J., Roos, D. (1996):
The role of basophils in allergic disease.
Eur Respir J Suppl; 22: 126-131

Kocourek, J. (1986):
Historical background.
In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J.: The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press, Orlando, San Diego; S. 1-32

Köhler G., Milstein C. (1975):
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
aus: Nature Bd.256, S. 495-497

Kolb, G.M.H. (1991):
Vergleichende Histologie: Cytologie und Microanatomie der Tiere
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Kraft W., Dürr U. (1995):
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.
3. Auflage. 1995

Kraft, W., Dürr, U.M., Füll, M., Bostedt, H., Heinritzi, K. (1997):
Hämatologie
in: Kraft, W. (Hrsg.), Dürr, U.M. (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin
Schattauer

Kramer, J.W. (2000):
Normal hematology of the horse.
In: Schalm`s Veterinary Hematology. 5th ed: Lippincott Williams&Wilkins; 1069-1074

Kroegel, C., Warner, J.A., Virchow, J.C. Jr., Matthys, H. (1994):
Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part II). Eur Respir J; 7: 743-760

Krzywanek, H. (2005):
Leistungsphysiologie
in: Dietz, O. (Hrsg.), Huskamp, B. (Hrsg.): Handbuch der Pferdepraxis
Enke, 3. Auflage

Kydd, J.H., Antczak, D.F., Allen, W.R., Barbis, D., Butcher, G., Davis, W., Duffus, W.P.H., Edington, N., Gruning, G., Holmes, M.A., Lunn, D.P., Mc Cullock, J., O'Brien, M.A., Perryman, L.E., Tavernor, A.S., Williamson, S., Zhang, C. (1994):
Report of the First International Workshop on Equine Leucocyte Antigen, Cambridge, UK, July 1991
Vet. Immunol. Immunopathol. 42, 1-60.

Landsteiner K. (1900):

Zur Erkenntnis der antifermentativen lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutserums.

Zbl. Bakt. 27: 357-362

Landsteiner, K. (1902):

Beobachtungen über Hämagglutination.

Wien. Klein. Rundschau. S.774. zit. nach Roth, J. (1978)

Lassen, E.D., Swardson, C.J. (1995):

Hematology and Hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities.

Vet. Cli. North. Am: Equine Practice, 11; 3: 351-389

Latimer, K.S. (1995):

Leukocytes in health and disease.

In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C., eds. Textbook of veterinary internal medicine.

Diseases of the dog and cat, Vol 2. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders co; 1982-1992

Latimer, K.S., Prasse, K.W. (2003):

Leukocytes

In: Latimer, K.S., Mahaffey, E.A., Prasse, K.W., editors. Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine clinical pathology. 4th edition. Ames (IA): Iowa State Press; p.46-79

Lee, M., Turcinov, D., Damjanov, I. (1987):

Lectins as markers for eosinophilic leucocytes

Histochemie 86: 269-273

Lehnert, E. (1939).

Ein Beitrag zur Kenntnis der Blutgruppen des Pferdes mit Hilfe arteigener hochwertiger gruppenspezifischer Immunsere.

Almquist et Wiksells

Lehrer, R.I., Ganz, T. (1995):

Biochemistry and function of monocytes and macrophages.

In: Beutler, E., Lichtman, M.A., Coler, B.S., Kipps, T.J., eds Williams hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 869-873

Liebich, H.G. (2004):

Funktionelle Anatomie der Haussäugetiere

Schattauer, Stuttgart, 2. Auflage

Lindhorst, T.K. (2000):

Wenn Zucker- Attrappen Bakterien zum Narren halten.

Spektrum der Wissenschaft, März, S. 16-21

- Loeffler, K. (2002):
Anatomie und Physiologie der Haustiere
Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 10. Auflage
- Lording, P.M. (2008):
Erythrocytes
Vet. Clin. Equine, 24; 225-237
- Lösch, U., Cihak, J., Erhard, M., Kaspers, B. (2000):
Blut und Abwehr
in: Engelhardt, W. (Hrsg.), Breves, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*
Enke
- Lunn, D.P., Holmes, M.A., Antczak, D.F., Agerwal, N., Baker, J., Bendali-Ahcene, S., Blanchard-Channell, M., Byrne, K.M., Cannizzo, K., Davis, W., Hamilton, M.J., Hannat, D., Kondo, T., Kydd, J.H., Monier, M.C., Moore, P.F., O'Neil, T., Schram, B.R., Sheoran, A., Stott, J.L., Sugiura, T., Vagnoni, K.E. (1998):
Report of the Second Equine Leucocyte Antigen Workshop, Squaw Valley, California, July 1995
Vet. Immunol. Immunopathol. 62 (2): 101- 43.
- Lunn, D.P., Horohov, D.W. (2004):
Equine immunology
In: Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon, D.C., editors. *Equine internal medicine*. 2nd edition. St Louis (MO): Saunders; p.1-28
- Mabilat-Pragnon, C., Janin, A., Michel, L., Thomaidis A., Legrand, Y., Soria, C., Lu, H. (1997):
Urokinase localization and activity in isolated eosinophils
Thromb Res 88: 373-379
- Marone, G., Casolaro, V., Patella, V., Florio, G., Triggiani, M. (1997):
Molecular and cellular biology of mast cells and basophils.
Int Arch Allergy Immunol; 114: 207-217
- Marti, E., Horohov, D.W., Antzak, D.F., Lazary, S., Lunn, D.F. (2003): *Advances in equine immunology: Havemeyer workshop reports from Santa Fa, New Mexiko, and Hortobagy, Hungary.*
Vet Immunol Immunopathol, 91: 233-243.
- Mazur, G., Braunitzer, G. (1982):
The sequence of hemoglobins from an Asiatic wild ass and a mountain zebra.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 363: 59-71

- McClure, J.J., Koch, C., Traub-Dargatz, J. (1994):
Characterization of a red blood cell antigen in dunkeys and mules associated with neonatal isoerythrolysis.
Anim Genet; 25: 119-120
- McGuire, T.C., Poppie, M.J. (1973):
Hypogammaglobulinaemie and thymic hypoplasia in horses: a primary combined immunodeficiency disorders
Infect Immunity 8: 272-277
- Mèrant, C., Messouak, A., Cadorè, J.L., Monier, J.C. (2005):
PNA-binding glycans are expressed at high levels on horse mature and immature T lymphocytes and a subpopulation of B lymphocytes
Glycoconj J 22: 27-34
- Meyers, K.M. (1985):
Pathobiology of animal platelets
Adv Vet Sci Comp Med, 30: 131-165
- Meyers, K.M., Hopkins, G., Holmsen, H., Benson, K., Prieur, D.J. (1982):
Am J Pathol 106, 364-377
- Mirelmann, D., Ofek, I. (1986):
Introduction to microbial lectins and agglutinins.
In: Mirelmann, D. (Hrsg) (1986): Microbial lectins and agglutinins. Wiley&Sons, New York, Chichester, S. 1-19
- Mizoguchi, A., Bhan, A.K. (2006):
A case for regulatory B cells.
J Immunol; 176: 705-710
- Murakami, I., Ogawa, M., Amo, H., Ota, K. (1969):
Studies of kinetics of human leukocytes in vivo with H-thymidine autoradiography. II. Eosinophils and basophils.
Acta Haematol Jpn; 32: 384-390
- Neitz, A.W.H., Gothe, R., Pawlas, S., Groeneveld, H.T. (1993):
Investigations into lymphocyte transformation and histamine release by basophils in sheep repeatedly infested with Rhipicephalus evertsi evertsi ticks.
Exp Appl Acarol; 17: 551-559
- Nevalainen, M., Raulo, S.M., Brazil, T.J., Pirie, R.S., Sorsa, T., McGorum, B.C., Maisi, P. (2002):
Inhalation of organic dusts and lipopolysaccharide increases gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMPs) in the lung of heaves horses
Equine Vet J 34: 150-155

Newman, R.A., Uhlenbruck, G.G. (1977):

Investigation into the occurrence and structure of lectin receptors of human and bovine erythrocytes, milk-fat globule and lymphocyte plasma-membrane glycoproteins
Europ J Biochem 76: 149-155

Nowell, P.C. (1960):

Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leucocytes.
Cancer Res 20: 462-466

Olszewski, M.A., Robinson, N.E., Zhu, F.X., Zhang, X.Y., Tithof, P.K. (1999):

Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways
Am J Physiol 276: 522-529

Osgood, E.E. (1937):

Culture of human marrow; length of life of the neutrophils, eosinophils and basophils of normal blood as determined by comparative cultures of blood and sternal marrow from healthy persons.
JAMA; 109: 933-937

Pearse, A.E.G. (1980):

Histochemistry, Volume 1: Preparative and Optical Technology
Churchill Livingstone, Edinburgh London and New York

Pellegrini, A., Kalkinc, M., Hermann, M., Grunig, B., Winder, C., von Fellenberg, R. (1998):

Equinins in equine neutrophils: quantification in tracheobronchial secretions as an aid in the diagnosis of chronic pulmonary disease.
Vet J; 155: 257-262

Persson, C.G., Erjefalt, J.S. (1997) I:

Ultimate activation of eosinophils in vivo: lysis and release of clusters of free eosinophils granules
Thorax 52: 569-574

Persson, C.G., Erjefalt, J.S. (1997) II:

Eosinophil lysis and free granules: an in vivo paradigm for cell activation and drug development
Trends Pharmacol Sci 18: 117-123

Persson, S.G.B. (1967):

On blood volume and working capacity in horses.
Acta Physiol Scand; (Suppl 19): 5-35

- Persson, S.G.B. (1967):
On blood volume and working capacity in horses
Acta Physiol Scand (Suppl. 19): 5-35
- Podliachouk L. (1957):
Les antigènes de groupes sanguines des équidés et leur transmission héréditaire.
Thesis, Paris
- Podliachouk, L., Hesselholt, M. (1962):
Les groupes sanguines des équidés. Les sérums de référence. Immunogenetics Letters 2,
69
- Podliachouk, L., Wroblewski, A. (1958):
Recherche des substances de groupes sanguins chez les chevaux et les mulets.
Ann. Inst. Pasteur 94, 748
- Pschyrembel (2004):
Klinisches Wörterbuch
260. Auflage de Gruyter, Berlin
- Reisner, Y., Biniaminov, M., Rosenthal, E., Sharon, N., Ramot, B. (1979):
Interaction of peanut agglutinin with normal human lymphocytes and with leucemic cells
PNCA 76: 447-451
- Renkonen, K.O. (1948):
Studies of hemagglutinins present in seeds of some representatives of leguminosae.
Ann Med Exp Fenn, 26: 66-72. zit. nach Koucourek, J. (1986)
- Revington, M. (1983):
Haematology of the racing Thoroughbred in Australia 1: Reference values and the effect of excitement
Equine Vet J 15: 141
- Robinson, N.E. (2001):
International Workshop on Equine Chronic Airway disease, Michigan State University, June 16-18, 2000
Equine Vet J 33: 5-19
- Romeis, P., Böck, P. (Hrsg.) (1989):
Mikroskopische Techniken
Urban & Schwarzenbeck, München

Rose, R.J., Allen J.R., Hodgson, D.R. et al. (1983):

Responses to submaximal treadmill exercise and training in the horse: Changes in haematology, arterial blood gas and acid base measurements, plasma biochemical values and heart rate

Vet Rec 113: 612

Rossdale, P.D., Burguez, P.N., Cash, R.S.G. (1982):

Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse

Equine Vet J 14: 293

Roth, J. (1978):

The lectins. Molecular probes in cell biology and membrane research. Fischer- Verlag (Jena): S. 8-9

Rüsse, I. (Hrsg.), Sinowatz, F. (2008):

Embryologie der Haustiere

Schermer, S. (1928):

Untersuchungen über die Blutgruppen des Pferdes.

Z. Immunforschung 58, 130

Schermer, S. (1934/35):

Die Blutgruppen der Haustiere (Pferd, Rind, Schwein und Schaf).

Z. Rassenphysiol 7, 33

Schermer, S., Hofferber, O., Kaempffer, A. (1932):

Weitere Untersuchungen über die Blutgruppen des Pferdes.

Arch Tierheilkunde 64, 518

Schermer, S., Kaempffer, A. (1933):

Weitere gruppenspezifische Differenzierungen im Pferdeblut.

Z. Immunforsch. 80, 146

Schermer, S., Kaempffer, A. (1936):

Die Blutgruppen des Pferdes und ihre praktische Bedeutung.

Berlin tierärztl Wschr 9, 145

Schnorr B. Kressin M. (2006):

Embryologie der Haustiere

5. Auflage

Scott, M.A., Stockham, S.L. (2000):

Basophils and Mast cells.

In: Schalm`s Veterinary Hematology. 5th ed: Lippincott Williams&Wilkins; 308-317

- Sengelov, H. (1995):
Complement receptors in neutrophils.
Crit Rev Immunol; 15: 107-131
- Sharon, N. (1977):
Lectins.
Sci Am; 236; 6: 108-119
- Sharon, N. (1987):
Lectins. An overview.
In: Olden, K., Parent, J.B. (Hrsg): Vertebrate Lectins. Van Nostrand Reinhold
Advanced Cell Biology Series, New York; S. 27-45
- Sharon, N., Lis, H. (1993):
Carbohydrates in cell recognition.
Sci Am; 268; 1: 74-81
- Shin, E.K., Perryman, L.E., Meek, K. (1997):
*A kinase-negative mutation of DNA-PK (CS) in equine SCID results in defective coding
and signal joint formation*
J Immunol 158: 3565-3569
- Sinowatz F., Hees H. (2006):
Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.
4. Auflage
- Smith, G.S. (2000):
Neutrophils.
In: Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed: Lippincott Williams&Wilkins; 281-296
- Snow, D.H., Ricketts, S.W., Madson, D.K. (1983):
*Haematological response to racing and training exercise in Thoroughbred horses, with
particular reference to the leucocyte response*
Equine Vet J 15: 149
- Sonoda, M. (1960):
*Clinical and experimental studies on the erythrocytes which include Jolly's bodies in
the horse.*
Equine Vet J 8:1
- Sonoda, M., Kobayashi, K. (1966):
*Electron microscopic observation on the blood of the horse I
Neutrophils in the peripheral blood of the clinically healthy horses*
Jap J Vet Res 14, Nos 1&2

- Spiro, R.G., Zhu, Q., Bhoyroo, V., Soling, H.D. (1996):
Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperon, calreticulin and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi.
J Biol Chem; 271; 115:88-94
- Steffens, W.L. (2000):
Ultrastructural features of leukocytes
In: Feldmann, B.F. (Hrsg.), Zinkl, J.G. (Hrsg.), Jain, N.C. (Hrsg.): Schalm's Veterinary Hematology, Lippincott Williams & Wilkins 326-336
- Steward, G.A., Riddle, C.A., Salmon, P.W. (1977):
Haematology of the racehorse. A recent study of Thoroughbreds in Victoria
Aust Vet J 53: 353
- Stickle, J.E. (1996):
The neutrophil. Function, disorders and testing.
Vet Clin North Am Small Anim Pract; 26: 1013-1021
- Stillmark, H. (1888):
Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen.
Dorpat Univ., Dissertation
- Stobo, J.D. (1988):
Lymphocytes: development and function.
In: Gallin, J.I., Goldstein, I.M., Snyderman, R., editors. Inflammation: basic principles and clinical correlates. New York: Raven Press Ltd
- Stockert, J.C., Trigosos, C.I., Tato, A., Ferrer, J.M. (1993):
Electron microscopical morphology of cytoplasmic granules from horse eosinophil leucocytes.
Z Naturforsch; 48: 669-671
- Stockham, S.L., Scott, M.A. (2002)
Leukocytes. Fundamentals of veterinary clinical pathology.
1st edition. Ames (IA): Iowa State Press; p.49-83
- Stormont C., Suzuki Y. (1964):
Genetic systems of blood groups in horses.
Genetics; 50:915-929
- Stormont C., Suzuki Y., Rhode E. A. (1964):
Serology of the horse blood groups.
Cornell Vet., 54: 439-452

- Stormont, C., Suzuki, Y. (1963):
Genetic control of albumin phenotypes in horses.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114, 673
- Stormont, C., Suzuki, Y. (1964):
Genetic systems of bloodgroups in horses.
Genetics 50, 915
- Stormont, C., Suzuki, Y., Rhode, E.A. (1963):
Studies of equine bloodgroups.
Proc. XI th Congr. Genetics Den Haag
- Stormont, C., Suzuki, Y., Rhode, E.A. (1964):
Serology of horse blood groups.
Cornell Vet. 54; 439
- Summer, J.B., Howell, S.F. (1936):
The identification of the hemagglutination of the jack bean with concanavalin A.
J Bacteriol 32, 277-237 zit. nach J. Kocourek (1986)
- Tizard, I.R. (2000):
Veterinary Immunology: An Introduction
6th Edition Saunders Philadelphia, PA
- Tizard, I.R. (2000):
Veterinary Immunology: An Introduction,
6th Edition, Saunders, Philadelphia, PA
- Torten, M., Schalm, O.W. (1964):
Influence of the equine spleen on rapid changes in the concentration of erythrocytes in peripheral blood.
Am J Vet Res; 25: 500-504
- Traub-Dargatz JL, McClure JJ, Koch C, Schlipf JW Jr. (1995):
Neonatal isoerythrolysis in mule foals.
J Vet M assoc; 206:67-70
- Traub-Dargatz, J., McClure, J.J., Koch, C. et al (1995):
Neonatal isoerythrolysis in a mule foal.
J Am Vet Med Assoc; 206: 67-70
- Tyler, R.D., Cowell, R.L., Clinkenbeard, K.D., et al (1987)
Hematologic values in horses and interpretation of hematologic data.
Vet. Clin. North. Am: Equine Practice, 3: 461

Umlauf, C. (2004):

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen equine Leukozyten.
Dissertation, Vetmed Fakultät der Universität München

Watanabe, Y. (1964):

The fine structure of leucocyte

Compendium of Hematology I, Ed. Amano, S. & Hibino, S., 1 ed. 327, Tokyo:
Maruzen

Wong P.L., Nickel L.S., Bowling A.T., Steffey E.P. (1986):

Clinical survey of anti-red blood cell antibodies in horses after homologous blood transfusion.

Am J Vet Res; 47:2566-2571

Wu, M.J., Feldman, B.F., Zinkl, J.G. et al (1983):

Using red blood cell creatinin concentration to evaluate the equine erythropoietic response

Am J Vet Res; 44: 1427-1432

Würsch A. (1972):

Blutgruppen beim Freiburger Pferd.

Dissertation

Yamaguchi, M., Hirai, K., Morita, Y., Takaishi, T., Otha, K., Suzuki, S., Motoyoshi, K., Kawanami, O., Ito, K. (1992):

Hemopoietic growth factors regulate the survival of human basophils in vivo.

Int Arch Allerg Immunol; 97: 322-329

Young, K.M. (2005):

Eosinophils.

In: Schalm`s Veterinary Hematology. 5th ed: Lippincott Williams&Wilkins; 297-307

Zwahlen, R.D., Spreng, D., Wyder-Walther, M. (1994):

In vitro and in vivo activity of human interleukin 8 in dogs.

Vet Pathol; 31: 61-66

IX Anhang

1. Verzeichnis der Gebrauchslösungen

Lichtmikroskopie

<i>Giemsa- Lösung:</i>	Giemsa- Stammlösung ¹	0,3ml
	Aqua dest.	ad 10ml

Elektronenmikroskopie

Bleicitratlösung nach Reynolds:

Natriumcitrat Stock:	Natriumcitrat $\text{Na}_2(\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7)\text{x}2\text{H}_2\text{O}^1$	35,7g
	Aqua dest.	ad 100ml
Bleinitrat Stock:	Bleinitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2^1$	33,1g
	Aqua dest.	ad 100ml
Bleicitrat- Lösung:	Aqua dest.	16ml
	Natriumcitrat- Stock	3ml
	Bleinitrat- Stock	2ml
	NaOH, 1M ¹	4ml
	Aqua dest.	ad 100ml

Cacodylat- Puffer:

Lösung A:	Cacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{x}3\text{H}_2\text{O}^2$	8,56g
	Aqua dest.	ad 200ml
Lösung B:	HCl, 0,2M ¹	
Cacodylat- 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 ³	16ml
DDSA ³	10ml
NMA ³	9ml
DMP-3O ³	0,3-0,5ml

Fixierlösung nach Karnovsky

10% Paraformaldehyd- Lösung		
10% Paraformaldehyd- Lösung ¹	10g	
Aqua dest.	ad 100ml	
NaOH, 0,1M ¹	bis zu 6Tropfen	
Karnovsky- Stammlösung		
Paraformaldehyd- Lösung	20ml	
Cacodylat- Puffer, 0,2M	50ml	
Kalziumchlorid, wasserfrei ⁴	0,05g	
Karnovsky- Gebrauchslösung		
Karnovsky- Stammlösung	10ml	
Glutaraldehyd, 2,5%	1037ml	

Kontrastierungslösung

Osmiumtetroxid- Lösung, 3%		
Osmiumtetroxid, 4%ig ³	2ml	
Cacodylat- Puffer, 0,1M	2ml	
Kaliumferrocyanid- Lösung, 3%		
Kaliumferrocyanid ⁵	0,3g	
Cacodylat- Puffer, 0,1M	ad 10ml	
Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%) in Cacodylatpuffer, 0,1M		
Osmiumtetroxid- Lösung, 2%	4ml	
Kaliumferrocyanid- Lösung, 3%	4ml	

Glykohistochemie*PBS- Puffer, pH 7,4*

NaCl ¹	42,50g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O ¹	6,35g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O ¹	1,95g
Aqua dest.	ad 5,0L

¹MERCK, Darmstadt²AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England³POLYSCIENCES INC, Warrington, USA⁴SERVA, Heidelberg⁵SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen⁶AGAR-AIDS, Essex, England⁷ROTH, Karlsruhe

2. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zusammensetzung des Blutes	4
Abbildung 2: Entwicklung verschiedener Blutzellen	10
Abbildung 3: Lymphozyten	26
Abbildung 4: Funktionen der Makrophagen	28
Abbildung 5: Flussdiagramm Immunhistochemie	54
Abbildung 6: Segmentierter Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten (Kjàni)	61
Abbildung 7: Neutrophile Granulozyten (Lady)	61
Abbildung 8: Stabkerniger Neutrophiler Granulozyt (Fjalli)	62
Abbildung 9: Segmentierter neutrophiler Granulozyt (Fjalli)	62
Abbildung 10: Neutrophiler Granulozyt (Lady)	63
Abbildung 11: Eosinophiler Granulozyt (Skålm)	64
Abbildung 12: Eosinophiler Granulozyt (Skålm)	64
Abbildung 13: Lymphozyt (Trölli)	66
Abbildung 14: Lymphozyt (Vindstjarni)	66
Abbildung 15: Monozyt (Katla)	68
Abbildung 16: Monozyt (Vindstjarni)	68
Abbildung 17: Semidünnschnitt	69
Abbildung 18: Thrombozyten (Tjörvi)	70
Abbildung 19: Thrombozyt (Tjörvi)	71
Abbildung 20: Segmentierter neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt (Tjörvi)	73
Abbildung 21: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Kjàni)	74

Abbildung 22: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten (Kjàni)	75
Abbildung 23: Segmentierter neutrophiler Granulozyt und Lymphozyten (Tjörvi)	76
Abbildung 24: Eosinophiler Granulozyt (Tjörvi)	78
Abbildung 25: Lymphozyt (Trausti)	80
Abbildung 26: Lymphozyt (Trausti)	81
Abbildung 27: Lymphozyt und Thrombozyten (Tjörvi)	82
Abbildung 28: Monozyt (Tjörvi)	84
Abbildung 29: Erythrozyten (Brellir, ConA-FITC)	87
Abbildung 30: Eosinophiler Granulozyt (Mökkur, ConA-FITC)	87
Abbildung 31: Neutrophiler Granulozyt mit Thrombozyten (Brellir, ConA- FITC)	88
Abbildung 32: Lymphozyt mit Thrombozyten (Fönix, ConA-FICT)	88
Abbildung 33: Lymphozyt mit Thrombozyten (Vindstjarni, LCA-FITC)	91
Abbildung 34: Neutrophiler Granulozyt (Fönix, LCA-FITC)	91
Abbildung 35: Neutrophiler Granulozyt (Kjàni, PSA-FITC)	94
Abbildung 36: Erythrozyten und Thrombozyten (Isenburg, PSA-FITC)	94
Abbildung 37: Eosinophiler Granulozyt und Erythrozyten (Mökkur, PSA-FITC)	95
Abbildung 38: Lymphozyt (Lady, GSL-FITC)	98
Abbildung 39: Segmentierter Neutrophiler Granulozyt (Skàlm, GSL-FITC)	98
Abbildung 40: Eosinophiler Granulozyt (Gàski, PNA-FITC)	101
Abbildung 41: Lymphozyt (Vindstjarni, PNA-FITC)	101
Abbildung 42: Segmentierter neutrophiler Granulozyt (Stigandi, RCA-FITC)	104
Abbildung 43: Lymphozyt (Lady, RCA-FITC)	104

Abbildung 44: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt (Katla, VAA-FITC)	107
Abbildung 45: Segmentierter Neutrophiler Granulozyt (Katla, VAA-FITC)	107
Abbildung 46: Lymphozyt (Brellir, VAA-FITC)	108
Abbildung 47: Erythrozyten und Thrombozyten (Mökkur, WGA-FITC)	110
Abbildung 48: Neutrophiler Granulozyt (Fönix, WGA-FITC)	110
Abbildung 49: Lymphozyt (Brellir, WGAs-FITC)	113
Abbildung 50: Neutrophiler Granulozyt (Katla, WGAs-FITC)	113
Abbildung 51: Eosinophiler Granulozyt (Skålm, WGAs-FITC)	114
Abbildung 52: Eosinophiler Granulozyt (Gàski, DBA-FITC)	116
Abbildung 53: Neutrophiler Granulozyt (Trausti, DBA-FITC)	116
Abbildung 54: Eosinophiler Granulozyt (Gàski, SBA-FITC)	119
Abbildung 55: Lymphozyten und Thrombozyten (Isenburg, SBA-FITC)	119
Abbildung 56: Neutrophiler Granulozyt (Skålm, SJA-FITC)	122
Abbildung 57: Eosinophiler Granulozyt (Frechdachs, SJA-FITC)	122
Abbildung 58: Eosinophiler Granulozyt (Skålm, UEA-1-FITC)	125
Abbildung 59: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten	125
Abbildung 60: Lymphozyt (Tjörvi, MAA-FITC)	128
Abbildung 61: Neutrophiler Granulozyt (Trausti, MAA-FITC)	128
Abbildung 62: Erythrozyten und Thrombozyt (Katla, SNA-FITC)	131
Abbildung 63: Neutrophiler Granulozyt (Kjàni, SNA-FITC)	131
Abbildung 64: Lymphozyt (Katla, SNA-FITC)	132
Abbildung 65: Lymphozyten (Gàski, PHA-E-FITC)	134
Abbildung 66: Eosinophiler Granulozyt (Stigandi, PHA-E-FITC)	134
Abbildung 67: Erythrozyten und Thrombozyt (Trausti, PHA-L-FITC)	137

Abbildung 68: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt (Nökkvi, PHA-L-FITC)	137
Abbildung 69: Lymphozyt und Thrombozyten (Stigandi, PHA-L-FITC)	138
Abbildung 70: Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt und Thrombozyten	138
Abbildung 71: B-Lymphozyten, Antikörper 1-19, Gina	140
Abbildung 72: Neutrophile Granulozyten, Antikörper 1-19, Felix	140
Abbildung 73: B-Lymphozyt, Antikörper 2-52, Karri	141
Abbildung 74: B-Lymphozyt, Antikörper 2-52, Karri	141

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Physiologische Werte des roten Blutbildes beim erwachsenen Pferd (Kramer, 2005)	7
Tabelle 2:	Physiologische Werte des weißen Blutbildes beim erwachsenen Pferd (Kramer, 2005)	7
Tabelle 3:	Weißes Blutbild des gesunden Pferdes (nach Schäfer, 2005)	13
Tabelle 4:	Einige Inhaltsstoffe primärer und sekundärer Granula (Smith, 2000)	15
Tabelle 5:	Wichtigste Eigenschaften von Mastzellen und basophilen Granulozyten (Scott und Stockham, 2000)	18
Tabelle 6:	Zytochemische Eigenschaften der Monozyten (Grindem et al., 1986; Jain, 1986; Douglas und Ho, 1995)	20
Tabelle 7:	Lokalisation und Bezeichnung der Makrophagen	26
Tabelle 8:	Einteilung nach Goldstein und Poretz (1986)	32
Tabelle 9:	Einteilung der Lektine der Säugetiere (nach Gabius, 1997)	33
Tabelle 10:	Auszug der Ergebnisse des First International Workshop on Equine Leucocyte Antigens (Lunn et al., 1993):	37
Tabelle 11:	Nomenklatur der Blutgruppen nach Podliachouk und Hesselholt, 1962:	40
Tabelle 12:	Übersicht über die für die lichtmikroskopischen und glykohistochemischen Untersuchungen verwendeten Pferde	41
Tabelle 13:	Übersicht über die für die Immunzytochemie verwendeten Pferde	43
Tabelle 14:	FITC markierte Lektine	48
Tabelle 15:	Hemmwasser	51
Tabelle 16:	Biotinylierte Lektine	52

Tabelle 17:	Übersicht über die Blutbilder der untersuchten Pferde	56
Tabelle 18:	Lichtmikroskopische Übersichtsfärbungen	59
Tabelle 19:	Auswertung der Bindung von Concanavalia Agglutinin	86
Tabelle 20:	Auswertung der Bindung von Lens culinaris Agglutinin	90
Tabelle 21:	Auswertung der Bindung von Pisum sativum Agglutinin	93
Tabelle 22:	Auswertung der Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin	97
Tabelle 23:	Auswertung der Bindung von Peanut Agglutinin	100
Tabelle 24:	Auswertung der Bindung von Ricinus communis Agglutinin	103
Tabelle 25:	Auswertung der Bindung von Viscum album Agglutinin	106
Tabelle 26:	Auswertung der Bindung von Wheat germ Agglutinin	109
Tabelle 27:	Auswertung der Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert	112
Tabelle 28:	Auswertung der Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin	115
Tabelle 29:	Auswertung der Bindung von Soybean Agglutinin	118
Tabelle 30:	Auswertung der Bindung von Sophora japonica Agglutinin	121
Tabelle 31:	Auswertung der Bindung von Ulex europaeus Agglutinin-1	124
Tabelle 32:	Auswertung der Bindung von Maackia amurensis Agglutinin	127
Tabelle 33:	Auswertung der Bindung von Sambucus nigra Agglutinin	130
Tabelle 34:	Auswertung der Bindung von Phaseolus vulgaris E	133
Tabelle 35:	Auswertung der Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin	136

4. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Dr. Fred Sinowatz für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und die allzeit äußerst freundliche Unterstützung. Es war mir eine große Ehre und Freude unter seiner Aufsicht diese Doktorarbeit anzufertigen.

Ganz besonders danken möchte ich auch Frau Christine Neumüller, die immer ein offenes Ohr für alle meine Probleme hatte und mich stets gut gelaunt unterstützte. Ebenso danken möchte ich den anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tieranatomie II für ihre Hilfe.

Bei Herrn Professor Dr. Göbel vom Institut für Tierphysiologie, physiologische Chemie und Tierernährung möchte ich mich herzlichst für die Bereitstellung der Antikörper bedanken.

Ein großes Dankeschön auch an alle Pferdebesitzer, die mir ihre Pferde für die Blutentnahme zur Verfügung gestellt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Joachim Keppler, der mir eine sehr große Hilfe bei allen Problemen rund um den Computer war.

Allen meinen Freunden, vor allem Margret Keppler und Christina Wimmer möchte ich für die unermüdliche Unterstützung und Aufheiterung danken.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen dafür danken, dass sie immer für mich da sind und mir in jeder Situation eine unschätzbar große Hilfe sind.