

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

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

**Ultrastrukturelle, enzymhistochemische, immunhistochemische und
glykohistochemische Untersuchungen am Blut des Kaninchens
(*Oryctolagus cuniculus*)**

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

Vorgelegt von Katharina Maria Merten aus Duderstadt

München, 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz
2. Korreferenten:
 - Univ.-Prof. Dr. Gabius
 - Univ.-Prof. Dr. Straubinger
 - Priv.-Doz. Dr. Wess
 - Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 30.07.2011

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... I-III

1 EINLEITUNG 1

2 LITERATURÜBERSICHT 2

2.1 ALLGEMEINES ZUM BLUT DES KANINCHENS 2

2.1.1 *Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes* 2

2.1.2 *Hämatopoese* 3

2.1.3 *Spezielle Hämatologie des Kaninchens*..... 7

2.2 CHARAKTERISIERUNG DER BLUTZELLEN DES KANINCHENS 10

2.2.1 *Erythrozyten*..... 10

2.2.1.1 Allgemeines 10

2.2.1.2 Bildung 10

2.2.1.3 Morphologie..... 12

2.2.1.4 Histochemische Eigenschaften 15

2.2.1.5 Aufgaben 15

2.2.2 *Thrombozyten*..... 16

2.2.2.1 Allgemeines 16

2.2.2.2 Bildung 16

2.2.2.3 Morphologie..... 17

2.2.2.4 Histochemische Eigenschaften 22

2.2.2.5 Aufgaben 23

2.2.3 *Lymphozyten*..... 24

2.2.3.1 Allgemeines 24

2.2.3.2 Bildung 25

2.2.3.3 Morphologie..... 26

2.2.3.4 Histochemische Eigenschaften 28

2.2.3.5 Aufgaben 28

2.2.4 *Monozyten*..... 29

2.2.4.1 Allgemeines 29

2.2.4.2 Bildung 29

2.2.4.3 Morphologie..... 30

2.2.4.4 Histochemische Eigenschaften 31

2.2.4.5 Aufgaben 33

2.2.5 *Neutrophile Granulozyten* 33

2.2.5.1 Allgemeines 33

2.2.5.2 Bildung 34

2.2.5.3 Morphologie..... 36

2.2.5.4 Histochemische Eigenschaften 39

2.2.5.5 Aufgaben 41

2.2.6 *Eosinophile Granulozyten* 43

2.2.6.1 Allgemeines 43

2.2.6.2 Bildung 43

2.2.6.3 Morphologie..... 44

2.2.6.4 Histochemische Eigenschaften 46

2.2.6.5 Aufgaben 47

2.2.7 *Basophile Granulozyten*..... 48

2.2.7.1 Allgemeines 48

2.2.7.2 Bildung 48

2.2.7.3 Morphologie..... 49

2.2.7.4 Histochemische Eigenschaften 51

2.2.7.5 Aufgaben 52

2.3 HISTOCHEMIE 54

2.3.1 *Entstehung und Definition* 54

2.3.2 *Klassifikation der histochemischen Methoden* 54

2.3.3	<i>Enzymhistochemie</i>	55
2.3.3.1	Definition und Anwendung	55
2.3.3.2	Technik der Enzymhistochemie.....	55
2.3.3.3	Charakterisierung in der Arbeit nachgewiesener Enzyme	57
2.3.4	<i>Glykohistochemie</i>	60
2.3.4.1	Definition, Anwendung und Technik	60
2.3.4.2	Lektine aus Pflanzen – Struktur, Einteilung und Funktion.....	61
2.3.4.3	Zuckerstrukturen auf den Blutzellen des Kaninchens	65
2.3.4.4	Lektinbindungsstellen der Blutzellen des Kaninchens.....	66
2.3.5	<i>Immunhistochemie</i>	69
2.3.5.1	Definition und Anwendung	69
2.3.5.2	Technik der Immunhistochemie.....	69
2.3.5.3	Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten	71
2.4	BLUTGRUPPEN BEIM KANINCHEN	74
2.4.1	<i>Allgemeines</i>	74
2.4.2	<i>Die Blutgruppen des Kaninchens</i>	74
2.4.3	<i>Bedeutung der Blutgruppen des Kaninchens</i>	76
3	MATERIAL UND METHODEN	77
3.1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	77
3.2	KONVENTIONELLE LICHTMIKROSKOPISCHE FÄRBUNGEN	79
3.2.1	<i>Diff-Quick-Färbung</i>	79
3.2.2	<i>Giemsa-Färbung</i>	80
3.2.3	<i>Färbung nach May-Grünwald</i>	81
3.2.4	<i>Panoptische Färbung nach Pappenheim</i>	81
3.2.5	<i>H.E.-Färbung</i>	82
3.2.6	<i>Färbung der eosinophilen Granulozyten mit Sirius Red</i>	83
3.2.7	<i>Toluidinblaufärbung der basophilen Granulozyten nach Undritz</i>	83
3.2.8	<i>Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)</i>	84
3.2.9	<i>Alcianblaufärbung zum Nachweis saurer und sulfatierter Mukosubstanzen</i>	85
3.3	ELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	87
3.4	ENZYMISTOCHEMIE.....	89
3.4.1	<i>Nachweis der Peroxidase</i>	89
3.4.2	<i>Nachweis der alkalischen Phosphatase</i>	90
3.4.3	<i>Nachweis der sauren Phosphatase</i>	91
3.4.4	<i>Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase nach Löffler (1961)</i>	92
3.4.5	<i>Nachweis der α-Naphthyl-Acetat-Esterase nach Löffler (1961)</i>	93
3.4.6	<i>Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase modifiziert nach Moloney et al. (1960)</i>	95
3.4.7	<i>Nachweis der β-Glucuronidase modifiziert nach Lojda et al. (1979)</i>	96
3.5	GLYKOHISTOCHEMIE	98
3.5.1	<i>FITC markierte Lektine</i>	98
3.5.2	<i>Inhibition mit Hemmzuckern</i>	100
3.5.3	<i>Vorbehandlung mit Neuraminidase</i>	100
3.5.4	<i>Biotinylierte Lektine</i>	102
3.5.5	<i>Galektine</i>	103
3.6	IMMUNHISTOCHEMIE UND HISTOCHEMIE.....	104
3.6.1	<i>Immunhistochemische Untersuchung der Blutzellen</i>	104
3.6.2	<i>Immunhistochemische und histochemische Untersuchungen des Zytoskeletts</i>	105
3.6.2.1	Histochemischer Nachweis von Mikrofilamenten.....	105
3.6.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Intermediärfilamenten	105
3.6.2.3	Immunhistochemischer Nachweis von Mikrotubuli.....	106
3.6.2.4	Doppelfärbungen des Zytoskeletts	107
4	ERGEBNISSE	108
4.1	LABORDIAGNOSTIK	108
4.2	KONVENTIONELLE LICHTMIKROSKOPISCHE FÄRBUNGEN	116
4.2.1	<i>Übersichtsfärbungen</i>	116
4.2.1.1	Erythrozyten.....	116

4.2.1.2	Thrombozyten	118
4.2.1.3	Lymphozyten	119
4.2.1.4	Monozyten	120
4.2.1.5	Neutrophile Granulozyten	122
4.2.1.6	Eosinophile Granulozyten	124
4.2.1.7	Basophile Granulozyten	126
4.2.2	<i>Färbung der eosinophilen Granulozyten mit Sirius Red</i>	128
4.2.3	<i>Toluidinblaufärbung der basophilen Granulozyten nach Undritz</i>	129
4.2.4	<i>Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)</i>	129
4.2.5	<i>Alcianblaufärbung zum Nachweis saurer und sulfatierter Mukosubstanzen</i>	130
4.3	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	133
4.3.1	<i>Erythrozyten</i>	133
4.3.2	<i>Thrombozyten</i>	135
4.3.3	<i>Lymphozyten</i>	137
4.3.4	<i>Monozyten</i>	140
4.3.5	<i>Neutrophile Granulozyten</i>	143
4.3.6	<i>Eosinophile Granulozyten</i>	146
4.4	ENZYMISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	148
4.4.1	<i>Nachweis der Peroxidase</i>	148
4.4.2	<i>Nachweis der sauren Phosphatase</i>	149
4.4.3	<i>Nachweis der alkalischen Phosphatase</i>	152
4.4.4	<i>Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase nach Löffler (1961)</i>	153
4.4.5	<i>Nachweis der α-Naphthyl-Acetat-Esterase nach Löffler (1961)</i>	155
4.4.6	<i>Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase nach Moloney u. Mitarbeiter (1960)</i>	157
4.4.7	<i>Nachweis der β-Glucuronidase</i>	159
4.5	GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	161
4.5.1	<i>Glukose- und Mannose-spezifische Lektine</i>	161
4.5.1.1	Bindung von Concanavalin Agglutinin	161
4.5.1.2	Bindung von Lens culinaris Agglutinin	165
4.5.1.3	Bindung von Pisum sativum agglutinin	169
4.5.2	<i>Galaktose-spezifische Lektine</i>	173
4.5.2.1	Bindung von Peanut Agglutinin	173
4.5.2.2	Bindung von Ricinus communis Agglutinin	173
4.5.2.3	Bindung von Sambucus nigra Agglutinin	173
4.5.2.4	Bindung von Viscum album Agglutinin	176
4.5.3	<i>N-Acetylglukosamin-spezifische Lektine</i>	178
4.5.3.1	Bindung von Wheat germ Agglutinin	178
4.5.3.2	Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert	183
4.5.4	<i>N-Acetylgalaktosamin-spezifische Lektine</i>	187
4.5.4.1	Bindung von Griffonia simplicifolia I Agglutinin	187
4.5.4.2	Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin	190
4.5.4.3	Bindung von Soybean Agglutinin	190
4.5.4.4	Bindung von Sophora japonica Agglutinin	190
4.5.5	<i>Fukose-spezifische Lektine</i>	190
4.5.5.1	Bindung von Ulex europaeus I Agglutinin	190
4.5.6	<i>Für komplexe Kohlenhydrate spezifische Lektine</i>	190
4.5.6.1	Bindung von Maackia amurensis I Agglutinin	190
4.5.6.2	Bindung von Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuko	193
4.5.6.3	Bindung von Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro	196
4.5.7	<i>Bindung von Galektinen</i>	198
4.5.7.1	Bindung von Galektin-1	198
4.5.7.2	Bindung von Galektin-8	200
4.5.8	<i>Inhibition mit Hemmzuckern</i>	203
4.5.9	<i>Vorbehandlung mit Neuraminidase</i>	203
4.6	IMMUNHISTOCHEMISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	206
4.6.1	<i>Immunhistochemischer Nachweis von spezifischen Antigenen der Lymphozyten und basophilen Granulozyten</i>	206
4.6.2	<i>Immunhistochemischer und histochemischer Nachweis zytoskelettaler Elemente</i>	209
4.6.2.1	Histochemischer Nachweis von F-Aktin	209
4.6.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin	211

4.6.2.3	Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin.....	214
4.6.2.4	Doppelfärbung von Aktin und Vimentin.....	216
4.6.2.5	Doppelfärbung von Aktin und Tubulin	218
5	DISKUSSION	222
5.1	BLUTPROBEN.....	222
5.2	LICHTMIKROSKOPIE.....	223
5.3	ELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	232
5.4	ENZYMISTOCHEMIE.....	238
5.5	GLYKOHISTOCHEMIE	244
5.6	IMMUNHISTOCHEMIE UND HISTOCHEMIE.....	250
5.6.1	<i>Immunhistochemischer Nachweis von spezifischen Antigenen der Lymphozyten und basophilen Granulozyten.....</i>	<i>250</i>
5.6.2	<i>Immunhistochemischer und histochemischer Nachweis zytoskelettaler Elemente.....</i>	<i>252</i>
6	ZUSAMMENFASSUNG	258
7	SUMMARY	261
A.	VERZEICHNIS DER GEBRAUCHSLÖSUNGEN	263
B.	ÜBERSICHT DER LABORWERTE VON KANINCHEN IN DER LITERATUR	270
C.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	272
D.	TABELLENVERZEICHNIS.....	274
E.	LITERATURVERZEICHNIS.....	276
F.	DANKSAGUNG.....	291

Abkürzungsverzeichnis

A	Anisozytose	CFU-M	colony forming unit monocyte
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase	CFU-MK	colony forming unit megakaryocyte
ADP	Adenosindiphosphat	CFU-NEU	colony forming unit neutrophil
Ag	Agglutination	CFU-S	colony-forming-unit spleen/pluripotente Stammzelle
αG	α-Granula	CFU-T	colony forming unit T-lymphocyte
AGE	advanced glycation ends	Cl	Chlor
AIP-1	ASK-interacting protein 1	Co	Kobalt
Ak	Akanthozyt	Con A	Concanavalin Agglutinin
ALT	Alanin-Aminotransferase	CRD	carbohydrate recognition domain
AN	Aktinnetzwerk	CREA	Kreatinin
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-alkalische-Phosphatase	CSF	Stammzellfaktor
Aq. dem.	Aqua demineralisata	CSF-Meg	colony stimulating factor megakaryocyte
Aqua dest.	Aqua destillata	Cu	Kupfer
AS-D	3-Hydroxy-2'-methyl-2-naphthanilidin	D	Degranulation
ATP	Adenosintriphosphat	Da	Dalton
ATPase	Adenosintriphosphatase	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ba	Barium	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Bas	Basophiler Granulozyt	DAS	Datura stramonium Agglutinin
BAS I	absolute Anzahl basophiler Granulozyten	DB	dense bodies
BAS II	prozentualer Anteil basophiler Granulozyten	DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
bcl-2	integrales Membranprotein	Dm	Doppelmembran
BFU	burst forming unit	Dp	Diaphragma pori
BFU-E	burst forming unit erythrocyte	DTS	dense tubular system
BFU-MK	burst forming unit megakaryocyte	εBP	IgE-binding protein
BHL	N-butanoyl-L-homoserine lactone	Ec	Echinozyt
BPI	bacterial permeability-inducing protein	EC	Euchromatin
C	Chromatin	ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
C3b	Komplementfaktor	ECGF	endothelial growth factor
C4.4a	GPI-linked glycoprotein	ECP	eosinophiles kationisches Protein
Ca	Calcium	EDN	eosinophil-derived neurotoxin
CA 125	carbohydrate antigen 125	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	eG	eosinophile Granula
CAP18	cationic antibacterial protein 18	EGF	epidermal growth factor
CBP-35	carbohydrate binding protein 35	EK	Einschlusskörperchen
CD	cluster of differentiation	Eo	Eosinophiler Granulozyt
CEA	Carcinoembryonales Antigen	EO I	absolute Anzahl eosinophiler Granulozyten
CFU	colony forming unit	EO II	prozentualer Anteil eosinophiler Granulozyten
CFU-B	colony forming unit B-lymphocyte	EPO	eosinophile Peroxidase
CFU-BAS	colony forming unit basophil	ER	endoplasmatisches Retikulum
CFU-E	colony forming unit erythrocyte	ERY	Erythrozyten
CFU-EOS	colony forming unit eosinophil	esG	sekundäre Granula mit extrahiertem Inhalt
CFU-GM	colony forming unit granulocyte monocyte	f	filamentös
CFU-L	colony forming unit lymphocyte	F	Fluoreszenz

Fc	fragment crystallized	hRNPQ	human regulatory protein Q
fgRP	feine, granuläre Reaktionsprodukte	HSC	hematopoietic stem cell
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	HSP	heat shock protein
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin	HT	Heimtier
fRP	flächige Reaktionsprodukte	IFN- γ	Interferon γ
Fuc	Fukose	Ig	Immunglobulin
G	Granula	IL	Interleukin
GA	Golgi-Apparat	K	Kalium
Gal	Galaktose	kDa	kilo-Dalton
Gal-1	Galektin-1	Ke	Keratozyt
Gal-3 fl	Galektin-3 full length	K-Ras	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral onogene homolog
Gal-3 tr	Galektin-3 truncated	L-1	Transmembranprotein der L1- Proteinfamilie
Gal-8	Galektin-8	L-14	ribosomales Protein L-14
Gal-9	Galektin-9	L-29	ribosomales Protein L-29
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin	Lamp-1	lysosomal associated membrane protein 1
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor	LCA	Lens culinaris Agglutinin
GEMM	Vorläuferzelle für Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten, Megakaryozyten	LEU	Leukozytenanzahl
GEMML	Progenitorzelle für Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten, Monozyten und Lymphozyten	IsG	längliche sekundäre Granula
ggRP	große, granuläre Reaktionsprodukte	LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
GI	Glykogen	LTB4	Leukotrien B4
Glc/GLC	Glukose	Ly/LY	Lymphozyt
GlcNAc	N-Acetylglukosamin	LY I	Absolute Anzahl der Lymphozyten
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase	LY II	Prozentualer Anteil der Lymphozyten
GM	Vorläuferzelle für Granulozyten und Monozyten	Lyp	primäre Lysosomen
GM1	monosialotetrahexosylganglioside	Lys	sekundäre Lysosomen
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony-stimulating factor	m	männlich
Gr	Granulomer	M	Mitochondrien
gr	granulär	MAA	Maackia amurensis Agglutinin
GRAN	Granulozyt	Mac-2	macrophage galactose-specific lectin-2
GRIFIN	galectin related inter fiber protein	MAG	myelin-associated glycoprotein
gRP	granuläre Reaktionsprodukte	Man	Mannose
GSL-1	Griffonia simplicifolia I Agglutinin	MBP	major basic protein
GTP	Guanosintriphosphat	MCH	mean corpuscular hemoglobin
GTPase	Guanosintriphosphatase	MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
H	Hyalomer	M-CSF	monocyte-specific colony stimulating factor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	MCV	mean corpuscular volume
HA	Aktin im Hyalomer	Min.	Minuten
HB	Hämoglobin	Mg	Magnesium
HC	Heterochromatin	MHC	major histocompatibility complex
HCl	Kochsalz	mk	männlich kastriert
H.E.	Hämalaun-Eosin	Mm	Membran
His	Histidin	Mn	Mangan
HKT	Hämatokrit	Mne	Membrana nuclearis externa
HLA	human leukocyte antigen	Mni	Membrana nuclearis interna
H-Ras	transforming protein 21 (GTPase)	Mon	Monozyt
		MON I	absolute Anzahl der Monozyten
		MON II	prozentualer Anteil der Monozyten

MP20	intrinsic membrane protein	RNA	Ribonukleinsäure
MPS	mononukleäres Phagozytensystem	RP	Reaktionsprodukt
mRNA	messenger ribonucleic acid	RPTPβ	receptor-type protein-tyrosine phosphatase
mSufu	mouse suppressor of fused	S	Sphärozyt
MT	Masttier	SBA	Soybean Agglutinin
Mt	Mikrotubulus	Sek.	Sekunden
MUC1-D	Human mucin 1 D	sG	sekundäre Granula
N	Normoblast	SJA	Sophora japonica Agglutinin
Na	Natrium	SNA	Sambucus nigra Agglutinin
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat	Spn	Spatium perinucleare
Neu	Neutrophiler Granulozyt	St	Stomatozyt
NEU I	absolute Anzahl neutrophiler Granulozyten	Std.	Stunde/Stunden
NEU II	prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten	SWC	swine workshop cluster
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure	TCR	T-Zell-Rezeptor
NG2	type 1 transmembrane protein	tG	tertiäre Granula
NM	Neuraminidase	TGF-β	β-transforming growth factor
NP	neutrophil peptide	THR	Thrombozyten
NUC	Nukleolus	Thr	Thrombozyt
OCA-B	B-cell specific transcription coactivator	Thy-1	CD 90
OCS	open canalicular system	Tim-3	T-helper type 1 specific cell-surface molecule
PA	Aktin in den Pseudopodien	TNFα	Tumornekrosefaktor α
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor	TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase	TTF-1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
PAS	periodic-acid-Schiff	UEA-1	Ulex europaeus I Agglutinin
PA-TCH-SP	periodic-acid-thiocarbohydrazid-silver proteinate	uG	unreife Granula
Pb	Blei	UREA	Harnstoff
PBS	phosphate buffered saline	UTP	Uridintriphosphat
Pcip	immunomodulatory protein	V	Vakuole
PDGF	platelet derived growth factor	v	violett
pG	primäre Granula	VAA	Viscum album Agglutinin
PHA-E	Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro	w	weiblich
PHA-L	Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuco	WGA	Wheat germ Agglutinin
PIAS1	Proteinligase	WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
PNA	Peanut Agglutinin	wk	weiblich kastriert
PP-13	Plazentaprotein 13	Z	Zisternen
Pr	Polyribosomen	Za	Zytoplasmaausläufer
Ps	Pseudopodien	Zika	Zimmermann-Kaninchen
PSA	Pisum sativum Agglutinin	ZK	Zellkern
R	Retikulozyt	ZM	Zellmembran
r	rot	Zn	Zink
RCA	Ricinus communis Agglutinin	ZP	Zytoplasma
rER	raues endoplasmatisches Retikulum		
RET I	absolute Anzahl der Retikulozyten		
RET II	prozentualer Anteil der Retikulozyten		
rG	reife Granula		
Rh	Rhesus		
Ri	Ribosomen		
rl	rotlila		

Kapitel 1

1 EINLEITUNG

Das domestizierte Kaninchen stammt vom europäischen Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) ab und gehört zur Ordnung der Hasenartigen (Lagomorpha). Es ist eine in vielen Bereichen sehr gut erforschte Tierart. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurden die Blutzellen des Kaninchens von Paul Ehrlich eingehend untersucht. Schon damals konnte ein Unterschied in der Anfärbung der neutrophilen Granulozyten von Kaninchen und anderen Tierarten beobachtet werden. Um 1900 begann man mit der Blutgruppenforschung des Menschen, der ein Jahr später Untersuchungen der Blutgruppen beim Kaninchen folgten. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts studierten viele Forscher die enzymatischen und ultrastrukturellen Eigenschaften der Blutzellen des Kaninchens. Bis heute werden verschiedene Aspekte der Blutzellen des Kaninchens untersucht. Eine umfassende Darstellung der funktionellen Morphologie der Blutzellen fehlt jedoch. Zudem wurden oft nur einzelne Blutzelltypen, wie z.B. die Thrombozyten oder die neutrophilen Granulozyten genauer betrachtet. Der Grund hierfür ist, dass die Thrombozyten des Kaninchens als gutes Modell für die menschlichen Thrombozyten angesehen werden, und Kaninchen in vielen experimentellen Untersuchungen als Versuchstiere Verwendung finden.

Im Unterschied zu diesen Arbeiten sollten in meiner Arbeit alle Blutzellen des Kaninchens mit modernen morphologischen Verfahren umfassend charakterisiert werden. Um eine kritische Beurteilung der eigenen Untersuchungen und früherer Befunde vornehmen zu können, wurde zusätzlich eine ausführliche Literaturübersicht erstellt. Für den praktischen Teil der Arbeit wurden die am häufigsten verwendeten Übersichtsfärbungen durchgeführt, um zu sehen, ob kommerziell erhältliche Färbekits (Diff-Quick) vergleichbare Ergebnisse wie die wesentlich aufwändigeren konventionellen Färbeprotokolle, wie z.B. die Färbung nach May-Grünwald oder Pappenheim, liefern. Daran schlossen sich zytochemische Methoden zur näheren Charakterisierung der einzelnen Zelltypen an. Eine Darstellung der Ultrastruktur der Blutzellen erfolgte durch transelektronenmikroskopische Untersuchungen. Mittels glykohistochemischer Untersuchungen wurden die Kohlenhydratstrukturen der Blutzellen analysiert. Eine Differenzierung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen und basophiler Granulozyten war durch immunhistochemische Methoden möglich. Weiterhin konnte mit Hilfe von immunhistochemischen Verfahren die Ausbildung des Zytoskeletts bei den verschiedenen Blutzellen demonstriert werden.

Kapitel 2

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Allgemeines zum Blut des Kaninchens

2.1.1 Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes

Die Gesamtblutmenge eines ausgewachsenen Haussäugetieres beträgt 6-8 % seines Körpergewichts (*Kraft et al., 2005*). Nach Gassmann und Lutz (2005b) macht das Blutvolumen ca. $\frac{1}{13}$ der fettfreien Körpermasse eines Tieres aus (*Gassmann und Lutz, 2005b*). Beim Kaninchen sind es 4,5-8,1 % der Körpermasse oder 55-66 ml/kg Körpergewicht (*Hein und Hartmann, 2005; Melillo, 2007*), 55,6-57,3 ml/kg Körpergewicht (*Kozma et al., 1974*) bzw. 55-65 ml/kg Körpergewicht (*Harcourt-Brown, 2008*).

Das Blut ist eine Suspension von freien, korpuskulären Bestandteilen, den Blutzellen, die in einer elektrolythaltigen Proteinlösung, dem Blutplasma, schwimmen (*Mosimann und Kohler, 1990; Sinowatz und Hees, 2000*). Das Blutplasma ist die flüssige Matrix des Blutes. Es besteht zu 90 % aus Wasser und zu 10 % aus gelösten Substanzen und Feststoffen. Diese 10 % entfallen auf gelöste anorganische Ionen, auf Plasmaproteine und auf organische Substanzen. Zusätzlich findet man im Blutplasma auch noch andere Komponenten wie Enzyme, Hormone und Vitamine (*Banks, 1986*). Trennt man das Blutplasma von Gerinnungsproteinen, spricht man von Blutserum (*Mosimann und Kohler, 1990*).

Die zellulären Bestandteile des Blutes sind die Blutzellen. Man unterscheidet hierbei die roten Blutzellen, die Erythrozyten, von den weißen Blutzellen, den Leukozyten, und von den Blutplättchen, den Thrombozyten. Die Leukozyten stellen eine Gruppe von verschiedenen kernhaltigen Zellen dar, zu der die Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten gehören (*Sinowatz und Hees, 2000*).

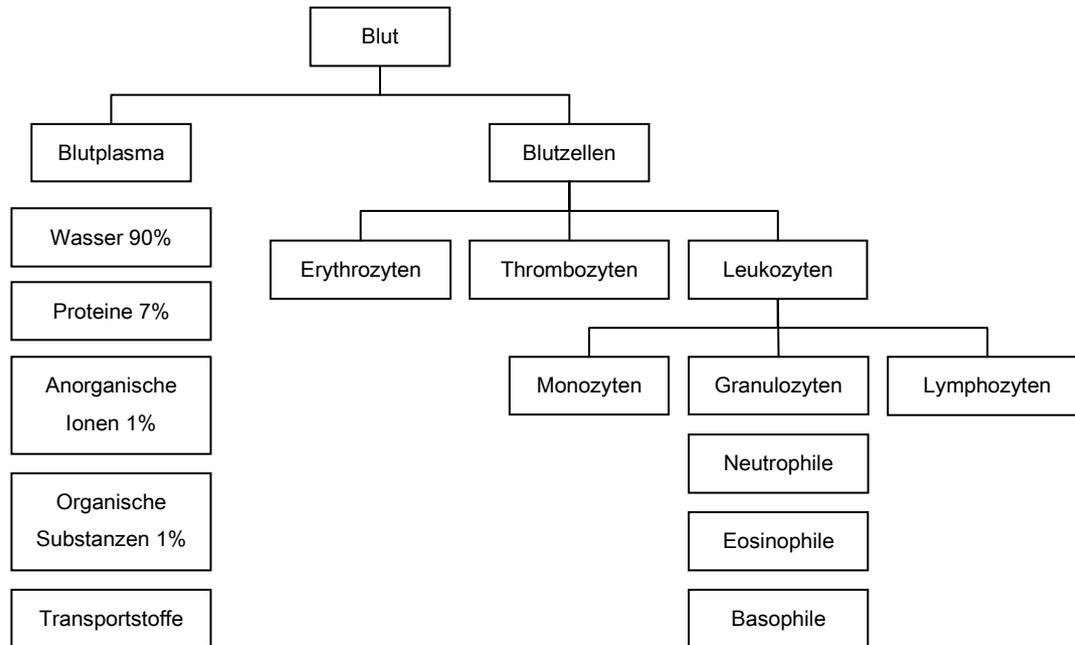


Abbildung 2.1: Zusammensetzung des Blutes

Die Aufgaben des Blutes sind sehr vielfältig. Zum einen ist es ein wichtiges Transportmedium für Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Wasser, Proteine, Fette und Blutzellen. Zum anderen spielt es aber auch eine nicht unerhebliche Rolle bei der Regulation des Wärme- und Säure-Basen-Haushalts (Sinowatz und Hees, 2000; Kraft et al., 2005). Zudem ist es ein wichtiger Bestandteil des körpereigenen Abwehrsystems, da es durch den Gehalt an Antikörpern und an Zellen des Immunsystems an Abwehrprozessen im Körper beteiligt ist. (Sinowatz und Hees, 2000).

2.1.2 Hämatopoese

Die Hämatopoese ist die Neubildung von Blutzellen und Blutplättchen (Sobotta und Welsch, 2006). Sie ist ein komplexer und fein regulierter Prozess. Da alle Blutzellen eine bestimmte Lebensspanne besitzen und ihre Anzahl im Blut bei gesunden Tieren immer weitgehend konstant bleibt, müssen sie regelmäßig neu synthetisiert werden, um den Zellpool im Blut wieder aufzufüllen (Reagan, 2008).

Die Hämatopoese findet beim Säugetier extravaskulär im Knochenmark statt. Während der Embryonalentwicklung beginnt sie im Dottersack des Embryos. Im Verlauf der embryonalen und fetalen Entwicklung werden nacheinander die Leber, die Milz und das Knochenmark hämatopoetisch aktiv (Jain, 1993). Die drei Phasen der Blutbildung während der intrauterinen Entwicklung werden daher auch als megaloblastische bzw. mesoblastische, hepatolienale und medulläre Blutbildung bezeichnet (Sobotta und Welsch, 2006). Zum Zeitpunkt der Geburt ist das Knochenmark schon der Hauptort der Blutzellproduktion. Dies setzt sich postnatal fort. Leber und Milz sind im Gegensatz zum

Knochenmark postnatal hämatopoetisch inaktiv, behalten aber ihr grundsätzliches hämatopoetisches Potential, sodass sie bei Schädigung des Knochenmarks wieder aktiv werden können (*Jain, 1993*). Primitive Erythrozyten sind bei Säugetieren immer groß und besitzen einen Zellkern. Der Wechsel zur Bildung von adulten Erythrozyten ohne Zellkern beginnt während der fetalen Entwicklung (*Harvey, 2008*). Die Leukozytenzahl ist während des Fetallebens gering und steigt bis zur Geburt auf Normalwerte an (*Jain, 1993*). Aktives Knochenmark findet sich perinatal und während des frühen postnatalen Lebens in nahezu allen Knochen. Diese Aktivität beschränkt sich aber während des adulten Lebens auf flache Knochen wie das Sternum, die Rippen, das Becken, die Wirbelkörper, die Schädelknochen und die Epiphysen der langen Röhrenknochen (*Jain, 1993*).

Im Knochenmark können drei funktionelle Kompartimente bei der Blutzellbildung unterschieden werden: das Stammzell-, das Progenitorzell- und das Precursorzellkompartiment (*Gasper, 2000*).

Das Stammzellkompartiment umfasst dabei die hämatopoetischen Stammzellen, die auch als Hämocytoplasten bezeichnet werden (*Sinowatz und Hees, 2000*). Die Bildung der Blutzellen geht somit von einer pluripotenten Stammzelle (HSC, engl. Hematopoietic stem cell) aus (*Sobotta und Welsch, 2006*). Die pluripotente Stammzelle wird im Englischen auch als CFU-S („colony-forming unit-spleen“) bezeichnet, da sie Kolonien in der Milz von letal bestrahlten Mäusen bilden kann (*Parmley, 1988; Jain, 1993*). Sie ist in der Lage, sich selbst zu erneuern und zu differenzieren (*Sobotta und Welsch, 2006*) und alle Zellen des lymphohämatopoetischen Systems hervorzubringen (*Parmley, 1988; Sinowatz und Hees, 2000*). Die meisten pluripotenten Stammzellen befinden sich in der G₀-Phase des Zellzyklus, nur wenige sind mitotisch aktiv. Morphologisch gleichen sie sich und können nicht von kleinen Lymphozyten oder anderen Zellen mit einem hohen Kern-Zytoplasma-Verhältnis, prominenten Nukleoli und basophilem Zytoplasma ohne Granula unterschieden werden (*Gasper, 2000*). Sie besitzen keinen Golgi-Apparat, kaum endoplasmatisches Retikulum und nur sehr wenige Lysosomen (*Sinowatz und Hees, 2000*).

Aus der pluripotenten Stammzelle entwickeln sich zunächst oligopotente, dann bipotente und schließlich unipotente Progenitorzellen (*Sinowatz und Hees, 2000*), die zum Progenitorzellkompartiment gehören. Sie können von den pluripotenten Stammzellen durch eingeschränkte Differenzierungs- und Proliferationsmöglichkeiten unterschieden werden (*Gasper, 2000*). Die Progenitorzellen sind differenzierte und determinierte Zellen, die man auch morphologisch kaum von den pluripotenten Stammzellen unterscheiden kann. Unter dem Einfluss des Stammzellfaktors (CSF) bildet sich zunächst aus der pluripotenten Stammzelle die Progenitorzelle für Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten, Monozyten und Lymphozyten (GEMML), also für alle Blutzelltypen (*Sobotta und Welsch, 2006*). Von dieser Zelle gehen zwei Hauptdifferenzierungslinien aus, die lymphoide und die myeloide Zellreihe (*Gassmann und Lutz, 2005a*). Die Vorläuferzelle der myeloischen Reihe wird auch als myeloische Stammzelle oder GEMM (Vorläuferzelle für

Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten) bezeichnet (*Sobotta und Welsch, 2006*). Die GEMM ist Ausgangspunkt für je eine Zelllinie zu Megakaryozyten und Erythrozyten und einer weiteren zu Monozyten und Granulozyten (GM). Die lymphatischen Vorläuferzellen hingegen führen zur Bildung von T- und B-Lymphozyten (*Sobotta und Welsch, 2006*).

Die Progenitoren werden abhängig von ihrem Verhalten in Kulturmedien als CFU („colony-forming-unit“) oder als BFU („burst-forming-unit“) bezeichnet. Unter der CFU versteht man dabei die Bildung von Kolonien (mehr als 50 Zellen) durch die Tochterzellen der Progenitorzelle nach Wachstumsstimulation. Die BFU sind Tochterzellen, die Kolonien mit mehreren Zentren bilden (*Sinowatz und Hees, 2000*).

Das Zellkompartiment der Precursorzellen kann in einen Teilungs-, Reifungs- und Speicherpool unterteilt werden. Es schließt zelllinienspezifische Blastzellen und ihre Abkömmlinge ein. Diese Zellen können morphologisch sehr gut voneinander unterschieden werden. Sie sind unipotent mit fehlender Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Alle Precursorzellen befinden sich außerdem in der aktiven Phase des Zellzyklus (*Gasper, 2000*).

Morphologisch können sie bestimmten hämatopoetischen Zelllinien zugeordnet werden. Sie differenzieren sich zu den reifen Blutzellen, den sogenannten Effektorzellen, die eine begrenzte Lebenszeit haben und ihre spezifischen Aufgaben, mitunter auch durch Auswanderung ins Gewebe, erfüllen (*Sinowatz und Hees, 2000*). Auf die einzelnen Precursorzellen wird im Kapitel 2.2 „Charakterisierung der einzelnen Blutzellen“ noch näher eingegangen.

Die Hämatopoese ist in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt:

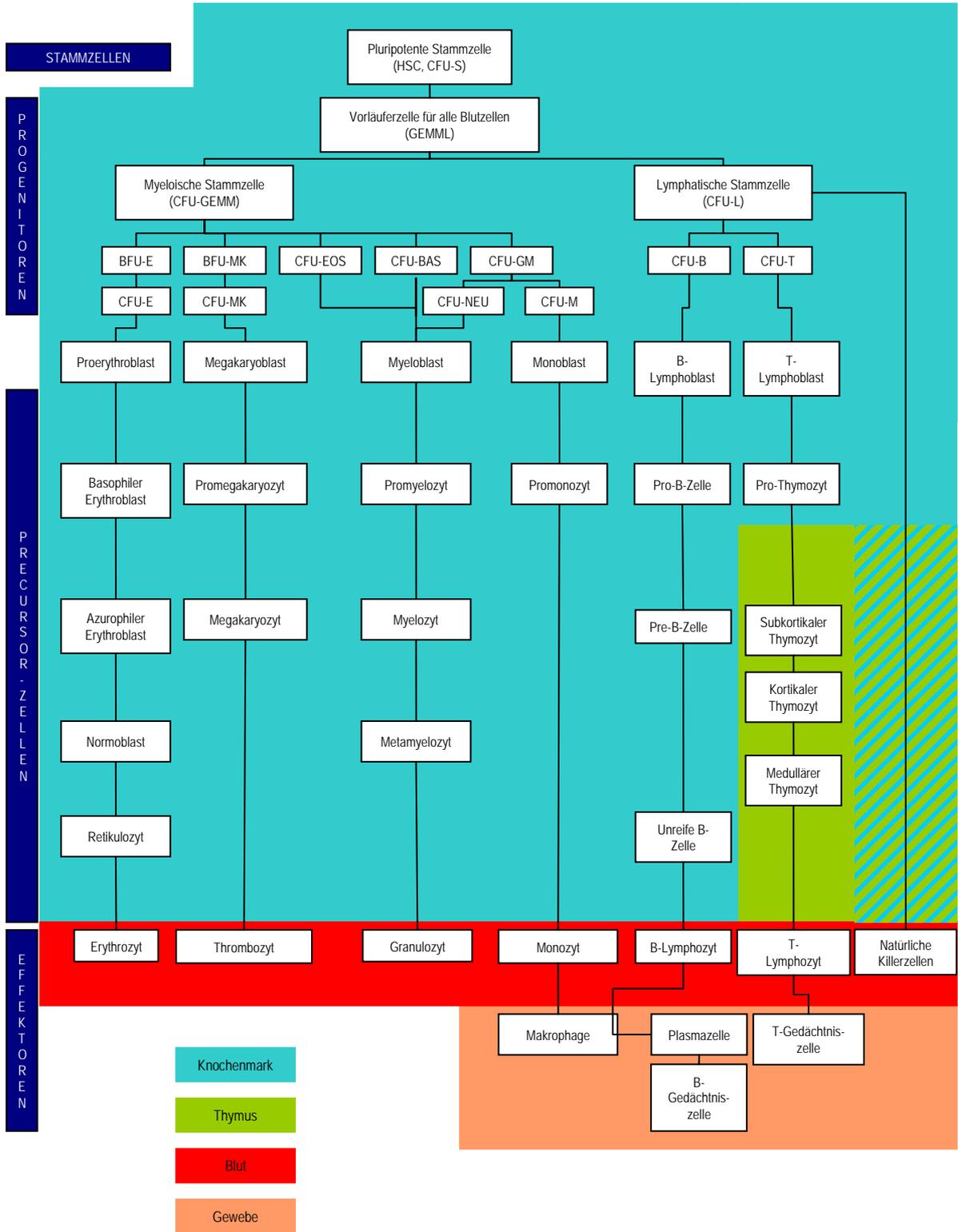


Abbildung 2.2: Ablauf der Hämatopoese

2.1.3 Spezielle Hämatologie des Kaninchens

Kaninchen besitzen ebenso wie Rinder, Schweine, Ratten, Mäuse und Hühner ein lymphozytäres Blutbild. Die Lymphozyten dieser Tiere machen mehr als 50% der Leukozyten im Blut aus. Im Gegensatz dazu haben der Mensch, das Pferd, der Hund und die Katze ein granulozytäres Blutbild (*Gassmann und Lutz, 2005a*).

Die Zusammensetzung des Blutes ist einem ständigen Wechsel unterworfen (*Kraft et al., 2005*). Dabei spielt auch das Alter des Kaninchens eine wesentliche Rolle. Dies wurde von *Jeklova et al. (2009)* an Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ im Alter von einem Tag bis zu 20 Wochen untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass die Erythrozytenzahl um insgesamt $1,6 \times 10^6/\mu\text{l}$ nach der Geburt kontinuierlich ansteigt (*Jeklova et al., 2009*). Der MCV (mean corpuscular volume) und der MCH (mean corpuscular hemoglobin) sind zum Zeitpunkt der Geburt signifikant höher als bei adulten Tieren, wohingegen der Hämatokrit und der MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) ähnlich den Werten adulter Tiere sind (*Bortolotti et al., 1989*). Vergleichbares zeigt sich bei der Gesamtleukozytenzahl im Blut, die auch post partum ansteigt. Zum Zeitpunkt der Geburt ist das Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis noch größer als 1. Es sinkt innerhalb der ersten zwei Wochen unter 1, wie bei adulten Kaninchen. Dabei bleibt die Anzahl der neutrophilen Granulozyten nahezu konstant, so dass die Verschiebung des Verhältnisses hin zu einem lymphozytären Blutbild nur durch eine verstärkte Produktion von Lymphozyten innerhalb der ersten vier Wochen zu erklären ist. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten und die absolute Anzahl an Lymphozyten steigen bis zu einem Alter von vier Wochen kontinuierlich an. Einen Tag nach der Geburt beträgt der prozentuale Anteil der Lymphozyten am weißen Blutbild ca. 30,8 %, mit vier Wochen um die 67,6 %. Die absolute Anzahl steigert sich innerhalb der ersten vier Lebenswochen um ungefähr $2,12 \times 10^3/\mu\text{l}$. Der prozentuale Anteil der eosinophilen und basophilen Granulozyten an den Leukozyten ist von Geburt an stabil. Die absolute Anzahl der eosinophilen Granulozyten steigt jedoch vom ersten Tag bis zur 20. Lebenswoche um $0,08 \times 10^3/\mu\text{l}$, die der basophilen Granulozyten um $0,12 \times 10^3/\mu\text{l}$. Bei den Monozyten zeigen sich keine altersabhängigen Veränderungen des prozentualen Anteils und keine in der absoluten Anzahl. Insgesamt kann man sagen, dass Kaninchen mit sechs Wochen Blutwerte erreichen, die mit denen adulter Tiere vergleichbar sind (*Jeklova et al., 2009*).

Auch in Bezug auf das Geschlecht des Kaninchens gibt es Unterschiede in den Laborwerten (*Purvis und Sewell, 1973; Srinivasan et al., 1979; Mitruka und Rawnsley, 1981; Sanderson und Phillips, 1981; Wolford et al., 1986; Kabata et al., 1991; Aleman et al., 2000; Black et al., 2009*), jedoch variieren sie je nach Autor so erheblich, dass eine allgemeingültige Aussage nicht getroffen werden kann. Im

Anhang B befindet sich eine Tabelle mit den physiologischen Blutwerten von Kaninchen, nach Rassen und Geschlecht aufgegliedert.

Die Parameter während des fetalen Lebens wurden von Sabin et al. (1936) und Kriesten et al. (1987) ermittelt (*Sabin et al., 1936; Kriesten et al., 1987*). Die Blutwerte im arteriellen und venösen Blut von Niere, Milz und Mesenterium bei „Weißen Neuseeländern“ wurden von Yang et al. (2005) evaluiert (*Yang et al., 2005*). Weiterhin wurden der Einfluss der Trächtigkeit (*Kriesten et al., 1987; Bortolotti et al., 1989; Wells et al., 1999; Kim et al., 2002; Black et al., 2009*), der Laktation (*Kriesten et al., 1987*), des Tagesrhythmus (*Fox und Laird, 1970; Gattermann, 1978a; Gattermann, 1978b*), der Fütterung (*Jegatheesan et al., 2006*), der Rasse (*Laird et al., 1970; Fetters, 1972; Lepitzki und Woolf, 1991; Jain, 1993; Black et al., 2009*) und des Gesundheitszustandes (*Hinton et al., 1982*) beim Kaninchen untersucht. Diese sollen jedoch hier nur aus Gründen der Vollständigkeit genannt werden.

In der folgenden Tabelle werden die physiologischen Blutwerte, unabhängig vom Geschlecht, vom Alter und von der Rasse, zusammenfassend dargestellt.

<i>Blutbild</i>		<i>Kaninchen aller Rassen</i>	
		<i>Spannbreite</i>	<i>Durchschnitt</i>
Rotes Blutbild			
Erythrozyten	x 10 ⁶ /μl	4-8,51	6,26
Retikulozyten	%	1-7	4
Hämatokrit	%	26,7-53,06	39,88
Hämoglobin	g/dl	8,5-17,4	12,95
MCV	fl	57,8-79,6	68,7
MCH	pg	17,1-29,5	23,3
MCHC	%	28,7-37	32,85
Weißes Blutbild			
Leukozyten gesamt	x 10 ³ /μl	2,6-12,5	7,55
Lymphozyten	x 10 ³ /μl	1,85-5,8	3,83
	%	28-90	59
Neutrophile Granulozyten	x 10 ³ /μl	0,94-5,75	3,46
	%	17-75	46
Eosinophile Granulozyten	x 10 ³ /μl	0-1,1	0,55
	%	0-4	2
Basophile Granulozyten	x 10 ³ /μl	0,067-0,96	0,514
	%	0-30	15
Monozyten	x 10 ³ /μl	0,21-1,1	0,66
	%	0,6-13,4	7
Thrombozyten	x 10 ³ /μl	126-1000	563

Tabelle 2.1: Physiologische Blutwerte des Kaninchens

2.2 Charakterisierung der Blutzellen des Kaninchens

2.2.1 Erythrozyten

2.2.1.1 Allgemeines

Die Anzahl der Erythrozyten im Blut vom Kaninchen beträgt nach den Angaben verschiedener Autoren ca. $5,36-8,13 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Hein und Hartmann, 2005), $5,1-7,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Quesenberry, 2004) bzw. $4,0-6,0 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Gassmann und Lutz, 2005b). Sie variiert abhängig vom Alter der Tiere, der Rasse und dem Geschlecht, wie bereits in Kapitel 2.1.3. erwähnt wurde.

Die durchschnittliche Lebensdauer der Kaninchenerythrozyten beläuft sich auf 50 (Percy und Barthold, 2007; Harcourt-Brown, 2008) oder 57 Tage (Vacha, 1983; Dodds, 2000; Melillo, 2007; Jenkins, 2008), bei einer maximalen Lebensdauer von 67 oder 68 Tagen (Vacha, 1983; Jain, 1993; Campbell und Ellis, 2007; Jenkins, 2008). Harkness und Wagner (1995) geben eine Lebensspanne der Erythrozyten beim Kaninchen zwischen 45 und 70 Tagen an (Harkness und Wagner, 1995). Die Abbaurate der Erythrozyten des Kaninchens beträgt ca. 0,5 % pro Tag (Vacha, 1983).

2.2.1.2 Bildung

Die Erythropoese beginnt mit einer pluripotenten Stammzelle, aus der sich die myeloische Stammzelle entwickelt. Aus ihr differenziert sich über eine „burst-forming unit-erythrocyte“ (BFU-E) und eine „colony-forming unit-erythrocyte“ (CFU-E) der Proerythroblast (Jain, 1993), der im Englischen auch als „rubriblast“ bezeichnet wird. Der Proerythroblast bildet die Ausgangszelle für die Bildung des zunächst basophilen Erythroblasten und später azidophilen Erythroblasten. Über die Stadien des Normoblasten und des Retikulozyten wird schließlich der Erythrozyt gebildet (Sinowatz und Hees, 2000). Der Prozess der Erythropoese tritt in den sogenannten Blutinseln des Knochenmarks auf, die aus einem zentralen Makrophagen und einem den Makrophagen umgebenden Ring von sich entwickelnden erythrozytären Zellen bestehen. Hierbei kommt es durch Fibronectin zu einem Zellkontakt zwischen dem Makrophagen und der erythrozytären Zelle. Der Makrophage, im Englischen auch als „nurse cell“ bezeichnet, versorgt die erythrozytäre Zelle mit Nährstoffen und Eisen für die Hämoglobinsynthese (Jain, 1993). Zudem reguliert er die basale Erythrozytenproduktion durch Herstellung von Wachstums- und Hemmfaktoren wie Erythropoetin, aber auch IL-1, TNF- α und Interferone. Er erkennt auch das auf der Oberfläche der extrudierten Zellkerne exprimierte Phosphatidylserin, woraufhin er diese bindet und phagozytiert (Harvey, 2008).

Der Proerythroblast ist eine große, runde Zelle, die durch ca. 5 Teilungen in einem Zeitraum von 3-5 Tagen bis zu 32 Normoblasten produziert (*Harvey, 2008*). Seine Größe beim Säugetier beträgt in Blutaussstrichen 14-19 µm und nach Einbettung in Kunststoff für die Elektronenmikroskopie 10-12 µm (*Parmley, 1988*). Er besitzt einen runden Zellkern mit getüpfeltem Chromatin (*Jain, 1993*) und ein oder zwei Nukleoli (*Parmley, 1988*). Der Zellkern befindet sich in einem tiefblauen Zytoplasma (*Jain, 1993*), dessen Anfärbung aus der großen Zahl von Polyribosomen resultiert (*Hawkey und Dennett, 1990*). Im Zytoplasma befinden sich wiederum einige stabförmige Mitochondrien (*Parmley, 1988*).

Der basophile Erythroblast ist eine kleinere, runde Zelle. Der Zellkern enthält grobkörniges Chromatin und typischerweise keinen Nukleolus (*Hawkey und Dennett, 1990; Reagan, 2008*). Seine Bezeichnung rührt von dem sich in Standardfärbungen basophil anfärbenden Zytoplasma her (*Jain, 1993*), das um den Zellkern eine klare Zone zeigt (*Reagan, 2008*).

Auf dieses Stadium folgt der polychromatische oder auch azidophile Erythroblast (*Hawkey und Dennett, 1990*), der eine kleine, runde Zelle mit zentral gelegenem Zellkern ist (*Reagan, 2008*) und ein kleineres Kern-Zytoplasma-Verhältnis als sein Vorgänger hat (*Hawkey und Dennett, 1990*). Der azidophile Erythroblast hat in Blutaussstrichen einen Durchmesser von 8-12 µm (*Parmley, 1988*). Sein Zellkern zeigt ein grobkörniges Chromatin, das stärker kondensiert ist als das Chromatin in den vorhergehenden Entwicklungsstadien (*Reagan, 2008*). Das Zytoplasma ist von hellgrauer Farbe (*Jain, 1993*) oder auch leicht eosinophil (*Hawkey und Dennett, 1990*) bzw. variiert zwischen tiefblau und rötlich-blau (*Reagan, 2008*).

Der Normoblast ist der letzte erythrozytäre Vorläufer mit einem Zellkern (*Jain, 1993*), der im Gegensatz zu seinen Vorgängern mit 7-10 µm im Durchmesser (*Parmley, 1988*) kleiner und einheitlich basophil (*Hawkey und Dennett, 1990*) ist. Der Zellkern ist rund bis oval, leicht exzentrisch lokalisiert und enthält sehr stark kondensiertes Chromatin (*Reagan, 2008*). Das Zytoplasma ist grau oder auch selten orthochromatisch (*Jain, 1993*), was auch zu der Bezeichnung orthochromatischer Erythroblast geführt hat (*Hawkey und Dennett, 1990*). Dem Normoblasten fehlt außerdem die Fähigkeit zur weiteren mitotischen Zellteilung (*Parmley, 1988*).

Der Retikulozyt besitzt keinen Zellkern mehr. Das Zytoplasma lässt sich eosinophil oder noch leicht basophil anfärben (*Hawkey und Dennett, 1990*). Diese Färbung verschiebt sich aufgrund des steigenden Hämoglobingehalts während der Reifung des Retikulozyten immer mehr in Richtung rot (*Reagan, 2008*). Mit der Retikulozytenfärbung kann man eine oder mehrere Granula oder Filamente nachweisen (*Hawkey und Dennett, 1990*). Die Retikulozyten sind nach ihrem retikulären Netzwerk im Zytoplasma benannt, das nach Anfärbung mit Methylenblau oder Brilliantkresylblau blau erscheint. Dieses Netzwerk ist ein Artefakt, welches durch die Präzipitation von ribosomalen Ribonukleinsäuren und Proteinen gebildet wird (*Harvey, 2008*).

Frühe Retikulozyten besitzen eine gelappte Oberfläche, die durch Verlust von Membranmaterial und schlussendlich durch die Bildung der bikonkaven Form einem starken Umbau unterworfen ist. Im Gegensatz zu den Retikulozyten und den erythrozytären Vorläufern im Knochenmark steigt durch diesen Umbau die mechanische Stabilität der Retikulozyten und der Erythrozyten im Blut. Auch die Mitochondrien der Retikulozyten gehen zugrunde. Polyribosomen zerfallen in einzelne Ribosomen und verschwinden dann während der Umwandlung des Retikulozyten zum Erythrozyten (*Harvey, 2008*).

Die Anzahl der Retikulozyten im Blut des Kaninchens beim adulten Tier beträgt 1-7 % (*Schermer, 1958; Mitruka und Rawnsley, 1981; Moore, 2000*), 1,4-3,9 % (*Benson und Paul-Murphy, 1999*), 2-4 % (*Harkness und Wagner, 1995; Jenkins, 2008*) bzw. 2-5 % (*Sanderson und Phillips, 1981; Percy und Barthold, 2007*). Die Anzahl bei männlichen erwachsenen Tieren liegt bei $2 \pm 0,2$ % und bei weiblichen Tieren bei $3 \pm 0,5$ % (*Schermer, 1958; Moore, 2000*). Beim jungen Kaninchen sind die Werte höher (*Mitruka und Rawnsley, 1981; Sanderson und Phillips, 1981*).

Der Anteil der erythrozytären Zellen im Knochenmark macht beim Kaninchen 41,9 % aus. Dabei findet man ca. 0,2 % Proerythroblasten, ca. 6,1 % basophile Erythroblasten, ca. 18,9 % azidophile Erythroblasten und ca. 16,7 % Normoblasten im Knochenmark (*Moore, 2000*).

2.2.1.3 Morphologie

Die Erythrozyten des Kaninchens sind runde, bikonkave Scheiben (*Moore, 2000; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Jenkins, 2008*). Durch die bikonkave Form kommt es zu einer zentralen Aufhellung (*Campbell und Ellis, 2007*), die beim Kaninchen als moderat beschrieben wird (*Reagan, 2008*). Die Erythrozyten haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 6,5-7,5 μm (*Mitruka und Rawnsley, 1981; Percy und Barthold, 2007*), 6,6 μm (*Hawkey und Dennett, 1990*), 6,7 μm (*Jain, 1993*), 6,7-6,9 μm (*Sanderson und Phillips, 1981; Moore, 2000; Jenkins, 2008*) bzw. 6,8 μm (*Dodds, 2000; Melillo, 2007*) und eine Dicke von 2,15 μm (*Hawkey und Dennett, 1990*), 2,4 μm (*Schermer, 1958*) bzw. 2,15-2,4 μm (*Moore, 2000*). Einige Autoren geben beim Durchmesser der Erythrozyten eine Schwankungsbreite von 5,0-7,8 μm (*Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007*) bzw. 5,0-7,9 μm an (*Schermer, 1958*). Genauere morphometrische Untersuchungen der Erythrozyten des Kaninchens wurden von Poljičak-Milas et al. (2009) durchgeführt. Mittels Morphometrie ist eine quantitative Analyse von geometrischen Strukturen in allen Dimensionen eines Objekts möglich. Es wurden von 26 Neuseeländer-Kaninchen, davon 12 männlichen und 14 weiblichen Tieren, Blutproben entnommen, ausgestrichen und mit der Pappenheim-Färbung angefärbt. Die verschiedenen morphometrischen Parameter wurden mit einem speziellen Computerprogramm evaluiert. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Untersuchung (*Poljičak-Milas et al., 2009*).

Morphologische Charakteristika	Männliche Tiere	Weibliche Tiere
Zellfläche (μm^2)	25,72-29,48	32,1-29,52
Zellumfang (μm)	19,55-21,53	20,96-21,44
Maximale Achsenlänge (μm)	3,21-3,47	3,48-3,6
Minimale Achsenlänge (μm)	2,38-2,56	2,59-2,63
Konvexe Fläche (μm^2)	26,98-31,08	31,35-32,55
Länge der Zelle (μm)	6,09-6,57	6,25-6,85
Breite der Zelle (μm)	5,53-5,95	5,87-6,01

Tabelle 2.2: Morphometrische Parameter der Erythrozyten beim Kaninchen (Poljičak-Milas et al., 2009)

Die weiblichen Tiere hatten eine signifikant größere Erythrozytenfläche als die männlichen Tiere. Zudem zeigten ihre Erythrozyten einen höheren Grad an Konvexität als die der männlichen Tiere. Abgesehen von Zellumfang und Zellbreite waren die evaluierten Parameter beim weiblichen Tier signifikant höher als bei den männlichen Tieren (Poljičak-Milas et al., 2009).

Eine Anisozytose, bei der die Mikrozyten ein Viertel des Durchmessers eines normalen Erythrozyten besitzen (Moore, 2000), tritt bei 1-2 % der Erythrozyten des Kaninchens auf und wird bei gesunden Kaninchen als normal angesehen (Dodds, 2000; Jenkins, 2008). Stechapfelförmige Erythrozyten kommen im Blutaussstrich zahlreich vor und sind charakteristisch für das Kaninchenblut (Schermer, 1958; Mitruka und Rawnsley, 1981; Sanderson und Phillips, 1981; Moore, 2000). Eine weitere Auffälligkeit der Erythrozyten des Kaninchens ist das Auftreten von Polychromasie bei 1-2 % der Erythrozyten im peripheren Blut (Mitruka und Rawnsley, 1981; Dodds, 2000; Moore, 2000), 2-4 % (Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007) oder 2-5 % (Marshall, 2008). Polychromasie ist die Bezeichnung für die unterschiedliche Anfärbbarkeit von Zellen (Pschyrembel, 2007). Hierbei handelt es sich um junge Erythrozyten, die frühzeitig aus dem Knochenmark entlassen werden. Sie sind üblicherweise groß und zeigen in gefärbten Blutaussstrichen eine intensivere blaue Farbe als die reifen Erythrozyten, die aus dem Vorkommen von Organellen wie Ribosomen und Mitochondrien resultiert (Thrall, 2004).

Das Auftreten 1-7% Retikulozyten im Blutaussstrich von adulten Tieren ist physiologisch. Polychromasie und Retikulozyten können durch die kurze Lebensspanne und den hohen Umsatz der Erythrozyten im Blut des Kaninchens erklärt werden (Harcourt-Brown, 2008).

Erythrozyten mit Zellkern und Howell-Jolly-Körperchen können beim Kaninchen bisweilen auch beobachtet werden (Sanderson und Phillips, 1981; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Harcourt-Brown, 2008; Jenkins, 2008). Howell-Jolly-Körperchen sind kleine, runde, dunkelblaue Einschlüsse von variabler Größe, die nukleäre Überreste repräsentieren (Thrall, 2004). Das Auftreten von einigen

Erythrozyten mit Zellkern und von Howell-Jolly-Körperchen sollte als normal angesehen werden und ist kein Indikator für eine zelluläre Regeneration beim Kaninchen (*Melillo, 2007*).

Die Zellmembran der Erythrozyten ist eine Lipiddoppelmembran, die beim Säugetier zu 48 % aus Proteinen, zu 44 % aus Lipiden und zu 8 % aus Kohlenhydraten besteht (*Jain, 1993*). Dabei gibt es speziesspezifische Variationen in der Zusammensetzung der Membranphospholipide (*Harvey, 2008*). Beim Kaninchen baut sich die Erythrozytenmembran nach Angaben von Wessels und Veerkamp (1973) zu 5,3 % aus Glykolipiden, zu 65,8 % aus Phospholipiden und zu 28,9 % aus Cholesterol auf (*Wessels und Veerkamp, 1973*). Transmembranproteine wie Band 3 und Glykophorin C verankern das Zytoskelett an der Zellmembran und stabilisieren es. Über submembranöse Proteine wie Ankyrin, Spektrin (α -Spektrin und β -Spektrin) und Band 4.1 wird ein Netzwerk mit Aktinfilamenten und anderen Proteinen wie Adducinen (α -Adducin und β -Adducin), Tropomyosin (*Geiger, 1983; Harvey, 2008; Pasini et al., 2010*) und Tropomodulin gebildet (*Pasini et al., 2010*). Spektrin spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellform, der Verformbarkeit der Zellmembran, der Stabilität der Zelle und der Mobilität von Band 3 (*Pasini et al., 2010*). Spektrinmoleküle bilden mit ihren zwei Untereinheiten ein Heterodimer, das in der Lage ist, sich in der Kopfregion mit einem weiteren Spektrinmolekül zu verbinden, sodass ein Tetramer entsteht (*Shotton und Burke, 1979*), welches in Erythrozyten die dominante Form darstellt (*Ji et al., 1980*). Durch die Ausbildung einer stark gewundenen Helix ist Spektrin in der Lage sich zu kontrahieren und auszudehnen. Es steht zum einen durch Band 4.1 mit Glykophorin C der Zellmembran in Verbindung, zum anderen durch Ankyrin mit Band 3 (*Pasini et al., 2010*). An seiner β -Untereinheit verfügt Spektrin zudem über eine Bindungsstelle für Ankyrin (*Tyler et al., 1979*). Ankyrin ist ein asymmetrisches, globuläres Molekül mit einem Molekulargewicht von 215 000 Da, das verschiedene Bindungsstellen für Spektrin und Band 3 besitzt (*Gardner und Vann Bennett, 1989*). Der Schwanz des Spektrinmoleküls enthält eine Bindungsstelle für Aktin (*Gardner und Vann Bennett, 1989*), welches in Erythrozyten im Gegensatz zu anderen Zellen mit 12-20 Monomeren pro Aktinfilament vorliegt (*Pinder und Gratzer, 1983*). Insgesamt sind 5-8 Spektrintetramere mit einem Aktinmolekül verbunden (*Gardner und Vann Bennett, 1989*). Die Polymerisationsrate von Aktin ist ausschlaggebend für die Elastizität der Zellmembran, die bei Inhibition der Aktinpolymerisation ansteigt. Diese Rate wird von mehreren Proteinen wie Tropomodulin, Tropomyosin, Adducinen und Dematin gesteuert. Die Tropomodulin-Tropomyosinkomplexe stabilisieren die kurzen Aktinfilamente in den Erythrozyten durch „Capping“. Dematin ist für die Bündelung der Aktinfilamente zuständig, wohingegen die Adducine beide Funktionen besitzen (*Pasini et al., 2010*). Das mit Aktin interagierende Myosin wurde 1985 in Erythrozyten des Menschen nachgewiesen (*Fowler et al., 1985*). Hierbei handelt es sich um nichtmuskuläres Myosin II, das aus einer schweren (200 kDa) und zwei leichten Ketten (26 und 19,5 kDa) besteht (*Wong et al., 1985*). Es ist an F-Aktin gebunden und besitzt ATPase-Aktivität, die durch F-Aktin induziert wird (*Korn und Hammer, 1988*). In Erythrozytenvorläufern

ist außerdem eine Isoform des β -Tubulins vorhanden (*Cohen, 1991*), das sich in murinen Erythrozytenvorläufern korbarig um den Zellkern und zusätzlich radial unterhalb der Zellmembran anordnet (*Koury et al., 1989*). Insgesamt ist das Zytoskelett der Erythrozyten ein stark organisiertes Netzwerk, dessen einzelne Komponenten nicht nur miteinander, sondern auch mit Proteinen und Lipiden der Zellmembran interagieren. Dabei sind die Protein-Protein-Interaktionen bislang gut untersucht, wohingegen Lipid-Protein- und Zucker-Protein-Interaktionen noch weitgehend unerforscht sind (*Pasini et al., 2010*).

2.2.1.4 Histochemische Eigenschaften

In histochemischen Untersuchungen an Erythrozyten verschiedener Tierspezies von Fey und Kuntze (1970) konnte eine Esteraseaktivität in der Zellmembran der Erythrozyten bei höheren Wirbeltieren, unter anderem dem Kaninchen, festgestellt werden. Dabei besitzen die Erythrozyten des Kaninchens eine Aktivität von α -Naphthyl-Esterase und Naphthol-AS-Esterase. Im Gegensatz dazu tritt eine Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase nur bei Erythrozyten niederer Wirbeltiere (*Fey und Kuntze, 1970*) oder in den Erythrozytenvorläufern des Kaninchens in Form von zytoplasmatischen Einschlüssen auf (*Wetzel et al., 1967b*). Sowohl Peroxidase als auch Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase konnten bei keiner Tierspezies in den Erythrozyten nachgewiesen werden (*Fey und Kuntze, 1970*).

2.2.1.5 Aufgaben

Die primäre Funktion der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff von der Lunge zum Körpergewebe, was durch ihre geringe Größe, das Fehlen eines Zellkerns und die bikonkave Form unterstützt wird. Hierdurch wird die Distanz zwischen dem Hämoglobin und der Zelloberfläche beim Gasaustausch verringert und die Plastizität der Zelle bei ihrer Wanderung durch die Blutgefäße garantiert (*Campbell und Ellis, 2007*). Der Sauerstoff ist dabei an das Hämoglobin gebunden, ein tetrameres Protein, welches während der Reifung des Erythrozyten in seinen Vorläuferzellen bis zum Stadium des Retikulozyten synthetisiert wird (*Harvey, 2008*). Es gibt verschiedene Hämoglobintypen bei Tieren und Menschen im embryonalen, fetalen und adulten Lebensstadium (*Jain, 1993*). Beim Kaninchen besitzt der Embryo zwölf Tage nach der Konzeption drei Hämoglobintypen, von denen zwei typisch embryonal sind und einer vom adulten Typ nicht zu unterscheiden ist. Die Hauptkomponente sind jedoch die beiden embryonalen Hämoglobintypen. Am 20. Tag der Gestation sind nur noch zwei Hämoglobine präsent. Der Hauptanteil wird dabei von dem adulten Hämoglobintyp gebildet (*Jain, 1993*).

Die roten Blutzellen tragen eine Vielzahl von Proteinen und Kohlenhydratkomplexen auf ihrer Zelloberfläche. Dabei finden sich einige auf der Erythrozytenoberfläche von allen Tieren einer

Spezies, andere hingegen sind nur bei einigen Tieren zu finden, zu denen auch die Erythrozytenisoantigene gehören, die in Blutgruppen gegliedert werden können (*Harvey, 2008*). Auf die Existenz von Blutgruppen beim Kaninchen wird in Kapitel 2.4 und auf die Kohlenhydratkomplexe auf der Oberfläche der Erythrozyten in Kapitel 2.3.4.4 näher eingegangen.

2.2.2 Thrombozyten

2.2.2.1 Allgemeines

Die Thrombozyten (Blutplättchen) sind kernlose Abschnürungen der Megakaryozyten des Knochenmarks und spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung (*Sobotta und Welsch, 2006*). Ihre Anzahl im Blut des Kaninchens beträgt je nach Autor zwischen $300-500 \times 10^3/\mu\text{l}$ (*McLaughlin und Fish, 1994*), $126-1000 \times 10^3/\mu\text{l}$ (*Schermer, 1958*), $250-650 \times 10^3/\mu\text{l}$ (*Quesenberry, 2004*), $110-206 \times 10^3/\mu\text{l}$ (*Kabata et al., 1991*), $112-795 \times 10^3/\mu\text{l}$ (*Hewitt et al., 1989*), $250-600 \times 10^3/\mu\text{l}$ (*Harcourt-Brown, 2008*) und $193-725 \times 10^3/\mu\text{l}$ (*Hein und Hartmann, 2005*). Damit ist die Thrombozytenanzahl im Blut des Kaninchens höher als beim Menschen. Trotzdem ist die Thrombozytenmasse pro ml Blut bei beiden Spezies gleich. Dies erklärt sich durch den geringeren Protein- und Sialinsäuregehalt in den kleineren Thrombozyten des Kaninchens (*Packham et al., 1992*). Die Lebensspanne der Thrombozyten des Kaninchens im Blut beläuft sich auf ca. 6 Tage (*Kriesten et al., 1987*), im Mittel auf 60-77 Stunden (*Packham et al., 1992*).

2.2.2.2 Bildung

Die Thrombopoese, Bildung der Blutplättchen, erfolgt durch sogenannte Knochenmarksriesenzellen, den Megakaryozyten, im Knochenmark (*Sinowatz und Hees, 2000*). Ihren Ursprung nehmen die Megakaryozyten, wie alle Blutzellen, von einer pluripotenten Stammzelle, die sich über die Stadien der „burst-forming unit-megakaryocyte“ (BFU-Meg) und der „colony-forming unit-megakaryocyte“ (CFU-Meg) (*Jain, 1993*) zum Megakaryoblasten entwickelt (*Reagan, 2008*). Der Megakaryoblast ist die erste morphologisch erkennbare Precursorzelle der Zelllinie der Megakaryozyten (*Jain, 1993; Reagan, 2008*) und hat eine Größe von ca. $15-50 \mu\text{m}$ (*Leven, 2000*) bzw. $6-24 \mu\text{m}$ (*Parmley, 1988*). Er besitzt einen runden Zellkern mit einem oder mehreren Nukleoli. Der Zellkern füllt dabei fast die ganze Zelle aus, so dass das Kern-Zytoplasma-Verhältnis sehr hoch ist. Die Basophilie des agranulären Zytoplasmas (*Jain, 1993*) resultiert aus dem Vorkommen von zahlreichen Ribosomen (*Leven, 2000*). Durch Teilung des Zellkerns ohne Teilung des Zytoplasmas, entsteht ein diploider, später ein polyploider Zellkern, wobei auch die Zelle insgesamt größer wird. Die diploide Zelle wird auch als Promegakaryoblast bezeichnet, die polyploide Zelle als Megakaryoblast. Der Megakaryoblast

differenziert sich zu einer Zelle mit mehr als vier Zellkernen und einem basophilen, agranulären Zytoplasma, dem Promegakaryozyten (*Jain, 1993*). Er hat eine Größe von ca. 7µm (*Leven, 2000*) und ist durch seine vielfach gelappten Zellkerne (*Jain, 1993; Reagan, 2008*) und ein umfangreicheres Zytoplasma gekennzeichnet. Somit ist das Kern-Zytoplasma-Verhältnis geringer als beim Megakaryoblasten (*Jain, 1993*). Im „polychromatophil“ anfärbbaren Zytoplasma können azurophile Granula beobachtet werden (*Leven, 2000*). Der aus diesem Stadium entstehende Megakaryozyt hat beim Säugetier einen Durchmesser von ungefähr 150µm (*Leven, 2000*), 20-160 µm (*Jain, 1993*) bzw. 100-200 µm (*Reagan, 2008*). Die Menge an Zytoplasma ist variabel, jedoch stets umfangreicher als bei den Vorläuferzellen. Es färbt sich einheitlich eosinophil an und besitzt zahlreiche azurophile Granula (*Leven, 2000*). Die Reifungszeit der Precursorzellen bis zum Megakaryozyten dauert beim Kaninchen ca. 3 Tage (*Cooney und Smith, 1965*). Aus den reifen Megakaryozyten entstehen über einen Zeitraum von 3-12 Stunden 2000-8000 Thrombozyten (*Jain, 1993*). Der Mechanismus der Thrombozytenbildung ist bis heute nicht vollständig verstanden (*Leven, 2000*). Es gibt jedoch drei verschiedene Theorien: das sogenannte „Platelet budding“, die zytoplasmatische Fragmentation und die Bildung von Prothrombozyten (*Choi, 1997*). Die Entwicklung von der pluripotenten Stammzelle hin zur CFU-Meg wird durch die hämatopoetische Mikroumgebung, Zell-Zell-Interaktionen sowie humorale Faktoren aus dem Umfeld beeinflusst. Die Teilung und Differenzierung des CFU-Meg zum Megakaryoblasten wird durch den „specific colony stimulating factor megakaryocyte“ (CSF-Meg) und andere Zytokine gesteuert. Bei den folgenden Stadien bis zum Thrombozyten hat primär Thrombopoetin Einfluss auf die Thrombopoese (*Jain, 1993*).

2.2.2.3 Morphologie

Die Thrombozyten des Kaninchens sind kleine, längsovale Gebilde mit einem Durchmesser von 1-3 µm (*Schermer, 1958; Sanderson und Phillips, 1981*). Es können jedoch auch größere Formen im Blut gefunden werden (*Sanderson und Phillips, 1981*). Diese als Riesenthrombozyten bezeichneten Zellen, kommen im Blut von gesunden Kaninchen mit 0,1-0,3 % vor (*Silver und Silver, 1971*). In Blutausstrichen sind Thrombozyten oft in Clustern angeordnet (*Schermer, 1958; Sanderson und Phillips, 1981*), treten aber auch vereinzelt auf (*McLaughlin und Fish, 1994*). Beim Säugetier ist der Thrombozyt eine flache Scheibe, die aus Zytoplasma mit den dazugehörigen zytoplasmatischen Organellen besteht. In Romanowsky-Färbungen kann man kleine purpurne Granula erkennen (*Schermer, 1958; Silver und Silver, 1971; Sanderson und Phillips, 1981; Campbell und Ellis, 2007*), die von einem blassblauen Zytoplasma umgeben sind (*Schermer, 1958; Silver und Silver, 1971; Sanderson und Phillips, 1981*). Unter Romanowsky-Färbungen versteht man verschiedene hämatologische Färbemethoden wie Giemsa und Pappenheim als auch Schnellfärbungen wie den Diff-Quick (*Mischke, 2005*).

Die Thrombozyten verschiedener Säugetierspezies haben eine ähnliche Ultrastruktur. Durch elektronenmikroskopische Studien konnte gezeigt werden, dass ruhende Thrombozyten von scheiben- oder linsenförmiger Gestalt mit einer glatten Oberfläche und einer leicht konvexen Kontur sind (Jain, 1993). Aktivierte Thrombozyten hingegen verlieren rasch ihre diskoidale Form. Sie nehmen eine kugelförmige Gestalt an und breiten sich mit langen, spitzen Pseudopodien aus (White, 1987).

Die Zellmembran der Thrombozyten weist eine gut ausgebildete Glykokalyx von 15-20 nm (Tablin, 2000) bzw. nach anderen Angaben von 150-200 nm (Jain, 1993) Dicke auf. Sie besteht aus Kohlenhydratketten, die in kovalenter Verbindung mit den Membranlipiden oder Membranproteinen stehen (Wiesner und Ribbeck, 2000). Vor allem Glykoproteine der Thrombozytenmembran spielen eine wichtige Rolle für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Beim Kaninchen findet man insgesamt 3-4 Hauptglykoproteine (Jain, 1993). Mittels verschiedener Marker wie kationisiertem Ferritin, Lanthan, Meerrettichperoxidase und Rutheniumrot kann die Glykokalyx ultrazytochemisch dargestellt werden (Tablin, 2000).

Das Glykoprotein GPIIb/IIIa beim Kaninchen unterscheidet sich von dem des Menschen, scheint jedoch strukturelle Ähnlichkeit mit dem Glykoprotein GPIIb/IIIa des Menschen zu besitzen. Weiterhin exprimieren die Thrombozyten von Kaninchen im Gegensatz zu denen des Menschen keinen Fc-Rezeptor für IgG. Umgekehrt verhält es sich für den C3b-Rezeptor, der zwar an der Oberfläche der Thrombozyten des Kaninchens, nicht aber auf den Thrombozyten des Menschen, exprimiert wird (Packham et al., 1992).

Die Zellmembran der Thrombozyten besteht beim Kaninchen wie bei allen Säugetieren aus Phospholipiden, aus denen Arachidonsäure mittels Phospholipase A gebildet wird (Hashizume et al., 1994). Dabei kann man fünf verschiedene Phospholipide beim Menschen und Kaninchen unterscheiden. Ihr prozentualer Anteil beim Kaninchen beträgt für Phosphatidylcholin 31 %, für Phosphatidylethanolamin 32 %, für Phosphatidylserin 12 %, für Phosphatidylinositol 3 % und für Sphingomyelin 22 %. Der Gehalt an Fettsäuren in den Phospholipiden reflektiert die Ernährungsweise. Aufgrund ihrer pflanzlichen Nahrung nehmen Kaninchen keine Arachidonsäure mit der Nahrung auf, weshalb ihre Thrombozyten ein Fünftel weniger Arachidonsäure als die der Menschen enthalten, dafür jedoch doppelt so viel Stearinsäure (Packham et al., 1992). Bei ruhenden Thrombozyten ist in der Zellmembran außerdem noch ein signifikanter Anteil an cAMP vorhanden, um die Aktivität der Kalziumpumpe zu regulieren (Jain, 1993).

Das Zytoskelett der Thrombozyten besteht bei Säugetieren aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (Tablin, 2000). Thrombozyten besitzen ein auf Spektrin basierendes Membranskelett. Dieses bildet Spektrin-Stränge, die die zytoplasmatische Oberfläche der Plasmamembran und des „offenen kanalikulären System“ (OCS) bedecken. In Thrombozyten befinden sich ca. 2000 Spektrinmoleküle, die über lange Aktinfilamente miteinander in Verbindung

stehen. Die Aktinfilamente ziehen vom Zytoplasma bis zur Plasmamembran und bilden somit eine zweite, kontinuierliche Ultrastruktur (*Hartwig, 2006*). Lediglich die Hälfte der Aktinmoleküle in Thrombozyten ist zu Filamenten zusammengefügt. Sie formen zum einen ein submembranöses, kontraktiles Zytoskelett, zum anderen das zytoplasmatische Zytoskelett. In ruhenden Thrombozyten dient das zytoplasmatische Aktin als Matrix, in der sich alle Organellen befinden und voneinander abgeschirmt werden. Bei aktivierten Thrombozyten übernimmt das zytoplasmatische Actomyosin-Zytoskelett eine einzigartige Rolle bei der Kontraktilität der Zelle, indem es den Ring an Mikrotubuli zusammenzieht, sodass α -Granula und „dense bodies“ (elektronendichte Granula) sich in der Mitte der Zelle sammeln und ihre Inhalte bei starker Stimulation ins OCS abgegeben werden (*White, 2006*). Im Zytoplasma werden die Aktinfilamente durch Proteine wie α -Actinin und Filamin miteinander vernetzt. Ihre Affinität zu Spektrinmolekülen wird zudem durch $\alpha\gamma$ -Adducine verstärkt, da diese durch „Capping“ die spitzen Enden der Aktinfilamente modifizieren (*Hartwig, 2006*).

Thrombozyten exprimieren nichtmuskuläres Myosin IIA und IIB. Dieses kann 300 nm lange Filamente bilden. Seine Aktivität wird durch Phosphorylierung der zwei 20 kDa leichten Ketten reguliert (*Hartwig, 2006*).

Intermediärfilamente wie Vimentin kommen in Thrombozyten von Rindern und Menschen vor (*Tablin, 2000*). Dies wurde von Muszbek et al. (1987) bei den Thrombozyten des Menschen nachgewiesen. Vimentin bildet in ruhenden Thrombozyten einen Ring, der wahrscheinlich eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der diskoiden Form spielt. In aktivierten Thrombozyten hingegen zeigt sich in der Immunfluoreszenz eine starke Anfärbung in den Pseudopodien und eine stärkere Verteilung in der Zelle (*Muszbek et al., 1987*).

Das Tubulin in Thrombozyten liegt zu 50-60 % in polymerisierter Form vor. Dabei wird der unter der Zellmembran liegende Mikrotubulus aus vier verschiedenen β -Tubulinen aufgebaut. Für einen Mikrotubulus von ca. 100 μm Länge, der sich acht- bis zwölfmal um sich selbst windet, werden 1,6 bis 2×10^5 Tubulinuntereinheiten benötigt (*Hartwig, 2006*). Die Morphologie dieses Systems wurde bereits 1967 von Silver und McKinstry beim Kaninchen untersucht. Im Querschnitt bildete die Wand des Mikrotubulus einen relativ homogenen, elektronendichten Anulus von ca. 7 nm Dicke. In der Wand des Mikrotubulus waren 12-13 Untereinheiten mit einem Durchmesser von ca. 3,5-4 nm zu erkennen (*Silver und McKinstry, 1967*). Der Mikrotubulus dient zur Aufrechterhaltung der diskoiden Zellform in ruhenden Thrombozyten (*Tablin, 2000; White, 2006*). Durch Abkühlungsversuche und Knockout-Versuche konnte diese Abhängigkeit nachgewiesen werden (*Hartwig, 2006*). In aktivierten Thrombozyten können in einigen Zellen Reste des Mikrotubulusringes verbleiben, in anderen wiederum kommt es zur Fragmentierung und / oder Generierung von neuen Mikrotubuli (*Hartwig, 2006*).

Auf der Thrombozytenoberfläche befinden sich kleine Öffnungen, die die Verbindung zwischen dem OCS und der Zelloberfläche darstellen (*White, 1987*). Diese Öffnungen haben eine Größe von ca. 25 nm und werden von der Glykokalyx bedeckt (*Jain, 1993*). Das OCS ist im Zytoplasma des Kaninchens in Form von vielen Vesikel-ähnlichen Strukturen elektronenmikroskopisch zu erkennen (*Liu et al., 1998*). Ein zweites Tunnelsystem, das „dense tubular system“ (DTS), befindet sich im Zytoplasma (*Liu et al., 1998*) der Thrombozyten direkt unter der Randzone der Mikrotubuli. Es öffnet sich nicht zur Zelloberfläche hin und enthält ein Isoenzym der Peroxidase, das für die Thrombozyten spezifisch ist (*Jain, 1993*). Das DTS stammt vom endoplasmatischen Retikulum des Megakaryozyten ab und dient als Kalziumspeicher (*Tablin, 2000*).

Es gibt drei membrangebundene Granulapopulationen in den Thrombozyten. Dazu gehören die lysosomalen Granula, die α -Granula und die sogenannten „dense bodies“ (*Tablin, 2000*).

Die lysosomalen Granula stellen ein membrangebundenes Reservoir von Hydrolasen (*Tablin, 2000*) wie saure Phosphatase, β -Glucuronidase, Arylsulfatase und Cathepsin (*Jain, 1993*) dar, die sowohl endozytiertes Material abbauen können als auch mit der Membran des OCS fusionieren und ihren Inhalt ins extrazelluläre Milieu entlassen (*Tablin, 2000*).

Die α -Granula sind die häufigste, beim Menschen mit 40-100 pro Thrombozyt (*White, 2006*), und größte Granulapopulation (*Tablin, 2000*) mit einem Durchmesser von 400 nm beim Kaninchen (*Bak et al., 1969; Spicer et al., 1969*). Sie sind rund oder oval (*White, 2006*), moderat elektronendicht und homogen bis auf eine runde oder ellipsoide, exzentrische Stelle von etwas geringerer Elektronendichte und einer Größe von ca. 0,25 μ m. Diese Struktur wurde früher als Nukleoid bezeichnet (*Spicer et al., 1969*). Generell kann man die Proteine in den α -Granula der Thrombozyten des Kaninchens schwer bestimmen, da sie meist keine Kreuzreaktion mit Antikörpern, die gegen menschliche Proteine gerichtet sind, im Radioimmunoassay zeigen und für die Proteine des Kaninchens spezifische Antikörper schwer zu bekommen sind (*Packham et al., 1992*). Dennoch konnten Thomas et al. (1970) den Plättchenfaktor 4 beim Kaninchen nachweisen (*Thomas et al., 1970*). Bei Säugetieren enthalten die α -Granula unter anderem Proteine wie Albumin, Faktor V und Fibrinogen, Plättchen-spezifische Faktoren wie β -Thromboglobulin und Plättchenfaktor 4, Wachstumsfaktoren wie „platelet-derived growth-factor“ (PDGF), „ β -transforming growth-factor“ (TGF- β), „epidermal growth factor“ (EGF) und „endothelial growth factor“ (ECGF) und Glykoproteine. Zusätzlich finden sich auch Thrombospondin und Fibronectin in den α -Granula. Glykoprotein Ib, Glykoprotein IIb-IIIa und das für α -Granula spezifische Protein P-Selektin gehören zu den Membranproteinen (*Tablin, 2000*). P-Selektin ist in der Membran der α -Granula von ruhenden Thrombozyten gespeichert. Es hat beim Kaninchen ein Molekulargewicht von 117 ± 7 kDa. Seine Sequenz stimmt mit der des Menschen um 74 % überein, mit der des Rindes, des Hundes, der Maus, von Ratten und Schafen um 69-77 %. Nach Aktivierung des Thrombozyten durch Thrombin oder ADP

und Freisetzung des Granulainhalts wird das P-Selektin beim Kaninchen, wie auch bei anderen Säugetieren und dem Menschen, an der Oberfläche des OCS und der Pseudopodien exprimiert. Es gehört zur Selektinfamilie und dient als membrangebundener Rezeptor für P-Selektin-Liganden. P-Selektin fördert unter anderem Interaktionen zwischen aktivierten Thrombozyten und Leukozyten (*Reed et al., 1998*). Eine weitere Granulapopulation in den Thrombozyten des Kaninchens stellen die „dense granules“ dar. Sie besitzen eine vakuolenähnliche Struktur und sind mit 50-150 nm (*Tranzer et al., 1966*) bzw. 170 nm (*Bak et al., 1969*) kleiner als die α -Granula. Im Durchschnitt kommen 3-5 dieser Granula in einem Thrombozyten des Kaninchens vor (*Bak et al., 1969*). Die elektronendichten Granula sind beim Kaninchen eng von einer Membran umgeben, die die typische Struktur von Einheitsmembranen besitzt. Einige Granula sind jedoch kleiner als die umgebende Membran, sodass sie eine klare Vakuole hinterlassen. Die Granula sind meist rund, können jedoch auch andere Variationen in Form und Struktur zeigen (*Davis und White, 1968*). Verschiedene Autoren wiesen Serotonin in speziellen subzellulären Organellen, den sogenannten „dense bodies“ oder auch „dense granules“, nach (*Tranzer et al., 1966; Meyers et al., 1982; Packham et al., 1992*). Die elektronendichten Granula enthalten weiterhin Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , Nukleotide wie ATP und ADP sowie Histamin (*Meyers et al., 1982; Packham et al., 1992*). Der Kalziumgehalt der elektronendichten Granula ist beim Menschen im Vergleich zu anderen Spezies, auch dem Kaninchen, besonders hoch. Im Gegensatz dazu haben das Kaninchen und das Schwein die höchste Konzentration an Mg^{2+} . Das ATP-ADP-Verhältnis beträgt beim Kaninchen 5, beim Menschen 0,8, was auf den wesentlich höheren Gehalt an ATP in den elektronendichten Granula des Kaninchens zurückzuführen ist. Auch andere Nukleotide wie GTP und UTP befinden sich in den elektronendichten Granula der Thrombozyten des Kaninchens. Der Hauptanteil der Nukleotide wird im Megakaryozyten gebildet und nur ein kleiner Anteil in den zirkulierenden Thrombozyten. Im Gegensatz zum Menschen ist das Kaninchen jedoch in der Lage, neu synthetisierte Triposphonukleotide in den Thrombozyten zu akkumulieren. Die Austauschrate des ATP zwischen Zytoplasma und elektronendichtem Granulum ist beim Kaninchen 300 Mal geringer als der Transfer von Serotonin (*Da Prada et al., 1981*). Der Serotoningehalt der Granula ist beim Kaninchen am höchsten. In absteigender Reihenfolge sind Rinder, Nerze, Schweine, Katzen, Pferde und Hunde, sowie der Mensch zu nennen (*Meyers et al., 1982*). Auch der Histamingehalt der elektronendichten Granula liegt beim Kaninchen wesentlich höher als beim Menschen (*Packham et al., 1992*) und bei anderen Säugetieren. Aufgrund der Decarboxylierung von Histidin zu Histamin in den Thrombozyten des Kaninchens ist eine in situ Produktion von Histamin in diesen möglich. Trotzdem wird angenommen, dass Histamin vor allem in den Megakaryozyten im Knochenmark gebildet wird (*Da Prada et al., 1981*). Die elektronendichten Granula der Kaninchen schließen außerdem Synaptophysin ein, ein Membranprotein synaptischer Vesikel, welches bei anderen Säugetieren und dem Menschen dort nicht vorkommt (*Packham et al.,*

1992). Synaptische Vesikel sind sekretorische Organellen, die sich in den präsynaptischen Nervenendigungen befinden und ihren Inhalt nach Stimulation abgeben. Es wird vermutet, dass Synaptophysin in den „dense granules“ der Thrombozyten der Kaninchen eine Rolle bei der Bildung spezifischer hexamerer Proteinkanäle für die Exozytose von Serotonin spielt (Bähler et al., 1990).

Der Nachweis von Monoaminen wie Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Normetanephrin, p-Oktopamin und m-Oktopamin in Thrombozyten des Kaninchens erfolgte durch Da Prada et al. (1981) (Da Prada et al., 1981). Desweiteren befinden sich bei allen Säugetierspezies Glykogengranula frei im Zytoplasma der Thrombozyten (Tablin, 2000; White, 2006). Sie dienen als erste Ressource für den Energiemetabolismus der ruhenden Thrombozyten (Tablin, 2000). Im Vergleich zum Kaninchen besitzen die Thrombozyten des Menschen dreimal so viel Glykogen (Bak et al., 1969). Beim Menschen wurden zudem sogenannte Glykosomen im Zytoplasma nachgewiesen. Sie sind von einer typischen Einheitsmembran umgeben und schließen Glykogenpartikel, die mit denen des Zytoplasmas identisch sind, ein (White, 2006).

Im Zytoplasma der Thrombozyten sind außerdem einige Mitochondrien und Peroxisomen vorhanden. Der Golgi-Apparat ist mäßig entwickelt und kann nur in einigen Thrombozyten ausgemacht werden. Zisternen des endoplasmatischen Retikulums oder des rauen endoplasmatischen Retikulums werden in Thrombozyten kaum gefunden (Jain, 1993).

2.2.2.4 Histochemische Eigenschaften

In den Thrombozyten des Kaninchens können verschiedene Enzyme nachgewiesen werden. In der Literatur findet man vor allem Untersuchungen zum Vorkommen der sauren Phosphatase und Arylsulfatase B. Dabei variieren die Angaben bezüglich der Lokalisation. Nach Bak et al. (1969) befindet sich die saure Phosphatase in den α -Granula der Thrombozyten des Kaninchens (Bak et al., 1969), nach Wetzel et al. (1967b) in den elektronendichten Granula (Wetzel et al., 1967b). Untersuchungen von Bentfeld und Bainton (1975) an Ratten wiesen das Enzym jedoch in den lysosomalen Granula der Thrombozyten nach, die eindeutig von den α -Granula und elektronendichten Granula abgrenzbar waren (Bentfeld und Bainton, 1975a). Auch Jain (1993) postuliert, dass sich die saure Phosphatase bei Säugetieren in den lysosomalen Granula befindet (Jain, 1993). Die Arylsulfatase B wurde 1975 von Murata et al. in den α -Granula der Thrombozyten des Kaninchens nachgewiesen (Murata et al., 1975). Im Gegensatz dazu erfolgte der Nachweis von Arylsulfatase B von Bentfeld und Bainton (1975b) bei den Thrombozyten der Ratte in den lysosomalen Granula (Bentfeld und Bainton, 1975b), was mit der Auffassung von Jain (1993) übereinstimmt. Weitere Enzyme der lysosomalen Granula bei Säugetieren sind nach Jain (1993) -Glucuronidase und Cathepsin (Jain, 1993). Es können außerdem α -Naphthyl-Acetat- und Naphthol-AS-Acetat-Esterase in den Thrombozyten des Kaninchens nachgewiesen werden, die eine stark positive Reaktion nach der

Anfärbung zeigen. Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase konnte jedoch nicht in den Thrombozyten lokalisiert werden (*Fey und Kuntze, 1970*). Beim Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase weisen die Thrombozyten von Angora-Kaninchen positive Granula auf (*Özcan, 2005*). Die alkalische Phosphatase ist nur bei niederen Vertebraten und nicht bei Mammaliern in den Thrombozyten lokalisiert (*Fey und Kuntze, 1970*). In Anwesenheit von Koagulationsfaktoren wie Thrombin und ADP kann das Reaktionsprodukt der Guanylatcyclase an der Plasmamembran und an der Membran des OCS der Thrombozyten von Kaninchen nachgewiesen werden. An denselben Stellen wurde auch Adenylatcyclase nach Inkubation mit Prostaglandin E₁ festgestellt (*Spreca et al., 1991*). Ein weiteres Enzym, das im DTS, aber nicht im OCS, lokalisiert ist, ist die Thrombozyten-spezifische Peroxidase (*Jain, 1993*). Enzyme zur Metabolisierung von Monoaminen finden sich in den Thrombozyten verschiedener Spezies, darunter auch dem Kaninchen. Die Monoaminoxidase ist in den Mitochondrien lokalisiert. Sie kommt beim Kaninchen zu 90% als A-Typ vor. Der Mensch, bei dem die Aktivität der Monoaminoxidase im Vergleich mit anderen Spezies am höchsten ist, besitzt vor allem Monoaminoxidase des B-Typs. Die Catechol-O-Methyl-Transferase befindet sich im Zytoplasma der Thrombozyten und ist beim Kaninchen zehnmal höher als beim Menschen. Sie transformiert die in den Thrombozyten vorhandenen Katecholamine in methoxylierte Derivate wie beispielsweise Normetanephrin. Die Phenolsulphotransferase katalysiert die Konjugation der Katecholamine und ihrer Metaboliten sowie verschiedener Medikamente mit Phenolgruppen. Ihre Aktivität ist beim Menschen fast 300 Mal höher als beim Kaninchen (*Da Prada et al., 1981*). In der Glykokalyx der Thrombozyten des Kaninchens und auf verschiedenen zytoplasmatischen Vakuolen, wie auch im bereits oben genannten Nukleoid, kann saure Mukosubstanz mittels dialysiertem Eisen nachgewiesen werden (*Spicer et al., 1969*). Der Begriff Mukosubstanz umfasst dabei alle mit Proteinen gekoppelten Kohlenhydrate und somit auch Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane, Glyko- und Mukoproteine (*Romeis, 1989*). Die Thrombozyten des Kaninchens zeigen zudem eine geringe Menge an PAS-positivem Material (*Jain, 1969*).

2.2.2.5 Aufgaben

Die Hauptfunktion der Thrombozyten ist die Hämostase (Blutgerinnung). Durch die Interaktion mit endothelialen Zellen erhalten die Thrombozyten die vaskuläre Integrität aufrecht (*Jain, 1993*). Dabei kommt es bei Verletzungen des Endothels zum Ausstülpen der Pseudopodien, die sich anheften und Thrombozytenaggregate bilden (*Sinowatz und Hees, 2000*). Dieser Vorgang wird als primäre Blutstillung bezeichnet (*Kaspers und Göbel, 2005a*). Die primäre Blutstillung wird durch den von-Willebrandt-Faktor, einem Integrin, vermittelt. Er bindet an das durch die Gefäßverletzung freigelegte Kollagen. Daraufhin erfolgt die Aggregation der Thrombozyten durch verschiedene Plasmafaktoren, unter anderem Thrombin und Thromboxan A₂, als auch ADP und Plättchenaktivierender Faktor (PAF).

Durch Vermehrung der für Thrombospondin und Fibrinogen hochaffinen Rezeptoren wird die Fibrinogenverbindung stabilisiert und die Thrombozyten „verkleben“ (*Karlson et al., 2005*). Dieser zweite Schritt der Hämostase wird daher auch als sekundäre Blutstillung bezeichnet (*Kaspers und Göbel, 2005a*).

Thrombozyten spielen außerdem eine Rolle bei der Immunantwort durch Aktivierung von chemotaktischen Substanzen und der Abgabe von kationischen Proteinen sowie vasoaktiven Aminen, als auch bei der Phagozytose von kleinen Partikeln und Bakterien. Sie entlassen eine Vielzahl von Proteinen wie Prokoagulantien, antiheparine Substanzen, inflammatorisch wirkende Stoffe und Wachstumsfaktoren (*Jain, 1993*). Insgesamt greifen Thrombozyten in viele Funktionkreisläufe des Körpers ein, deren Abläufe teilweise noch genauer untersucht werden müssen oder noch gar nicht erforscht sind, weshalb dies an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt wird.

2.2.3 Lymphozyten

2.2.3.1 Allgemeines

Wie in Kapitel 2.1.3. bereits erwähnt, besitzen adulte Kaninchen ein lymphozytäres Blutbild (*Gassmann und Lutz, 2005b*). Die Lymphozyten sind somit die vorherrschenden kernhaltigen Zellen in der peripheren Zirkulation (*Sanderson und Phillips, 1981*). Ihr Anteil an der Gesamtleukozytenzahl variiert (nach Angaben verschiedener Autoren) zwischen 31-52 % (*Mitruka und Rawnsley, 1981*), 30-85 % (*Quesenberry, 2004*) bzw. 30-80 % (*Jenkins, 2008*) und dürfte typischerweise bei 60 % liegen (*Benson und Paul-Murphy, 1999*). Die Schwankungsbreite der Angaben ist mit der allmählichen Entwicklung eines lymphozytären Blutbildes nach der Geburt zu erklären. Zunächst besitzen Kaninchen nur 30 % Lymphozyten, die innerhalb von vier Wochen nach der Geburt auf adulte Werte von ca. 60 % ansteigen (*Jeklova et al., 2009*). Die Lymphozyten können auf verschiedene Weise unterteilt werden. Zum einen nach der Zellgröße in klein und groß oder klein, mittelgroß und groß, zum anderen nach ihren funktionellen Unterschieden hinsichtlich der Immunantwort in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten sowie Null-Zellen (*Jain, 1993*). Die Null-Zellen umfassen Subtypen der Lymphozyten, wie große, granuläre Lymphozyten, Natürliche Killerzellen und andere Zellen, die Killerzellaktivität besitzen (*Thrall, 2004*). Beim gesunden Kaninchen besteht die Lymphozytenpopulation aus 39 % B-Lymphozyten, 44 % T-Lymphozyten und 8 % Null-Zellen (*Jenkins, 2008*) bzw. 38 % B-Lymphozyten, 45 % T-Lymphozyten und 15 % Null-Zellen (*Bast et al., 1979*). Der prozentuale Anteil von B- und T-Lymphozyten in den verschiedenen lymphatischen Organen des Kaninchens wurde von Bast et al. (1979) untersucht. Sie kamen zu folgendem Ergebnis:

	B-Lymphozyten in %	T-Lymphozyten in %
Peripheres Blut	38	45
Knochenmark	46	10
Caecumlymphknoten	31	27
Milz	45	40
Peyer-Platten	46	42
Thymus	0,3	96
Periphere Lymphknoten	16	70

Tabelle 2.3: Prozentualer Anteil von T- und B-Lymphozyten in lymphatischen Organen (nach Bast et al., 1979)

2.2.3.2 Bildung

Wie die anderen Blutzellen entstehen auch die Lymphozyten zunächst aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark (Day, 2000). Sie differenzieren sich über die „colony-forming unit-lymphocyte“ (CFU-L) (Gasper, 2000), auch lymphatische Stammzelle genannt (Gassmann und Lutz, 2005b), zur „colony-forming unit-B-lymphocyte“ (CFU-B) und „colony-forming unit-T-lymphocyte“ (CFU-T) (Gasper, 2000). Die lymphoiden Progenitoren des Knochenmarks siedeln sich dann in den primären lymphatischen Organen an. Dies sind zum einen der Thymus, in dem sich die Vorläuferzellen der T-Lymphozyten ausbilden, und zum anderen bei den Säugetieren das Knochenmark, beim Vogel die Bursa fabricii, in der sich die Vorläufer der B-Lymphozyten entwickeln. In den primären lymphatischen Organen differenzieren sich zwei funktionell und phänotypisch unterschiedliche Populationen (Jain, 1993). Nach der Ausreifung der nativen B-Zellen im Knochenmark über die Stadien der Pro-B-Zelle, Prä-B-Zelle und unreife B-Zelle gelangen sie über den Blutstrom in die sekundären lymphatischen Organe (Freund, 2008), wo sie durch Antigenstimuli zu immunkompetenten B-Lymphozyten in Form von Plasmazellen und B-Gedächtniszellen ausreifen (Jain, 1993; Freund, 2008). Die Vorläufer der T-Lymphozyten wandern bereits früh als „Thymus seeding progenitors“ in den Thymus ein und durchlaufen folgende Reifungsstadien: subkortikaler Thymozyt, kortikaler Thymozyt, medullärer Thymozyt. Sie entwickeln sich zu den verschiedenen T-Lymphozyten wie beispielsweise zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen) und T-Helferzellen (CD4⁺-T-Zellen), die in die Peripherie auswandern und dort durch ein Antigen aktiviert werden (Freund, 2008). Nach Antigenkontakt können sie sich zu T-Gedächtniszellen weiterentwickeln (Sinowatz und Hees, 2000). Auch die Natürlichen Killerzellen stammen von lymphoiden Vorläufern ab (Lebien, 2001; Schmidt et al., 2005). Sie entwickeln sich nicht nur im Knochenmark, sondern auch im Thymus (Lebien, 2001; Sobotta und Welsch, 2006). Reguliert wird die Lymphopoese durch zahlreiche Faktoren, deren Zusammenspiel sehr komplex ist. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die lokale Mikroumgebung, Interleukine und Antigene. Bei der B- und T-Zell-Bildung und -Reifung nehmen folgende Faktoren Einfluss: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-11 (B-Zellen), IL-12 (T-Zellen), TNF- α , „T-cell growth factor β “ und Interferon α (Jain, 1993). Die Entwicklung

der natürlichen Killerzellen wird vor allem durch den Stammzellofaktor, den flt-3-Liganden, IL-7 und IL-15 reguliert (Lebien, 2001).

2.2.3.3 Morphologie

Die B- und die T-Lymphozyten können mittels konventioneller histologischer Färbemethoden morphologisch nicht voneinander unterschieden werden. Eine Differenzierung ist nur mit immunzytochemischen Methoden möglich, mit denen verschiedene Antigenrezeptoren auf der Zellmembran der Lymphozyten bestimmt werden können (Sinowatz und Hees, 2000; Steffens, 2000). Noch schwieriger gestaltet sich die Identifizierung der Null-Zellen, die keine spezifischen Antigenrezeptoren exprimieren (Lebien, 2001). Auf die immunhistochemischen Methoden wird in Kapitel 2.3.5 näher eingegangen.

Allgemein sind Lymphozyten runde Zellen, die bei allen Spezies eine ähnliche und charakteristische Morphologie aufweisen (Harcourt-Brown, 2008). Anhand ihrer Größe kann man beim Kaninchen kleine und große Lymphozyten unterscheiden (Harkness und Wagner, 1995), wobei die kleinen Lymphozyten im Blutbild dominieren (Thrall, 2004) (Campbell und Ellis, 2007; Harcourt-Brown, 2008; Jenkins, 2008). Ihr Durchmesser beträgt ca. 7-10 µm (Sanderson und Phillips, 1981; Harcourt-Brown, 2008); der große Lymphozyt ist ca. 10-15 µm groß (Sanderson und Phillips, 1981).

Der Zellkern der Lymphozyten des Kaninchens ist von runder oder ovaler Form, manchmal mit einer leichten Einkerbung, und färbt sich tief purpurbau in Romanowsky-Färbungen an. Das Zytoplasma des kleinen Lymphozyten bildet einen schmalen Rand um den Zellkern, wohingegen der große Lymphozyt ein umfangreicheres Zytoplasma besitzt. Es zeigt bei den üblichen Blutfärbungen eine mittlere bis tiefe Blaufärbung, wobei in großen Lymphozyten ein perinukleärer Hof vorhanden sein kann (Sanderson und Phillips, 1981). Die zytoplasmatische Farbe ist dabei abhängig von dem Gehalt an freien Ribosomen, Polyribosomen und / oder rauem endoplasmatischem Retikulum (Jain, 1993) und variiert auch mit der Aktivität des Lymphozyten. Lymphozyten mit hoher Aktivität, die Proteine synthetisieren, besitzen ein dunkelblaues Zytoplasma im Gegensatz zu dem hellblauen Zytoplasma der inaktiven Zellen (Jain, 1993; Lester et al., 2005). Einige azurophile Granula können im Zytoplasma des großen Lymphozyten vorkommen (Sanderson und Phillips, 1981; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007). Nach Benson und Paul-Murphy (1999) gibt es azurophile Granula in den großen Lymphozyten als auch in den kleinen Lymphozyten des Kaninchens (Benson und Paul-Murphy, 1999). Zellen mit großen azurophilen Granula mit einer Größe von 1-2 µm werden auch als große, granuläre Lymphozyten bezeichnet (Jain, 1993).

Ultrastrukturell kann man bei Säugetieren kleine, mittelgroße und große Lymphozyten unterscheiden. Die kleinen Lymphozyten sind rund und im Durchschnitt 6 µm groß. Auf ihrer Oberfläche sieht man ein paar kurze Mikrovilli. Der runde Zellkern zeigt oft flache Einkerbungen und hat einen Durchmesser von

ca. 5 µm. Er enthält keine Nukleoli und verleiht der Zelle aufgrund seiner Größe ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Im Randbereich des Zellkerns befindet sich dicht gepacktes dunkles Heterochromatin. Das beim kleinen Lymphozyten spärlich vorhandene Zytoplasma enthält ein paar freie Ribosomen. Ungefähr 10% der kleinen Lymphozyten besitzen membrangebundene azurophile Granula, die sich dunkel anfärben und zwischen 0,25 und 0,5µm groß sind. Mittlere Lymphozyten mit einer Größe von 8-9 µm beim Säugetier haben einen leicht eingekerbten Zellkern mit einer dünnen Schicht Heterochromatin am Rand und einem beträchtlichen Gehalt an Euchromatin. Zudem befinden sich meist ein oder zwei Nukleoli im Zellkern. Im Zytoplasma sind in größerer Zahl freie Ribosomen vorhanden als beim kleinen Lymphozyten. Der Golgi-Apparat ist immer nachweisbar, jedoch nur klein ausgebildet. Die Anzahl anderer Organellen wie der Mitochondrien und der Zisternen des endoplasmatischen Retikulums ist variabel. Große Lymphozyten mit einer Größe von 14 oder mehr findet man in den Keimzentren lymphatischer Follikel wie in den Peyer Plaques, den Lymphknoten und der Milz. Sie sind rund bis ovoid mit Mikrovilli an ihrer Oberfläche. Der Zellkern ist rund mit zahlreichen Einkerbungen und einem hohen Gehalt an Euchromatin. Das Heterochromatin ist in einer schmalen Zone im Randbereich des Zellkerns angeordnet. Charakteristisch für den Zellkern der großen Lymphozyten ist ein grobkörniger Nukleolus. Im Zytoplasma befinden sich vor allem freie Ribosomen, Polyribosomen, endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien. Auch große, azurophile Granula mit einem Durchmesser von 1-2 µm können beobachtet werden (*Jain, 1993*). Ein Golgi-Apparat ist meist nicht nachweisbar (*Steffens, 2000*). Das Zytoskelett von tierischen Zellen besteht aus Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli (*Sinowatz und Hees, 2000*). Bereits 1987 wiesen Zauli et al. mit histochemischen Methoden Aktin in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten des Menschen nach, wobei die B-Lymphozyten eine stärkere Ausprägung von Aktinfilamenten zeigten. In B-Lymphozyten befand sich ein großer Teil der Aktinfilamente im Zytoplasma und den Mikrovilli, wohingegen in den T-Lymphozyten die Verteilung der eher spärlich vorhandenen Mikrofilamente in der Zelle variabel war (*Zauli et al., 1988*). Die Mikrovilli der Lymphozyten bestehen dabei aus parallelen Aktinfilament-Bündeln, die seitlich durch Aktin-bindende Proteine miteinander verbunden sind (*Khismatullin, 2009*). Gezielt in T-Lymphozyten nachgewiesene Aktinfilamente dienen in diesen der Kontrolle der Zellmorphologie und Plastizität. Zudem ermöglichen sie eine mechanische Belastung, die für die Mobilität der Zelle erforderlich ist. Über fokale Adhäsion sind die Aktinfilamente mit den Integrinen der Zellmembran verknüpft. Zu den Aktin-bindenden Proteinen gehören Talin, Vinculin und Paxillin (*Billadeau et al., 2007*). Intermediärfilamente spielen eine aktive Rolle bei der Transmigration und Adhäsion von mononukleären Zellen. Das Intermediärfilament Vimentin beeinflusst in Lymphozyten die Lokalisation und Aktivität von Oberflächenmolekülen durch Bildung einer fest verankerten und organisierten Struktur (*Nieminen et al., 2006*). In B- und T-Lymphozyten des Menschen kann Vimentin durch Immunfluoreszenzmethoden

nachgewiesen werden. Vor allem T-Lymphozyten besitzen viel Vimentin, das in Form von großen Spiralen fluoreszenzmikroskopisch zu sehen ist (*Zauli et al., 1988*). Mikrotubuli dienen in T-Lymphozyten der Regulation der Sekretion von Effektormolekülen der T-Zellen und wirken bei der Rezeptor-Endozytose und der Aufrechterhaltung der F-Aktin-abhängigen Strukturen mit (*Billadeau et al., 2007*).

2.2.3.4 Histochemische Eigenschaften

Die Lymphozyten des Kaninchens weisen keine Aktivität der Peroxidase auf (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*). Positive Färbereaktionen zeigen die Lymphozyten des Kaninchens jedoch beim Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase, der Chloracetat-Esterase (*Fey und Kuntze, 1970; Osbaldiston und Sullivan, 1978a*) und Naphthol-AS-Acetat-Esterase (*Fey und Kuntze, 1970*). Die Aktivität der unspezifischen Esterase in Lymphozyten kann im Gegensatz zu der in den Monozyten nicht mit Natriumfluorid gehemmt werden (*Jain, 1993*). Die α -Naphthyl-Acetat-Esterase zeigt sich in positiven Lymphozyten durch das Auftreten von ein oder mehreren enzympositiven Granula, teilweise auch mit einem höheren Granulagehalt. Positive Lymphozyten haben im Blutausschlag einen Anteil von 68,2% (*Özcan, 2005*). Alkalische Phosphatase kann in den Lymphozyten des Kaninchens nicht nachgewiesen werden (*Jain, 1968; Fey und Kuntze, 1970*). Saure Phosphatase ist hingegen in den Lymphozyten des Kaninchens vorhanden (*Fey und Kuntze, 1970; Micheev und Suchanov, 1972*). Eine genauere Untersuchung der sauren Phosphatase in mononukleären Zellen von Wetzel et al. (1967b) ergab eine positive Reaktion in den Granula, den Vesikeln und Vakuolen des Golgi-Apparates (*Wetzel et al., 1967b*). Bei Säugetieren enthalten Lymphozyten außerdem β -Glucuronidase sowie Enzyme für die Nucleinsäuresynthese (*Jain, 1993*). Zudem färben sich Lymphozyten von Kaninchen nicht mit Sudanswarz B an (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*) und sind PAS-negativ (*Jain, 1969*).

2.2.3.5 Aufgaben

Lymphozyten sind Zellen des erworbenen Immunsystems. Sie besitzen Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche, die spezifisch bestimmte molekulare Strukturen erkennen. Durch den Kontakt mit dem Antigen kommt es zur Aktivierung, Vermehrung und Reifung von Lymphozyten mit dieser Antigen-spezifität in den sekundären lymphatischen Organen. Es bilden sich dabei die antigenspezifischen Effektorzellen und langlebigen Gedächtniszellen (*Kaspers und Göbel, 2005b*). Die B-Lymphozyten gehören zu der humoralen Abwehr des erworbenen Immunsystems. Sie werden nach Antigenstimulation zu Plasmazellen, die Immunglobuline bilden (*Kaspers und Göbel, 2005b*). Für die Antikörperbildung müssen Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten interagieren. Zunächst binden Makrophagen das Antigen mit Hilfe ihrer Rezeptoren an ihrer Oberfläche. Dieses Antigen wird prozessiert und den T-Helferzellen und B-Zellen präsentiert. Sowohl die T-Helferzellen als auch die B-

Zellen binden an das prozessierte Antigen und werden durch Zell-Zell-Interaktionen zur Proliferation angeregt (*Jain, 1993*).

Die T-Lymphozyten sind für die zellvermittelte Immunantwort zuständig. Bei den T-Lymphozyten können verschiedene Subpopulationen unterschieden werden (*Kaspers und Göbel, 2005b; Sinowatz und Hees, 2000*), zu denen die T-Helferzellen, die zytotoxischen T-Zellen, die T-Suppressorzellen und die T-Gedächtniszellen gehören. Die T-Helferzellen interagieren mit den B-Lymphozyten und fördern damit ihre Reifung zu Plasmazellen. Im Gegensatz dazu sind die zytotoxischen T-Zellen Effektorzellen, die Zielzellen zerstören können. Die T-Suppressorzellen hingegen verhindern überschießende Immunreaktionen, wobei sich ihre Fähigkeit sowohl gegen B-Zellen als auch gegen T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen richtet. T-Gedächtniszellen können ein auslösendes Antigen auch nach längerer Zeit wiedererkennen (*Sinowatz und Hees, 2000*). Die Natürlichen Killerzellen sind auch eine Population von Lymphozyten, die keinen Rezeptor für spezifische Antigene exprimieren (*Gershwin, 2008*). Sie erkennen Zielzellen durch inhibitorische und aktivierende Signale (*Lebien, 2001*). Da sie ihre Zielzellen ohne vorherige Exposition abtöten, gehören sie zum angeborenen Immunsystem (*Gershwin, 2008*).

2.2.4 Monozyten

2.2.4.1 Allgemeines

Die Monozyten sind die größten Zellen im peripheren Blut des Kaninchens mit einem Durchmesser von ca. 15-18 μm (*Moore, 2000; Melillo, 2007; Jenkins, 2008*). Sie machen ca. 1-4 % (*Schermer, 1958; Quesenberry, 2004; Jenkins, 2008*) bzw. 9 % (*Banks, 1986; Parmley, 1988*) den Zellen des weißen Blutbildes aus.

2.2.4.2 Bildung

Monozyten entwickeln sich aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und wandern schon kurz nach dem Eintreten in die Blutbahn in das umgebende Bindegewebe und in die Körperhöhlen aus, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren (*Jain, 1993*). Ihre Entwicklung im Knochenmark bis zur Freisetzung in die Blutbahn beträgt beim Kaninchen $38,1 \pm 3,1$ Stunden (*Goto et al., 2003*). Aus der pluripotenten Stammzelle entwickelt sich unter dem Einfluss der Mikroumgebung des Knochenmarks und verschiedenen Zytokinen die bipotente „colony-forming-unit-granulocyte-monocyte“ (CFU-GM), aus der sich auch die neutrophilen Granulozyten bilden (*Jain, 1993; Bienzle, 2000*). Aus der CFU-GM entsteht die CFU-M („colony-forming-unit-monocyte“) (*Gasper, 2000*) und dann der Monoblast, auf den der Promonozyt und der Monozyt als weitere Differenzierungsstufen

folgen. Dabei teilt sich der Monoblast einmal, der Promonozyt ein- bis zweimal. Der Monozyt dagegen ist nicht mehr zur Teilung fähig (*Jain, 1993*). Lichtmikroskopisch kann man den Monoblasten vom Myeloblasten nicht unterscheiden (*Bienzle, 2000*). Der Promonozyt hingegen kann mit der Wright-Färbung identifiziert werden. Er ist ca. 7-15 µm groß und enthält einen großen runden oder ovalen Nukleus mit zwei bis fünf Nukleoli. Um den Kern herum befindet sich reichlich Zytoplasma, das zahlreiche freie Ribosomen, einen deutlichen Golgi-Apparat und einige Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums enthält. Zusätzlich kann man viele kleine azurophile Granula, die in der Golgi-Region lokalisiert sind, erkennen (*Nichols et al., 1971*). Sie haben einen homogen dichten Inhalt und sind normalerweise von runder oder ovaler Form, manchmal jedoch auch pleomorph (*Spicer et al., 1968; Nichols et al., 1971*). Ihre Größe beträgt zwischen 100 und 500 nm (*Nichols et al., 1971*).

Der gesamte Prozess der Monozytopoese wird durch IL-3 und den „granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF)“ reguliert (*Jain, 1993*). Zusätzlich steuert der „monocyte-specific colony-stimulating factor (M-CSF)“ die Proliferation der Vorläuferzellen wie des Monoblasten und des Promonozyten (*Jain, 1993*) (*Bienzle, 2000*). Der M-CSF ist ein Glykoprotein, das von verschiedenen Zellen wie aktivierten Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und endothelialen Zellen produziert wird (*Jain, 1993*). Auch IL-6 und β-Chemokine spielen beim Kaninchen eine wichtige Rolle als Mediatoren der Produktion und Mobilisation von Monozyten aus dem Knochenmark. Im Gegensatz zu den Granulozyten gibt es keinen Pool von Monozyten im Knochenmark des Kaninchens. Sie besitzen hingegen einen großen Monozytenpool in der Lunge (*Goto et al., 2003*), da ihre Monozyten vorübergehend in den pulmonalen Blutgefäßen verweilen. Dadurch können Stimuli, wie z.B. infektiöse Agentien beim Kaninchen zu einer Monozytose führen (*Bienzle, 2000*).

2.2.4.3 Morphologie

Die Monozyten beim Kaninchen sind denen der anderen Säuger und des Menschen ähnlich (*Thrall, 2004*). Der Zellkern ist insgesamt kleiner als bei den Promonozyten und es liegt ein geringeres Kern-Zytoplasma-Verhältnis vor (*Nichols et al., 1971*). Die Beschreibungen hinsichtlich der Form des Zellkerns variieren in der Literatur von rund bis oval (*Campbell und Ellis, 2007*) oder gelappt (*Schermer, 1958; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007*) bis hin zu bohnen- oder hufeisenförmig (*Moore, 2000; Melillo, 2007*) oder auch nierenförmig (*Oka et al., 1982*). Der Zellkern lässt sich purpurfarben in Standardfärbungen für Blutzellen darstellen (*Melillo, 2007*), wobei sich das Chromatin diffus oder hell anfärbt (*Moore, 2000*). Es erscheint weniger kondensiert als das Chromatin von den neutrophilen Granulozyten (*Jenkins, 2008*). Der Zellkern ist von einem breiten Saum von hellblauem Zytoplasma umgeben (*Moore, 2000; Quesenberry, 2004*), das teilweise wolzig graublau oder auch marmoriert erscheint (*Schermer, 1958; Campbell und Ellis, 2007; Melillo, 2007*). In ihm befinden sich

normalerweise ein paar (Moore, 2000; Campbell und Ellis, 2007) bzw. viele (Thrall, 2004) Vakuolen (Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Quesenberry, 2004). Das Zytoplasma enthält einige Ribosomen und feine Granula, die in Romanowsky-Färbungen azurophil erscheinen (Campbell und Ellis, 2007). Sie sind größer als die Granula der Promonozyten und haben im Elektronenmikroskop einen einheitlich dichten und homogenen Inhalt. Nach Nichols et al. (1971) können bis zu 50 Granula in einem Monozyten vom Kaninchen beobachtet werden (Nichols et al., 1971). Oka et al. (1982) konnten 18-50 Granula pro Monozyt, ca. 30,4 Granula im Durchschnitt, erkennen, die eine Tendenz zur Bildung von Clustern zeigten (Oka et al., 1982). Der Golgi-Apparat ist in zirkulierenden Monozyten gut ausgebildet, was darauf schließen lässt, dass die Granula auch in zirkulierenden Zellen gebildet werden (Nichols et al., 1971). Elektronenmikroskopisch kann man bei Säugetieren ein paar unregelmäßige kurze Mikrovilli an der Zelloberfläche ausmachen. Im Zytoplasma sind kleine, runde Mitochondrien, freie Ribosomen und kurze Profile des endoplasmatischen Retikulums zu erkennen (Steffens, 2000). Das Zytoskelett der Monozyten besteht, wie das Zytoskelett aller tierischen Zellen, aus Aktin-, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli (Sinowatz und Hees, 2000). Aktinfilamente verleihen der Zellmembran Stabilität und Form und bilden Projektionen wie beispielsweise Mikrovilli an ihrer Zelloberfläche (Alberts et al., 2008). In Leukozyten sind sie die Hauptstrukturproteine, die sich mit Hilfe von Myosin kontrahieren (Schmid-Schönbein, 1990). In adhärenenten Monozyten des Menschen konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Verteilung von Aktin, Myosin und α -Actinin bestimmt werden. Diese Untersuchungen zeigten, dass Myosin und α -Actinin eng mit dem Aktinnetzwerk verbunden sind. Es wird von den Autoren angenommen, dass in Monozyten das Aktinnetzwerk durch α -Actinin an der Plasmamembran verankert ist. Dies wird beibehalten, wenn sich aufgrund eines Stimulus Aktin in den Lamellipodia reorganisiert und polymerisiert. Somit spielen F-Aktin und α -Actinin eine entscheidende Rolle an den mobilen Enden der Lamellipodien. Durch das Hineingleiten der Myosinmoleküle in die Aktinfilamente entsteht eine mechanisch-chemische Energie, die die Bildung von Lamellipodien bewirkt (Takubo et al., 1999).

Das Intermediärfilament Vimentin wurde von Benes et al. (2006) in Monozyten und Makrophagen des Menschen nachgewiesen, wo es eine entscheidende Rolle bei der Bildung von aktiven Makrophagen spielt (Benes et al., 2006).

2.2.4.4 Histochemische Eigenschaften

Die Granula der Monozyten sind positiv für saure Phosphatase (Spicer et al., 1968; Fey und Kuntze, 1970; Nichols et al., 1971) und Arylsulfatase, weshalb sie auch als primäre oder lysosomale Granula bezeichnet werden können. Reaktionsprodukte finden sich auch in einigen Segmenten der Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (Nichols et al., 1971), in einigen Zisternen des Golgi-Apparates und damit assoziierten Vesikeln (Wetzel et al., 1967b; Nichols et al., 1971) sowie in den unreifen

Granula der Promonozyten und im Fall der Arylsulfatase auch in den reifen Granula. Saure Phosphatase kann selten in den reifen Granula nachgewiesen werden. Reaktionsprodukte der Arylsulfatase sind nur in wenigen Zisternen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates zu sehen (*Nichols et al., 1971*).

Monozyten des Kaninchens aus dem Knochenmark und der Blutbahn sind, im Gegensatz zu denen des Menschen und des Meerschweins, Peroxidase-negativ (*Nichols et al., 1971; Oka et al., 1982*). Osbaldiston und Sullivan (1978) konnten in einem Blutaussstrich bei einem Monozyten zwei bis drei kleine Peroxidase-positive Granula nachweisen. Die Monozyten anderer Blutaussstriche verhielten sich aber ausschließlich Peroxidase-negativ (*Osaldiston und Sullivan, 1978b*). In vitro Untersuchungen von Oka et al. (1982) zeigten, dass jedoch bei 20% der untersuchten Monozyten des Kaninchens eine Reaktivität im rauen endoplasmatischen Retikulum und der Kernhülle vorliegt, wenn die Monozyten an Plastikteilchen gebunden hatten (*Oka et al., 1982*).

Die Granula der Monozyten beim Kaninchen sind außerdem positiv für unspezifische Esterasen bei Verwendung von α -Naphthyl-Acetat als Substrat (*Osaldiston und Sullivan, 1978a; Osaldiston und Sullivan, 1978b; Özcan, 2005*) und für die spezifische Chloracetat-Esterase (*Osaldiston und Sullivan, 1978a; Osaldiston und Sullivan, 1978b*). Sie zeigen eine diffuse, positive Reaktion (*Özcan, 2005*). Die unspezifische Esterase der Monozyten kann, im Gegensatz zu der unspezifischen Esterase der Lymphozyten (*Jain, 1993*), mit Natrium-Fluorid gehemmt werden (*Raskin und Valenciano, 2000*).

Monozyten sind außerdem negativ für alkalische Phosphatase (*Osaldiston und Sullivan, 1978b; Jain, 1968*). Mit der Sudanschwarz B-Färbung kann, im Unterschied zu den Lymphozyten, in den Monozyten des Kaninchens sudanophiles Material im Zytoplasma nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den positiven Granula der Granulozyten sind die sudanschwarzpositiven Granula der Monozyten sehr viel kleiner und weniger zahlreich (*Osaldiston und Sullivan, 1978b*). Monozyten des Kaninchens reagieren außerdem negativ bei der PAS-Reaktion (*Jain, 1969*).

Durch immunhistochemische Methoden wiesen Shimokawa et al. (1990) die Bindung des monoklonalen Antikörpers RbM2, der spezifisch für ein Antigen der Monozyten und Makrophagen des Kaninchens ist, nach. Dabei konnten Reaktionsprodukte in den Lysosomen der Monozyten und Makrophagen durch Immunelektronenmikroskopie identifiziert werden. Bei dem zugehörigen Antigen handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 50 000 Da. Eine genauere Charakterisierung fehlt jedoch (*Shimokawa et al., 1990*). Weiterhin sind verschiedene CD-Antigene (CD9, CD11a, CD14, CD18, CD23 und CD43) auf der Zelloberfläche von Monozyten beim Kaninchen durch monoklonale Antikörper identifiziert worden (*Brodersen et al., 1998*).

2.2.4.5 Aufgaben

Monozyten sind Bestandteile des mononukleären Phagozytensystems (MPS), zu dem auch ihre Vorläufer im Knochenmark, Gewebsmakrophagen und Zellen, die sich von den Monozyten ableiten, wie z.B. die Kupffer-Sternzellen der Leber, gehören (*Sinowatz und Hees, 2000*). Sie sind Bestandteil der unspezifischen Abwehr (*Silbernagl und Despopoulos, 2001*). Ihre Aufgabe besteht vor allem in der Phagozytose und im Abbau von Zelldebris und Mikroorganismen (*Bienzle, 2000*). Letztere erkennen sie anhand von Kohlenhydratrezeptoren auf ihrer Oberfläche (*Silbernagl und Despopoulos, 2001*). Dies zeigt sich beim Kaninchen durch eine Erhöhung der Anzahl der Monozyten im peripheren Blut bei bakteriellen Infektionen. Bei anderen Spezies ist die Monozytose dagegen mit chronischen Erkrankungen assoziiert, was beim Kaninchen nicht der Fall sein muss (*Harcourt-Brown, 2008*). Bei Entzündungsreaktionen sezernieren Monozyten Zytokine und chemische Mediatoren (*Bienzle, 2000*), zu denen Prostaglandin-2 und Thromboxan-2 gehören, was in Bezug auf das Kaninchen von Saito et al. (1986) nachgewiesen wurde (*Saito et al., 1986*). Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der spezifischen Immunabwehr. Dabei präsentieren sie Antigene zusammen mit MHC-Molekülen der Klasse II den T-Lymphozyten, welche diese durch den T-Zell-Rezeptor erkennen, sodass eine T-Zell-spezifische Immunreaktion in Gang gesetzt wird (*Karlson et al., 2005*). Weiterhin sind sie auch zytotoxisch gegenüber Tumoren oder Fremdzellen (*Bienzle, 2000*).

2.2.5 Neutrophile Granulozyten

2.2.5.1 Allgemeines

Die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens nehmen eine besondere Stellung innerhalb der neutrophilen Granulozyten der Säugetiere ein, da sich ihre Granula in Romanowsky-Färbungen nicht neutral verhalten, sondern eine eosinophile Färbung zeigen (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974; Sanderson und Phillips, 1981; Jain, 1993; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007*). Dies wurde bereits von Ehrlich im 19. Jahrhundert festgestellt, der diese Zellen daher als pseudoeosinophil bezeichnete (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974*). Weitere Synonyme für die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens in der Literatur findet man vor allem im Englischen. Hier werden sie amphophile, azidophile oder heterophile Granulozyten genannt (*Kozma et al., 1974; Sanderson und Phillips, 1981; Harkness und Wagner, 1995; Benson und Paul-Murphy, 1999; Jenkins, 2008*). Abgesehen von ihrem Färbeverhalten entsprechen die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens elektronenmikroskopisch, funktionell und biochemisch denen der anderen Säugetiere und des Menschen (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974; Sanderson und Phillips, 1981; Dodds, 2000; Quesenberry, 2004; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Jenkins, 2008*).

Die neutrophilen Granulozyten haben einen Anteil von ca. 30-50 % (*Schermer, 1958*), 36-50 % (*Mitruka und Rawnsley, 1981*) bzw. 20-75 % (*Jenkins, 2008*) an der Gesamtleukozytenzahl beim Kaninchen und machen somit den zweitgrößten Pool an Leukozyten im Blut aus.

2.2.5.2 Bildung

Die Differenzierung der Granulozyten, die Granulopoese, wird von allen drei Granulozytenpopulationen ähnlich durchlaufen. Dabei bildet der Myeloblast eine für alle drei Granulozytenarten morphologisch erkennbare Vorstufe. Aus diesem entsteht durch Teilung und Differenzierungsprozesse der Promyelozyt, aus dem der Myelozyt hervorgeht (*Sobotta und Welsch, 2006*). Der Promyelozyt ist das Differenzierungsstadium, in dem sich zunächst unspezifische Granula der einzelnen Granulozytenpopulationen ausbilden. Erst im Myelozyten werden die spezifischen Granula gebildet, sodass man einen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Myelozyten unterscheiden kann. Über den Myelozyten kommt es zur Bildung der Metamyelozyten, die sich über eine stabkernige Zwischenstufe zu den reifen Granulozyten entwickeln (*Sinowatz und Hees, 2000*). Diese letzten drei Stadien repräsentieren Zellen, die nicht mehr zur Teilung befähigt sind (*Parmley, 1988*). Bei den neutrophilen Granulozyten spricht man somit vom neutrophilen Myelozyt, neutrophilen Metamyelozyt, stabkernigen neutrophilen Granulozyten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (*Sobotta und Welsch, 2006*).

Morphologisch können die granulozytären Myeloblasten nicht unterschieden werden. Sie sind bei allen Säugetieren ca. 10-15 µm groß (*Parmley, 1988*) und besitzen einen runden bis ovalen Zellkern (*Jain, 1993; Reagan, 2008*). Das Chromatin ist fein getüpfelt (*Jain, 1993; Reagan, 2008*) bzw. feinverteilt (*Parmley, 1988*). Zumeist sind im Zellkern ein bis mehrere Nukleoli (*Jain, 1993; Reagan, 2008*), nach *Parmley (1988)* zwei bis vier, mit einem Durchmesser von 1,5 µm vorhanden (*Parmley, 1988*). Der neutrophile Myeloblast des Kaninchens hat einen runden oder ovoiden Zellkern mit weicher Kontur, komplexen Nukleoli und Chromatin mit der Tendenz zur Margination (*Wetzel et al., 1967a*). Das gut ausgebildete Zytoplasma der Myeloblasten hat in der Wright-Färbung einen blaugrauen Farbton (*Parmley, 1988; Jain, 1993; Reagan, 2008*). Es kann sowohl frei von Granula sein (Typ I Myeloblast) oder manchmal ein paar feine, rötlich-purpurne azurophile Granula zeigen (Typ II Myeloblast) (*Jain, 1993*). Ultrastrukturell sieht man im neutrophilen Myeloblasten des Kaninchens zahlreiche Ribosomen an der äußeren Membran der Kernhülle und eine große Population an freien Ribonukleoproteinpartikeln im Zytoplasma. Die Menge an rauem endoplasmatischem Retikulum variiert. Ein paar Mitochondrien und eine Golgi-Zone können nur unregelmäßig beobachtet werden (*Wetzel et al., 1967a*). Der Promyelozyt, auch Progranulozyt genannt (*Hawkey und Dennett, 1990*), ist beim Säugetier mit einem Durchmesser von 14-20 µm in Blutausstrichen größer als der Myeloblast (*Parmley, 1988*). Sein Zellkern unterscheidet sich nicht wesentlich von dem des Myeloblasten (*Jain,*

1993). Er enthält auch feinverteilt Chromatin sowie ein bis zwei Nukleoli (Parmley, 1988). Das Zytoplasma ist umfangreich und färbt sich hellblau (Jain, 1993). Der Promyelozyt ist beim Säugetier, somit auch beim Kaninchen, das Stadium der primären Granulogenese (Wetzel et al., 1967a; Dunn et al., 1968; Parmley, 1988). Die primären Granula der neutrophilen Granulozyten sind klein und zeigen im Mikroskop eine rötlich-purpurne als auch pinkfarbige Anfärbung (Jain, 1993; Reagan, 2008). Ultrastrukturell stellen sie beim Kaninchen homogene, elektronendichte, kugelige Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 0,4 µm bzw. $0,5 \pm 0,2$ µm dar, umgeben von einer typischen zytoplasmatischen Membran (Wetzel et al., 1967a; Spicer et al., 1968). Sie entspringen der konkaven Seite des Golgi-Apparates (Spicer et al., 1968). Freie Ribonukleoproteinpartikel und raues endoplasmatisches Retikulum entwickeln sich zeitgleich mit einem extensiven zytoplasmatischen Wachstum. Der Reichtum an endoplasmatischem Retikulum deutet dabei auf eine aktive Proteinsynthese für die Granula hin (Wetzel et al., 1967a). Der Myelozyt variiert in seiner Größe, da er sich zweimal teilt, bevor er zum Metamyelozyten ausreift (Jain, 1993). Er hat in Blutausrichen von Säugetieren einen Durchmesser von 10-15 µm (Parmley, 1988). Beim Kaninchen ist der Zellkern langgestreckt und hat ausgeprägte Einkerbungen. Das Chromatin ist stark kondensiert und die Nukleoli sind wenig prominent (Wetzel et al., 1967a). Das Zytoplasma des Myelozyten färbt sich vor allem in der Peripherie schwach blau an und enthält zelllinienspezifische Granula (Jain, 1993). Im Stadium des neutrophilen Myelozyten kommt es beim Kaninchen zur Ausbildung der sekundären Granula mit einem Durchmesser von 0,13-0,65 µm (Wetzel et al., 1967a), die sich meist pink anfärben lassen (Reagan, 2008). Sie entstammen Vesikeln, die aus der konvexen Seite des Golgi-Apparates entspringen und Material enthalten, das für sekundäre Granula spezifisch ist (Spicer et al., 1968). In diesem Reifungsstadium werden auch primäre Granula mit einem Durchmesser von 0,25-0,75 µm beobachtet. Die neutrophilen Myelozyten des Kaninchens enthalten weniger freie Ribonukleoproteinpartikel als ihre Vorgänger und haben einen reduzierten Gehalt an rauem endoplasmatischem Retikulum sowie ein reduziertes Zytoplasmavolumen (Wetzel et al., 1967a). Der Metamyelozyt variiert, wie auch der Myelozyt, in seiner Größe. Sein Zellkern ist bohnenförmig eingekerbt sowie breit als auch langgestreckt mit verdickten Enden (Jain, 1993). Das Chromatin ist granulär und stärker kondensiert (Parmley, 1988; Reagan, 2008). Der Inhalt des Zytoplasmas, das blau anfärbbar ist (Parmley, 1988), entspricht dem des Myelozyten (Jain, 1993). Der stabkernige Granulozyt hat ungefähr die Größe eines ausgereiften Granulozyten. Sein Nukleus ist schlanker als bei seinen Vorläufern, nicht segmentiert mit verstreuten Chromatinansammlungen und einer weichen Kontur (Jain, 1993). Er wird auch als hufeisenförmig beschrieben (Reagan, 2008). Das Zytoplasma kann klar, blass oder schwach blau sein (Jain, 1993; Reagan, 2008) und enthält verschiedene Granula (Jain, 1993).

Der ausgereifte Granulozyt kann durch seinen segmentierten Zellkern mit stark kondensiertem Chromatin (*Reagan, 2008*) und anhand der spezifischen Granula den verschiedenen Granulozytenpopulationen zugeordnet werden (*Jain, 1993*).

Im Knochenmark des Kaninchens sind die Vorläufer der granulozytären Zelllinien und ihre Endzellen mit 42,4 % vertreten. Davon entfallen 0,7 % auf Myeloblasten, 0,6 % auf Promyelozyten, 3,1 % auf Myelozyten, 7,4 % auf Metamyelozyten, 23,2 % auf stabkernige und 5,3 % auf segmentkernige neutrophile Granulozyten (*Moore, 2000*).

Die Regulation der Granulopoese erfolgt durch eine Vielzahl von Faktoren. Zu den wichtigsten Regulationsfaktoren gehören IL-3 als multispezifischer Wachstumsfaktor und verschiedene „colony-stimulating factors“ (CSFs), die durch eine Vielzahl von Zellen unter anderem den T-Lymphozyten und Makrophagen produziert werden. Die wichtigsten drei Kolonie-stimulierenden Faktoren sind „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF), „granulocyte colony-stimulating factor“ (G-CSF) und „monocyte colony-stimulating factor“ (M-CSF). GM-CSF wird für den physiologischen Regulator der Granulopoese gehalten und daher auch als Granulozytopoetin bezeichnet (*Jain, 1993*).

2.2.5.3 Morphologie

Der neutrophile Granulozyt des Kaninchens hat einen Durchmesser von ca. 7-11 µm (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974; Hein und Hartmann, 2005*), 8-11 µm (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*), 10-15 µm (*Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007*) bzw. 9-15 µm (*Marshall, 2008*). Der Zellkern ist mehrfach gelappt (*Dodds, 2000*), polymorph (*Kozma et al., 1974; Moore, 2000; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Jenkins, 2008*) bzw. stark segmentiert (*Schermer, 1958*). Seine Einzelsegmente stehen über dünne Stränge von Chromatin miteinander in Verbindung (*Schermer, 1958; Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007*). Er färbt sich in Romanowsky-Färbungen dunkel purpurbau (*Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007*), hellblau bis purpurfarben (*Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Jenkins, 2008*) bzw. ist von heller purpurner Farbe (*Moore, 2000*). Eine ausbleibende Segmentierung des Zellkerns der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens kann aufgrund der Pelger-Huët-Anomalie auftreten (*Nachtsheim, 1950*).

Das Zytoplasma kann als nahezu farblos (*Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007*) oder diffus bzw. blass pink, aufgrund der zahlreich vorkommenden zytoplasmatischen Granula, angesehen werden (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Sanderson und Phillips, 1981; McLaughlin und Fish, 1994; Moore, 2000; Thrall, 2004; Jenkins, 2008*). Nach Osbaldiston und Sullivan (1978b) stellt sich das Zytoplasma in der Giemsa-Färbung pink dar (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*).

In den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens sind drei Granulapopulationen vertreten, die als primäre (azurophile), sekundäre (spezifische) und tertiäre Granula bezeichnet werden (*Dunn et al.,*

1968). Im Gegensatz zu den primären und sekundären Granula sind die tertiären Granula nur elektronenmikroskopisch zu sehen (Jain, 1993).

Die beiden zytoplasmatischen Granulapopulationen, die primären und sekundären Granula, entstammen verschiedenen Bereichen des Golgi-Apparates und haben somit unterschiedliche Funktionen (Benson und Paul-Murphy, 1999). Allgemein kann man zum einen die kleinen, pinkfarbigen Granula und zum anderen die großen, dunkleren, pinkfarbigen bis rötlichen Granula in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens unterscheiden (Baggiolini et al., 1970; Sanderson und Phillips, 1981; Jain, 1993; Harkness und Wagner, 1995; Benson und Paul-Murphy, 1999; Dodds, 2000; Moore, 2000; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Melillo, 2007; Jenkins, 2008). In der Giemsa-Färbung sind diese beiden Granulapopulationen gut zu differenzieren (Osbaldiston und Sullivan, 1978b). Dabei haben die großen Granula der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens einen Durchmesser von 0,5-0,8 µm (Baggiolini et al., 1970) oder 0,3-0,8 µm (Parmley, 1988), die kleinen Granula einen Durchmesser von ca. 0,25-0,4 µm (Baggiolini et al., 1970) bzw. 0,25-0,5 µm (Parmley, 1988). Sie zeigen eine runde bis längliche Form, wobei die meisten Granula oval sind. In der Literatur ist die Zuordnung der primären und sekundären Granula nicht ganz eindeutig. Im Gegensatz zu den anderen Autoren (Baggiolini et al., 1970; Sanderson und Phillips, 1981; Parmley, 1988; Jain, 1993; Harkness und Wagner, 1995; Benson und Paul-Murphy, 1999; Dodds, 2000; Moore, 2000; Melillo, 2007) bezeichnen Thrall (2004) wie auch Campbell und Ellis (2007) die kleinen, pinkfarbigen Granula als primäre und die großen, dunklen pinkfarbigen bis rötlichen Granula als sekundäre Granula (Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007). Da in der Literatur (siehe oben) die allgemeine Auffassung herrscht, dass die primären Granula größer, dunkel-pink bis -rötlich und die sekundären Granula klein und pinkfarben sind, wird im nachfolgenden Text auch diese Nomenklatur verwendet. Nach Osbaldiston und Sullivan (1978b) beträgt der Anteil der primären Granula an der gesamten Granulapopulation 25-40 % (Osbaldiston und Sullivan, 1978b). Die sekundären Granula machen 80-90 % der Granulapopulation im neutrophilen Granulozyten des Kaninchens aus (Benson und Paul-Murphy, 1999). Jain (1993) beschreibt das Verhältnis von primären zu sekundären Granula als 1:2 (Jain, 1993).

Elektronenmikroskopisch kann man auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten verschiedener Tierspezies Mikrovilli identifizieren, die eine Rolle bei der Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an das Endothel spielen. Während ihrer phagozytotischen Aktivität verändert sich die Gestalt der neutrophilen Granulozyten von rund zu langgestreckt mit langen Pseudopodien, die Zytoplasma ohne Organellen enthalten (Steffens, 2000). Der Zellkern zeigt bei weiblichen Tieren, somit auch beim weiblichen Kaninchen, einen trommelschlegelartigen Fortsatz („drumstick“) (Kozma et al., 1974; Jain, 1993; Harkness und Wagner, 1995), der ein inaktiviertes X-Chromosom darstellt (Jain, 1993). Der Zellkern enthält vor allem Heterochromatin. Im Zentrum des Zellkerns befindet sich in geringerer

Menge Euchromatin. Ein Nukleolus ist bei neutrophilen Granulozyten meist nicht vorhanden oder schlecht abgrenzbar. Abgesehen von den Granula sind im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten wenige Organellen zu finden (*Steffens, 2000*). Den größten Anteil nehmen Glykogenpartikel ein. Die Mitochondrien sind langgestreckt, dünn und spärlich vorhanden. Beim Kaninchen sind zudem wenig raues endoplasmatisches Retikulum, ein paar Ribosomen und ein schwach ausgeprägter Golgi-Apparat zu sehen (*Wetzel et al., 1967a*).

Die primären Granula sind beim Kaninchen am größten und elektronendichter als andere zytoplasmatische Strukturen im neutrophilen Granulozyten (*Baggiolini et al., 1970*). Die sekundären Granula sind zahlreicher und ungefähr halb so groß wie die primären Granula (*Steffens, 2000*). Die nur elektronenmikroskopisch sichtbaren tertiären Granula kommen sowohl beim Kaninchen als auch beim Menschen und anderen Tieren vor und sind kleiner als die sekundären Granula (*Jain, 1993*). Sie stellen sich als kleine, pleomorphe, elektronendichte Granula (*Wetzel et al., 1967a*) mit einer Tendenz zur Bildung von Clustern dar (*Wetzel et al., 1967b; Spicer et al., 1968*) und können in den Vorläufern des neutrophilen Granulozyten nicht identifiziert werden. Sie sind erst in den reiferen Zellen zu erkennen, wobei nicht geklärt ist, ob sie parallel mit den sekundären Granula oder erst später in Erscheinung treten (*Wetzel et al., 1967a*). Zytoskelettale Elemente umfassen bei den neutrophilen Granulozyten, wie auch allgemein den Leukozyten, Aktinfilamente, Vimentin und Mikrotubuli (*Khismatullin, 2009*). Das Aktinmolekül hat in neutrophilen Granulozyten des Kaninchens ein Molekulargewicht von 43 kDa (*Huang und Devanney, 1986*). Wie bei allen Leukozyten besteht es aus zwei miteinander verdrehten Strängen aus Aktinmonomeren, die einen Durchmesser von ca. 7 nm haben (*Alberts et al., 2008*). Mit Hilfe von vernetzenden Proteinen bilden sie ein kortikales Netzwerk. Die Plasmamembran der Leukozyten im Blut ist eingefaltet. Diese Falten bestehen beim neutrophilen Granulozyten aus 0,3-1,0 µm großen, Aktin-reichen Projektionen. Dabei bildet Aktin in diesen Oberflächenprojektionen ein Netzwerk (*Khismatullin, 2009*). Das mit Aktin verknüpfte Myosin hat in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens ein Molekulargewicht von 180 kDa (*Huang und Devanney, 1986*). Intermediärfilamente wie Vimentin bilden in den Leukozyten Filamente, die im Gegensatz zu den Aktinfilamenten keine polaren Enden besitzen. Sie liegen in der Zelle meist vollständig polymerisiert vor, sodass sie im Zytoplasma eine 3D-Struktur formen (*Khismatullin, 2009*). Mikrotubuli sind kleine röhrenförmige Strukturen, die aus Tubulin bestehen. Sie bilden ein 3D-Netzwerk, das an den Zentrosomen in der Nähe des Zellkerns verankert ist (*Alberts et al., 2008*). Von hier breiten sich die Mikrotubuli zur Plasmamembran hin aus, können sich jedoch auch sehr schnell wieder an die Centrosomen zurückziehen. Über Kinesin und Dynein sind die Mikrotubuli in den Leukozyten mit Vimentin verbunden (*Khismatullin, 2009*).

2.2.5.4 Histochemische Eigenschaften

Die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens wurden ausführlich histochemisch untersucht. In der Sudanschwarz B-Färbung zeigen die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens bräunliche bis schwarze, sudanophile Granula von ovaler Form, die im gesamten Zytoplasma verteilt sind (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*). Die Intensität der Anfärbung der Granula differiert dabei in ein- und demselben neutrophilen Granulozyten beim Kaninchen, wohingegen sich die Granula der neutrophilen Granulozyten des Menschen einheitlich intensiv anfärben (*Hermansky et al., 1970*). In der PAS-Reaktion zeigen die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens viele positive, purpurrote Granula ähnlicher Größe (*Jain, 1969*). Der Nachweis von Glykogenpartikeln in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens kann auch mit der „periodic acid-thiocarbohydrazid-silver proteinate“ (PA-TCH-SP)-Methode erfolgen. Hierbei erkennt man in den Promyelozyten keine oder nur eine schwache Reaktion. Im Laufe der Entwicklung nimmt jedoch der Glykogengehalt in der Zelle zu, so dass schon im Stadium des Myelozyten viele Glykogenpartikel im Zytoplasma zu sehen sind. In ausgereiften neutrophilen Granulozyten kann man oft große Ansammlungen von Glykogenpartikeln beobachten (*Murata et al., 1978*). Saure Mukosubstanzen in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens können mit dialysiertem Eisen ultrastrukturell nachgewiesen werden. Dabei zeigen die Oberfläche der Plasmamembran, der Golgi-Komplex und die primären und tertiären Granula eine Reaktion (*Hardin und Spicer, 1971*). Auch sulfatierte Mukopolysaccharide und eine starke Aktivität des „Basic Protein“ sind in den azurophilen Granula vorhanden. Die Sulfatreste der sauren Mukopolysaccharide wurden durch Horn und Spicer (1964) mit Hilfe der Autoradiographie nachgewiesen (*Horn und Spicer, 1964*). Untersuchungen von Parmley et al. (1979) auf verschiedene komplexe Kohlenhydratstrukturen zeigten, dass vor allem in den tertiären Granula der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens komplexe Kohlenhydratstrukturen vorhanden sind. Diese umfassen Kohlenhydrate mit sulfatierten und carboxylierten Gruppen, Glykokonjugate mit vizinalen Glykolen wie Glykogen und Glykoproteine. Reife primäre und sekundäre Granula hingegen zeigen eine schwache Reaktivität beim Nachweis von Glykokonjugaten, sowie bei Pyroantimonat-reaktiven Kationen wie Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ und Histamin (*Parmley et al., 1979*).

Im Hinblick auf ihren Enzymgehalt und andere Inhaltsstoffe besitzt der neutrophile Granulozyt ein weites Spektrum. Allgemein sind die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens positiv für Esterasen, wenn Chloracetat und α -Naphthyl-Acetate als Substrate verwendet werden (*Fey und Kuntze, 1970*; *Osbaldiston und Sullivan, 1978a*). Die Chloracetat-Esterase befindet sich bei Säugetieren in den primären und sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten (*Raskin und Valenciano, 2000*). Özcan (2005) konnte eine positive, granuläre Reaktion in den neutrophilen Granulozyten von Angorakaninchen nachweisen (*Özcan, 2005*). Kaninchen und alle anderen Wirbeltiere zeigen zudem eine

starke Peroxidaseaktivität (Fey und Kuntze, 1970) bzw. Myeloperoxidaseaktivität (Rausch und Moore, 1975; Ferencik et al., 1982). Sie ist in den primären Granula lokalisiert (Dunn et al., 1968; Rausch und Moore, 1975; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Zellmer und Shannon, 1983). Die Aktivität der Peroxidase kann bei Säugetieren schon im Promyelozyten nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopisch ist sie auch in der Kernmembran, dem rauen endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat von Myeloblasten nachweisbar (Raskin und Valenciano, 2000). In den primären und sekundären Granula befindet sich außerdem Lysozym (Rausch und Moore, 1975; Ferencik et al., 1982), das beim Kaninchen jedoch eine fast sechsfach geringere Aktivität als beim Menschen und Huhn zeigt. In den primären Granula ist beim Kaninchen außerdem β -Glucuronidase lokalisiert, die zu den sauren Hydrolasen der primären Granula gehört (Rausch und Moore, 1975). Weiterhin zeigen die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens positive Färbereaktionen für alkalische (Jain, 1968; Fey und Kuntze, 1970) und saure Phosphatase (Fey und Kuntze, 1970; Micheev und Suchanov, 1972). Dabei enthalten die primären Granula saure Phosphatase (Wetzel et al., 1967b; Osbaldiston und Sullivan, 1978b), die sekundären Granula alkalische Phosphatase (Wetzel et al., 1967b; Spicer et al., 1968; Rausch und Moore, 1975; Osbaldiston und Sullivan, 1978b) und die tertiären Granula wiederum saure Phosphatase (Wetzel et al., 1967b; Spicer et al., 1968; Parmley et al., 1979). Zusätzlich kann man eine Aktivität für saure Phosphatase in den Golgi-Säckchen und -vesikeln nachweisen (Wetzel et al., 1967b; Spicer et al., 1968). Der Nachweis der Phospholipase A₂ in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens erfolgte durch Elsbach et al. (1979). Sie ist in der Membran der Zelle lokalisiert (Elsbach et al., 1979), nach Jain (1993) auch in den sekundären Granula (Jain, 1993). Eine Degradierung der Phospholipide intakter *E.coli* scheint jedoch nur zu erfolgen, wenn das Enzym mit dem "Bacterial permeability-inducing protein (BPI)" in den primären Granula assoziiert ist. Dies ist nach Elsbach et al. (1979) spezifisch für die Phospholipase A₂ des Kaninchens, da ein derartiges Zusammenspiel bei anderen Spezies wie dem Menschen nicht beobachtet werden konnte (Elsbach et al., 1979). Den Laktoferringehalt in den sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten verschiedener Säugetiere, darunter auch dem Kaninchen, eruierten 1988 Barton et al. (Barton et al., 1988). Ferencik et al. (1982) konnten zudem die Anwesenheit von Elastase in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens belegen (Ferencik et al., 1982). In den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens befinden sich zudem Cathelicidine als auch Defensine (Smith, 2000). Defensine sind mikrobizide Peptide in den primären Granula der neutrophilen Granulozyten (Wiesner und Ribbeck, 2000). Beim Kaninchen wurden bislang sechs verschiedene Defensine NP-1, -2, -3a, -3b, -4 und -5 nachgewiesen (Selsted et al., 1985). Eine genauere Untersuchung der Defensine NP-2 und NP-5 erfolgte durch Klut et al. (2000). Sie zeigten, dass NP-2 und NP-5 in den zytoplasmatischen Granula der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens und aller myeloiden Vorstufen der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark vorhanden sind (Klut et al.,

2000). Zu den Cathelicidinen gehört unter anderem das „Cationic Antibacterial Protein 18“ (CAP18), das von Hirata et al. (1994) in peritonealen Granulozyten des Kaninchens nachgewiesen wurde (Hirata et al., 1994). Auf den Granulozyten des Kaninchens wurden von Brodersen et al. (1998) folgende CD-Antigene festgestellt: CD9, CD11a, CD14, CD18, CD23 und CD43 (Brodersen et al., 1998).

2.2.5.5 Aufgaben

Die neutrophilen Granulozyten sind an unspezifischen Abwehrvorgängen beteiligt, zu denen die Phagozytose von Bakterien, Parasiten und unbelebten körperfremden Partikeln gehört, die intrazellulär abgebaut werden (Karlson et al., 2005). Aufgrund ihrer amöboiden Fortbewegung können sie mittels Diapedese die Blutbahn verlassen und ins Gewebe auswandern (Sinowatz und Hees, 2000). Dies geschieht durch Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise den Integrinen (Jain, 1993). Beim Kaninchen ist hierfür unter anderem der CD18-Rezeptorkomplex verantwortlich, mit dessen Hilfe die Adhärenz der neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellen stimuliert wird. Zum CD18-Rezeptorkomplex gehört der C3bi-Rezeptor für den Faktor C3bi der Komplementkaskade, welcher beim Menschen hochkonserviert und auch beim Kaninchen vorhanden ist. Dies konnten Arfors et al. (1987) mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers aus der Maus darstellen (Arfors et al., 1987). Der C3bi-Rezeptor konnte beim Rind im Gegensatz zum Kaninchen in keiner Studie nachgewiesen werden (Styrt, 1989). Nach Anlockung durch chemotaktische Stoffe, beim Kaninchen sind dies Komplementfaktoren wie C5a und C3bi, Leukotrien B4 (LTB4), Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) und mit Zymosan aktiviertem Serum (Chenoweth et al., 1980; Arfors et al., 1987; Sugawara et al., 1995), wandert der neutrophile Granulozyt (Sinowatz und Hees, 2000) mit Hilfe seines Zytoskeletts aktiv zu den Zielzellen. Dieser Vorgang wird auch als Chemotaxis bezeichnet (Jain, 1993). Auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten gibt es verschiedene Rezeptoren, die bei der Bindung eines Liganden zu einer Aktivierung des neutrophilen Granulozyten führen. Hierzu gehört unter anderem der Rezeptor für das chemotaktische Tripeptid FMLP, das Chemotaxis, Degranulation und oxidativen Metabolismus hervorruft (Styrt, 1989). Wie beim Menschen gibt es auch beim Kaninchen zwei Populationen an FMLP-Rezeptoren (Kermode et al., 1988). Der Rezeptor für FMLP befindet sich beim Menschen nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch gespeichert in den Granula und kann bei einer Aktivierung an die Zelloberfläche transportiert werden (Styrt, 1989). Er ist auch beim Kaninchen mit einem GTP-bindenden Protein mit GTPase-Aktivität gekoppelt. Dabei wird die GTPase-Aktivität nicht nur durch die Bindung von FMLP an die Zellmembran eingeleitet (Feltner et al., 1986). Die Bindung von LTB4 an seinen speziellen Rezeptor erfolgt beim Kaninchen wie bei FMLP durch ein GTP-bindendes Protein, das die Information über eine GTPase in die Zelle weiterleitet (Feltner et al., 1986). Eine weitere heterogene Gruppe an Membranrezeptoren sind Rezeptoren für

das Fc-Ende von Immunglobulinmolekülen (*Styrt, 1989*). Auf die Bindung von aggregiertem humanen IgG reagieren die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens und des Schweins mit einer Degranulation (*Ferencik et al., 1982*). Nach chemotaktischer Anlockung erfolgt die Phagozytose von opsonisierten, durch Immunglobuline oder Komplementfaktoren für die neutrophilen Granulozyten kenntlich gemachten Partikel (*Jain, 1993*). Nach Internalisierung des Partikels wird dieser im Phagosom vom übrigen Zytoplasma separiert. Die in der Phagosomenmembran lokalisierte NADPH-Oxidase reduziert daraufhin Sauerstoff zu Superoxidanionen. Hieraus entstehen weitere Sauerstoffradikale sowie Wasserstoffperoxid, wodurch es zur Schädigung und Abtötung von Fremdstoffen kommt. Dieser Vorgang wird als „oxidative burst“ (*Karlson et al., 2005*) oder „respiratory burst“ bezeichnet und ist sauerstoffabhängig (*Jain, 1993*). Ein weiterer Mechanismus ist sauerstoffunabhängig und resultiert aus der Verschmelzung von Lysosomen und dem Phagosom zum Phagolysosom (*Karlson et al., 2005*). Hier werden durch die saure Umgebung des Phagosoms und die verschiedenen in den Granula beinhaltenen Substanzen wie Laktoferrin, Lysozym, Myeloperoxidase und kationische Proteine die Bakterien erfolgreich abgetötet (*Jain, 1993*). Dabei produziert die Myeloperoxidase H_2O_2 aus molekularem Sauerstoff, sodass Keime abgetötet werden können (*Sinowatz und Hees, 2000*). Das Lysozym sorgt für die Aufspaltung der Proteoglykane in Zellmembranen von gramnegativen Bakterien. Laktoferrin hingegen bindet Eisen, sodass dieses den Bakterien nicht mehr zur Verfügung steht (*Karlson et al., 2005*). Abgesehen von enzymatisch aktiven, antimikrobiellen Enzymen enthalten die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens auch nichtenzymatische, antimikrobielle Stoffe, die die Effektivität der Enzyme, die nur eine limitierte Wirkung haben, potenzieren. Hierzu gehört auch das „Bacterial permeability-inducing protein (BPI)“. Es ist bei einem neutralen pH-Wert aktiv und tötet gramnegative Bakterien, jedoch keine grampositiven Bakterien ab (*Elsbach et al., 1979*). Weiterhin haben die Defensine, die von den neutrophilen Granulozyten abgegeben werden, antibakterielle, zytotoxische und chemotaktische Wirkung und sind an der Immunabwehr und an inflammatorischen Prozessen beteiligt (*Jain, 1993*). Bei experimentellen Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* konnte gezeigt werden, dass die Defensine, vor allem NP-1, für die Abtötung der Sporen und Hyphen verantwortlich sind (*Levitz et al., 1986*). In der Plasmamembran der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens befindet sich außerdem eine Calcium-Pumpe (*Volpi et al., 1983*). Nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten durch chemotaktische Stoffe wie FMLP und LTB₄ steigt die Konzentration an freiem Calcium im Zytoplasma. Dabei wird Calcium aus den internen Speichern entlassen und aus dem extrazellulären Medium in die Zelle transportiert. Somit kann eine „second messenger“-Funktion durch Calcium-Ionen angenommen werden (*White et al., 1983*).

2.2.6 Eosinophile Granulozyten

2.2.6.1 Allgemeines

Die eosinophilen Granulozyten wurden von Jones im Jahr 1846 entdeckt. Paul Ehrlich identifizierte sie daraufhin 1879 erstmals als Leukozyten (*Jain, 1993; Young, 2000*) und bezeichnete sie nach eingehender Studie der Granulation von Blutzellen als eosinophile Granulozyten. In seinen Untersuchungen konnte Ehrlich (1879) eine konstante Anzahl einer geringen Menge von eosinophilen Zellen im Blut des Kaninchens feststellen (*Ehrlich, 1879*). Sie sind im Kaninchenblut mit 0-2 % (*Dodds, 2000*), 0,5-5 % (*Mitruka und Rawnsley, 1981*), 0-4 % (*Harkness und Wagner, 1995*), 1-3 % (*Schermer, 1958; Campbell und Ellis, 2007*), 1-4 % (*Benson und Paul-Murphy, 1999; Quesenberry, 2004; Jenkins, 2008*) an der Gesamtleukozytenzahl vertreten. Eine niedrige Anzahl von bis zu Null an eosinophilen Granulozyten im Blut des Kaninchens ist somit nicht ungewöhnlich (*Marshall, 2008*).

2.2.6.2 Bildung

Die Entwicklung der eosinophilen Granulozyten ist der Entwicklung der neutrophilen Granulozyten ähnlich und geht somit auch von einer pluripotenten Stammzelle aus. Über die „colony-forming unit-eosinophil“ (CFU-Eos) entwickeln sich Myeloblasten und Promyelozyten. Der eosinophile Promyelozyt kann in der Wright-Giemsa-Färbung durch seine großen, azurophilen Granula identifiziert werden. Sie stellen sich im Elektronenmikroskop homogen, sphärisch und elektronendicht dar (*Jain, 1993*). Die eosinophilen Granula haben beim Kaninchen eine Größe von ca. 0,25-1,0 µm. Sie sind von einer Membran umgeben (*Wetzel et al., 1967a*) und werden vom Golgi-Apparat gebildet (*Jain, 1993*). Die eosinophilen Promyelozyten besitzen beim Kaninchen weiterhin einen runden Zellkern mit großen, komplexen Nukleoli. Ihr Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist hoch. Im Zytoplasma finden sich raues endoplasmatisches Retikulum mit umfangreichen, dilatierten Zisternen und Mitochondrien, die größer und zahlreicher als die der neutrophilen Promyelozyten sind (*Wetzel et al., 1967a*). Hier können typische unreife eosinophile Granula mit einem Durchmesser von $0,65 \pm 0,3$ µm beobachtet werden (*Spicer et al., 1968*).

Die Granula im eosinophilen Myelozyten wandeln sich zu kristalloiden Granula um oder bleiben homogen. In jedem Fall werden sie kompakter und nehmen die zelllinienspezifischen Charakteristika an. Diese zwei Granulatypen, die homogenen und die kristalloiden Granula, zeichnen die eosinophilen Granulozyten aus (*Jain, 1993*). Die Granula mit der kristalloiden Struktur sind gewinkelt und nehmen im Laufe der Entwicklung der eosinophilen Granulozyten des Kaninchens zu (*Spicer et al., 1968*). Der Zellkern der eosinophilen Myelozyten zeigt eine Lappung und Margination des Heterochromatins.

Zudem verringert sich die Zellgröße. Der Golgi-Apparat schließt prominente, übereinander gestapelte Vesikel und zahlreiche damit assoziierte Mikrovesikel ein (*Wetzel et al., 1967a*).

Die eosinophilen Granulozyten entwickeln sich über den Metamyelozyten zu stabkernigen eosinophilen Granulozyten und dann zu segmentkernigen eosinophilen Granulozyten, die ins Blut abgegeben werden (*Jain, 1993*). Die Differenzierung und Reifung der eosinophilen Granulozyten im Knochenmark dauert je nach Tierspezies 2-6 Tage (*Young, 2000*). Die Regulation der eosinophilen Granulopoese erfolgt durch Wachstumsfaktoren und Zytokine. Der „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) und IL-3 stimulieren dabei die Entwicklung der eosinophilen Granulozyten und anderer Leukozyten, wohingegen IL-5 ausschließlich die Entwicklung und die abschließende Reifung der eosinophilen Granulozyten beeinflusst (*Jain, 1993*).

2.2.6.3 Morphologie

Der eosinophile Granulozyt des Kaninchens ist mit einem Durchmesser von ca. 10-15 µm (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974*), 10-16 µm (*Melillo, 2007*), 12-16 µm (*Sanderson und Phillips, 1981; Moore, 2000; Lester et al., 2005; Jenkins, 2008*), 14-15 µm (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*) größer als der neutrophile Granulozyt (*Kozma et al., 1974; Benson und Paul-Murphy, 1999; Dodds, 2000; Moore, 2000; Quesenberry, 2004; Thrall, 2004; Harcourt-Brown, 2008*). Der Zellkern ist zweigelappt und U- bzw. hufeisenförmig (*Sanderson und Phillips, 1981; Benson und Paul-Murphy, 1999; Moore, 2000; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Melillo, 2007; Jenkins, 2008*). Er lässt sich purpur oder violett (*Melillo, 2007*) bzw. in einem dunklen purpur-blau (*Sanderson und Phillips, 1981*) anfärben und ist größer als der Zellkern der neutrophilen Granulozyten (*Schermer, 1958*). Eine ausbleibende Segmentierung des Zellkerns der eosinophilen Granulozyten des Kaninchens kann aufgrund der Pelger-Huët-Anomalie auftreten (*Nachtsheim, 1950*). Charakteristisch für die eosinophilen Granulozyten beim Kaninchen sind die zytoplasmatischen, eosinophilen Granula, die zahlreich im Zytoplasma vorhanden sind (*Moore, 2000*) bzw. dieses oft ganz ausfüllen (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974; Sanderson und Phillips, 1981; Benson und Paul-Murphy, 1999; Jenkins, 2008*) und drei- bis viermal so groß sind wie die Granula der neutrophilen Granulozyten (*Kozma et al., 1974; Harkness und Wagner, 1995; Moore, 2000*). In Romanowsky-Färbungen zeigen die Granula intensives Pink bis dunkles Pink-Orange (*Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Jenkins, 2008*). Auch Osbaldiston und Sullivan (1978b) konnten in der Giemsa-Färbung eine einzelne Population von Granula, die sich hellrot anfärbten, mit einer Größe von mehr als 1 µm feststellen. Mit Hilfe von Giemsa-Urea und Eosin-Urea können die eosinophilen Granulozyten von den neutrophilen Granulozyten unterschieden werden, da die neutrophilen Granulozyten mit diesen Färbungen keine positive Reaktion zeigen (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*). In der Hämalaun-Eosin-(H.E.)-Färbung färben sich die Granula der eosinophilen Granulozyten des Kaninchens in einem dunklen Rot an, sodass sie sehr gut von anderen

Leukozyten, die sich mit Hämalaun-Eosin nicht anfärben lassen, differenziert werden können. Auch mit der modifizierten Undritz II Färbung können die eosinophilen Granulozyten durch ihre roten Granula identifiziert werden (*Shanklin et al., 1977*). Da die Granula die Zelle oft vollständig ausfüllen, verleihen sie dieser ein orange-pinkfarbiges, schaumiges Aussehen (*Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007*).

Elektronenmikroskopisch zeigen die eosinophilen Granulozyten allgemein eine runde oder leicht unregelmäßige Form und sind mit Mikrovilli besetzt (*Steffens, 2000*). Im zweigeklappten Zellkern kann man häufig Nukleoli erkennen. Das Zytoplasma enthält größere Mitochondrien und einen besser ausgebildeten Golgi-Apparat als die neutrophilen und basophilen Granulozyten. Ribosomen, Glykogenpartikel, Lipidkörper sowie raues und glattes endoplasmatisches Retikulum sind stets zu beobachten (*Steffens, 2000; Young, 2000*). Die Lipidkörperchen stellen dabei kugelförmige Speicher von Arachidonsäure in der Zelle dar (*Young, 2000*).

Insgesamt kann man ultrastrukturell vier Granulatypen in den eosinophilen Granulozyten der Säugetiere ausmachen. Dazu gehören spezifische Granula, primäre Granula, kleine elektronendichte Granula und Mikrogranula (*Young, 2000*).

Die spezifischen oder sekundären Granula haben eine typische Struktur (*Young, 2000*). Charakterisiert sind sie bei vielen Spezies, wie auch beim Kaninchen, durch eine Aufteilung in zwei Kompartimente, einem elektronendichten kristalloiden Kern, umgeben von einer klaren Matrix (*Spicer et al., 1968; Young, 2000*), oder durch eine rein homogene Struktur (*Jain, 1993*). Beim Kaninchen ist das Kristalloid nadelförmig (*Parmley et al., 1982; Thrall, 2004*). Die spezifischen Granula haben einen Durchmesser von 0,5-0,9 µm (*Parmley et al., 1982*) bis ca. 1 µm (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*) und werden im Golgi-Apparat produziert. Sie besitzen lysosomale Funktionen (*Steffens, 2000*).

In den eosinophilen Granulozyten des Kaninchens findet man die kristalloid-freien, membrangebundenen primären Granula (*Young, 2000*) mit ca. zehn Stück pro Zellprofil (*Bainton und Farquhar, 1970*). Die dritte Granulapopulation sind die kleinen elektronendichten Granula.

Die kleinen Mikrogranula sind nur bei den eosinophilen Granulozyten anzutreffen (*Young, 2000*). Sie wurden 1973 von Schäfer et al. bei verschiedenen Säugetieren, unter anderem auch beim Kaninchen, in den eosinophilen Granulozyten nachgewiesen und als spezifische Mikrogranula bezeichnet. Sie kommen nicht in den eosinophilen Vorstufen im Knochenmark vor. In reifen eosinophilen Granulozyten im Knochenmark sind sie selten anzutreffen, dafür regelmäßig in den eosinophilen Granulozyten im Blut und Gewebe. Beim Kaninchen sind sie hantelförmig und ca. 25-180 nm groß. Sie sind von einer Membran umgeben. Ihr Inhalt ist im Vergleich zum Zytoplasma relativ elektronendicht (*Schäfer et al., 1973*).

2.2.6.4 Histochemische Eigenschaften

Mit der „periodic-acid-Schiff-reaction“ (PAS-Reaktion) kommt es zu einer mäßig-positiven Reaktion im Zytoplasma zwischen den Granula der eosinophilen Granulozyten des Kaninchens (*Hermansky et al., 1970; Jain, 1969*). Murata et al. wiesen 1978 mit der PATCH-SP-Reaktion („periodic acid thiosemicarbazide-thiocarbohydrazide-silver proteinate procedure“) Glykogen in den eosinophilen Granulozyten des Kaninchens nach. Dabei enthalten eosinophile Granulozyten nur halb so viel Glykogen wie die neutrophilen Granulozyten (*Murata et al., 1978*). Genauere Untersuchungen auf komplexe Kohlenhydrate der eosinophilen Granulozyten des Kaninchens zeigen eine mittlere Reaktivität der elektronendichten Granula auf Glykokonjugate mit vizinalen Glykolen (*Parmley et al., 1979*).

Mit der Sudanschwarz B-Färbung sind in eosinophilen Granulozyten des Kaninchens Sudanschwarz B-positive Granula mit einem Durchmesser von ca. 1 µm zu sehen (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*). Mittels histochemischer Methoden können verschiedene Enzyme, wie Peroxidase, in den eosinophilen Granulozyten des Kaninchens nachgewiesen werden (*Fey und Kuntze, 1970; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Bainton und Farquhar, 1968*). Dabei handelt es sich um eine Myeloperoxidase (*Dunn et al., 1968*), die in der Matrix der spezifischen Granula (*Young, 2000*) und dem rauen endoplasmatischen Retikulum mittels Elektronenmikroskopie identifiziert werden kann (*Dunn et al., 1968*). Die Peroxidase der eosinophilen Granulozyten unterscheidet sich von der Peroxidase der neutrophilen Granulozyten durch antigenetische, genetische und physikalische Eigenschaften (*Jain, 1993*). Der Nachweis von Phosphatasen gelingt auch in den eosinophilen Granulozyten des Kaninchens (*Fey und Kuntze, 1970*). Sie enthalten jedoch keine alkalische Phosphatase (*Jain, 1968*), sondern lediglich saure Phosphatase (*Seeman und Palade, 1967; Wetzel et al., 1967b*). Dabei kann man eine schwache Reaktion in den spezifischen Granula der eosinophilen Granulozyten des Kaninchens beobachten. Eine stärkere Aktivität tritt intergranulär im Zytoplasma auf (*Micheev und Suchanov, 1972*). Seeman und Palade (1967) beobachteten eine Reaktion in der Matrix der Granula, jedoch nicht im Kristalloid (*Seeman und Palade, 1967*). Parmley et al. (1979) konnten die saure Phosphatase sowohl in den spezifischen Granula als auch in den elektronendichten Granula nachweisen (*Parmley et al., 1979*).

Unspezifische Esteraseaktivität in den eosinophilen Granulozyten des Kaninchens kann mit - Naphthyl-Acetat als Substrat evaluiert werden (*Osbaldiston und Sullivan, 1978a; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Özcan, 2005*). Fey und Kuntze (1970) wiesen sowohl die α-Naphthyl-Acetat-Esterase, als auch die Naphthol-AS-Acetat-Esterase und die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase in den eosinophilen Granulozyten des Kaninchens nach (*Fey und Kuntze, 1970*), wohingegen Osbaldiston und Sullivan (1978) keine Chloracetat-Esterase in den eosinophilen Granulozyten

ausmachen konnten (*Osbaldeston und Sullivan, 1978a; Osbaldeston und Sullivan, 1978b*). Die Arylsulfatase der eosinophilen Granulozyten befindet sich vor allem in den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums, einigen Zisternen des Golgi-Apparates als auch in unreifen, aber nicht in den spezifischen, reifen Granula (*Bainton und Farquhar, 1970*).

Die spezifischen Granula enthalten eine Gruppe von hoch aktiven Proteinen. Das „major basic protein“ (MBP) befindet sich im Kristalloid, wohingegen die anderen Proteine wie die eosinophile Peroxidase (EPO), eosinophiles kationisches Protein (ECP) und „Eosinophil-derived neurotoxin“ (EDN) in der Matrix lokalisiert sind. Andere Bestandteile der Granula sind Katalase, Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation wie Enoyl-CoA-Hydratase und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, Flavoprotein, β -Glucuronidase, Cathepsin D, Serin-Pyruvat-Aminotransferase und Zink. In aktivierten eosinophilen Granulozyten kann man in den spezifischen Granula auch saure Phosphatase und Arylsulfatase nachweisen, wohingegen die primären Granula Lysophospholipase-Aktivität besitzen.

Die kleinen elektronendichten Granula enthalten, wie auch die spezifischen Granula, saure Phosphatase, Arylsulfatase, ECP, Katalase und Peroxidase.

Eosinophile Granulozyten synthetisieren außerdem Zytokine, Proteoglykane, Vitamin B-Bindungsproteine und zahlreiche Enzyme wie Kollagenase, Histaminase, Phospholipase D und unspezifische Esterasen. Den eosinophilen Granulozyten fehlen allerdings Lysozym, Laktoferrin und Phagozytin (*Young, 2000*).

2.2.6.5 Aufgaben

Die eosinophilen Granulozyten haben unterschiedliche Funktionen. Dazu gehört auch eine Phagozytoseaktivität, die jedoch geringer ist als die der neutrophilen Granulozyten, da sie eine geringere Dichte als neutrophile Granulozyten an Rezeptoren auf ihrer Oberfläche haben und ihnen verschiedene bakterizide Substanzen fehlen (*Young, 2000*). Durch Antigen-Antikörper-Komplexe, Antigene, Gammaglobuline, Fibrin und Histamin chemotaktisch angezogen, wandern sie aus dem Blut in Gewebe und Organe aus (*Kraft et al., 2005*). Mittels Phagozytose nehmen sie Immunkomplexe, mit Antikörpern besetzte Erythrozyten, Mastzellgranula, inerte Partikel, Hefen und Bakterien auf. Ihr eigentliches Angriffsziel, die Helminthen, sind zu groß für die Phagozytose (*Young, 2000*). Diese werden durch Interaktionen des IgG-Rezeptors auf der Zelloberfläche der eosinophilen Granulozyten mit dem Parasiten erkannt, woraufhin die Exozytose der Granula oder eine Degranulation erfolgen. Die Degranulation kann auch durch Interaktionen mit IgE und Parasitenantigenen forciert werden. Die Produkte der eosinophilen Granula zerstören den Parasiten durch Bildung eines Komplexes aus Peroxidase, H_2O_2 und Chlorid-Ionen (*Jain, 1993*). Beim Kaninchen zeigt das Leukogramm bei Parasitenbefall jedoch kaum eine Eosinophilie wie bei anderen Säugetieren (*Dodds, 2000*). Eosinophile Granulozyten haben außerdem eine immunsuppressive Wirkung, da sie Immunkomplexe

und granulären Debris, der von Mastzellen stammt, abbauen, von basophilen Granulozyten und Mastzellen abgegebene Mediatoren und ihre Degranulation inhibieren und die Bildung von aktiven Metaboliten verhindern. Die eosinophilen Granulozyten scheinen die Haupteffektoren von Gewebsschädigungen in der Lunge bei Erkrankungen wie Asthma zu sein, die durch eine Typ-IV-Allergie hervorgerufen werden, zu sein. Durch verschiedene proinflammatorische Mediatoren wie Leukotrien C₄, Eicosanoide und MBP kommt es zur Schädigung des Gewebes. Bei Asthma ist hier vor allem das Atemwegsepithel betroffen. In einigen Studien wurde inzwischen auch die antitumoröse Wirkung von eosinophilen Granulozyten nachgewiesen, wobei der Mechanismus noch ungeklärt ist (*Young, 2000*).

2.2.7 Basophile Granulozyten

2.2.7.1 Allgemeines

Basophile Granulozyten wurden erstmals von Paul Ehrlich im späten 19. Jahrhundert beschrieben. Sie sind mit den Mastzellen die einzigen Zellen von Säugetieren, die Histamin synthetisieren und hochaffine Rezeptoren für IgE besitzen (*Scott und Stockham, 2000*). Die basophilen Granulozyten sind allgemein die bei Tieren am seltensten vorkommenden Granulozyten, abgesehen von einigen Vögeln und Reptilien (*Steffens, 2000*). Eine Sonderstellung bei den Säugetieren nimmt das Kaninchen ein. Bei ihm werden in Blutaussstrichen regelmäßig basophile Granulozyten in geringer oder mäßiger (*Moore, 2000*), in großer (*Melillo, 2007*) bzw. in gleicher Anzahl wie die der eosinophilen Granulozyten bei anderen Spezies (*Quesenberry, 2004*) gefunden. Die Literaturangaben im Hinblick auf den Anteil der basophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl variieren. Er beträgt beim Kaninchen 0-4 % (*Boseila, 1959*), 2,4-7,5 % (*Mitruka und Rawnsley, 1981; Eguchi, 1991*), 4 % (*Banks, 1986; Parmley, 1988*), 2-5 % (*Jenkins, 2008*), 5 % (*Thrall, 2004*), 1-7 % (*Quesenberry, 2004*), ca. 10-15 % (*Jain, 1993*) und kann mit bis zu 30 % bei klinisch unauffälligen Kaninchen vorhanden sein (*Benson und Paul-Murphy, 1999; Thrall, 2004; Harcourt-Brown, 2008*). Ihre durchschnittliche Überlebenszeit in der Zirkulation beträgt 8-9 Stunden, bevor sie durch Monozyten und Makrophagen verdaut werden (*Clark et al., 1977*). Die Anzahl der basophilen Granulozyten ist normalerweise umgekehrt proportional zu der Anzahl der Mastzellen im Gewebe. Beim Kaninchen sind, im Gegensatz zur Katze, viele basophile Granulozyten im Blut und wenige Mastzellen im Gewebe (*Jain, 1993*).

2.2.7.2 Bildung

Die Entwicklung der basophilen Granulozyten entspricht grundsätzlich der der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Von einer pluripotenten Stammzelle ausgehend erfolgt die Differenzierung

zur myeloischen Stammzelle, aus der sich die CFU-Bas ("colony-forming-unit basophil") entwickelt (Jain, 1993). Aus dieser entsteht der Myeloblast, welcher sich zum Promyelozyten differenziert. Im Elektronenmikroskop zeigt der Promyelozyt des Kaninchens einen vesikulären Zellkern mit darin verteiltem Heterochromatin (Komiyama und Spicer, 1974) und prominenten Nukleoli (Wetzel et al., 1967a). Sein Zytoplasma ist mit Ribosomen und rauem endoplasmatischem Retikulum mäßig gefüllt (Komiyama und Spicer, 1974). Im Stadium des Myelozyten werden die basophilen Granula gebildet, die für den basophilen Granulozyten charakteristisch sind (Sinowatz und Hees, 2000). Beim Kaninchen ist das Chromatin im Zellkern stärker kondensiert und zeigt eine Margination. Auch die Nukleoli sind weniger auffällig (Wetzel et al., 1967a). Von diesem Stadium stammt der Metamyelozyt ab, aus dem schließlich der basophile Granulozyt entsteht (Sinowatz und Hees, 2000). Die Produktion der basophilen Granulozyten ist antigenspezifisch und wird durch IL-3 und durch ein von T-Lymphozyten synthetisiertes, noch nicht charakterisiertes, spezifisches Lymphokin, das als Basophilopoetin bezeichnet wird, gesteuert (Jain, 1993).

2.2.7.3 Morphologie

Die basophilen Granulozyten beim Kaninchen entsprechen in ihrer Morphologie dem typischen Modell für Säugetiere (Dodds, 2000). Sie sind rund (Steffens, 2000) und etwa 8-12 µm (Melillo, 2007) bzw. 10-15 µm groß (Sanderson und Phillips, 1981). Schermer (1958) und Jenkins (2008) beschreiben sie beim Kaninchen von ähnlicher Größe wie die neutrophilen Granulozyten (Schermer, 1958; Jenkins, 2008).

Der Zellkern ist gelappt oder segmentiert (Schermer, 1958; Campbell und Ellis, 2007), jedoch weniger segmentiert als bei den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Melillo, 2007; Reagan, 2008), teilweise auch langgestreckt (Sanderson und Phillips, 1981). Er kann bei Tieren, die an der Pelger-Huët-Anomalie leiden auch rund sein (Scott und Stockham, 2000). Der Zellkern wird in der Regel von den basophilen Granula verdeckt. Wenn er sichtbar ist, hat er in Übersichtsfärbungen eine purpurblaue (Sanderson und Phillips, 1981) bzw. purpurne Färbung (Moore, 2000). Die zahlreichen basophilen Granula verleihen dem Zytoplasma ein schaumiges (Reagan, 2008) oder auch getüpfeltes Aussehen (Quesenberry, 2004). Allgemein zeigt das Zytoplasma des basophilen Granulozyten des Kaninchens eine eher hellgraue Farbe (Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007).

Die das Zytoplasma dicht bepackenden Granula (Moore, 2000) sind in Romanowsky-Färbungen stark basophil (Campbell und Ellis, 2007). Die Farbe der Granula wird in der Literatur über violett und tiefviolett (Sanderson und Phillips, 1981; Moore, 2000; Melillo, 2007) sowie purpurfarben (Quesenberry, 2004; Reagan, 2008) oder dunkelblau in der Wright-Färbung (Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Harcourt-Brown, 2008) bis hin zu schwarz beschrieben (Moore, 2000). Teilweise färben sie sich auch metachromatisch mit basischen Farbstoffen wie z.B. saurem Toluidinblau oder

Alcianblau an (Moore, 2000; Scott und Stockham, 2000; Jenkins, 2008). Unter Metachromasie versteht man das Vermögen von Zellen, sich in einem anderen Farbton als des in der angebotenen Farblösung enthaltenen Farbstoffes anzufärben. Dies kommt durch einen hohen Gehalt an sauren Mukopolysacchariden in der Zelle zustande (Pschyrembel, 2007).

Ultrastrukturell sieht man eine Zellmembran mit zahlreichen Falten und Mikrovilli (Steffens, 2000), an die IgE durch einen membranständigen Rezeptor gebunden ist (Sinowatz und Hees, 2000; Thrall, 2004). Basophile Granulozyten des Kaninchens zeigen im Elektronenmikroskop einen tief eingekerbten Nukleus mit stark am Rand gelegenen Heterochromatin (Komiyama und Spicer, 1974). Auch Euchromatin befindet sich im Zellkern, jedoch meist in granulärer Form. Falls Nukleoli vorhanden sind, sind sie unregelmäßig geformt und beschränken sich auf ein nukleäres Segment (Steffens, 2000).

Das Zytoplasma schließt ein paar elektronentransparente Bereiche ein und enthält zahlreiche Ribosomen, Polyribosomen und Glykogengranula. Andere Organellen wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und ein gut entwickelter zentraler Golgi-Apparat sind gewöhnlich präsent, obwohl diese sich mit fortschreitender Zellreifung reduzieren. Zytoskelettale Elemente umfassen Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli (Steffens, 2000).

Es gibt zwei Granulatypen beim Kaninchen, die als basophile Granula und kleine Granula, im Englischen „small type granules“, bezeichnet werden (Eguchi, 1991).

Die basophilen Granula der basophilen Granulozyten des Kaninchens enthalten elektronendichtes Material (Eguchi, 1991) und haben einen Durchmesser von 1,0-1,2 μm (Osbaldiston und Sullivan, 1978b), 0,15-0,5 μm (Wetzel et al., 1967a) oder $0,35 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (Spicer et al., 1968). Ihre Form ist kugelig oder langgestreckt (Wetzel et al., 1967a). Ein paar Granula zeigen eine homogene Textur oder Myelinstrukturen (Eguchi, 1991). Sie enthalten Histamin, Heparin (Thrall, 2004) und zinkhaltige Proteine (Sinowatz und Hees, 2000), was durch spezifische Färbungen sichtbar gemacht werden kann (Steffens, 2000). In frühen basophilen Granulozyten, d.h. Promyelozyten, haben die Granula unterschiedliche Ausprägung. Sie können eine locker gedrehte, fadenförmige Struktur in einer transparenten Matrix enthalten, oder kleinere Granula darstellen, die mit einer kompakteren, fadenförmigen Komponente von einheitlich hoher Dichte ausgefüllt sind. Mitunter bestehen die Granula auch aus konzentrischen Laminae aus elektronendichtem Material, die durch die transparente Matrix räumlich abgetrennt sind. Die intrazelluläre Verteilung der Granula, die eine fadenförmige Struktur beinhalten, verändert sich im Laufe der Zellentwicklung nicht. Späte basophile Granulozyten enthalten anteilig mehr kompakte, dichte zytoplasmatische Granula und einen geringeren Anteil an weniger elektronendichten Granula, die die lockere fadenförmige Struktur besitzen (Komiyama und Spicer, 1974).

Die kleinen Granula haben einen Durchmesser von 0,12-0,16 µm, von denen man ca. 2-3 pro Zellquerschnitt im Elektronenmikroskop findet, und kommen in jedem Reifungsstadium der basophilen Granulozyten vor. Sie sind von einer Einheitsmembran umgeben und mit amorphem Material von mittlerer Dichte gefüllt. Zwischen der Membran und dem amorphen Material befindet sich ein ringförmiges Areal von geringer Elektronendichte. Es gibt keine morphologischen Unterschiede zwischen den kleinen Granula der unreifen Zellen der basophilen Reihe, wie den Promyelozyten und Myelozyten, und denen der reifen Zellen. In unreifen Zellen liegen die kleinen Granula jedoch hauptsächlich in der Nähe des Golgi-Apparates, wohingegen sie bei reifen Zellen vor allem in der Peripherie der Zelle zu sehen sind (*Sakakibara und Eguchi, 1985a*).

2.2.7.4 Histochemische Eigenschaften

In den basophilen Granulozyten können verschiedene Enzyme und Stoffe histochemisch erfasst werden. Die saure Phosphatase kann nach Wetzel et al. (1967) nur in den Säckchen des Golgi-Apparates und damit assoziierten Vesikeln nachgewiesen werden (*Wetzel et al., 1967b*). Bei Micheev und Suchanov (1972) zeigte sich eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas bei Untersuchungen auf saure Phosphatase (*Micheev und Suchanov, 1972*). Im Gegensatz dazu konnten Komiyama und Spicer (1974) keine Aktivität mit dem Barka-Anderson-Medium, sondern nur mit dem Gomori-Medium, nachweisen. Diese beim Kaninchen durchgeführten histochemischen Untersuchungen der basophilen Granula ergaben auch eine Aktivität der sauren Phosphatase in den oben genannten gedrehten, fadenförmigen Strukturen (*Komiyama und Spicer, 1974*) bzw. allgemein in den basophilen Granula (*Parmley et al., 1979*). Nach Jain (1993) besitzen die basophilen Granulozyten der Säugetiere jedoch keine saure Phosphatase (*Jain, 1993*). Nach Osbaldiston et al. (1987) enthalten alle Granulozyten kleine zytoplasmatische, für alkalische Phosphatase positive, Granula. Dabei konnte jedoch nicht zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten unterschieden werden (*Osobaldiston und Sullivan, 1978b*). Jain (1993) hingegen wies keine Reaktivität für alkalische Phosphatase in den basophilen Granulozyten des Kaninchens nach (*Jain, 1968*). Der Unterschied zwischen verschiedenen Tierarten und dem Menschen manifestiert sich in dem Gehalt von Chloracetat-Esterase in den basophilen Granulozyten (*Hermansky et al., 1970*). Die basophilen Granulozyten des Kaninchen besitzen keine histochemisch nachweisbare Chloracetat-Esterase (*Hermansky et al., 1970*) (*Osobaldiston und Sullivan, 1978b*).

Die basophilen Granulozyten enthalten außerdem keine Peroxidase (*Scott und Stockham, 2000*). Diesem Befund widerspricht Jain (1993), indem er schreibt, dass die basophilen Granulozyten des Menschen und der Kaninchen Peroxidase besäßen (*Jain, 1993*). Mit Sudanschwarz B zeigen die basophilen Granulozyten eine hellrote Farbe und ein paar oder auch keine Sudanschwarz B-positiven Granula im Zytoplasma (*Osobaldiston und Sullivan, 1978b*).

Durch histochemische Methoden können zudem Glykogenpartikel in den basophilen Granulozyten nachgewiesen werden, die in größerer Anzahl bei reifen basophilen Granulozyten als bei unreifen Zellen vorkommen (*Murata et al., 1978*).

Beim Kaninchen befinden sich in den basophilen Granulozyten verschiedene Glykokonjugate (*Sakakibara und Eguchi, 1985b*). Saure Mukopolysaccharide sind an der Zellhülle und in den basophilen Granula lokalisiert (*Hardin und Spicer, 1971; Clark et al., 1977*). Daher färben sich die basophilen Granula auch mit Toluidinblau und Alcianblau metachromatisch an (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*). Chondroitinsulfat stellt dabei das am häufigsten vorkommende Polysaccharid in den basophilen Granula dar. Daneben sind auch Heparin, Histamin und andere Enzyme in den basophilen Granula gespeichert (*Clark et al., 1977*). In diesen besteht zudem auch eine Reaktivität gegenüber sulfatierten Glykokonjugaten. Dabei nimmt die positive Reaktion mit zunehmendem Reifungsstadium der basophilen Granulozyten ab. Anhand des Verteilungsbildes von sauren Mukopolysacchariden und sulfatierten Glykokonjugaten, kann man die basophilen Granula des Kaninchens wie beim Menschen in drei Typen untergliedern. Man unterscheidet eine Gesamtreaktion des Granulums, eine Reaktion nur an der Peripherie und keine Reaktivität nach Versetzen mit dialysiertem Eisen. Daraus ergibt sich folgende Verteilung: Bei den Granula von unreifen basophilen Granulozyten sieht man eine Reaktion im ganzen Granulum, im Gegensatz zu den reifen basophilen Granulozyten, bei denen diese mit zunehmendem Reifungsstadium abnimmt bis hin zur Reaktionslosigkeit (*Sakakibara und Eguchi, 1985b*). Weiterhin sind Perjodsäure-reaktive Glykokonjugate in den basophilen Granula mittels der PA-TCH-SP („periodate-thioalbohydrazide-silver proteinate“)-Methode nachweisbar (*Eguchi, 1991*).

Die kleinen Granula enthalten im Gegensatz zu den basophilen Granula keine sauren Mukopolysaccharide sowie keine sulfatierten Glykokonjugate. Lediglich neutrale Glykokonjugate konnten in mäßiger Menge oder diffus in den kleinen Granula nachgewiesen werden (*Sakakibara und Eguchi, 1985a*).

Es gibt noch zahlreiche andere Inhaltsstoffe in den basophilen Granulozyten von Säugetieren, die hier der Vollständigkeit halber aufgezählt werden, obwohl ein definitiver Nachweis beim Kaninchen noch aussteht. Es handelt sich hierbei um Phospholipasen, Leucin-Aminopeptidase, α -Chromotrypsin, PAF, Prostaglandine, Thromboxane, Prostazykline, hydroperoxieicosatetranoide Säuren, Leukotriene und „Slow reacting substance of anaphylaxis“ (*Uston und Lee, 2003*).

2.2.7.5 Aufgaben

Die Funktion der basophilen Granulozyten beim Kaninchen ist zwar noch nicht ganz verstanden (*Melillo, 2007*), es ist jedoch erwiesen, dass sie eine wichtige Rolle bei der Auslösung einer sofortigen Hypersensitivitätsreaktion nach allergischer Stimulation spielen (*Clark et al., 1977*). Allgemein wird durch die Bindung von Antigenen mit IgE-Antikörpern an membranständige Rezeptoren die

Degranulation hervorgerufen und getriggert (*Benveniste et al., 1977*). Aufgrund des in den Granula gespeicherten Histamins kommt es zu Juckreiz und Bildung von Quaddeln. Eine weitere Aufgabe der basophilen Granulozyten besteht in der Bereitstellung von Leukotrienen bei entzündlichen Prozessen und allergischen Reaktionen (*Sinowatz und Hees, 2000*). Durch Freisetzung chemotaktischer Stoffe locken sie zudem eosinophile Granulozyten an (*Jain, 1993*). Bei parasitären Infektionen scheinen sie auch eine Rolle zu spielen. Es ist jedoch nicht geklärt inwieweit ihre Reaktionen protektiv sind. Auch der spezifische Mechanismus ihres Schutzes ist unbekannt, da er anscheinend abhängig vom Parasiten, der Wirtsspezies und dem Ort der Infektion ist. Basophile Granulozyten beeinflussen durch die Freisetzung von Heparin und Proteasen die Hämostase. Auch die Lipolyse wird durch Aktivierung der Lipoproteinlipase durch Heparin gefördert. Das phagozytotische Potential der basophilen Granulozyten ist jedoch im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten gering (*Scott und Stockham, 2000*).

2.3 Histochemie

2.3.1 Entstehung und Definition

Die Histochemie, auch Zytochemie genannt, ist eine Wissenschaft, bei der durch Farbreaktionen unter dem Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop chemische Gruppen oder Komponenten in Zellen und Geweben nachgewiesen und lokalisiert werden (*Wiesner und Ribbeck, 2000*).

Diese Wissenschaft wurde erstmals angewandt bei der Erforschung von Techniken zum Nachweis der alkalischen Phosphatase von Gomori (1939) und Takamatsu (1938, 1939) vor mehr als 80 Jahren (*Nagata, 2001*).

2.3.2 Klassifikation der histochemischen Methoden

Die histochemischen Verfahren können in drei Gruppen, die chemischen, physikalischen und biologischen Methoden, unterteilt werden.

Zu den chemischen Methoden gehören die Anfärbung von DNA durch die Feulgen-Reaktion oder der Nachweis von Kohlenhydraten mit der PAS-Reaktion und der „high-iron diamine-alcian blue sequence“. Mit Hilfe der Millon-Reaktion können angefärbte Proteine in der Zelle identifiziert werden. Die Sudanfärbung dient zur Darstellung von Lipiden. Weitere chemische Verfahren werden in der Enzymhistochemie zur Lokalisation verschiedener Enzyme in den Zellen verwendet.

Die physikalischen Methoden der Histochemie umfassen Mikroveraschung, Kryotechniken, Mikrospektrometrie, Fluoreszenzmikroskopie, Autoradiographie und Röntgen-Mikroanalyse. Diese Techniken basieren auf physikalischen Phänomenen wie Temperatur, verschiedenen Lichtressourcen und radioaktiver Markierung mit Isotopen.

Die biologischen Methoden der Histochemie nutzen biologische Reaktionen, die in lebenden Pflanzen und Tieren beobachtet werden können. Sie etablierten sich später als die chemischen und physikalischen Methoden. Heutzutage umfasst dieser Bereich die Immunhistochemie und die Lektinfärbungen (*Nagata, 2001*).

In den folgenden Kapiteln soll nun auf die für diese Arbeit relevanten Gebiete der Enzymhistochemie, Glykohistochemie und Immunhistochemie eingegangen werden.

2.3.3 Enzymhistochemie

2.3.3.1 Definition und Anwendung

Die Enzymhistochemie dient dem Nachweis von Enzymen in verschiedenen Zellen und Geweben. Durch enzymhistochemische Techniken können Stoffwechselforgänge in der Zelle dargestellt und bestimmte Zellstrukturen aufgrund ihres charakteristischen Enzymgehalts identifiziert werden. Die hohe Substratspezifität der Enzyme ist auf ein aktives Zentrum innerhalb des Moleküls, das spezifisch Verbindungen spaltet, zurückzuführen (*Sinowatz und Hees, 2000*).

2.3.3.2 Technik der Enzymhistochemie

Prinzipiell kann man Enzyme nur indirekt durch den Nachweis ihrer katalytischen Aktivität erfassen (*Arnold, 1968*). Bei der Enzymhistochemie muss man mehrere Methoden zum Nachweis eines Enzyms unterscheiden. Erstens erfolgt der Nachweis der Anwesenheit eines Enzyms durch das Anbieten eines Substrates, welches durch das Enzym in ein oder mehrere Produkte umgesetzt und anschließend sichtbar gemacht wird (*Romeis, 1989*). Dieser Vorgang stellt eine Fällungsreaktion dar, bei der das Substrat durch das Enzym in seine Bestandteile aufgespalten und als unlöslicher Komplex zur Fällung gebracht wird. Diesen kann man im Licht- oder Elektronenmikroskop nachweisen (*Sinowatz und Hees, 2000*). Nach diesem Prinzip werden Präzipitationsreaktionen mit Metallionen durchgeführt (*Lojda et al., 1979*). Diese werden auch als Metallsalzmethode bezeichnet (*Deane et al., 1960*). Die Metallsalzmethode umfasst insgesamt drei Schritte. Zunächst erfolgt die primäre Reaktion, bei der es zur Umsetzung des Substrats durch das Enzym kommt. Anschließend wird eine Präzipitationsreaktion durchgeführt, bei der Ionen wie Ca^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} oder Ba^{2+} hinzugefügt werden. Im Anschluss wird das gefärbte Endprodukt durch die Zugabe eines Farbstoffes, der sich an dieses bindet, im Lichtmikroskop sichtbar (*Lojda et al., 1979*). Ein weiteres Verfahren zur Darstellung des Substratumsatzes ist die simultane Azokopplungsreaktion (*Sinowatz und Hees, 2000; Lojda et al., 1979*). Hier wird auch zunächst ein Substrat durch das entsprechende Enzym umgesetzt. Danach wird ein Diazoniumsalz hinzugegeben, das mit dem primären Reaktionsprodukt reagiert, sodass ein unlöslicher Azofarbstoff entsteht (*Arnold, 1968; Lojda et al., 1979*). Hierbei ist das Diazoniumsalz für die Farbe und Farbtiefe des Pigments verantwortlich (*Arnold, 1968*). Zu den Präzipitationsreaktionen gehört auch die Tetrazoliummethode, bei der zunächst das Substrat oxidiert wird. Danach wird ein zum Inkubationsmedium hinzugegebenes Coenzym reduziert. Darauf erfolgt die Reduktion der Tetrazoliumreduktase oder eines anderen Elektronenakzeptors, durch die das hinzugefügte

Tetrazoliumsalz zu unlöslichem Formazan, das als Indikator dient, reduziert wird (*Lojda et al., 1979*). Weitere Enzymnachweismethoden sind die sukzessive Azokopplungsreaktion, Synthesereaktionen und Substratfilmverfahren (*Lojda et al., 1979*) sowie die Autoradiographie (*Arnold, 1968*).

Zweitens kann man ein Enzym aufgrund seiner antigenen Eigenschaften direkt darstellen. Dies wird mittels immunhistochemischer Methoden durchgeführt (*Romeis, 1989*).

Nach *Lojda et al. (1979)* müssen folgende Voraussetzungen für einen verlässlichen Enzymnachweis erfüllt sein:

- a) Die Aufbereitung von Geweben und Schnitten sollte die Aktivität und Verteilung des Enzyms nicht beeinflussen.
- b) Das Substrat und unterstützende Reagenzien sollten in alle Zellen und ihre Komponenten mit gleicher Geschwindigkeit vordringen können.
- c) Das Substrat sollte durch nur ein einziges Enzym umgesetzt werden.
- d) Die Hilfsreagenzien sollten weder mit der enzymatischen Reaktion interagieren noch das Vordringen des Substrats verhindern.
- e) Das Reaktionsprodukt sollte durch die Hilfsreagenzien, unabhängig vom Milieu der Zelle, schnell eingefangen werden.
- f) Das Endprodukt sollte unverzüglich präzipitiert werden. Es sollte wasser- und lipidunlöslich sein.
- g) Die in die Reaktion involvierten Substanzen sollten nicht an andere Strukturen als die enzymatisch aktiven Stellen gebunden oder absorbiert werden (*Lojda et al., 1979*).

Entscheidend für den Nachweis eines Enzyms in Blutzellen sind zum einen frische native Blutausstriche, die nicht älter als drei Tage sein dürfen. Zum anderen muss bei der Probengewinnung beachtet werden, dass Antikoagulanzen wie EDTA die Enzymreaktion stark abschwächen. Weiterhin sollten nur Ausstriche verwendet werden, die vorher mindestens 30 Minuten luftgetrocknet wurden (*Mahlberg et al., 2004*). Bei der Fixation der Ausstriche sollte beachtet werden, dass manche Enzyme gegenüber bestimmten Fixationsmitteln sehr empfindlich sind (*Romeis, 1989*). Die Aktivität der Enzyme ist weiter abhängig vom pH-Wert des Inkubationsmediums. Das sogenannte pH-Optimum stellt dabei den Bereich höchster Aktivität dar. Dieser kann konstant sein oder in Abhängigkeit vom Substrat variieren. Um das pH-Optimum eines Enzyms im Inkubationsmedium zu erreichen, werden Pufferlösungen eingesetzt. Auch die Temperatur hat einen Einfluss auf die Reaktionsfähigkeit eines Enzyms. Allgemein führt eine Erhöhung der Temperatur zu einer Reaktionsbeschleunigung. Dabei muss man berücksichtigen, dass bei zu starker Erwärmung eine Denaturierung der Enzyme erfolgen

kann. Somit existiert für jedes Enzym ein Temperatur-Optimum, welches meist der Körpertemperatur des Organismus entspricht (*Deane et al., 1960*).

2.3.3.3 Charakterisierung in der Arbeit nachgewiesener Enzyme

Peroxidasen fördern die Oxidation eines Stoffes in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (*Romeis, 1989*), weswegen sie als Hämproteine bezeichnet werden. Eine Form der Peroxidasen sind Pseudoperoxidasen, zu denen Zytochrome, Hämoglobin oder Myoglobin gehören (*Romeis, 1989*). Peroxidasen findet man in zahlreichen Tier- und Pflanzengeweben. In den Leukozyten ist die Myeloperoxidase vertreten (*Lojda et al., 1979*). Sie kann als Markerenzym für den Nachweis von Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten dienen (*Raskin und Valenciano, 2000*). Dies gilt jedoch nicht für die Monozyten des Kaninchens, in denen keine Peroxidase vorkommt (*Nichols et al., 1971; Oka et al., 1982*). Während der Entwicklung von polymorphnukleären Blutzellen ist eine Aktivität der Myeloperoxidase im endoplasmatischen Retikulum, in der Kernhülle und im Golgi-Apparat vorhanden. Im Laufe der Reifung begrenzt sich die Aktivität auf die Granula der Monozyten, der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. In den Thrombozyten ist die Peroxidase im DTS lokalisiert (*Borgers und Verheyen, 1985*). Die Peroxidase ist sehr empfindlich gegenüber der histologischen Aufbereitung von Geweben, weshalb stets frische und nicht in Paraffin eingebettete Präparate verwendet werden sollten. Die Fixierung der Probe sollte mit Formalinacetone erfolgen (*Raskin und Valenciano, 2000*). Nach *Lojda et al. (1979)* toleriert die Myeloperoxidase länger andauernde Fixierung mit Formaldehyd und nach einer gründlichen Waschung auch das Einbetten in Paraffin (*Lojda et al., 1979*). Ihre Aktivität nimmt im Laufe der Zeit ab, vor allem in Proben, die älter als eine Woche sind (*Raskin und Valenciano, 2000*).

Phosphatasen sind sehr genau untersuchte Enzyme. Sie sind der Gruppe der Hydrolasen zuzuordnen. Die alkalische und saure Phosphatase gehören dabei zu den Hydrolasen der Phosphomonoester (*Lojda et al., 1979*).

Die alkalische Phosphatase ist für die Katalyse der hydrolytischen Spaltung von Estern der Phosphorsäure mit Alkoholen oder Phenolen zuständig. Dies geschieht stets bei einem alkalischen pH-Wert (*Romeis, 1989*). Das pH-Optimum der alkalischen Phosphatase liegt zwischen 9,2 und 9,8 und ist abhängig von der Art und der Konzentration des Substrats oder des Puffers. Durch verschiedene Ionen wie Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} wird das Enzym aktiviert, wohingegen es durch Phosphat- und Arsenatanionen als auch durch zahlreiche Alkohole, wie L-Cystein und Tetramisol, inhibiert wird (*Lojda et al., 1979*). Alkalische Phosphatasen werden als Markerenzym der neutrophilen Granulozyten angesehen (*Romeis, 1989*), können aber auch in Osteoblasten, Histozyten, Endothelzellen der Gefäße und Untereinheiten von Lymphozyten nachgewiesen werden (*Raskin und*

Valenciano, 2000). Sie befinden sich primär in der Zellmembran, dem Ort aktiver Transportprozesse (*Lojda et al., 1979*).

Saure Phosphatasen sind Enzyme, die Phosphatester in einer sauren Umgebung hydrolysieren (*Raskin und Valenciano, 2000*). Inhibiert wird die saure Phosphatase durch Fluorid- und Phosphationen. Für einige saure Phosphatasen wirken außerdem Cu^{2+} , Tartrationen, Alloxan und Formaldehyd hemmend. Mn^{2+} -Ionen hingegen aktivieren das Enzym. Sein pH-Optimum liegt zwischen pH 4 und 5 (*Lojda et al., 1979*). Da saure Phosphatasen empfindlich auf Gewebebehandlung und Hitze reagieren, sollte man keine Präparate, die in Paraffin eingebettet sind, verwenden (*Raskin und Valenciano, 2000*), da durch eine inadäquate Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials Lysosomen zerstört werden können (*Lojda et al., 1979*). Die saure Phosphatase wird allgemein als Markerenzym für Lysosomen angesehen (*Borgers und Verheyen, 1985; Lojda et al., 1979*). Sie kommt jedoch auch extralysosomal im endoplasmatischen Retikulum oder im Hyaloplasma vor. Die extralysosomalen sauren Phosphatasen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktivität gegenüber Inhibitoren und aliphatischen sowie aromatischen Estern der Orthophosphorsäuren differenziert werden (*Lojda et al., 1979*). Mit histochemischen Methoden wird die saure Phosphatase in Lymphozyten, Monozyten, Histiozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Megakaryozyten, Plasmazellen und erythrozytären Vorläufern nachgewiesen (*Raskin und Valenciano, 2000*).

Die Esterasen unterteilt man in zwei Gruppen. Es gibt spezifische Esterasen, wie die Chloracetat-Esterase, und unspezifische Esterasen, zu denen die α -Naphthyl-Acetat-Esterase (*Raskin und Valenciano, 2000*) und die Naphthol-AS-Acetat-Esterase gehören (*Stobbe, 1970*). Die spezifischen Esterasen werden von den unspezifischen Esterasen durch Separierung ihrer Isoenzyme mittels Gelelektrophorese unterschieden. Zudem zeigen sich spezifische Esterasen resistent gegen die Inhibition durch Natriumfluorid. Die Chloracetat-Esterase ist spezifisch für neutrophile Granulozyten sowie Mastzellen und hydrolysiert Ester, die mit Naphthol AS-D (3-Hydroxy-2'-methyl-2-naphthanilidin) Chloracetat verbunden sind. Die histochemische Reaktion ist stabil und kann auch bei in Paraffin eingebetteten Präparaten verwendet werden (*Raskin und Valenciano, 2000*). Lediglich neutrophile Granulozyten und ihre Vorläufer sowie Mastzellen zeigen eine positive Reaktion (*Lojda et al., 1979*).

Die unspezifischen Esterasen sind unter anderem im endoplasmatischen Retikulum, in Lysosomen und manchmal auch in den Mitochondrien lokalisiert (*Lojda et al., 1979*). Sie werden aufgrund ihrer großen Spanne an Substratspezifität und ihrer Aktivität in unterschiedlichen pH-Bereichen als unspezifisch bezeichnet. Viele dieser Esterasen, die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt wurden, sind spezifisch für bestimmte Zellen. Monozyten, Granulozyten und eine Untereinheit der Lymphozyten zeigen einzigartige Reaktionsprodukte. Im Gegensatz zu den unspezifischen Esterasen in den T-Lymphozyten können die unspezifischen Esterasen in Monozyten durch Natriumfluorid gehemmt werden. Dieser Unterschied ist auf die Lokalisation der unspezifischen

Esterasen in den Zellen zurückzuführen. Die Enzyme sind eher instabil und empfindlich gegenüber Hitze, Fixation und Lagerung (*Raskin und Valenciano, 2000*). Zudem sind sie in wässrigen Inkubationsmedien löslich, sodass die Enzyme der Zellen ohne vorherige Fixation innerhalb einer Minute verloren gehen können (*Lojda et al., 1979*). Außerdem sollten nur frische Blutaussstriche oder Gewebe auf Objektträger aufgetragen werden. Die Zellspezifität der α -Naphthyl-Acetat-Esterase kann durch spezifische Inkubationsparameter (pH-Wert, Temperatur, Inhibitoren und Inkubationszeit) demonstriert werden. Monozyten und Granulozyten zeigen Enzymaktivität in neutralem Medium, obwohl die Anfärbung der Monozyten im sauren Medium am besten ist. In Lymphozyten kann man das Enzym vorzugsweise unter sauren Bedingungen und einer verlängerten Inkubationszeit nachweisen (*Raskin und Valenciano, 2000*).

Die β -Glucuronidase gehört zu den sauren Hydrolasen (*Pearse, 1980*) und zeigt eine ähnliche Reaktivität wie die Esterasen (*Raskin und Valenciano, 2000*). Sie katalysiert unter Anwesenheit von H_2O die Umwandlung eines β -Glucuronids zu einem Glucuronat und einem Aglykon (*Lojda et al., 1979*). Sie kommt an zwei Lokalisationen in der Zelle vor, zum einen in Lysosomen, zum anderen im endoplasmatischen Retikulum (*Lojda et al., 1979*). Ihre Aktivität kann sowohl in den Lymphozyten, als auch in den Monozyten und Granulozyten nachgewiesen werden (*Raskin und Valenciano, 2000*). Die Existenz verschiedener Isoenzyme mit unterschiedlichen pH-Optima weist auf eine Inhomogenität der β -Glucuronidase hin. Das pH-Optimum ist organ- und speziesspezifisch, liegt jedoch meist zwischen 4,5 und 5,5. Eine Inhibition des Enzyms kann durch D-Glucuronolacton, D-Saccharonolacton, Citrat und Ascorbinsäure erfolgen (*Lojda et al., 1979*).

2.3.4 Glykohistochemie

2.3.4.1 Definition, Anwendung und Technik

Der Begriff Lektin entstammt dem lateinischen Wort „legere“ für auflesen, sammeln, auswählen und wurde 1954 von William C. Boyd etabliert. Nach seiner Auffassung beinhaltete dieser Begriff blutgruppenspezifische Antigene und andere Antikörper-ähnliche Substanzen aus Samen und anderen Pflanzenteilen (*Boyd und Shapleigh, 1954*). Eine eingrenzende Definition wurde 1980 von Irwin J. Goldstein verfasst: „Ein Lektin [...] ist ein zuckerbindendes Protein oder Glykoprotein nicht-immunogenen Ursprungs, das Zellen agglutiniert und / oder Glykokonjugate präzipitiert“ (*Goldstein et al., 1980*). Diese Definition beinhaltet folgende Eigenschaften für Lektine: Sie besitzen mindestens zwei Bindungsstellen für Zuckerstrukturen und agglutinieren Zellen von Tieren und Pflanzen und / oder präzipitieren Polysaccharide, Glykoproteine und Glykolipide. Dabei wird die Spezifität eines Lektins durch ein Monosaccharid oder ein einfaches Oligosaccharid, das die lektininduzierten Agglutinationen oder Präzipitationen hemmt, definiert. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen müssen Lektine von anderen zuckerbindenden Molekülen differenziert werden (*Goldstein et al., 1980*). Nach der aktuellen Definition werden Lektine als Kohlenhydrat-bindende Proteine aufgefasst, die weder Antikörper sind noch enzymatisch an Liganden agieren oder Sensor- bzw. Transportproteine darstellen (*Rüdiger und Gabius, 2009a*).

Da Lektine in allen Organismen vorkommen, thermisch stabil sind und eine meist gut definierte Spezifität für bestimmte Kohlenhydrate aufweisen, werden sie in vielen Forschungsfeldern verwendet (*Rüdiger, 1998*). In der Frühphase der Lektinforschung befasste man sich hauptsächlich mit der Blutgruppenspezifität der Lektine (*Franz, 1990*). Allgemein dienen Lektine vor allem der Identifizierung und Isolierung von Zuckerstrukturen auf verschiedenen Zellen (*Franz, 1990; Gabius et al., 1988; Sharon und Lis, 2004*). Dies kann sowohl mit der Affinitätschromatographie, die von Goldstein und Agrawal (1965) etabliert wurde (*Agrawal und Goldstein, 1965*), als auch mit der Affinitätselektrophoresechromatographie von Bøg-Hansen (1973) untersucht werden (*Bøg-Hansen, 1973*). Gerade die Kohlenhydratstrukturen auf Zelloberflächen sind von großer Bedeutung, da sie sich bei malignen Prozessen verändern können. Somit können mit Hilfe verschiedener Lektine entartete von normalen Zellen unterschieden werden (*Rüdiger, 1982*). Dieser Nachweis gelang Aub et al. (1963), als sie herausfanden, dass das Wheat germ Agglutinin (WGA) vorzugsweise maligne Zellen agglutiniert (*Sharon und Lis, 2004*). Weitere Lektine, die bevorzugt mit Tumorzellen reagieren, sind Lektine aus der Leibeshöhlenflüssigkeit der Mördermuschel *Tridacna gigas* und des Schwamms

Geodia cydonium (Gabius et al., 1988). Insgesamt ist der Einsatz von Lektinen in der Tumorforschung weit verbreitet (Franz, 1990). Auch die Tumorzellen selbst tragen Lektine auf ihrer Oberfläche. Diese Lektine spielen eine große Rolle bei der Ansiedlung von Tumorzellen während der Metastasierung in anderen Geweben (Gabius et al., 1988). Die mitogenen Eigenschaften verschiedener Lektine, unter anderem des Lektins PHA (Phaseolus vulgaris Agglutinin) der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris*, machen sie zu geeigneten Instrumenten zur Untersuchung von Signaltransmissionen in Zellen. Da die mitogenen Lektine wie PHA die Proliferation von Lymphozyten stimulieren, gelang es, den T-Cell-Growth-Factor (IL-2) in menschlichen Lymphozyten nachzuweisen (Sharon und Lis, 2004).

Im Rahmen der Lektinhistochemie werden Lektine auch zur Identifizierung von Zellen und ihrer Bindungsstellen an den Zellen eingesetzt (Nicolson, 1974). Die Verfahrensweise der Lektinhistochemie ähnelt der Immunhistochemie. Hier werden jedoch anstelle von Antikörpern spezifische Lektine eingesetzt, die an Mono- oder Oligosaccharide an bzw. in Zellen binden (Mulisch und Welsch, 2010). Im Licht- bzw. Elektronenmikroskop kann man ihre Bindungsstellen durch Konjugation der Lektine mit fluoreszierenden Stoffen wie FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder auch mit Enzymen wie der Meerrettich-Peroxidase sichtbar machen (Nicolson, 1974; Cooper, 1984; Mulisch und Welsch, 2010). Mit Biotin markierte Lektine sind eine weitere Möglichkeit, die Bindung des Lektins an einen Zucker zu demonstrieren. Eine genauere Erläuterung der Methode erfolgt in Kapitel 3.5.4 (Mulisch und Welsch, 2010).

2.3.4.2 Lektine aus Pflanzen – Struktur, Einteilung und Funktion

Bei den Lektinen kann man allgemein zwischen Lektinen von Pflanzen, von Tieren und Mikroorganismen unterscheiden. Pflanzenlektine sind gewöhnlich multimere und lösliche Proteine, die multiple Bindungsstellen für Kohlenhydrate besitzen, was sie befähigt, gebundene Zellen zu agglutinieren (Cummings, 1997). Die als Glykoproteine bezeichneten Pflanzenlektine enthalten zu 2-50 % Kohlenhydrate. Ausnahmen sind Concanavalin A und das Agglutinin WGA aus Weizenkeimen, die keine Zuckerstrukturen besitzen (Rüdiger, 1982; Rüdiger, 1998). Pflanzliche Lektine wurden bislang am genauesten untersucht und stellen wichtige Werkzeuge in der Forschung dar (Gabius et al., 1988). Man kann ihre normalen Aufgaben in den Zellen in extrinsische Funktionen, bei denen die Lektine mit einem externen Partner reagieren, und in intrinsische Funktionen, bei denen die Lektine mit Bindungspartnern in der Pflanze interagieren, untergliedern (Rüdiger, 1998; Gabius et al., 2004). Die Interaktion zwischen einigen Leguminosen und Bakterien der Gattung *Rhizobium* wird durch Lektine vermittelt (Rüdiger, 1981; Franz, 1990). Durch die in den Wurzelhaaren lokalisierten Lektine werden die Rhizobien festgehalten (Franz, 1990), die den atmosphärischen Stickstoff in Ammoniak umwandeln, der wiederum den Pflanzen zur Verfügung gestellt wird (Rüdiger, 1981). Weiterhin schützen Lektine die Pflanzen gegen phytopathogene Mikroorganismen und Insekten sowie gegen

Fressfeinde (*Sharon und Lis, 2004*). In Bezug auf intrinsische Funktionen wird eine Beteiligung der Lektine an der Verpackung von Speicherproteinen in Leguminosensamen und an Keimungs- und Wachstumsprozessen vermutet (*Franz, 1990; Gabius et al., 2004*). Die Funktionen der Pflanzenlektine sind insgesamt vielfältig. Gemeinsam ist ihnen jedoch die Fähigkeit an der Speicherung von Proteinen teilzunehmen (*Rüdiger und Gabius, 2009b*).

Man kann die Pflanzenlektine ihrer Herkunft nach in Lektine aus Leguminosen, Lektine aus Nachtschattengewächsen, Lektine aus Wolfsmilchgewächsen und Lektine aus Monokotyledonen einteilen (*Cummings, 1997; Rüdiger und Gabius, 2001*). Die pflanzlichen Agglutinine kommen vor allem im Samen, seltener in den Wurzeln und Blättern der Pflanzen vor (*Gabius et al., 1988*). Die Struktur der Pflanzenlektine ist entsprechend ihrer verschiedenen Quellen sehr unterschiedlich. Am besten untersucht sind dabei die Lektine der Leguminosen, die Sequenzhomologien mit einer hohen Variabilität in der Bindung an Zuckerstrukturen besitzen. Es wurden Lektine mit Spezifität für Glukose, N-Acetylglukosamin, Mannose, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin, Fukose und komplexe Oligosaccharide festgestellt (*Rüdiger und Gabius, 2001*). In dieser Gruppe unterscheidet man Einkettenlektine mit zwei gleichgroßen Untereinheiten und Zweikettenlektine mit zwei verschiedenen Untereinheiten (*Rüdiger, 1981; Rüdiger, 1998*). Den Lektinen der Leguminosen gemeinsam ist jedoch ihre Sekundärstruktur, die ein β -Faltblatt bildet (*Rüdiger und Gabius, 2009b*). Zudem enthalten sie N-Glykane (*Rüdiger und Gabius, 2001*). Zu den Einkettenlektinen gehören unter anderem PHA-E und -L aus der Gartenbohne sowie SBA aus der Sojabohne und Con A aus der Schwertbohne. PHA besteht aus zwei Typen von Untereinheiten, die für die bevorzugte Bindung an Leukozyten im Fall von PHA-L und an Erythrozyten im Fall von PHA-E verantwortlich sind (*Rüdiger und Gabius, 2001*). Insgesamt gibt es fünf verschiedene Isolectine von PHA mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften. Das Isolectin L₄ wirkt als Mitogen auf T-Lymphozyten, wohingegen das Isolectin E₄ Erythrozyten agglutiniert. Zudem können die Isolectine von PHA zwischen sogenannten „diantennary“ und „non-diantennary“ N-Glykanen unterscheiden (*Gabius et al., 2004*). SBA (Soybean Agglutinin) besitzt zwei Bindungsstellen für Kohlenhydrate in einem einzigen Molekül. Eine dieser Bindungsstellen hat eine hohe Spezifität für Oligosaccharide mit einem hohen Anteil an Mannose, die andere Bindungsstelle ist spezifisch für Galaktose und N-Acetylgalaktosamin (*Rüdiger und Gabius, 2001*). Die biologische Funktion von SBA ist die Speicherung von Proteinen und Enzymen in Proteinkörpern der Zelle. Zudem fördert SBA den Kontakt zwischen den Speicherproteinen und den Membranen der Proteinkörper. Außerdem kann es die Aktivität von Enzymen, z.B. der Phosphatasen, regulieren (*Rüdiger und Gabius, 2009b*). Con A ist das bekannteste Lektin, das bereits 1919 mittels Kristallisation isoliert wurde (*Gabius et al., 2004*). Seine Aminosäuresequenz zeigt eine starke Übereinstimmung mit der anderer Leguminosenlektine. Reifes Con A ist in der Lage Kohlenhydrate zu

binden, da es im Gegensatz zu seinem Vorläufer nicht glykosyliert ist. Das Protein besteht aus - Faltblättern, die über α -Helices miteinander verbunden sind (*Rüdiger und Gabius, 2001*).

Zu den Zweikettenlektinen gehören Lektine der Pflanzenfamilie *Vicia* (Wicken). Entsprechend unterschiedlicher molekularer Größen unterscheidet man eine kleinere - und eine größere - Untereinheit (*Rüdiger und Gabius, 2001*).

Alle Lektine der Nachtschattengewächse, wie das Kartoffellektin, binden an N-Acetyl-Glukosamin und seine Oligomere. Das Kartoffellektin liegt zu 52,3% glykosyliert vor und enthält O-Glykane, die an einen Hydroxyprolin- oder Serinrest gebunden sind (*Rüdiger und Gabius, 2001*).

Bei den Lektinen der Wolfsmilchgewächse (*Euphorbiaceae*) ist das RCA (*Ricinus communis* Agglutinin) am genauesten untersucht worden (*Rüdiger und Gabius, 2001*). Die Untereinheit der AB-Toxine von *Ricinus communis* bildet ein β -„trefoil“- (Kleeblatt)-Faltungsmuster (*Rüdiger und Gabius, 2009b*). Es schützt die Pflanzen vor herbivoren Tieren (*Rüdiger und Gabius, 2009b*), inaktiviert Ribosomen und wird zur Herstellung von Immunotoxinen genutzt (*Gabius et al., 2004*).

Lektine der Monokotyledonen, wie WGA (Wheat germ Agglutinin), weisen Hevein-ähnliche Domänen als Sekundärstruktur auf (*Gabius et al., 2004*). Diese vier unterschiedlich gefalteten und helikal aufgebauten Hevein-ähnlichen Domänen werden durch Disulfidbrücken stabilisiert. Ihre Bindungsstellen für Kohlenhydrate sind an der Übergangsstelle zwischen den Untereinheiten lokalisiert. WGA interagiert mit N-Acetylglukosamin, bevorzugt mit $\beta 1 \rightarrow 4$ -gebundenen Oligomeren. Das gesamte Molekül ist nach seiner Reifung ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 36 kDa (*Rüdiger und Gabius, 2001*). Biologische Eigenschaften von WGA sind zum einen die Förderung der Symbiose zwischen Pflanze und Bakterium, zum anderen auch der Schutz der Pflanze vor herbivoren Tieren (*Rüdiger und Gabius, 2009b*).

Goldstein und Poretz (1986) stellten die erste Klassifizierung der Pflanzenlektine auf (*Goldstein und Poretz, 1986*). Diese wurde im Laufe der Zeit durch andere Autoren wie Rüdiger und Gabius (2009) modifiziert und auf den aktuellsten Forschungsstand gebracht. Demnach existieren zur Zeit sechs Lektingruppen (*Rüdiger und Gabius, 2009a; Lohr et al., 2010*).

Die Mannose und Glukose bindenden Lektine wurden bislang am gründlichsten untersucht, da zu ihnen auch das Lektin Concanavalin A gehört. Diese Lektingruppe stammt zum größten Teil aus Leguminosen. Gemeinsam ist allen, dass sie Metallionen, z.B. Mn^{2+} und Ca^{2+} , für ihre Aktivität benötigen. Zudem zeichnen sie sich teilweise durch eine mitogene Wirkung auf Lymphozyten aus (*Goldstein und Poretz, 1986*).

Viele N-Acetylglukosamin-bindenden Lektine stammen aus Getreiden, wie z.B. WGA (Wheat germ Agglutinin), Nachtschattengewächsen und Leguminosen (*Goldstein und Poretz, 1986*).

Die N-Acetylgalaktosamin- und Galaktose-bindenden Lektine werden traditionell in einer Gruppe zusammengefasst. Zu ihnen gehören toxische Lektine wie z.B. das Lektin der Rizinusbohne *Ricinus*

communis und der Paternostererbse *Abrus precatorius* (Goldstein und Poretz, 1986). Bei einigen Mitgliedern dieser LektinGruppe wurde die Blutgruppenspezifität von Lektinen entdeckt und näher untersucht. So fand man heraus, dass das Lektin der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) wie auch DBA (Dolichos biflorus Agglutinin) spezifisch für die Blutgruppe A des Menschen sind (Goldstein und Poretz, 1986; Gabius et al., 2004). Das Lektin der Erdnuss *Arachis hypogea* (PNA) hingegen trägt zur Etablierung der Symbiose zwischen Pflanze und Bakterium bei (Rüdiger und Gabius, 2009b). Zudem kann es unreife von reifen Thymozyten differenzieren (Gabius et al., 2004). VAA (Viscum album Agglutinin) wird aus Extrakten der Mistel gewonnen und ist ein Ribosomen-inaktivierendes Protein (Gabius et al., 2004).

Für Fukose spezifische Lektine wurden aus unterschiedlichen Quellen gewonnen, zu denen sowohl Grünpflanzen als auch Pilze und Tiere gehören (Goldstein und Poretz, 1986). Daher haben sie auch nur sehr wenige Gemeinsamkeiten. UEA-1 von *Ulex europaeus* agglutiniert beispielsweise Erythrozyten des Menschen mit der Blutgruppe 0 und stellt einen selektiven Marker für endotheliale Zellen von Primaten dar (Gabius et al., 2004).

Schließlich gibt es Lektine mit Bindungsstellen für komplexe Kohlenhydrate. Zu ihnen gehören das Lektin der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* (PHA) (Goldstein und Poretz, 1986) und das Lektin von *Maackia amurensis* (Asiatisches Gelbholz) (Rüdiger und Gabius, 2009b).

Wichtig ist, dass die Bindungsaffinität von Lektinen an Monosaccharide durch konservierte Aminosäurereste bestimmt wird, wohingegen die Spezifität von der Länge der α -Helices in der Sekundärstruktur des Moleküls abhängig ist (Rüdiger und Gabius, 2001). Mit Hilfe der Dissoziationskonstante kann die Affinität der Lektine für Monosaccharide ausgedrückt werden. Im Gegensatz zu Monosacchariden ist eine höhere Bindungsaffinität der Lektine für Oligosaccharide vorhanden (Rüdiger et al., 2010). Durch Substitutionen und Verzweigungen an Glykanen wurden in experimentellen Versuchen die Bindungsaffinitäten von Lektinen moduliert (André et al., 2004; André et al., 2006). Damit wurde gezeigt, dass sich die Bindung der Lektine nicht nur auf eine Zuckereinheit beschränkt (Rüdiger und Gabius, 2001).

In der folgenden Tabelle sind für die einzelnen Gruppen Beispiele aufgeführt. Die Spezifität der Lektine für α - und β -Anomere ist nicht berücksichtigt.

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

Tabelle 2.4. Einteilung ausgewählter Pflanzenlektine

2.3.4.3 Zuckerstrukturen auf den Blutzellen des Kaninchens

Das wichtigste Ziel für die Bindung von Lektinen sind die Oberflächen von Zellen. Dabei ist die Bezeichnung „Zelloberfläche“ nur ein allgemeiner Begriff, der die Plasmamembran und damit assoziierte intra- und extrazelluläre Strukturen umfasst. Daher ist es wichtig, den allgemeinen Aufbau von Zellmembranen zu verstehen (Nicolson, 1974). Die Grundstruktur der Zellmembran bildet eine Lipiddoppelschicht, die aus Phospholipiden, Glykolipiden und Cholesterin besteht (Schröder und Diener, 2005). Sie besitzt einen hydrophilen und einen lipophilen Anteil. Dabei ist der hydrophile Teil zur wässrigen Phase, der hydrophobe Teil zur Membranmitte hin angeordnet (Nicolson, 1974). Ein weiterer Bestandteil der Zellmembran sind Proteine, die dieser angelagert sind oder sie durchziehen. Dabei handelt es sich vor allem um Glykoproteine, die in die wässrige Umgebung ragen und mit ihren Kohlenhydratresten auf der Zelloberfläche eine Hülle bilden, die als Glykokalyx bezeichnet wird (Schröder und Diener, 2005).

Bereits 1968 wurden von Eto et al. Glykolipide auf der Zelloberfläche von Erythrozyten des Kaninchens mittels Chromatographie bestimmt. Sie stellten fest, dass vor allem das Glykolipid Galaktosyl-Galaktosyl-N-Acetylglukosaminy-Galaktosyl-Glukosyl-Ceramid auf der Zelloberfläche, aber

auch Galaktosyl-Galaktosyl-Glukosyl-Ceramid und ein geringer Anteil an Dihexosyl-Ceramid vertreten sind (*Eto et al., 1968*)

1973 wiesen Parmley et al. in ihren Untersuchungen nach, dass sämtliche peripheren Blutzellen sowie die erythrozytären und granulozytären Vorläufer im Knochenmark Glukosereste auf ihrer Zelloberfläche tragen, da sie Con A, ein glukosespezifisches Lektin, binden (*Parmley et al., 1973*). Die verschiedenen Kohlenhydrate der Zellmembran wurden bei den Erythrozyten des Kaninchens und des Menschen von Ogawa und Galili (2006) mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden identifiziert. Sie konnten nachweisen, dass auf der Zelloberfläche der Erythrozyten des Kaninchens im Gegensatz zum Menschen α -Galaktose-Epitope exprimiert werden. Da die Erythrozyten des Kaninchens 2×10^6 Epitope pro Zelle zeigen, sind sie einzigartig im Vergleich zu den Erythrozyten anderer Säugetiere, die keine oder nur sehr wenige α -Galaktose-Epitope besitzen. Andere Epitope, wie ungekapptes N-Acetyllactosamin und N-Acetyllactosamin bedeckt mit Sialinsäure, finden sich bei den Erythrozyten des Kaninchens im Gegensatz zum Menschen und anderen Säugetierspezies nicht (*Ogawa und Galili, 2006*).

Auf den Lymphozyten werden jedoch $0,8 \times 10^6$ unbedeckte Acetyllactosamin-Epitope pro Zelle gefunden. Sie weisen außerdem annähernd die gleiche Anzahl an mit Sialinsäure bedeckten Acetyllactosamin-Epitopen auf sowie α -Galaktose-Epitope (*Ogawa und Galili, 2006*).

Die Thrombozyten des Kaninchens exprimieren an ihrer Oberfläche verschiedene Membranglykoproteine (*Packham et al., 1992*). Zunächst konnten Nurden et al. (1977) durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender PAS-Färbung drei verschiedene Banden an Glykoproteinen bei Thrombozyten des Menschen und des Kaninchens ausmachen. Diese als Glykoprotein I, II und III bezeichneten Glykoproteine haben beim Kaninchen ein Molekulargewicht von 170 000 Da, 132 000 Da bzw. 108 000 Da (*Nurden et al., 1977*). 1982 wiesen Toor et al. durch Markierung der Zelloberfläche nach, dass es sich bei dem terminalen Zuckerresten um Galaktose und N-Acetylglaktosamin handelt (*Toor et al., 1982*).

2.3.4.4 Lektinbindungsstellen der Blutzellen des Kaninchens

Die Lektinbindungsstellen an Blutzellen beim Kaninchen wurden vor allem bei den Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten evaluiert.

Die Blutzellen des Kaninchens wurden bereits 1973 von Parmley et al. auf die Bindung von Lektinen untersucht. Dabei verwendeten sie Con A, welches mit Meerrettichperoxidase gekoppelt wurde. Es zeigte sich, dass alle peripheren Blutzellen des Kaninchens Bindungsstellen für Con A besitzen. Im Gegensatz zu den Erythrozyten des Menschen agglutinieren die Erythrozyten des Kaninchens bei Zugabe von Con A. Auch die erythrozytären und granulozytären Vorläufer im Knochenmark des Kaninchens haben Bindungsstellen für Con A (*Parmley et al., 1973*). 1976 untersuchten Haskovec

und Kinkor die Agglutination von Erythrozyten des Kaninchens, der Menschen und des Schafes nach Zugabe von Con A. Dabei zeigte sich, dass eine Steigerung der Agglutination der Erythrozyten des Kaninchens durch Vorbehandlung mit Trypsin oder Neuraminidase hervorgerufen werden kann. Sogar die Erythrozyten des Menschen, die normalerweise in Anwesenheit von Con A nicht agglutinieren, zeigten eine Reaktion nach Vorbehandlung mit Trypsin und Neuraminidase. Keinen Effekt hatte diese Vorbehandlung jedoch auf die Erythrozyten der Schafe (*Haskovec und Kinkor, 1976*). Verloes und Kanarek (1976) konnten außerdem nachweisen, dass Erythrozyten des Kaninchens bei Zugabe von PHA als auch Con A eine Agglutination zeigen (*Verloes und Kanarek, 1976*). Die Erythrozyten des Kaninchens agglutinieren und hämolysieren auch bei Zugabe eines nichttoxischen Lektins der Samen des Krotonölbaums *Croton tiglium*. Auffällig hierbei ist, im Gegensatz zu den Erythrozyten anderer Tierspezies, die hämolysierende Eigenschaft dieses Lektins gegenüber Erythrozyten des Kaninchens. Dabei ist die Rolle der Lektinbindungsstellen unklar, da man nicht sicher sagen kann, ob verschiedene Kohlenhydratrezeptoren auf der Zelloberfläche für die Agglutination und Hämolysen verantwortlich sind. Durch Trypsinisierung der Erythrozyten kann die Lektin-induzierte Agglutination gesteigert werden. Eine Steigerung der Hämolysen bleibt jedoch meist aus. Die Hämolysen wird vielmehr von der Temperatur beeinflusst. Sie verringert sich bei niedrigen Temperaturen (*Banerjee und Sen, 1981*). Das Lektin der Sojabohne (SBA) ist ein weiteres Lektin, das zur Agglutination von Erythrozyten führt. Es bindet an N-Acetyl-D-Galaktosamin oder Galaktose (*Medina, 1990; Reisner et al., 1976*).

Die Untersuchung von Bindungsstellen der Thrombozyten des Kaninchens für die verschiedenen Lektine erfolgte 1982 durch Toor et al. Nach Waschung der Thrombozyten konnte eine Aggregation bei Zugabe des Lektins RCA I (Ricinus communis I Agglutinin) mit einer Zuckerspezifität vor allem für β -D-Galaktose nachgewiesen werden. Bei Zugabe des Erdnussagglutinins (PNA) mit einer Zuckerspezifität für β -D-Galaktose sowie D-Acetylgalaktosamin und des Agglutinins der Sojabohne (SBA) mit einer Zuckerspezifität für α -D-Acetylgalaktosamin kam es zu keiner Aggregation. Erst nach Behandlung mit Neuraminidase trat eine Reaktion mit PNA und SBA sowie eine gesteigerte Reaktion mit RCA I auf (*Toor et al., 1982*). Bei der Exposition von Thrombozyten des Kaninchens gegenüber WGA kommt es bei der Hälfte der Population zu einer Interaktion mit Thrombozyten (*Dhar und Ganguly, 1988*).

Alle Lymphozyten des Kaninchens besitzen Rezeptoren für PHA und Con A. Diese Lektine sind für mitogene Reaktionen bei den Lymphozyten verantwortlich (*Raffel und Sell, 1982*). Dabei reagieren die T-Lymphozyten auf Con A (*Sell, 1979; McNicholas et al., 1981*), wohingegen die B-Lymphozyten des Kaninchens keine mitogene Antwort auf die Zugabe von Con A zeigen (*Sell, 1979*). Hingegen kommt es bei beiden Lymphozytenpopulationen zu einer mitogenen Reaktion auf PHA (*Sell, 1979; McNicholas et al., 1981*). Auch das PWM zeigt bei den T-Lymphozyten eine mitogene Wirkung (*McNicholas et al., 1981*).

Blutzellen	Lektin	Quelle
Erythrozyten	Con A	<i>(Parmley et al., 1973) (Verloes und Kanarek, 1976)</i>
	PHA	<i>(Verloes und Kanarek, 1976)</i>
	Croton tiglium	<i>(Banerjee und Sen, 1981)</i>
	SBA	<i>(Reisner et al., 1976) (Medina, 1990)</i>
Thrombozyten	Con A	<i>(Parmley et al., 1973)</i>
	RCA I	<i>(Toor et al., 1982)</i>
	PNA + NM	<i>(Toor et al., 1982)</i>
	SBA + NM	<i>(Toor et al., 1982)</i>
	WGA	<i>(Dhar und Ganguly, 1988)</i>
B-Lymphozyten	PHA	<i>(Raffel und Sell, 1982)</i>
	Con A	<i>(Parmley et al., 1973) (McNicholas et al., 1981)</i>
T-Lymphozyten	Con A	<i>(Parmley et al., 1973) (Raffel und Sell, 1982) (McNicholas et al., 1981)</i>
	PHA	<i>(Raffel und Sell, 1982) (McNicholas et al., 1981)</i>
	PWM	<i>(McNicholas et al., 1981)</i>
Granulozyten	Con A	<i>(Parmley et al., 1973)</i>
Monozyten	Con A	<i>(Parmley et al., 1973)</i>

Tabelle 2.5: Lektinbindung der Blutzellen des Kaninchens

NM = Neuraminidase.

2.3.5 Immunhistochemie

2.3.5.1 Definition und Anwendung

Unter Immunhistochemie bzw. Immunzytochemie versteht man die Darstellung antigener bzw. „immunologisch reaktiver“ Strukturen in Zellen und Geweben mit Hilfe von bindenden Antikörpern (*Wiesner und Ribbeck, 2000; Pschyrembel, 2007*). Die Antikörper werden dabei mit verschiedenen Markersubstanzen konjugiert, sodass die Bindung sichtbar gemacht werden kann (*Sinowatz und Hees, 2000*). 1941 wurde die Immunhistochemie erstmals angewendet, indem ein Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurde (*Coons et al., 1941*). Seitdem wurde die Immunhistochemie im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität verbessert und stellt eine der am häufigsten angewendeten Techniken in der Histologie dar (*Denk, 1989*).

2.3.5.2 Technik der Immunhistochemie

In der Immunhistochemie unterscheidet man grundsätzlich zwei verschiedene Methoden. Bei der direkten Methode wird eine Lösung mit einem mit einer Markersubstanz gekoppelten Antikörper direkt auf das Präparat mit dem gebundenen Antigen aufgebracht, wo eine spezifische Bindung an das Antigen erfolgt. Dies kann anschließend im Mikroskop beobachtet werden. Bei der indirekten Methode wird zunächst ein für das Antigen spezifischer Antikörper ohne Marker aufgebracht. Daraufhin wird ein zweiter markierter Antikörper, ein sogenannter „Anti-Antikörper“, dazu gegeben, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Durch die Verwendung von zwei Antikörpern kann mit der zuletzt genannten Vorgehensweise eine höhere Empfindlichkeit des Nachweises erreicht werden (*Sinowatz und Hees, 2000*).

Zur Darstellung der Antikörper und Antigene gibt es in der Immunhistochemie verschiedene Verfahren. Bei der immunenzymatischen Methode werden unter anderem die alkalische Phosphatase aus *E. coli*, die Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* und die Meerrettichperoxidase verwendet (*Pearse, 1980*). Die Enzyme können direkt an den Antikörper gekoppelt sein oder erst durch Kopplung an einen Anti-Antikörper an den Ort der Antikörper-Antigen-Reaktion gebracht werden. Durch Zugabe von Substraten (Chromogene) kommt es zu einer Farbreaktion, die den Antigen-Antikörper-Komplex anzeigt. Ein Chromogen der Peroxidase ist beispielsweise Diaminobenzidin, welches mit H₂O₂ ein braunes Reaktionsprodukt bildet (*Denk, 1989*). Bei dem Antigennachweis mit Hilfe der Peroxidase können verschiedene Techniken angewendet werden. Zu ihnen gehört auch die Enzymbrückentechnik. Hierbei wird ein sogenanntes 3-Schicht-Verfahren durchgeführt. Zunächst wird

ein erster, spezifischer Antikörper gegen das gesuchte Antigen appliziert. Der zweite Antikörper (Anti-Antikörper gegen den ersten Antikörper) wird danach hinzugefügt. Er dient dem Peroxidase-bindenden Antiperoxidase-Antikörper als Brücke zum ersten, spezifischen Antikörper. Diese Technik gehört zu den „unmarkierten Antikörpermethoden“ (*Luppa, 1986*). Eine Modifikation stellt die „Enzym-Anti-Enzym-Komplex-Technik“ dar, bei der der Brückenantikörper und das Markerenzym in Form eines löslichen Komplexes, dem Enzym-Anti-Enzym-Komplex, zugegeben werden. Der Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Komplex und der alkalische-Phosphatase-Anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Komplex sind Beispiele für diese Methode (*Denk, 1989*). Der PAP-Komplex besteht dabei aus drei Molekülen Peroxidase und zwei Antiperoxidase-Antikörpern. Er hat eine fünfeckige Struktur und führt somit zu einer stabilen Bindung. Daher sind die Verluste von Peroxidase bei der Inkubation bei diesem Verfahren geringer als bei der Enzymbrückentechnik. Zudem steigert sich die Nachweisempfindlichkeit, sodass diese Methode um das 100- bis 1000-fache genauer ist als die Immunfluoreszenz (*Luppa, 1986*).

Abgesehen von Enzymen können auch Schwermetallverbindungen und Immunkolloide als Markersubstanzen zum Einsatz kommen. Die Immunferritintechnik stellt hierbei das älteste Verfahren zur Darstellung antigener Strukturen im Elektronenmikroskop dar. Dabei werden Ferritinmoleküle direkt oder indirekt an Antikörper gekoppelt (*Luppa, 1986*). Eine weitere Darstellung von Antigenen erfolgt mit Antikörpern, die mit kolloidalen Goldpartikeln markiert sind. Die an die Antikörper gekoppelten Goldpartikel sind sowohl im Lichtmikroskop als auch im Elektronenmikroskop erkennbar. Sie stellen sich lichtmikroskopisch mit roter Färbung dar (*Denk, 1989*).

Eine weitere immunhistochemische Methode ist die Avidin-Biotin-Technik, deren Grundlage die hohe Affinität des Hühnereiweißes Avidin zum Vitamin Biotin ist (*Denk, 1989*), einem Glykoprotein, das aus Vogel- oder Amphibieneiern stammt. Unspezifische Färbungen können durch die Verwendung von Streptavidin, aus *Streptomyces avidini*, anstelle von Hühner-Avidin vermieden werden. Sowohl Avidin als auch Streptavidin besitzt vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin. Das Coenzym Biotin bindet an Fc-Fragmente von Immunglobulinmolekülen, die mehrere Bindungsstellen für Biotinmoleküle haben. Allgemein unterscheidet man bei der Avidin-Biotin-Methode die Avidin-Biotin-Brückenmethode und die Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Methode (ABC-Methode) (*Luppa, 1986*). Bei der Avidin-Biotin-Brückenmethode verbindet sich unter Beteiligung des Avidins oder Streptavidins ein biotinylierter Antikörper mit einem biotinylierten Enzym (*Denk, 1989*) oder einem biotinylierten Antikörper (*Luppa, 1986*). Bei der sogenannten ABC-Methode wird ein bereits vorgefertigter Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Komplex) verwendet (*Denk, 1989*).

In der Immunfluoreszenz wird ein Fluoreszenzfarbstoff als Markersubstanz verwendet. Die Fluoreszenzfarbstoffe fluoreszieren bei Licht im UV-Bereich oder Blau-Anregung (*Denk, 1989*). Dazu gehören unter anderem Fluoresceinisothiocyanat (FITC), welches grün fluoresziert und

Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC), das orangerot fluoresziert. Zu den immunfluoreszenzmikroskopischen Verfahren zählen unter anderem die bereits erwähnte direkte und indirekte Methode sowie die Doppelimmunfluoreszenz, bei der zum Nachweis mehrerer Antigene mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper eingesetzt werden. Ein weiteres Verfahren ist die Avidin-Biotin-Technik (*Storch, 1986*), deren Anwendung oben bereits erwähnt wurde.

2.3.5.3 Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten

Die Immunhämatologie beschäftigt sich mit den Antigenstrukturen von Blutzellen und deren Erkrankungen, die durch Antigen-Antikörper-Reaktionen hervorgerufen werden. Das Wissen um bestimmte Antigenstrukturen auf Zelloberflächen spielt für Blut- und Organtransplantationen eine wichtige Rolle. Auch zum Verständnis des Immungeschehens ist die Kenntnis von Antigenen entscheidend. Auf allen Blutzellen befinden sich Antigene, die in Histokompatibilitäts-Antigene oder auch Transplantations-Antigene, Blutgruppenantigene und Leukozyten-spezifische Antigene unterteilt werden können (*Jain, 1993*). Auf die Blutgruppenantigene wird im nächsten Kapitel eingegangen. Hier werden nur die Antigene auf der Oberfläche der Lymphozyten des Kaninchens behandelt.

Auf der Zelloberfläche der B-Lymphozyten befinden sich der B-Zell-Rezeptor, Immunglobulinrezeptoren und Immunglobuline. Allgemein exprimieren unreife B-Lymphozyten vor allem zytoplasmatisches IgM, wohingegen reife Zellen IgM-, IgG- und IgD-Antikörper zeigen, die an spezifische Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden sind (*Jain, 1993*). Auch beim Kaninchen ist IgM auf der Zelloberfläche der B-Lymphozyten dominierend. Auch IgA und IgG befinden sich auf der Zelloberfläche der B-Lymphozyten. Die Anwesenheit von IgD konnte in Untersuchungen von Bast et al. (1979) nicht belegt werden (*Bast et al., 1979*). Alle T-Lymphozyten besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TCR). Allgemein können der $\alpha\beta$ -TCR und der $\gamma\delta$ -TCR unterschieden werden (*Jain, 1993*). Die T-Lymphozyten des Kaninchens tragen hauptsächlich den $\alpha\beta$ -TCR auf ihrer Oberfläche. Lediglich ein geringer Prozentsatz der T-Lymphozyten im Blut zeigt den $\gamma\delta$ -TCR auf der Zellmembran (*Davis und Hamilton, 2008*). Die Unterscheidung von Untergruppen der B- und T-Lymphozyten erfolgt durch die Klassifizierung spezifischer Antigene auf der Zellmembran in die sogenannten CD-Antigene (CD = „cluster of differentiation“). Beim Menschen sind bei den B-Lymphozyten die CD-Antigene CD9, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD37, CD38 und CD39, auf den T-Lymphozyten CD2, CD3, CD4, CD7 und CD8 präsent (*Jain, 1993*). Beim Kaninchen können mit Hilfe verschiedener monoklonaler Antikörper die CD-Antigene auf den Lymphozyten charakterisiert werden. In einer Studie von Brodersen et al. (1998) wurden folgende CD-Antigene auf den Lymphozyten des Kaninchens mit monoklonalen Antikörpern bestimmt: CD9, CD11a, CD18, CD20, CD23, CD43, Thy-1 (CD90), SWC7 (*Brodersen et al., 1998*). Davis und Hamilton (2008) konnten diese Ergebnisse mit anderen monoklonalen Antikörpern bestätigen und ergänzen. Sie differenzierten folgende CD-Antigene auf den

Lymphozyten des Kaninchens: CD4, CD5, CD8, CD9, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD44, CD45, CD58 (*Davis und Hamilton, 2008*). Eine genauere Unterscheidung des Vorkommens der CD-Antigene auf den verschiedenen Lymphozytenpopulationen wurde jedoch nicht vorgenommen. Lediglich Davis und Hamilton (2008) treffen die Aussage, dass die CD4- und CD8-Moleküle nur auf den T-Lymphozyten zu finden sind (*Davis und Hamilton, 2008*). In den unten genannten Untersuchungen wird hingegen die Zuordnung zu den Lymphozytenpopulationen näher besprochen.

Das CD4-Antigen wird allgemein auf den T-Helferzellen als TCR-assoziiierter Korezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle und IL-16 exprimiert (*Moore und Vernau, 2000*). Beim Kaninchen hat es ein Molekulargewicht von 42 kDa (*Kotani et al., 1993*). Die biologische Rolle von CD5 in T- und B-Lymphozyten ist die Regulation der intrazellulären Signalstärke (*Pospisil et al., 2009*). Das CD5-Antigen mit 67 kDa beim Kaninchen kann nach Kotani et al. (1993) bei nicht-stimulierten T-Lymphozyten als Pan-T-Zell-Marker angesehen werden. Auf B-Lymphozyten, die Immunglobuline auf ihrer Oberfläche tragen, befindet sich kein CD5. Dies steht im Kontrast zu den Immunglobulin-freien B-Lymphozyten in der Peritonealhöhle und den Lymphknoten des Zäkums, die CD5 exprimieren (*Kotani et al., 1993*). Nach Raman und Knight (1992) wird CD5 beim Kaninchen im Gegensatz zu Mäusen und dem Menschen auf allen B-Lymphozyten der peripheren Gewebe exprimiert (*Raman und Knight, 1992*). Das CD5-Molekül des Kaninchens ist ein Glykoprotein mit je einer O- und N-glykosylierenden Seite und einem terminalen Sialinsäurerest. Obwohl das CD5 von Menschen und Kaninchen zu ca. 63% identisch ist, hat das Kaninchen ein zusätzliches Cystein, welches möglicherweise die Struktur und Funktion des CD5-Moleküls beeinflusst. Der monoklonale Antikörper KEN-5 erkennt CD5 sowohl auf den B-Lymphozyten des Kaninchens als auch auf den T-Lymphozyten. Es wird vermutet, dass KEN-5 ein Epitop auf dem CD5-Molekül oder einem CD5-ähnlichen Molekül registriert, welches sich auf den meisten T-Lymphozyten des Kaninchens befindet und nur auf einer geringen Anzahl an B-Lymphozyten vorhanden ist. KEN-5 bindet nachweislich unterschiedlich an B- und T-Lymphozyten, was man auf die unterschiedlichen Glykanstrukturen zurückführen kann. Mit Hilfe von KEN-5 können 90% der Thymozyten, 40-45% der Lymphozyten in den Mesenteriallymphknoten und 3-6 % an IgM-tragende B-Lymphozyten differenziert werden. Es ist davon auszugehen, dass KEN-5 CD5-Isoformen der B- und T-Zelllinien unterscheidet, die eine Rolle bei der Entwicklung, Selektion und Funktion der B- und T-Zell-Untereinheiten spielen (*Pospisil et al., 2009*). Das CD8-Molekül ist ein Korezeptor des TCR zytotoxischer T-Lymphozyten für MHC-Klasse-I-Moleküle (*Moore und Vernau, 2000*). Der für den Nachweis herangezogene monoklonale Antikörper ruft eine Reaktion bei 70 % der im Thymus lokalisierten T-Lymphozyten und bei 15-25 % der peripheren T-Lymphozyten des Kaninchens hervor (*De Smet et al., 1983*). Die β_2 -Integrine (CD11/CD18) gehören zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen der Leukozyten. CD18 bildet dabei die β_2 -Untereinheit, an die eines der vier CD11-Moleküle (CD11a, CD11b, CD11c, CD11d) gebunden ist. Dabei findet sich CD11a auf allen

Leukozyten (*Moore und Vernau, 2000*). Der CD11a/CD18-Komplex stellt auch beim Kaninchen ein heterodimeres Molekül dar. Seine α -Kette hat ein Molekulargewicht von 150 kDa, seine β -Kette ein Molekulargewicht von 100 kDa. Es ist auf der Oberfläche aller Lymphozyten des Kaninchens vertreten (*Kotani et al., 1993*). In Untersuchungen auf das CD43-Antigen bei Lymphozyten des Kaninchens konnte eine Spezifität für T-Lymphozyten gezeigt werden (*Jackson et al., 1983; Wilkinson et al., 1992*). Es wird angenommen, dass das CD43 beim Kaninchen ein Äquivalent des Leukosialins ist, welches das Haupt-Sialoglykoprotein auf den T-Lymphozyten darstellt (*Wilkinson et al., 1992*). In Untersuchungen von Jacksons et al. (1983) wurden fünf verschiedene Lymphozytenpopulationen anhand ihrer Oberflächenantigene mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern in der Milz des Kaninchens charakterisiert. Dabei handelt es sich um zwei Subpopulationen an T-Lymphozyten, zwei Subpopulationen an B-Lymphozyten und Null-Zellen (*Jackson et al., 1983*). Sie kamen zu folgendem Ergebnis:

	T1	T2	B1	B2	Null-Zellen
Prozentualer Anteil in der Milz	14	26	24	31	5
CD18	+	++	-	+	-
CD43	++	++	-	-	-
CD44	+	++	-	+	+
CD45	+	+	+	+	+

Tabelle 2.6: Lymphozytenpopulationen anhand ihrer Oberflächenantigene nach Jackson et al. 1983

Das CD58-Antigen besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, deren Molekulargewicht von der exprimierenden Zellart abhängt. Beim Kaninchen wird es auf den Lymphozyten und Thrombozyten, im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Erythrozyten, nur schwach exprimiert. Sein Molekulargewicht beträgt bei den Lymphozyten 43000 Da, auf den Thrombozyten 48000 Da und auf den neutrophilen Granulozyten 60000-70000 Da. Diese Heterogenität wird auf eine unterschiedliche Glykosylierung des Moleküls zurückgeführt (*Wilkinson et al., 1992*). Insgesamt sind Antikörper, die spezifisch gegen CD-Antigene auf den Blutzellen des Kaninchens gerichtet sind, schwer zu erhalten. Erst durch die Entwicklung von Kaninchen-spezifischen Antikörpern durch Davis und Hamilton (2008) ist eine nähere Differenzierung und Evaluierung der einzelnen Zelltypen und des Vorhandenseins von CD-Antigenen auf der Zelloberfläche von Blutzellen des Kaninchens möglich (*Davis und Hamilton, 2008*).

2.4 Blutgruppen beim Kaninchen

2.4.1 Allgemeines

Eine große Anzahl von Proteinen und komplexen Kohlenhydraten, die als Antigene fungieren, sind in der Zellmembran der Erythrozyten lokalisiert. Einige dieser Antigene kommen bei allen Mitgliedern einer Spezies vor, andere hingegen, einschließlich der Blutgruppenantigene, werden genetisch isoliert, sodass sie nicht bei allen Mitgliedern einer Spezies auftreten. Blutgruppenantigene werden serologisch an der Zelloberfläche der Erythrozyten durch Agglutination oder Hämolyse identifiziert. Durch detaillierte genetische Studien können die Isoantigene in Blutgruppen aufgeteilt werden. Blutgruppen besitzen individuelle chromosomale Loci aus je zwei oder mehreren Allelen. Die meisten von ihnen erhalten ihre Antigenität durch den Kohlenhydratanteil der membranassoziierten Glykolipide und Glykoproteine (Harvey, 2008). Ein Beispiel hierfür ist das AB0-System des Menschen, das 1900 von Landsteiner entdeckt wurde (Cohen und Tissot, 1974). Die Aminosäurezusammensetzung von Membranproteinen ist eine weitere antigenetische Determinante bestimmter Blutgruppen wie des Rh-Systems des Menschen. Die meisten Isoantigene werden während der Erythropoese gebildet. Die Blutgruppe J des Rindes und die DEA-7-Blutgruppe des Hundes stellen eine Ausnahme dar, da sie von anderen Geweben produziert und aus dem Blutplasma an die Zellmembran der Erythrozyten absorbiert werden (Harvey, 2008).

2.4.2 Die Blutgruppen des Kaninchens

Das Kaninchen ist eine der wenigen Säugetierspezies, die keinen signifikanten Gehalt an natürlich vorkommenden Antikörpern gegen Antigene der Erythrozyten der gleichen Spezies besitzt (Cohen und Tissot, 1974). Daher behaupten einige Autoren, dass beim Kaninchen keine Blutgruppen existieren (Lichtenberger, 2004; Marshall, 2008). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Untersuchungen, die bereits ein Jahr nach Entdeckung des AB0-Systems des Menschen erstmals beim Kaninchen durchgeführt wurden. Im Jahr 1901 wiesen Hulot und Ramond nach, dass Kaninchen Hämolsine und Agglutinine gegen Erythrozyten anderer Kaninchen produzieren (Hulot und Ramond, 1901). Diese Agglutinationsreaktionen durch Vermischung des Blutserums eines Individuums mit Blutzellen anderer Individuen besaßen jedoch nur geringe Aussagekraft. 1929 gelang es Levin und Landsteiner als auch Fischer und Klinkhardt durch Alloimmunisierung Antikörper gegen

Blutgruppenantigene herzustellen (*Levine und Landsteiner, 1929; Levine und Landsteiner, 1931; Cohen und Tissot, 1974*). Sie konnten damit zeigen, dass die Blutzellen der Kaninchen möglicherweise Antigene besitzen, für die keine normalerweise im Serum vorkommenden Antikörper existieren (*Cohen und Tissot, 1974*). Die Alloimmunisierung ist die durch ein Alloantigen hervorgerufene Produktion von Alloantikörpern bei einem Individuum. Dabei versteht man unter Alloantigenen Antigene, die nicht bei allen Individuen einer Spezies vorkommen und somit bei Individuen mit fehlendem Antigen eine Immunantwort, also eine Produktion von Alloantikörpern, zur Folge haben. Sie gehören nicht zu den regulären Antikörpern, die auch ohne Immunisierung im Serum von gesunden Individuen vorkommen, sondern sind Antikörper, die erst durch eine Immunisierung gebildet werden. Beim Menschen gehört das AB0-System zu den regulär Antikörper-bildenden Systemen. Im Gegensatz dazu wird beim Rh-System erst nach einer Immunisierung durch den Kontakt des maternalen Blutes mit fetalen Blutkörperchen eine Antikörperproduktion hervorgerufen (*Pschyrembel, 2007*). Castle und Keeler (1933) verwendeten die zwei Antikörperseren von Levin und Landsteiner (1929 und 1931) sowie das AB0-System als Modell. Sie stellten fest, dass mit den zwei Antikörpern anti-H₁ und anti-H₂ alle Kaninchen in die Blutgruppen H₁, H₂, H₁H₂ oder 0 eingeordnet werden können. Sie schlossen daraus auf die Existenz von drei Allelen, die insgesamt 6 verschiedene Genotypen bilden (*Castle und Keeler, 1933*). In einer großen Anzahl von Studien über die Blutgruppen des Kaninchens fanden alle Autoren das gleiche System wie Castle und Keeler (1933). Cohen und Tissot (1974) führten weitergehende Untersuchungen zu den Blutgruppen des Kaninchens durch. Sie stellten fest, dass das von ihnen als Hg bezeichnete System der Komplexität des Rh-Systems des Menschen und des B-Systems des Rindes sehr ähnelt. Zudem kamen sie zu dem Schluss, dass das Hg-System beim Kaninchen aus insgesamt vier Allelen und 12 Antigenen in 10 Kombinationen besteht. Abgesehen vom Hg-System gibt es noch fünf verschiedene Blutgruppensysteme mit den dazugehörenden Allelen, Seren und Phänotypen (*Cohen und Tissot, 1974*). Eine Übersicht soll in der nachfolgenden Tabelle gegeben werden:

Locus	Allele	Blutsera	Anzahl der Phänotypen
Hg	Hg ^A , Hg ^D , Hg ^F , Hg ^N	Anti-A, -D, -F, -I, -J, -K, -N, -P, -R, -T, -V, -W (12)	10
Hb	Hb ^B , Hb ^M	Anti-B, -M (2)	3
Hc	Hc ^C , Hc ^L	Anti-C, -L (2)	3
He	He, he	Anti-E (1)	2
Hh	Hh, hh	Anti-H (1)	2
Hq	Hq ^Q , Hq ^S	Anti-Q, -S (2)	3

Tabelle 2.7: Blutgruppensysteme beim Kaninchen (*Cohen und Tissot, 1974*)

2.4.3 Bedeutung der Blutgruppen des Kaninchens

Das Kaninchen kann als Modell dafür verwendet werden, wie sich hämolytische Erkrankungen des Fetus bei Neugeborenen manifestieren. Im Kaninchen ist es möglich, eine Erkrankung, die der fetalen Erythroblastose menschlicher Neugeborener entspricht, zu induzieren (*Moise et al., 1995*). Die fetale Erythroblastose oder auch Morbus haemolyticus fetalis wird beim Menschen zumeist durch eine Rhesus-Inkompatibilität hervorgerufen. Dabei bildet die Mutter den Antikörper Anti-D gegen das fetale Antigen D der Rhesus-Blutgruppen. Dies geschieht jedoch erst nach einer vorangegangenen Schwangerschaft mit Blutgruppeninkompatibilität, da hier die Sensibilisierung der Mutter stattfindet. Klinisch äußert sich die Erkrankung in einer fetalen oder postnatalen Anämie, in schweren Fällen auch in Form eines Hydrops fetalis, der mit generalisierten Ödemen, Pleuraerguss und Aszites einhergeht (*Pschyrembel, 2007*). Beim Kaninchen wurde dieser Zusammenhang erstmals genauer durch Kellner und Hedal (1952) untersucht. Sie beobachteten, dass intrauteriner Tod und Hydrops fetalis bei Feten von Muttertieren, die mit inkompatiblen Erythrozyten alloimmunisiert wurden, auftritt (*Kellner und Hedal, 1952*). Im Kaninchenmodell sind die Antikörper Anti-A und Anti-F gegen Erythrozyten ein Nachweis für das Auftreten der fetalen Erythroblastose. Ein Antikörpertiter von 640 beim Muttertier ist ein Indiz für eine fetale Anämie. Zudem zeigen Erythrozyten von Feten mit inkompatiblen Muttertieren im Gegensatz zu kompatiblen Feten einen positiven Coombs-Test. Weitere Hinweise für einen Morbus haemolyticus fetalis beim Kaninchen sind ein Hydrops fetalis, der ab dem 20. Trächtigkeitstag mit Sonographie beobachtet werden kann und bei einem Antikörpertiter von über 640 beim Muttertier auftritt, sowie Kardiomegalie, Pleuraerguss und Aszites (*Moise et al., 1995*). Obwohl es seit 1968 Immunglobuline für Rhesus-negative, schwangere Frauen gibt, kommt eine Alloimmunisierung mit dem Rh(D) noch vor, sodass eines von 1000 Kindern Auswirkungen der Erkrankung bei der Geburt zeigt (*Whitecar et al., 2002*). Neppert et al. (1999) konnten nachweisen, dass Leukozytenantikörper des Menschen (HLA), die gegen väterliche Leukozyten gerichtet sind, einen protektiven Effekt auf den Morbus haemolyticus fetalis bei Rh(D)-alloimmunisierten Frauen ausüben (*Neppert et al., 1999*). An einem Kaninchenmodell wurde herausgefunden, dass die maternale Alloimmunisierung mit paternalen Leukozyten die Schwere der Erkrankung herabsetzt. Dies zeigte sich unter anderem durch eine Verbesserung des Grades des Hydrops fetalis. Die Autoren schlossen daraus, dass die anti-HLA-Antikörper die Plazenta passieren und die fetalen Monozyten inhibieren, sodass eine Destruktion der Erythrozyten verhindert wird. Um dieses Verfahren jedoch beim Menschen anwenden zu können, bedarf es laut der Autoren jedoch noch besserer Methoden zur Aufreinigung der Leukozyten (*Whitecar et al., 2002*).

Kapitel 3

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen an den Blutzellen wurden Blutproben von insgesamt 44 gesunden Kaninchen unterschiedlicher Rassen und Nutzungsrichtungen (Schlachtkaninchen und Heimtiere) genommen. Dabei stammen die Proben 1-10 von Kaninchen während der Schlachtung, wohingegen die restlichen Blutproben, aufgrund der raschen Gerinnung des Blutes durch die Probenahme während der Schlachtung, aus der *Vena saphena lateralis* entnommen wurden. Dazu wurden die Kaninchen in Brust-Bauch-Lage fixiert und eine 20G Kanüle zur Blutentnahme verwendet. Das Blut wurde in zwei EDTA-Röhrchen und einem Serum-Röhrchen gesammelt. Insgesamt wurden 28 weibliche Tiere und 16 männliche Tiere für die Untersuchungen herangezogen. Zehn Tiere wurden als Heimtiere gehalten, davon 4 Zwergkaninchen, 2 Angorakaninchen, 2 Riesenschecken und 2 Neuseeländer. 34 der untersuchten Tiere waren Masttiere. Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Aufstellung der für meine Untersuchungen herangezogenen Kaninchen mit Angaben zu Geschlecht, Alter, Rasse und Nutzungsrichtung.

Kaninchen	Geschlecht ¹	Alter	Rasse	Haltung
1	w	6-7 Monate	Großschinchilla	MT
2	w	6-7 Monate	Heller Großsilber	MT
3	w	6-7 Monate	Rheinischer Schecke	MT
4	m	6-7 Monate	Heller Großsilber	MT
5	m	6-7 Monate	Heller Großsilber	MT
6	m	6-7 Monate	Heller Großsilber	MT
7	m	6-7 Monate	Havanna	MT

Kaninchen	Geschlecht ¹	Alter	Rasse	Haltung
8	m	6-7 Monate	Rheinischer Schecke	MT
9	w	6-7 Monate	Heller Großsilber	MT
10	m	6-7 Monate	Heller Großsilber	MT
11	w	6-7 Monate	Zika ²	MT
12	m	12-14 Wochen	Weißer Neuseeländer Mix	MT
13	m	12-14 Wochen	Weißer Neuseeländer Mix	MT
14	m	12-14 Wochen	Weißer Neuseeländer Mix	MT
15	w	6-12 Monate	Weißer Neuseeländer	MT
16	m	12-14 Wochen	Weißer Neuseeländer Mix	MT
17	w	6-7 Monate	Zika	MT
18	w	6-12 Monate	Heller Großsilber	MT
19	w	6-12 Monate	Deutscher Riesenschecke	MT
20	w	6-12 Monate	Deutscher Riesenschecke	MT
21	mk	4,5 Jahre	Angora-Mix	HT ³
22	w	1,5 Jahre	Deutscher Riesenschecke	HT
23	mk	1,5 Jahre	Deutscher Riesenschecke	HT
24	w	1 Jahr	Zwergkaninchen	HT
25	w	1 Jahr	Zwergkaninchen	HT
26	w	4,5 Jahre	Angora-Mix	HT
27	m	adult	Weißer Neuseeländer	HT
28	m	adult	Weißer Neuseeländer	HT
29	mk	7 Jahre	Zwergkaninchen	HT
30	wk	7 Jahre	Zwergkaninchen	HT
31	w	6-7 Monate	Zika	MT
32	w	6-7 Monate	Zika	MT
33	w	6-7 Monate	Zika	MT
34	w	6-7 Monate	Zika	MT
35	w	6-7 Monate	Zika	MT
36	w	6-7 Monate	Zika	MT
37	m	6-7 Monate	Zika	MT
38	w	adult	Deutscher Riesenschecke	MT
39	w	adult	Havanna	MT

Kaninchen	Geschlecht ¹	Alter	Rasse	Haltung
40	w	adult	Deutscher Riesenschecke	MT
41	w	adult	Deutscher Riesenschecke	MT
42	w	adult	Deutscher Großsilber schwarz	MT
43	w	adult	Deutscher Riesenschecke	MT
44	w	adult	Heller Großsilber	MT

Tabelle 3.1: Aufstellung aller untersuchten Kaninchen

¹Geschlecht: w = weiblich; m = männlich; wk = weiblich kastriert; mk = männlich kastriert

²Zika ist die Abkürzung für Zimmermann-Kaninchen. Dies sind Masthybriden, die sich aus der Kombinationskreuzung von „Weißen

Neuseeländern“ mit anderen Rassen entwickelten.

³HT = Heimtier

3.2 Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen

Für die lichtmikroskopischen Färbemethoden wurden zehn Blutausstriche von zehn verschiedenen Tieren herangezogen.

3.2.1 Diff-Quick-Färbung

Bei der Diff-Quick-Färbung handelt es sich um eine Schnellfärbung vom Romanowsky-Typ. Zu den Färbungen vom Romanowsky-Typ zählen hämatologische Färbungen wie Giemsa, Pappenheim oder auch Schnellfärbungen wie der Diff-Quick (*Mischke, 2005*). Die Färbelösungen sind Kombinationspakete, die von verschiedenen Firmen erhältlich sind. Die hier verwendete Kombination von Färbelösungen von MERCK (Darmstadt) besteht aus der Fixierlösung, Eosin-Lösung und Hämalaun-Lösung. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll angefertigt:

1. Objektträger in Fixierlösung tauchen
2. Nach Abtropfen Objektträger für ca. 5 Sekunden in Eosin-Lösung tauchen
3. Danach für ca. 5 Sekunden eintauchen in Hämalaun-Lösung
4. Waschen in Aq. dem.
5. Trocknen des Objektträgers

In der Diff-Quick-Färbung stellen sich die Zellkerne der Granulozyten dunkelblau dar. Die Granula der eosinophilen Granulozyten zeigen sich rot bis orange, die der basophilen Granulozyten dunkellila bis schwarz und die der neutrophilen Granulozyten hellrosa. Die Zellkerne der Monozyten sind violett und ihr Zytoplasma hellblau. Die Thrombozyten färben sich violett bis lila.

3.2.2 Giemsa-Färbung

Die Färbelösung enthält die Farbstoffe Eosin, Methylenblau, Azur A und Azur B, welche in Methanol gelöst sind und denen Glycerin als Stabilisator zugesetzt wurde. Bei der Färbung bilden die basischen Farbstoffe Salze mit Eosin, sodass Azur-A-Eosinat, Azur-B-Eosinat und Methylenblau-Eosinat entstehen. Die Eosinate sind schlussendlich für die typische, rot-violette Anfärbung des Chromatins im Zellkern verantwortlich. Es wurden zwei verschiedene Protokolle angewendet:

	Verfahren I: Giemsa 1:11 (nach Osbaldiston et al.)	Verfahren II: Giemsa 1:20 (nach Mulisch und Welsch)
1.	Fixieren der Ausstriche für 5 Minuten in Methanol (MERCK, Darmstadt) und anschließende Lufttrocknung	
2.	Herstellen der Giemsa-Gebrauchslösung durch Mischen von 20 ml Giemsa-Stammlösung (MERCK, Darmstadt) mit 200 ml Aq. dem.	Herstellen einer Giemsa-Gebrauchslösung durch Mischen von 5 ml Giemsa-Stammlösung (MERCK, Darmstadt) mit 95 ml Aq. dem.
3.	Blutausstriche ca. 30 Minuten in der verdünnten Giemsa-Lösung anfärben	
4.	Spülen mit Aq. dem. und anschließend trocknen lassen.	
5.	Eindecken mit Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH, Steinheim).	

Tabelle 3.2: Methoden der Giemsa-Färbung

In der Giemsa-Färbung 1:11 sind die Zellkerne der Leukozyten rötlich-violett. Neutrophile Granulozyten zeigen sowohl hellrote als auch rötlich-schwarze Granula im blassrosa Zytoplasma. Die eosinophilen Granulozyten hingegen haben leuchtend rote Granula in einem blassrosa Zytoplasma. Basophile Granula färben sich nicht oder nur vereinzelt an. Eine Beurteilung der Erythrozyten, Monozyten und Lymphozyten erfolgte bei Osbaldiston et al. (1978b) nicht (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*).

In der Giemsa-Färbung 1:20 stellen sich die Zellkerne der Leukozyten und der Erythrozytenvorstufen rötlich-violett dar. Das Zytoplasma der Erythrozyten ist rötlich, der Lymphozyten blau und der Monozyten grau-blau. Die Thrombozyten zeigen sich blau-violett. Die neutrophilen Granula sind hellviolett bzw. rötlich, die eosinophilen Granula rot bis rötlich-braun und die basophilen Granula kräftig dunkelviolett (*Mulisch und Welsch, 2010*).

3.2.3 Färbung nach May-Grünwald

Die May-Grünwald-Lösung enthält die Farbstoffe Eosin und Methylenblau, aus denen Methyleneosinat entsteht, da Methylenblau in der Farbstofflösung mit Eosin ein Salz bildet. Zur Herstellung der im Handel erhältlichen Farbstofflösungen wird Methanol verwendet. Zur Färbung wird die Lösung unverdünnt eingesetzt, die zumeist auf den waagrecht liegenden Objektträger aufgetropft wird (*Mulisch und Welsch, 2010*). Das folgende Protokoll wurde angewendet:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche
2. Bedecken der Ausstriche für mit ca. 30 Tropfen unverdünnter May-Grünwald-Lösung (MERCK, Darmstadt) und 3 Min. inkubieren
3. Zusatz der gleichen Menge an Aq. dem. und 10 Minuten inkubieren
4. Kurz waschen in Aq. dem.
5. Abtropfen und Lufttrocknen lassen
6. Eindecken mit Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

In der May-Grünwald-Färbung sind die Zellkerne blau-violett, die eosinophilen Granula der eosinophilen Granulozyten ziegelrot, wohingegen sich basophile Granula kräftig blauviolett darstellen. Die Granula der neutrophilen Granulozyten sind hell-violett. Thrombozyten sind violett, die Erythrozyten rötlich. Das Zytoplasma der Lymphozyten ist blau, das der Monozyten taubenblau (*Mulisch und Welsch, 2010*).

3.2.4 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Die panoptische Färbung nach Pappenheim ist eine Kombination der May-Grünwald- und Giemsa-Färbung.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche
2. Bedecken der Ausstriche mit 30 Tropfen unverdünnter May-Grünwald Eosin-Methylenblau-Lösung (MERCK, Darmstadt) für 3 Min.
3. Hinzufügen der gleichen Menge Aqua dest. und 1 Minute färben
4. Abgießen der Färbelösung

5. Herstellen einer verdünnten Giemsa-Lösung durch Aufgießen von 20 ml Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung (MERCK, Darmstadt) in 200 ml Aq. dem.
6. Für 15-20 Minuten in die verdünnte Giemsa-Lösung einstellen
7. Abspülen mit Aq. dem.
8. Abtropfen und Lufttrocknen lassen
9. Eindecken mit Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

In der panoptischen Färbung nach Pappenheim zeigen die Zellkerne eine rötlich-violette, das Zytoplasma der lymphatischen Zellen und Monozyten eine hellblaue bzw. graublaue Färbung. In Monozyten und Lymphozyten vorhandene Azurkörnchen können sich purpurrot zeigen, in den Zellen der myeloischen Reihe violett. Die Granula der neutrophilen Granulozyten stellen sich hellviolett, die der eosinophilen Granulozyten ziegelrot bis orange und die der basophilen Granulozyten dunkelviolett dar (*Mulisch und Welsch, 2010*). Erythrozyten sind rosafarben. Polychrome Erythroblasten zeigen sich überwiegend bläulich. Die basophile Tüpfelung der Erythrozyten ist stark kobaltblau und die Howell-Jolly-Körperchen sind rotviolett (*Romeis, 1989*).

3.2.5 H.E.-Färbung

Die H.E.-Färbung ist eine Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin. Folgendes Protokoll wurde angewendet:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche
2. Fixation für 5 Min. in Methanol, danach Lufttrocknung
3. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer für 20 Min.
4. Abspülen mit Aqua dest.
5. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 20 Min.
6. Gegenfärben mit Eosin für 10 Min.
7. Abspülen mit Aq. dem.
8. Lufttrocknen und Eindecken mit Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Bei dieser Färbung stellen sich basophile Strukturen blau-violett und eosinophile Strukturen rötlich-orange dar (*Mulisch und Welsch, 2010*). Beim Kaninchen kann die Färbung zur gezielten

Differenzierung der eosinophilen Granulozyten herangezogen werden, da es bei neutrophilen und basophilen Granulozyten zu einer Degranulation kommt (*Shanklin et al., 1977*).

3.2.6 Färbung der eosinophilen Granulozyten mit Sirius Red

Die Färbung mit Sirius Red dient der gezielten Darstellung eosinophiler Granulozyten im Blut und Gewebe (*Wehrend et al., 2004*).

Reagenzien:

- 1) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- 2) Saures Hämalaun nach Mayer
- 3) Sirius Red – Färbelösung
- 4) Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutaussstriche	
2. Fixation in Methanol	10 Min.
3. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer	10 Min.
4. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“)	15 Min.
5. Einstellen in Sirius Red - Färbelösung	60 Min.
6. Kurze Spülung mit Aqua dest.	
7. Lufttrocknen	
8. Eindecken mit Eukitt®	

Die eosinophilen Granula zeigen eine leuchtend rote Anfärbung (*Wehrend et al., 2004*).

3.2.7 Toluidinblaufärbung der basophilen Granulozyten nach Undritz

Durch diese Färbung können Blut- und Gewebsbasophile aufgrund der charakteristischen, metachromatischen Granulation dargestellt werden. Sie entsteht durch die im Heparin veresterte anorganische Schwefelsäure (*Freund, 2008*).

Reagenzien:

- a) Toluidinblau-Färbelösung
- b) Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche
2. Blutausstriche mit der Färbelösung bedecken und 5 Minuten inkubieren
3. Abgießen der Färbelösung und spülen mit Aq. dem.
4. Lufttrocknen der Blutausstriche
5. Eindecken mit Eukitt®

Die Granula der basophilen Granulozyten zeigen aufgrund der Metachromasie eine leuchtend rotviolette Färbung. Andere Zellen sind graublau. Die Granulation bei neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten kann aufgrund toxischer Ereignisse eine Metachromasie aufweisen, die von der der basophilen Granulozyten unterschieden werden kann (*Stobbe, 1970*).

3.2.8 Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

Bei der PAS-Reaktion werden unsubstituierte 1,2-Glykole durch die Perjodsäure zu Aldehyden oxidiert, die mit dem Schiff-Reagenz interagieren und Fuchsin freisetzen, sodass eine leuchtend rote bis magentafarbene Verbindung entsteht (*Mulisch und Welsch, 2010*). Somit dient die PAS-Reaktion zum Nachweis von Polysacchariden (Glykogen, Stärke, Zellulose), neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen, Glykolipiden, ungesättigten Fetten und Phospholipiden. Eine weitere Differenzierung der verschiedenen Gruppen kann nur anhand von Blockierungsreaktionen erfolgen (*Romeis, 1989*).

Reagenzien:

- a) Formaldehyd 37 % (MERCK, Darmstadt)
- b) Saures Hämalaun nach Mayer
- c) 1 ml SO₂-Wasser
- d) 200 ml 0,5 %ige wässrige Perjodsäurelösung
- e) Schiffs-Reagenz (MERCK, Darmstadt)
- f) Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutausrich
2. Fixation in Formoldampf 5 Min.
3. Spülen mit Leitungswasser
4. Einstellen in Perjodsäurelösung unter Lichtabschluss 10 Min.
5. Spülen mit Leitungswasser
6. Einstellen in Schiffs-Reagenz unter Lichtabschluss 30 Min.
7. Spülen in SO₂-Wasser 4 Min.
8. Spülen mit Leitungswasser
9. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer 5 Min.
10. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) 5 Min.
11. Lufttrocknen
12. Eindecken mit Eukitt®

PAS-positive Substanzen in der Zelle stellen sich leuchtend rot, magenta, pink oder hellviolett dar (*Mulisch und Welsch, 2010*), wohingegen die Zellkerne durch die Kernfärbung mit saurem Hämalaun blau sind (*Hennemann et al., 1991*).

3.2.9 Alcianblaufärbung zum Nachweis saurer und sulfatierter Mukosubstanzen

Alcianblau 8 GX ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff. Alle sauren Muzine und andere Makromoleküle sind negativ geladen, sodass sie den kationischen Farbstoff Alcianblau 8GX binden. Bei einem pH-Wert von 2,5 kommt es zum Nachweis saurer Mukosubstanzen wie saurer Muzine und Glykosaminoglykane. Durch einen pH-Wert von 1 wird die Dissoziation der Carboxylgruppen unterdrückt, sodass nur noch Sulfatgruppen negativ sind und es zur Anfärbung stark sulfatierter Mukosubstanzen und Glykosaminoglykane kommt. Dabei färben sich die sauren und sulfatierten Mukosubstanzen türkis-blau an, wohingegen die Zellkerne durch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot hellrot erscheinen (*Mulisch und Welsch, 2010*).

Reagenzien für Alcianblaufärbung pH 2,5 und pH 1:

- 1) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- 2) Alcianblau-Färbelösung pH 2,5 / Alcianblau-Färbelösung pH 1
- 3) Kernechtrotlösung
- 4) Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche	
2. Fixation in Methanol	10 Min.
3. Einstellen in Alcianblau-Färbelösung pH 2,5 oder pH 1	5 Min.
4. Spülen in fließendem Leitungswasser	3 Min.
5. Kurze Spülung mit Aqua dest.	
6. Einstellen in Kernechtrot-Lösung	10 Min.
7. Spülen in fließendem Leitungswasser	3 Min.
8. Kurze Spülung mit Aqua dest.	
9. Lufttrocknen	
10. Eindecken mit Eukitt®	

3.3 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie dient der Darstellung der Feinstruktur von Zellen. Hierfür verwendete ich Blutproben von insgesamt 10 Kaninchen. Diese wurden zunächst 15 Min. lang in den EDTA-Probenröhrchen bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Anschließend wurde das geronnene und zentrifugierte Blut in Pellets von 1 µm geschnitten. Nach dem Abpipettieren des überstehenden Plasmas wurde, um die Feinstruktur der Blutzellen zu erhalten, eine chemische Fixation mit Karnovsky-Gebrauchslösung vorgenommen. Ein dem Plasmaüberstand entsprechendes Volumen der Karnovsky-Gebrauchslösung wurde dafür auf den Zytoplasmasaum aufgetragen. Dies wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte eine Spülung mit mehrfach gewechseltem 0,1-molarem Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) dreimal für je 60 Min. bei 4°C. Dies dient zum einen der Entfernung von Blutresten, zum anderen dazu, eine Interaktion zwischen den Resten der Fixanzien mit den Lösungsmitteln zu verhindern.

Im Anschluss erfolgte eine Vorkontrastierung mit 1 %igem Osmiumtetroxid und 1,5 %igem Kaliumferrocyanid in 0,1-molarem Natriumcacodylatpuffer. Die Proben wurden daraufhin 2 Stunden bei 4°C im Kühlschrank osmiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Proben abermals bei 4°C dreimal für je 20 Minuten in 0,1-molarem Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurde eine Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt. Für je 30 Min. wurden die Proben mit 30 %- und 50 %igem Alkohol, für 20 Min. mit 70 %- und 90 %igem Alkohol und einmal für 30 Min. in Ethanol absolut (MERCK, Darmstadt) gespült. Danach wurden die Proben zweimal für 15 Min. in Propylenoxid gegeben, das zu einer Reduktion von Polymerisationsartefakten führt. Wichtig hierbei ist, dass die Inkubationszeiten für die Entwässerung und die Propylenoxideinwirkung strikt eingehalten werden, um eine Extraktion von Zellbestandteilen zu verhindern und eine gute Polymerisation zu erhalten. Im Anschluss wurden die Proben für eine Stunde in einem Propylenoxid-Polyembed-Gemisch in einem Verhältnis von 1:2 inkubiert. Über Nacht wurden die Proben dann in einem Propylenoxid-Polyembed-Gemisch von 1:1 bei 4°C polymerisiert. Am nächsten Morgen wurde erneut Polyembed für eine Stunde zugegeben und die Proben in Silikonformen gegossen, die man max. 36 Stunden bei 60°C polymerisieren lässt. Danach wurden die Proben für die Semidünnschnitte abhängig von der Zellmenge der Probe ausgewählt, mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, REICHERT-JUNG, Wien) von 1 µm dick geschnitten und nach Richardson (1983) angefärbt (*Richardson et al., 1983*). Die Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 40-60 nm wurden von weiteren Proben angefertigt. Sie wurden auf Grids hexagonal Copper 150 Mesh (POLYSCIENCES, Warrington) aufgezogen und mit gesättigtem Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds (1963) nachkontrastiert (*Reynolds, 1963*).

Dabei dient das Uranylacetat, von dem 80-100 μl auf den Grid für 20 Min. aufgetragen wurden, der Kontrastierung von Membranen, vor allem dem Kernchromatin. Das Bleicitrat nach Reynolds (1963) hingegen dient zur Kontrastierung von Ribosomen und Zytoplasmasubstanzen (*Reynolds, 1963*). Es wurden 80-100 μl auf den Grid getropft und dieser für 5 Min. nachkontrastiert.

3.4 Enzymhistochemie

Insgesamt wurden sieben verschiedene Enzymfärbungen durchgeführt. Das Ausgangsmaterial waren frische, native Blutausstriche. Dabei wurde keine Antikoagulanzen verwendet, da das Blut direkt auf einen Objektträger getropft und auf weitere Objektträger übertragen wurde. Die luftgetrockneten Blutausstriche waren maximal 2 Tage alt.

3.4.1 Nachweis der Peroxidase

Der Nachweis der Peroxidase erfolgte bei insgesamt 12 Tieren. Die Peroxidase ist eine lysosomale Katalase, die Wasserstoff von einem Donor, in diesem Fall dem 4-Chlor-1-naphthol, auf ein Peroxid überträgt. Im Zuge dessen kommt es zur Oxidation von 4-Chlor-1-naphthol, das in einen unlöslichen, schwarzbraunen Farbstoff umgewandelt wird.

Reagenzien:

- a) LEUCOGNOST®-Fixiergemisch (MERCK, Darmstadt)
- b) LEUCOGNOST® POX Reagenziensatz (MERCK, Darmstadt):
 - Reagenz 1: 4-Chlor-1-naphthol
 - Reagenz 2: Tris(hydroxymethyl-aminomethan)-HCl-Puffer
 - Reagenz 3: Wasserstoffperoxid-Lösung
- c) Saures Hämalaun nach Mayer
- d) Aquatex® (MERCK, Darmstadt)

Herstellung der Färbelösung:

Die Färbelösung wurde anhand des von MERCK, Darmstadt vorgegebenen Protokolls hergestellt.

Die Färbelösung ist farblos und maximal 3 Stunden stabil.

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche	Mind. 30 Min.
2. Fixierung mit LEUCOGNOST®-Fixiergemisch	1 Min.
3. Spülen mit fließendem Leitungswasser	10 Sek.
4. Einstellen in frisch bereitete Färbelösung	10 Min.
5. Abspülen mit Aqua dest.	10 Sek.

6. Lufttrocknen	
7. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer	2 Min.
8. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“)	3-5 Min.
9. Lufttrocknen	
10. Eindecken mit Aquatex®	

Alle Zellen der neutrophilen und insbesondere der eosinophilen Reifungsreihe ab den Promyelozyten besitzen schwarz-braun gefärbte Granula. Monozyten zeigen eine schwächere positive Reaktion als die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Basophile Granulozyten sowie alle Zellen der lymphatischen und erythropoetischen Reihe sind Peroxidase-negativ.

3.4.2 Nachweis der alkalischen Phosphatase

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte bei insgesamt 12 Tieren. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern unter alkalischen Bedingungen. Dabei wird 1-Naphthol, das aus 1-Naphthylphosphat freigesetzt wird, mit einem Diazoniumsalz gekoppelt, das an Stellen der Enzymreaktivität präzipitiert.

Reagenzien:

- a) LEUCOGNOST® Fixiergemisch (MERCK, Darmstadt)
- b) LEUCOGNOST® ALPA Reagenziensatz (MERCK, Darmstadt):
 - Reagenz 1: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
 - Reagenz 2: 1-Naphthylphosphat-Natriumsalz
 - Reagenz 3: Variamin-Blausalz B
- c) Saures Hämalaun nach Mayer
- d) Aquatex® (MERCK, Darmstadt)

Herstellung der Färbelösung:

Die Färbelösung wurde anhand des von MERCK, Darmstadt vorgegebenen Protokolls hergestellt.

Die Färbelösung ist maximal 1,5 Stunden stabil.

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutausrich	Mind. 30 Min.
2. Fixieren mit LEUCOGNOST®-Fixiergemisch	1-3 Min.
3. Abspülen mit Aqua dest.	1 Min.

4. Lufttrocknen	
5. Einstellen in frisch bereitete Färbelösung	10-15 Min.
6. Abspülen mit Aqua dest.	10 Sek.
7. Lufttrocknen	
8. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer	5 Min.
9. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“)	3 Min.
10. Lufttrocknen	
11. Eindecken mit Aquatex®	

An Stellen der Enzymaktivität zeigt sich ein braunes Reaktionsprodukt.

3.4.3 Nachweis der sauren Phosphatase

Der Nachweis der sauren Phosphatase erfolgte bei insgesamt 12 Tieren. Die saure Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern unter sauren Bedingungen. In diesem Fall wird aus Naphthol AS-OL Phosphorsäure Naphthol-AS Bi freigesetzt und mit einem Diazoniumsalz, dem Pararosanilin, zu einem rot-braunen Azofarbstoff umgesetzt, der in der Zelle präzipitiert.

Reagenzien:

- a) LEUCOGNOST® Fixiergemisch (MERCK, Darmstadt)
- b) LEUCOGNOST® SP Reagenziensatz (MERCK, Darmstadt):
 Reagenz 1: Naphthol AS-OL Phosphorsäure
 Reagenz 2: Natriumacetat
 Reagenz 3: Pararosanilin-HCl-Lösung (2N)
 Reagenz 4: Nitritlösung
- c) Saures Hämalaun nach Mayer
- d) Aquatex® (MERCK, Darmstadt)

Herstellung der Färbelösung:

Die Färbelösung wurde anhand des von MERCK, Darmstadt vorgegebenen Protokolls hergestellt.

Die Färbelösung ist maximal 3,5 Stunden stabil. Die Färbung sollte somit spätestens 15 Minuten nach Herstellung erfolgen.

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche	Mind. 30 Min.
2. Fixieren mit LEUCOGNOST®-Fixiergemisch	1-3 Min.
3. Abspülen mit Aqua dest.	1 Min.
4. Einstellen in frisch bereitete Färbelösung Inkubation im Dunkeln	2-3 Std.
5. Abspülen mit Aqua dest.	10 Sek.
6. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer	15 Min.
7. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“)	2 Min.
8. Lufttrocknen	
9. Eindecken mit Aquatex®	

Das Reaktionsprodukt zeigt sich als rotbrauner Niederschlag in der Zelle. Die Zellkerne färben sich blau an.

3.4.4 Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase nach Löffler (1961)

Der Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase erfolgte bei insgesamt 12 Tieren.

Reagenzien:

- a) Formaldehyd 37 % (ROTH, Karlsruhe)
- b) 8 mg Naphthol-AS-Acetat (0,1 mg/ml Inkubationslösung) (APPLICHEM, Darmstadt)
- c) 1 ml Aceton (MERCK, Darmstadt)
- d) 80 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7)
- e) 160 mg Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride salt) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- f) Saures Hämalaun nach Mayer
- g) Aquatex® (MERCK, Darmstadt)

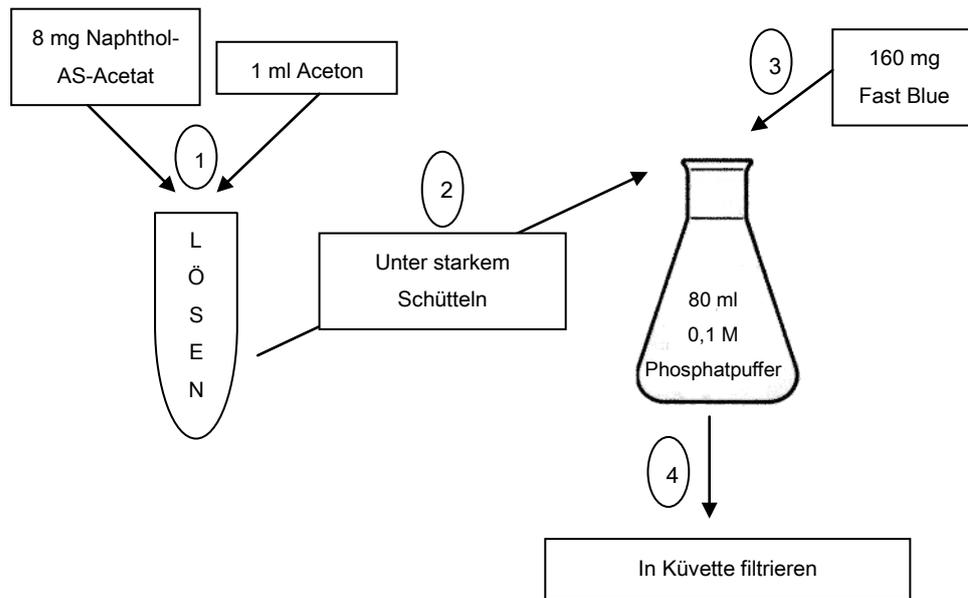
Herstellung der Inkubationslösung:

Abbildung 3.1: Herstellung der Färbelösung zum Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase

Durchführung der Färbung:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche	1-3 Std.
2. Fixation in Formoldampf	5 Min.
3. Einstellen in frisch bereitete Färbelösung	70 Min.
4. Abspülen mit Aqua dest.	
5. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer	8 Min.
6. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“)	15 Min.
7. Lufttrocknen	
8. Eindecken mit Aquatex®	

Am Ort der Enzymaktivität bildet sich bei Verwendung von Fast Blue BB ein blauer, feingranulärer Niederschlag. Die Zellkerne sind auch blau gefärbt (*Stobbe, 1970*).

3.4.5 Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase nach Löffler (1961)

Der Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase erfolgte bei 12 Tieren bei einem pH-Wert von 8.

Reagenzien:

- a) Formaldehyd 37 % (ROTH, Karlsruhe)
- b) 10 mg 2-Naphthyl-Acetat (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- c) 0,2 ml absolut reines Aceton (MERCK, Darmstadt)
- d) 40 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8)
- e) 50 mg Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride salt) (2 mg/ml) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- f) Saures Hämalaun nach Mayer
- g) Aquatex® (MERCK, Darmstadt)

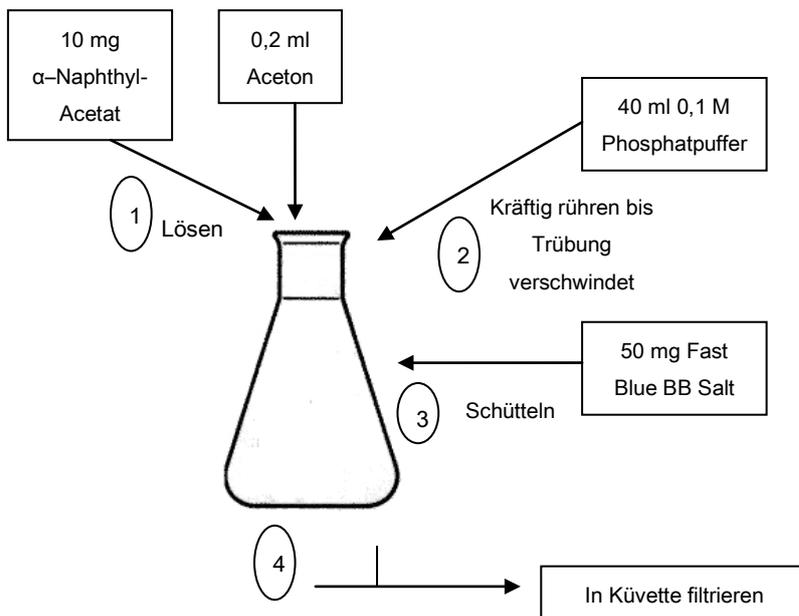
Herstellung der Inkubationslösung:

Abbildung 3.2: Herstellung der Färbelösung zum Nachweis der α-Naphthyl-Acetat-Esterase

Durchführung der Färbung (Stobbe, 1970):

1. Lufttrocknen der Blutausrich	1-3 Std.
2. Fixation in Formoldampf	4 Min.
3. Einstellen in frisch bereitete Färbelösung	30 Min.
4. Gründlich abspülen mit fließendem Leitungswasser	
5. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer	8 Min.
6. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“)	15 Min.
7. Lufttrocknen	
8. Eindecken mit Aquatex®	

3.4.6 Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase modifiziert nach

Moloney et al. (1960)

Der Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase erfolgte nach folgendem Schema:

Anzahl der Tiere	pH-Wert	Puffer	Kernfärbung
6	6,5	PBS	Saures Hämalaun nach Mayer
12	7,4	Michaelis-Barbital-Natrium-Puffer	Saures Hämalaun nach Mayer
4	5,5	PBS	Kernechtrot
4	6,5	PBS	Kernechtrot
4	7,4	PBS	Kernechtrot

Tabelle 3.3: Übersicht über die Methoden zum Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

Reagenzien:

- a) 10%iges Methanol-Formol:
- b) 40 mg Naphthol AS-D Chloracetat (APPLICHEM, Darmstadt)
- c) 4 ml Aceton (MERCK, Darmstadt)
- d) 50 ml Michaelis-Barbital-Natrium-Puffer (pH 7,4)
- e) Oder 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 5,5; pH 6,5; pH 7,4) für Variante
- f) 50 ml Aqua Milli Q
- g) 100 mg Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride salt) (1 mg/ml) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- h) Saures Hämalaun nach Mayer oder Kernechtrotlösung
- i) Aquatex® (MERCK, Darmstadt)

Herstellung der Färbelösung:

Zunächst werden 40 mg Naphthol AS-D Chloracetat in 4 ml Aceton gelöst und tropfenweise der Pufferlösung (Michaelis-Barbital-Natrium-Puffer oder PBS-Puffer) hinzugefügt. Daraufhin werden 100 mg Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride salt) in der Pufferlösung gelöst, die anschließend in eine kleine Küvette filtriert wird.

Durchführung der Färbung:

- | | |
|---------------------------------------------------|----------|
| 1. Lufttrocknen der Blutausrich | 1-3 Std. |
| 2. Fixation in kaltem (4°C) Methanol-Formol (10%) | 30 Sek. |
| 3. Einstellen in frisch bereitete Färbelösung | 30 Min. |
| 4. Abspülen mit Aqua dest. | |
| 5. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer | 8 Min. |
| 6. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) | 15 Min. |

ODER:

- | | |
|----------------------------------------|---------|
| 5. Kernfärbung mit Kernechtrot | 10 Min. |
| 6. Spülen in fließendem Leitungswasser | 3 Min. |
| 7. Lufttrocknen | |
| 8. Eindecken mit Aquatex® | |

An Stellen der Reaktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase zeigt sich eine blaue Reaktion. Die Zellkerne färben sich je nach Kernfärbung blau oder rot an.

3.4.7 Nachweis der β -Glucuronidase modifiziert nach Lojda et al. (1979)

Der Nachweis der β -Glucuronidase erfolgte bei insgesamt 12 Tieren.

Reagenzien:

- a) 4 mg Naphthol AS-BI β -D-Glucuronid (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- b) 0,25 ml N,N-Dimethylformamid (MERCK, Darmstadt)
- c) 19 ml 0,2 M Natriumacetatlösung
- d) 1 ml Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung
- e) Saures Hämalaun nach Mayer
- f) Aquatex® (MERCK, Darmstadt)

Herstellung der Färbelösung:

Es werden 19 ml der 0,2 M Natriumacetatlösung und 1 ml der Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung gemischt und auf einen pH-Wert von 5 eingestellt. Anschließend wird das in N,N-Dimethylformamid gelöste Naphthol AS-BI β -D-Glucuronid der Inkubationslösung beigegefügt, gemischt und in einen kleinen Erlenmeyerkolben filtriert.

Durchführung der Färbung:

Lufttrocknen der Blutausrüche	Mind. 30 Min.
Betropfen der Blutausrüche mit der Färbelösung	
Inkubation in der Feuchtkammer bei 37°C	3 Std.
Abspülen mit Aqua dest.	
Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer	8 Min.
Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“)	15 Min.
Lufttrocknen	
Eindecken mit Aquatex®	

Stellen der Enzymaktivität färben sich rot an. Die Zellkerne zeigen eine Blaufärbung (*Lojda et al., 1979*).

3.5 Glykohistochemie

3.5.1 FITC markierte Lektine

Es wurden insgesamt 14 an FITC gekoppelte pflanzliche Lektine (VECTOR, Burlingame) verwendet, wobei jeweils 14 mit Methanol fixierte und je 3 nicht mit Methanol fixierte Blutausrichungen vom Kaninchen auf die Bindungsfähigkeit des Lektins untersucht wurden. Die entsprechenden Lektine werden in der folgenden Tabelle mit ihrer Zuckerspezifität aufgelistet.

	Name	Abk.	Herkunft	Spezifität für Monosaccharide	Potente Oligosaccharide
1	Concanavalin Agglutinin	Con A	<i>Canavalis ensiformis</i> (Schwertbohne)	Man, Glc	GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 2Man α 3)Man β 4GlcNAc
2	Lens culinaris Agglutinin	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)	Man, Glc	N-Glykan-Bindung durch Core-Fucosylierung verstärkt
3	Pisum sativum Agglutinin	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	Man, Glc	Bindung an N-Glykane durch Core-Fucosylierung verstärkt
4	Peanut Agglutinin	PNA	<i>Arachis hypogea</i> (Erdnuss)	Gal	Gal β 3GalNAc α / β
5	Ricinus communis Agglutinin	RCA	<i>Ricinus communis</i> (Kastorbohne)	Gal	Gal β 4GlcNAc β 1R
6	Wheat germ Agglutinin	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	GlcNAc/Neu5Ac	(GlcNAc β 4) _n , (Man β 4)GlcNAc β 4GlcNAc(1,N-Asn); Geclusterte sialysierte Tn/Tn-Antigene in Muzinen; O-GlcNAcylierung von Proteinen
7	Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	(GlcNAc) ₂ , NeuNAc	a
8	Griffonia simplicifolia Agglutinin	GSL-1	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikan. Schwarzbohne)	GalNAc	GalNAc α 3Gal; GalNAc α 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc
9	Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikan. Pferdebohne)	GalNAc	GalNAc α 3GalNAc α 3Gal β 4Gal β 4Glc > A-Tetrasaccharide
10	Sophora japonica Agglutinin	SJA	<i>Sophora japonica</i> (Chin. Schnurbaum)	GalNAc	GalNAc β 6Gal; Gal β GalNAc
11	Soybean Agglutinin	SBA	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	Gal; GalNAc	GalNAc α 3Gal(β 6Glc), Sialidase-vorbehandelte submaxillare Muzine
12	Ulex europaeus Agglutinin	UEA-1	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	Fuc	Fuca2Gal β 4GlcNAc β 6R
13	Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	b	Mit β 1 \rightarrow 4 Bindung an zentrale Mannose von komplexen N-Glykanen verknüpfte GlcNAc; Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 2-Man α 3)(GlcNAc β 4)Man β 4GlcNAc
14	Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuco	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	b	„Tetraantennary“ und „triantennary“ N-Glykane mit β 6-Verzweigung

Tabelle 3.4: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten direkt FITC-markierten Pflanzenlektine (modifiziert nach Rüdiger, Gabius und Habermann (Rüdiger und Gabius, 2009b; Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011))

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

^aSuccinylierung von WGA (WGAs) reduziert die Sensitivität der Bindung an Neuraminidase in Zellen (*Monsigny et al., 1980*).

^bKeine Spezifität für Monosaccharide bekannt.

Die vierzehn Blutausrich wurden zunächst in Methanol (MERCK, Darmstadt) 10 Minuten fixiert. Je drei zusätzliche Blutausrich wurden nicht mit Methanol fixiert, bevor sie dreimal für je 5 Minuten in PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen wurden. Pro Blutausrich wurden 100 µl des in PBS-Puffer gelösten und an FITC-gekoppelten Lektins in einer Konzentration von 10 µg/ml aufpipettiert. Im Anschluss wurden die Blutausrich zum Schutz vor Austrocknung in einer Feuchtkammer 1 Stunde lang inkubiert. Diese wurde aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine erneute dreimalige Spülung für je 8 Minuten in PBS-Puffer. Um die Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop identifizieren zu können, wurden die Blutausrich mit dem VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) eingedeckt. Da die Lösung nicht härtet, wurde das Deckglas mit handelsüblichem Nagellack verschlossen. Bei der Durchführung des Nachweises wurden die Blutausrich ab der Inkubation in der Feuchtkammer vor Lichteinwirkung geschützt. Sie wurden außerdem bei 7°C im Kühlschrank im Dunkeln bis zur Auswertung aufbewahrt.

Als Negativkontrolle wurden Blutausrich verwendet, bei denen lediglich die Kernfärbung, aber keine Lektine aufgetragen wurden, um die Eigenfluoreszenz der Blutzellen beurteilen zu können. Als Positivkontrolle wurden Blutausrich vom Rind verwendet.

3.5.2 Inhibition mit Hemmzuckern

Bei den deutlich positiv reagierenden Lektinen wurde die Hemmung der Lektinbindung mit dem für sie spezifischen Kohlenhydrat durchgeführt. Dafür wurde das Lektin vor dem Auftragen auf den Blutausschrieb zunächst je nach Hemmzucker 30-60 Minuten mit diesem inkubiert. Die Konzentration des in PBS-Puffer gelösten Hemmzuckers ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Lektin	Hemmstoff	Konzentration	Inkubationszeit
WGA	Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)	1:4	30 Minuten
WGAs	Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)	1:4	30 Minuten
ConA	Methyl- α -Mannopyranosid (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Stunde
LCA	Methyl- α -Mannopyranosid (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Stunde
PSA	Methyl- α -Mannopyranosid (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Stunde

Tabelle 3.5: In der Arbeit verwendete Hemmzucker

Das Lektin-Hemmzucker-Gemisch wurde auf je 2 Blutausschriebe aufgetragen. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Blutausschrieb, auf den das Lektin ohne den Hemmzucker aufpipettiert wurde. Die Positivkontrolle stellte je ein Blutausschrieb vom Rind dar. Die Vorgehensweise entsprach der Färbung der FITC-markierten Lektine in Kapitel 3.5.1.

3.5.3 Vorbehandlung mit Neuraminidase

Bei den Lektinen GSL-1, PNA, RCA₁₂₀, DBA, SJA und SBA wurde der Einfluss einer vorangehenden Neuraminidase-Behandlung untersucht. Durch die Vorbehandlung der Blutausschriebe mit Neuraminidase soll evaluiert werden, ob Lektine, die vorher nur eine schwache Bindung zeigten oder negativ waren, in der Lage sind, nun eine Bindung einzugehen. Pro Lektin wurden drei native Blutausschriebe von den Kaninchen verwendet.

Das Enzym Neuraminidase spaltet allgemein Sialinsäure von Glykoproteinen ab. Sialinsäuren sind eine Familie von N- bzw. O-substituierten Derivaten der Neuraminsäure. Die Spezifität ihrer Reaktion ist abhängig von ihrem biologischen Ursprung. In dieser Arbeit wurde eine Neuraminidase von *Vibrio cholerae* (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) verwendet. Sie spaltet bevorzugt α -(2 \rightarrow 3)-Verbindungen der Sialinsäure, aber auch α -(2 \rightarrow 6)- und α -(2 \rightarrow 8)-Verbindungen. Voraussetzungen für die Aktivität des Enzyms sind der Zusatz von Ca²⁺, ein pH-Wert von 5,0 und eine Temperatur von 37°C. Zudem kommt es durch EDTA zu einer Hemmung der Enzymaktivität. Die folgende Methode wurde unter Zuhilfenahme von menschlichen Blutproben zunächst etabliert und daraufhin auch beim Kaninchen angewendet.

Reagenzien:

- a) Gebrauchslösung für Neuraminidase-Vorbehandlung
- b) Natrium-Acetatpuffer pH 5,5
- c) Phosphate-buffered-saline pH 7,4
- d) Lektinlösungen
- e) VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Färbeprotokoll:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche	
2. Fixieren der nativen Blutausstriche in Methanol	10 Min.
3. Waschen der Blutausstriche in Natriumacetat-Puffer (pH 5,5)	3 x 5 Min.
4. Bedecken der Blutausstriche mit 200 µl Neuraminidase-Gebrauchslösung	Inkubation in Feuchtkammer bei 37°C für 1 Std. unter Lichtausschluss
5. Spülen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Min.
6. Bedecken der Blutausstriche mit 100 µl Lektin (10 µg/ml)	Inkubation 1 Std. bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss in feuchter Kammer
7. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3 x 5 Min.
8. Auftragen von DAPI zur Kernfärbung	
9. Einschließen mit handelsüblichem Nagellack	

3.5.4 Biotinylierte Lektine

Zum Nachweis der biotinylierten Lektine MAA-I, VAA und SNA (VECTOR, Burlingame) wurden je zehn Methanol-fixierte und je vier nicht-Methanol-fixierte Blutaussstriche von Kaninchen untersucht.

	Name	Abk.	Herkunft	Spezifität für Monosaccharide	Potente Oligosaccharide/ Glykoproteinliganden
1	Maackia amurensis Agglutinin I (Leukoagglutinin)	MAA I	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)	a	Neu5Ac/Gcα3Galβ4GlcNAc/Glc ^b 3'-Sulfatierung wird toleriert Core-reaktiv bei 3-sulfatiertem LacNAc
2	Sambucus nigra Agglutinin	SNA	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	Gal, GalNAc	Neu5Acα6Gal/GalNAc ^c , clustered T _n -Antigen, 9'-O-Acetylierung wird toleriert
3	Viscum album Agglutinin	VAA	<i>Viscum album</i> (Mistel)	Gal	Galβ2(3); Galα3(4)Gal; Fucα2Gal; Galβ3(4)GlcNAc ohne/mit α2,6-Sialisierung

Tabelle 3.6: In der Arbeit verwendete biotinylierte Lektine. Modifiziert nach Gabius und Habermann (*Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011*)

Gal = Galaktose, GalNAc = N-Acetylgalaktosamin; Neu = Neuraminsäure; LacNAc = N-Acetylactosamin.

^aKeine Spezifität für Monosaccharide bekannt.

^bBindungsspezifität für Typ II LacNAc Core.

^cBindung von Typ I LacNAc Core bevorzugt; 6-Sulfatierung von GlcNAc in α2,6-sialysierten LacNAc steigert die Affinität.

Zunächst wurden die Lektine in der entsprechenden Verdünnung für MAA-1 und SNA 10 µg/ml und für VAA 2 µg/ml angesetzt. Für den Nachweis wurden die Blutaussstriche 10 Minuten in Methanol (MERCK, Darmstadt) fixiert und vier Blutaussstriche nicht fixiert. Anschließend wurden sie dreimal 5 Minuten in PBS (pH-Wert 7,4) gewaschen. Danach wurden die Ausstriche mit Dako Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg), das zur Reduktion der Hintergrundfärbung dient, bedeckt und für 10 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Abgießen des Dako Protein Block Serum Free wurden 100 µl des verdünnten, biotinylierten Lektins auf die Blutaussstriche aufgetragen und für 60 Minuten unter Lichtabschluss in einer Feuchtkammer inkubiert. Daraufhin erfolgte abermals eine dreimalige Waschung für je 5 Minuten in PBS. Dann wurde 3 µl aufgetautes Streptavidin/FITC (DAKO, Hamburg) mit 1497 µl PBS verdünnt und 200 µl der Lösung auf jeden Ausstrich aufgetragen. Eine erneute Inkubation für 30 Minuten in einer abgedunkelten Feuchtkammer folgte. Abschließend wurden die Ausstriche erneut dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Um die Zellkerne darstellen zu können, wurde die Blutaussstriche mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) eingedeckt. Da die Lösung nicht härtet, wurde das Deckglas mit handelsüblichem Nagellack verschlossen. Als Positivkontrolle dienten erneut Blutaussstriche vom Rind.

3.5.5 Galektine

In dieser Arbeit wurden erstmals rekombinante humane Galektine auf ihre Bindungseigenschaften an Blutzellen des Kaninchens getestet. Hierfür wurden je zehn mit Methanol fixierte und je zehn lediglich luftgetrocknete Blutausschläge von Kaninchen zum Nachweis der Bindung rekombinant hergestellter Galektine humanen Ursprungs (Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät, Institut für Physiologische Chemie, LMU München) verwendet (siehe Tabelle 3.7.). Entsprechende Untersuchungen wurden bereits für die Galektine initiiert. Die Adhäsion und Wachstum regulierenden Galektine binden allgemein an Galaktose und haben eine β -Sandwich-Struktur (*Smetana et al., 2006*) (*Szabo et al., 2009*). Alle Galektine besitzen konservierte Sequenzelemente, die eine Affinität zu dem Disaccharid N-Acetylglucosamin haben (*Dam et al., 2005*). Weitere Untersuchungen zeigen, dass Galektine in der Lage sind feinstrukturelle Eigenschaften von Oligosacchariden als auch ihre Modifikationen wie Dichte, Status der Sialysierung und ihr Faltungsschema in Glykokonjugaten zu erkennen (*Krzeminski et al., 2011*). Hierbei stellt sich die Frage, inwiefern die intrafamiliäre Divergenz bei den Galektinen die unterschiedliche Bindung an zytologische und histologische Proben beeinflusst (*Habermann et al., 2011*).

	Galektin	Abk.	Zuckerspezifität	
1	Galektin 1	Gal-1	LacNAc und seine α 2,3-sialysierten Derivate	α 2,3-sialysiertes LacNAc und LacNAc Wiederholungen in N-Glykanen
2	Galektin 3 full length	Gal-3 fl		α 2,3-sialysiertes LacNAc und LacNAc Wiederholungen in N-Glykanen
3	Galektin 3 truncated	Gal-3 tr ^a		α 2,3-sialysiertes LacNAc und LacNAc Wiederholungen in N-Glykanen
4	Galektin 8	Gal-8		α 2,3-sialysierte Glykane
5	Galektin 9	Gal-9		Monosialysierte „diantennary“ N-Glykane

Tabelle 3.7: In der Arbeit verwendete Galektine modifiziert nach Habermann (*Habermann et al., 2011*)

LacNAc = N-Acetylglucosamin.

^aGalektin 3 truncated: proteolytisch gespaltenes Galektin 3 full length.

Das Färbeprotokoll entspricht dem der biotinylierten Lektine, da auch die Galektine biotinyliert vorliegen. Diese Lektine wurden in einer Verdünnung von 10 μ g/ml aufgetragen.

3.6 Immunhistochemie und Histochemie

3.6.1 Immunhistochemische Untersuchung der Blutzellen

Für die immunhistochemische Differenzierung der CD8⁺-, CD4⁺- und B-Lymphozyten wurden Blutausstriche von je zehn Tieren, für die Differenzierung von basophilen Granulozyten von je fünf Tieren verwendet und auf die Bindung der entsprechenden Primärantikörper untersucht. Diese wurden durch den entsprechenden FITC-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Zum Nachweis der Bindung von MRB61A wurden insgesamt drei verschiedene Konzentrationen der Antikörperlösung verwendet. Bei fünf Blutausstrichen wurde eine Konzentration von 1:68, bei zwei Blutausstrichen eine Konzentration von 1:40 und bei zwei weiteren Blutausstrichen eine Konzentration von 1:20 getestet. Die Bindung der anderen Antikörper wurde stets mit der von VMRD, Pullman angegebenen Konzentration von 1:68 überprüft.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Antikörper und Sekundärantikörper zusammengestellt:

Zielzellen der Primärantikörper	Primärantikörper	Konz.	Tierart	Sekundärantikörper	Tierart	Konz.
CD8 ⁺ -Lymphozyten	ISC29E (VMRD, Pullman)	1:68	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC (DAKO, Hamburg)	Kaninchen	1:20
CD4 ⁺ -Lymphozyten	RTH1A (VMRD, Pullman)					
B-Lymphozyten	RACT30A (VMRD, Pullman)	1:68	Maus	Anti-Maus-IgM-FITC/ μ -chain specific (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)	Ziege	1:20
T-Lymphozyten + Basophile Granulozyten (Pan T3)	MRB61A (VMRD, Pullman)	1:20 1:40 1:68	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC (DAKO, Hamburg)	Kaninchen	1:20
Basophile Granulozyten, CD4 ⁺ + T-Lymphozyten-subpopulation	RACT20A (VMRD, Pullman)	1:68				

Tabelle 3.8: In der Arbeit verwendete Antikörper

Luftgetrocknete Blutausstriche wurden dreimal je 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit Dako Protein-Block Serum-Free (DAKO, Hamburg) für 10 Minuten bei Raumtemperatur bedeckt. Nach Abgießen des Dako Protein-Block Serum-Free wurden pro Ausstrich 200 μ l der Antikörperlösung (in Antibody-Diluent von DAKO, Hamburg) aufpipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer. Am nächsten Morgen wurden die Blutausstriche dreimal 5 Minuten in PBS

gewaschen und 200 µl der Sekundärantikörperlösung aufgetragen. Die Inkubation wurde unter Lichtabschluss in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten vorgenommen. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS für 5 Min. wurde eine Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) durchgeführt (siehe auch Kapitel 3.5.1).

3.6.2 Immunhistochemische und histochemische Untersuchungen des Zytoskeletts

3.6.2.1 Histochemischer Nachweis von Mikrofilamenten

Der Nachweis von F-Aktin erfolgte an Blutausstrichen von insgesamt 10 Kaninchen. Für die Untersuchung wurden die luftgetrockneten Blutausstriche dreimal je 5 Minuten in PBS (pH-Wert 7,4) gewaschen und im Anschluss für 10 Minuten mit Dako Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) bei Raumtemperatur bedeckt. Danach wurden 100 µl des Toxins Phalloidin von *Amanita phalloides* (SIGMA-ALDRICH, Steinheim), das direkt mit TRITC (Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat) gekoppelt ist, in einer Konzentration von 1:500 aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 45 Min. bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss in einer Feuchtkammer wurden die Ausstriche dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) vorgenommen und die Deckgläser mit klarem Nagellack fixiert. Als Positivkontrolle dienten je zwei Blutausstriche von Pferd und Rind.

3.6.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Intermediärfilamenten

Für die immunhistochemischen Nachweise von Vimentin und Zytokeratinen (mittels Pancytokeratin-Antikörper) wurden je 10 Blutausstriche verschiedener Kaninchen verwendet. Als Positivkontrolle dienten je zwei Blutausstriche vom Rind und Pferd. Folgende Antikörper wurden verwendet:

Zytoskelettales Element	Primärantikörper	Konz.	Tierart	Sekundärantikörper	Konz.	Tierart
Vimentin	Anti-Vimentin (DAKO, Hamburg)	1:500	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC (DAKO, Hamburg)	1:20	Kaninchen
Zytokeratine	Pan Cytokeratin Plus (BIOCARTA, Hamburg)	1:100	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC (DAKO, Hamburg)	1:20	Kaninchen

Tabelle 3.9: In der Arbeit verwendete Antikörper zum Nachweis von Intermediärfilamenten

Folgendes Färbeprotokoll wurde angewendet:

1. Lufttrocknen der Blutausstriche	
2. Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 Min.
3. Auftragen von DAKO Protein-Block Serum-Free (DAKO, Hamburg)	Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Min.
4. Auftragen von 100 µl der Primärantikörperlösung	Inkubation über Nacht bei 6°C in einer Feuchtkammer
5. Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 Min.
6. Auftragen von 100 µl der Sekundärantikörperlösung	Inkubation unter Lichtabschluss in einer Feuchtkammer für 30 Min. bei Raumtemperatur
7. Waschen in PBS (pH 7,4)	3 x 5 Min. unter Lichtabschluss
8. Gegenfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) unter weitgehendem Lichtabschluss	
9. Fixation des Deckglases mit klarem Nagellack	

3.6.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von Mikrotubuli

Bei insgesamt zehn Kaninchen wurden immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von Mikrotubuli durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten je zwei Blutausstriche vom Rind und Pferd.

Folgender Antikörper wurde verwendet:

	Primärantikörper	Konz.	Tierart	Sekundärantikörper	Konz.	Tierart
Tubulin	Anti-Tubulin (ABCAM, Cambridge)	2 µg/ml	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC (DAKO, Hamburg)	1:20	Kaninchen

Tabelle 3.10: In der Arbeit verwendeter Antikörper zum Nachweis von Tubulin

Die Färbung entspricht der Verfahrensweise, die bereits in Kapitel 3.6.2.2. erläutert wurde.

3.6.2.4 Doppelfärbungen des Zytoskeletts

Es wurden bei je fünf Kaninchen Doppelfärbungen des Zytoskeletts vorgenommen. Die folgenden Kombinationen und Antikörper wurden verwendet:

	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Toxin von <i>Amanita phalloides</i>
1	Anti-Tubulin (ABCAM, Cambridge) 2 µg/ml	Anti-Maus-IgG-FITC 1:20 (DAKO, Hamburg)	Phalloidin-TRITC 1:1000 (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
2	Anti-Vimentin 1:500 (DAKO, Hamburg)	Anti-Maus-IgG-FITC 1:20 (DAKO, Hamburg)	Phalloidin-TRITC 1:1000 (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Tabelle 3.11: Für die Doppelfärbung verwendete Antikörper und Phalloidin

Folgendes Protokoll für die Nachweise wurde angewendet:

Luftgetrocknete Blutausrich	
Waschen in PBS	3x je 5 Minuten
Auftragen von Protein Block Serum Free	10 Minuten
Auftragen des Primärantikörpers – 100 µl/Blutausrich: 1) Anti-Tubulin (2 µg/ml) 2) Anti-Vimentin (1:500)	
Inkubation bei 4°C	Über Nacht
Waschen in PBS	3x je 5 Minuten
Auftragen des Sekundärantikörpers – 100µl/Blutausrich: 1) Tubulin: Anti-Mouse IgG FITC (1:20) 2) Vimentin: Anti-Mouse IgG FITC (1:20)	
Inkubation bei Raumtemperatur, abgedunkelt	30 Minuten
Waschen in PBS	3x je 10 Minuten
Inkubation mit Phalloidin-TRITC (1:1000) bei Raumtemperatur – 100µl/Blutausrich	45 Minuten
Waschen in PBS	3x je 10 Minuten
Auftragen von VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) zur Kernfärbung	
Einschließen mit Nagellack	

Kapitel 4

4 ERGEBNISSE

4.1 Labordiagnostik

Von allen Blutproben wurde ein Differentialblutbild, einschließlich Beurteilung der Retikulozyten, erstellt. Zusätzlich wurde der Gesundheitsstatus der Tiere anhand folgender Serumparameter evaluiert: Harnstoff (UREA), Kreatinin (CREA), Alanin-Amino-Transferase (ALT), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Glukose (Glc), Natrium (Na⁺), Chlorid (Cl⁻) und Kalium (K⁺). Die folgenden Tabellen stellen die Laborwerte der einzelnen Tiere, sortiert nach rotem Blutbild, weißem Blutbild und Serumparametern, dar. Auffällige Blutwerte waren bei den ersten zehn Tieren, deren Blut während der Schlachtung entnommen wurde, zu vermerken. Da jedoch bei der amtstierärztlichen Untersuchung nach der Schlachtung alle Schlachtkörper als tauglich befundet wurden, können diese Tiere als gesund bezeichnet werden. Sie zeigten insgesamt erniedrigte Blutwerte. Zwischen den anderen Kaninchen konnten keine großen Unterschiede hinsichtlich der genannten klinischen Parameter festgestellt werden. Lediglich Kaninchen Nr. 30 zeigte einen stark erhöhten Glukosewert, der durch eine Überprüfung des Fruktosaminwertes als physiologisch identifiziert wurde.

Nr.	ERY	RET I	RET II	HKT	HB	MCH	MCV	MCHC	THR
1	5,03	0,16	3,18	34,8	11,5	22,9	69,2	33	23
2	5,21	0,107	2,05	37	12,2	23,4	71	33	278
3	5,24	0,077	1,46	33,9	11,4	21,8	64,7	33,6	117
4	4,98	0,093	1,86	33,8	11,4	22,9	67,9	33,7	102
5	5,25	0,052	0,98	31,2	10,4	19,8	59,4	33,3	54
6	6,08	0,136	2,24	39,7	13,4	22	65,3	33,8	86

Nr.	ERY	RET I	RET II	HKT	HB	MCH	MCV	MCHC	THR
7	6,26	0,136	2,17	37,4	12,4	19,8	59,7	33,2	61
8	5,78	0,153	2,65	37,9	12,5	21,6	65,6	33	139
9	5,32	0,105	1,98	35,3	11,8	22,2	66,4	33,4	70
10	6,06	0,0939	1,55	40,5	13,1	21,6	66,8	32,3	43
11	6,86	0,3389	4,94	45,5	14,9	21,7	66,3	32,7	313
12	6,32	0,2388	4,55	41,2	13,6	21,5	65,2	33	319
13	6,44	0,2486	4,91	39,8	13,4	20,8	61,8	33,7	251
14	6,23	0,3162	3,99	41,5	13,7	22	66,6	33	284
15	7,06	0,2556	3,62	45,8	15,1	21,4	64,9	33	403
16	5,08	0,2876	4,7	33,9	11,4	22,4	66,7	33,6	213
17	6,93	0,2231	3,22	45,7	14,9	21,5	65,9	32,6	299
18	6,07	0,2446	4,03	42,6	13,3	21,9	70,2	31,2	607
19	6,63	0,2195	3,31	45,5	14,8	22,3	68,6	32,5	141
20	5,49	0,2619	4,77	37,9	12,2	22,2	69	32,2	307
21	5,59	0,1112	1,99	36,5	11,8	21,1	65,3	32,3	491
22	4,51	0,1488	3,3	32,8	10,4	23,1	72,7	31,7	261
23	4,35	0,107	2,46	32,2	10,5	24,1	74	31,6	397
24	6,39	0,1112	1,74	38,2	13	20,3	59,8	34	365
25	6,09	0,1571	2,58	39,5	12,8	21	64,9	32,4	333
26	6,39	0,1761	3,02	40	12,7	21,8	68,6	31,8	457
27	5,49	0,0839	1,27	37,4	12,2	21,8	66,9	32,6	281
28	5,99	0,071	1,4	39,3	12,6	21	65,6	32,1	390
29	6,09	0,1821	2,99	39,3	12,6	20,7	64,5	32,1	512
30	5,96	0,1359	2,28	39,1	12,5	21	65,6	32	504
31	5,92	0,1977	2,72	46,5	14,6	20,1	64	31,4	381
32	7,52	0,151	2,4	41,2	13,8	21,9	65,5	33,5	338
33	4,97	0,1522	2,15	46,1	15,2	21,5	65,1	33	275
34	8,49	0,165	2,35	45,2	14,7	20,9	64,4	32,5	421
35	7,7	0,1757	2,63	44	14,3	21,4	65,9	32,5	273
36	4,94	0,2027	3,03	44,8	14,4	21,5	67	32,1	384
37	5,33	0,2336	3,24	44	14,3	19,8	61	32,5	399

Nr.	ERY	RET I	RET II	HKT	HB	MCH	MCV	MCHC	THR
38	6,12	0,216	3,53	40,5	12,9	21,1	66,2	31,9	344
39	6,41	0,275	4,29	39,4	12,8	20	61,5	32,5	585
40	5,85	0,2106	3,6	36,8	11,9	20,3	62,9	32,3	454
41	6,11	0,1674	2,74	38,6	12,4	20,3	63,2	32,1	398
42	5,94	0,1325	2,23	42	13,5	22,7	70,7	32,1	378
43	5,97	0,1087	1,82	38,6	12,9	21,6	64,7	33,4	328
44	6,06	0,0854	1,41	39,8	12,7	21	65,7	31,9	433

Tabelle 4.1: Rotes Blutbild der Kaninchen

ERY = Erythrozyten ($10^6/\mu\text{l}$); RET I = Retikulozyten absolut ($10^6/\mu\text{l}$); RET II = Retikulozyten prozentual (%); HKT = Hämatokrit (%); HB = Hämoglobin (g/l); MCH = mean corpuscular hemoglobin (pg); MCV = mean corpuscular volume (fl); MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration (g/l); THR = Thrombozyten ($10^3/\mu\text{l}$).

Nr.	LEU	LY I	LY II	MON I	MON II	NEU I	NEU II	EO I	EO II	BAS I	BAS II
1	2,09	1,56	74,6	0,15	7,2	0,33	15,8	0,01	0,05	0,04	1,9
2	4,08	3,36	82,4	0,24	5,9	0,43	10,5	0,02	0,5	0,03	0,07
3	3,65	2,15	58,9	0,19	5,2	1,17	32,1	0,03	0,8	0,11	3
4	3,93	2,73	69,5	0,18	4,6	0,96	24,4	0,02	0,5	0,04	1
5	2,05	1,11	54,1	0,28	13,7	0,52	25,3	0,02	1	0,12	5,9
6	4,74	2,77	58,4	0,36	7,6	1,39	29,6	0,03	0,6	0,19	4
7	4,36	3,63	87,3	0,14	3,4	0,28	6,6	0,02	0,5	0,09	2,2
8	2,93	2,3	78,5	0,17	5,8	0,27	9,2	0,02	0,7	0,17	5,8
9	3,32	2,32	69,9	0,26	7,8	0,54	16,3	0,03	0,9	0,17	5,1
10	2,72	1,84	67,6	0,23	8,5	0,54	19,8	0,01	0,4	0,1	3,7
11	4,48	2,57	57,4	0,34	7,6	1,3	28,9	0,11	2,5	0,16	3,6
12	8,12	4,74	58,4	0,73	9	2,03	25	0,07	1,1	0,53	6,5
13	7,85	4,95	63,1	0,47	6	2,07	26,3	0,18	0,8	0,3	3,8
14	10,29	6,54	63,6	0,74	7,2	2,32	22,5	0,06	1,7	0,51	5
15	9,77	5,87	60,1	0,69	7,1	2,7	27,6	0,19	0,19	0,32	3,3
16	5,79	3,37	56,4	0,67	11,2	1,6	26,8	0,09	1,2	0,26	4,4
17	4,93	2,98	60,4	0,35	7,1	1,34	27,3	0,1	2	0,16	3,2
18	5,5	3,27	59,5	0,93	16,9	1,13	20,5	0,01	0,2	0,16	2,9
19	4,73	2,48	52,4	0,6	12,7	1,33	28,2	0,03	0,6	0,29	6,1

Nr.	LEU	LY I	LY II	MON I	MON II	NEU I	NEU II	EO I	EO II	BAS I	BAS II
20	7,23	5,13	71	0,59	8,2	1,02	14	0,1	1,4	0,39	5,4
21	3,87	1,17	30,2	0,37	9,6	2,25	58,1	0,02	0,5	0,06	1,6
22	6,17	4,38	71	0,26	4,2	1,68	22,5	0,03	0,5	0,11	1,8
23	6,24	3,26	52,2	0,57	9,1	1,64	36,5	0,05	0,8	0,09	1,4
24	7,33	5,18	70,7	0,29	4	2,27	22,3	0,04	0,5	0,18	2,5
25	9,7	7,29	75,2	0,36	3,7	1,39	17,3	0,1	1	0,27	2,8
26	7,23	3,71	51,3	0,64	8,9	2,25	35,5	0,1	1,4	0,21	2,9
27	7,29	2,23	30,6	0,41	5,6	4,07	55,8	0,06	0,6	0,48	6,6
28	9,55	4,91	51,4	0,67	7	3,59	37,6	0,1	1,4	0,32	3,4
29	3,59	1,78	49,6	0,33	9,2	1,23	34,3	0,04	1,1	0,21	5,8
30	4,3	1,51	35,1	0,29	6,7	2,2	51,2	0,05	1,2	0,25	5,8
31	5,92	2,79	47,1	0,56	9,5	2,17	36,7	0,19	3,2	0,21	3,5
32	7,52	4,53	60,2	0,37	4,9	2,25	30	0,18	2,4	0,19	2,5
33	4,97	3,41	68,6	0,31	6,2	1	20,2	0,1	2	0,15	3
34	8,49	5,4	63,6	0,5	5,9	2,22	26,1	0,06	0,7	0,31	3,7
35	7,7	4,91	63,8	0,51	6,6	1,75	22,7	0,1	1,3	0,43	5,6
36	4,94	2,63	53,2	0,2	4	1,72	34,9	0,23	4,7	0,16	3,2
37	5,33	2,72	51	0,37	6,9	1,95	36,7	0,13	2,4	0,16	3
38	10,55	7,56	71,7	0,83	7,9	1,44	13,5	0,28	2,7	0,44	4,2
39	12,11	7,17	59,2	1,16	9,6	3,32	27,4	0,06	0,5	0,4	3,3
40	10,74	7,17	66,8	0,83	7,7	2,38	22,1	0,07	0,7	0,29	2,7
41	8,66	5,66	65,4	0,74	8,5	1,56	18	0,13	1,5	0,57	6,6
42	8,02	4,7	58,6	0,49	6,1	2,33	29	0,15	1,9	0,35	4,4
43	9,19	7,49	81,5	0,95	10,3	0,49	5,4	0,02	0,2	0,24	2,6
44	9,07	5,42	59,8	1,07	11,8	1,98	21,8	0,1	1,1	0,5	5,5

Tabelle 4.2: Weißes Blutbild der Kaninchen

LEU = Leukozyten, LY I = Lymphozyten, MON I = Monozyten, NEU I = Neutrophile Granulozyten, EO I = Eosinophile Granulozyten, BAS I = Basophile Granulozyten: $10^3/\mu\text{l}$

LY II = Lymphozyten, MON II = Monozyten, NEU II = Neutrophile Granulozyten, EO II = Eosinophile Granulozyten, BAS II = Basophile Granulozyten: %.

Nr.	ALT	UREA	CREA	GLC	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	GLDH
1	56	6,26	93	7,51	111	149	7,65	6,1
2	64	7,75	124	7,2	118	152	6,79	3,6
3	87	7,57	120	6,82	114	147	6,08	2,9
4	55	5,46	96	6,68	112	146	6,7	1,7
5	56	5,87	107	6,11	117	146	6,78	3,7
6	48	4,67	96	6,81	109	145	6,42	1,9
7	125	5,63	89	6,68	111	147	6,36	6,1
8	69	5,96	115	6,97	113	150	7,42	3,8
9	64	6,95	102	6,81	108	145	6,31	3,2
10	73	7,69	114	6,85	115	149	6,83	3,3
11	76	9,38	78	6,44	109	153	4,59	4,1
12	48	7,66	41	7,6	99	147	8,09	6,3
13	27	8,28	64	7,75	105	149	8,54	5,4
14	43	7,01	71	7,94	102	151	7,71	3,5
15	55	0,96	48	6,6	107	148	5,07	4,7
16	52	6,68	67	6	105	144	8,75	4,2
17	58	7,44	68	6,2	110	151	6,05	2,6
18	68	7,33	68	6,14	102	151	5,16	2,8
19	80	6,16	51	6,78	105	146	5,02	6,2
20	47	7,2	64	7,26	108	149	4,73	3,2
21	109	3,58	74	6,67	104	144	4,34	7,2
22	77	4,88	88	6,26	107	143	4,78	11,2
23	86	7,16	104	6,02	107	144	5,1	5
24	78	4,27	118	9,16	104	141	3,71	3,7
25	81	4,13	97	7,89	105	144	4,16	3,2
26	81	5,29	86	7,17	104	145	4,87	2,4
27	91	6,14	67	6,86	98	138	4,65	4,8
28	92	4,55	88	5,96	98	140	4,99	3
29	18	2,3	115	10,78	84	127	3,93	3,4
30	27	3,86	89	21,16	78	123	3,04	1,7
31	60	9,31	76	6,34	108	156	4,83	3,8

Nr.	ALT	UREA	CREA	GLC	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	GLDH
32	42	13,25	93	6,56	106	150	4,76	4,5
33	38	9,32	88	5,76	108	151	4,82	4,2
34	68	6,3	62	6,6	109	153	4,6	3,7
35	52	6,89	77	6	113	151	5,48	4,4
36	60	8,1	77	6,36	109	152	4,9	2,8
37	65	5,73	65	6,26	108	151	4,25	2,5
38	83	7,78	81	6,03	105	154	5,4	6,4
39	105	7,31	88	5,1	102	143	4,36	7
40	59	7,75	73	6,72	104	145	4,44	4,6
41	113	7,62	65	6,34	100	142	4,73	7,6
42	108	6,6	76	5,51	103	148	4,85	5
43	55	5,17	70	7,47	104	147	4,65	3,5
44	58	9,09	109	6,8	100	148	4,75	2,8

Tabelle 4.3: Serumparameter der Kaninchen

ALT = Alanin-Aminotransferase (U/l); UREA = Harnstoff (mmol/l); CREA = Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$); GLC = Glukose (mmol/l); Cl⁻ = Chloridionen (mmol/l); Na⁺ = Natriumionen (mmol/l); K⁺ = Kaliumionen (mmol/l); GLDH = Glutamatdehydrogenase (U/l).

Bei 9 männlichen und 23 weiblichen Tieren wurden das rote und weiße Blutbild verglichen. Dabei wurden jedoch die ersten zehn Tiere (6 männlich, 4 weiblich), deren Blut bei der Schlachtung entnommen wurde, für den Vergleich nicht berücksichtigt, da ihre Blutwerte aufgrund der Art der Probenahme insgesamt erniedrigt waren. Im roten Blutbild sind die Anzahl der Erythrozyten, der Hämatokrit und das Hämoglobin bei den weiblichen Tieren höher, wohingegen die Retikulozyten, MCV, MCH und MCHC bei männlichen und weiblichen Tieren annähernd gleich sind. Beim weißen Blutbild zeigen die weiblichen Tiere eine höhere Anzahl an Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Männliche und weibliche Tiere haben ein lymphozytäres Blutbild. Bei den männlichen Tieren sind jedoch die absolute Anzahl und auch der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten höher als beim weiblichen Tier. Ebenso ist auch der prozentuale Anteil der Monozyten an Leukozyten beim männlichen Tier höher, obwohl die Anzahl der Monozyten im Blut geringer ist als beim weiblichen Tier. Die Thrombozytenzahl ist im Durchschnitt beim weiblichen Tier höher. Die folgende Tabelle erfasst die Durchschnittswerte männlicher und weiblicher Tiere.

<i>Blutbild</i>		<i>Kaninchen aller Rassen</i>		
		<i>männlich</i>	<i>weiblich</i>	<i>gesamt</i>
Rotes Blutbild		Durchschnitt	Durchschnitt	Durchschnitt
Erythrozyten	x 10 ⁶ /μl	5,62	6,24	6,07
Retikulozyten	x 10 ⁶ /μl	0,18	0,18	0,18
	%	2,99	2,9	2,93
Hämatokrit	%	38,1	41,33	40,45
Hämoglobin	g/dl	12,5	13,38	13,13
MCV	fl	65,82	65,96	65,92
MCH	pg	21,52	21,34	21,39
MCHC	%	32,61	32,37	32,44
Weißes Blutbild		Durchschnitt	Durchschnitt	Durchschnitt
Leukozyten gesamt	x 10 ³ /μl	6,64	7,6	7,33
Lymphozyten	x 10 ³ /μl	3,44	4,81	4,42
	%	49,79	62,01	58,57
Neutrophile Granulozyten	x 10 ³ /μl	2,3	1,82	1,96
	%	37,18	24,97	28,4
Eosinophile Granulozyten	x 10 ³ /μl	0,08	0,11	0,1
	%	1,17	1,39	1,32
Basophile Granulozyten	x 10 ³ /μl	0,27	0,29	0,28
	%	3,89	3,8	3,83
Monozyten	x 10 ³ /μl	0,51	0,59	0,57
	%	7,98	7,76	7,82
Thrombozyten	x 10 ³ /μl	357,56	376,91	371,41

Tabelle 4.4: Differentialblutbild der männlichen und weiblichen Tiere im Vergleich

Die Blutwerte aus Tabelle 4.4 legen nahe, die Mittelwerte der männlichen und weiblichen Tiere auf einen statistisch signifikanten Unterschied hin zu überprüfen. Hierzu werden zuerst die Messwerte aus Tabelle 4.1 und 4.2 der Tiere 11-44 auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests überprüft. Es ergibt sich, dass alle Messwerte annähernd einer Normalverteilung folgten, so dass mit dem t-Test für unverbundene Stichproben auf statistische Signifikanz (zum Signifikanzniveau von 5%) hin getestet werden konnte. Bei keinem der Blutwerte konnte hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen männlichem und weiblichem Tier festgestellt werden.

4.2 Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen

Die Auswertung der lichtmikroskopischen Färbungen erfolgte unter dem Lichtmikroskop „Aristoplan“ der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar). Die Fotoaufnahmen wurden mit einer daran gekoppelten Canon-Powershot-A95-Digitalkamera erstellt.

4.2.1 Übersichtsfärbungen

Die Blutausstriche der Kaninchen unterschiedlicher Nutzungs-, Geschlechts- und Altersgruppen wurden für die Übersichtsfärbungen mit sechs verschiedenen Methoden gefärbt und unter dem Lichtmikroskop im Hinblick auf die Morphologie der einzelnen Blutzellen untersucht.

4.2.1.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten des Kaninchens sind runde, kernlose Zellen, die von einer glatten Zellmembran umgeben sind. Sie sind 5,05-7,4 µm groß, im Durchschnitt 6,2 µm. Diese Variation in der Größe wird auch als Anisozytose bezeichnet. Die Erythrozyten besitzen ein homogenes Zytoplasma, das eine zentrale Aufhellung zeigt. In allen Ausstrichen werden auch sogenannte Sphärozyten beobachtet, worunter man Erythrozyten ohne zentrale Aufhellung versteht. Zudem ist in allen Übersichtsfärbungen eine Polychromasie mit großen Erythrozyten ohne zentrale Aufhellung und einem ins bläuliche gehenden Zytoplasma zu erkennen. Erythrozyten mit einem kugelrunden, dunkelblauen bis ultramarinblauen Kern, der stark kondensiertes Chromatin aufweist und exzentrisch liegt, zeigen sich in einigen Blutausstrichen. Ihr Zytoplasma variiert je nach Färbung zwischen grau-bläulich bis rötlich-grau. Im Randbereich eines Blutausstrichs ist oft eine Agglutination der Erythrozyten zu sehen (siehe Abbildung 4.7). Die als Poikilozytose bezeichneten Abweichungen von der runden Form der Erythrozyten sind in den meisten Blutausstrichen vorhanden. Sie sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Bezeichnung	Ausprägung
Stomatozyten	Erythrozyten mit einer ovalen bis länglichen zentralen Aufhellung
Dacryozyten	Tränenförmige Erythrozyten
Akanthozyten	Erythrozyten mit unregelmäßigen, in Länge und Durchmesser variablen Ausläufern des Zytoplasmas
Echinozyten	Erythrozyten mit vielen kurzen, in Form und Größe einheitlichen Ausläufern („stechapfelförmige Erythrozyten“)

Bezeichnung	Ausprägung
Keratozyten	Erythrozyten mit ein oder mehr spitzen Projektionen

Tabelle 4.5: Abweichungen der Erythrozyten von der physiologischen Form

Weder basophile Tüpfelung noch Heinz-Körperchen konnten in den Erythrozyten beobachtet werden. Die Anfärbung der Erythrozyten in den Blutausstrichen wird in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Struktur	Diff-Quick	Giemsa 1:11	Giemsa 1:20	May-Grünwald	Pappenheim	HE
Zytoplasma	beige bis hellrot	beige bis blassrötlich	beige bis blassrötlich	rotbraun	hellrötlich	ziegelrot

Tabelle 4.6: Übersichtsfärbungen der Erythrozyten

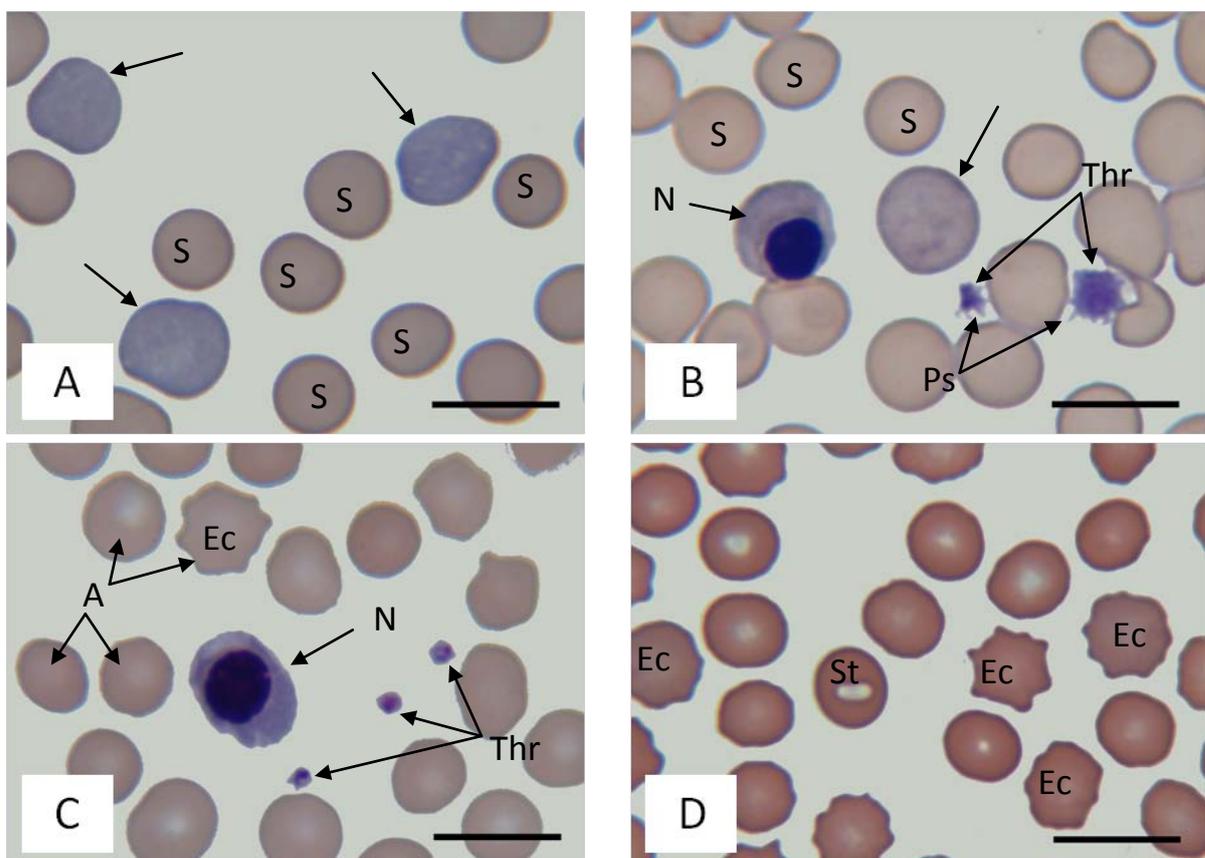


Abbildung 4.1: Übersichtsfärbungen der Erythrozyten

A. Pappenheim. Die Erythrozyten zeigen eine Sphärozytose (S = Sphärozyten). Zudem sind große, hellviolette Erythrozyten (Pfeil) im Blutausstrich zu erkennen. Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 10 µm.

B. Diff-Quick. Im Blutausstrich sind Sphärozyten (S) zu sehen. Zusätzlich sind ein großer, hellvioletter Erythrozyt (Pfeil) ohne Zellkern und ein Normoblast (N) mit stark kondensiertem Chromatin und exzentrisch gelegenen Zellkern zu erkennen. Im Blutausstrich finden sich auch zwei Thrombozyten (Thr) mit Pseudopodien (Ps). Kaninchen, m, 12-14 Wochen. SB = 10 µm.

C. Giemsa 1:11. Es sind ein Normoblast (N), ein Echinozyt (Ec) und Thrombozyten (Thr) zu erkennen. Zudem besteht eine Anisozytose (A) zwischen den Erythrozyten. Kaninchen, w, 6-7 Monate. SB = 10 µm.

D. May-Grünwald. Bei den Erythrozyten ist die zentrale Aufhellung gut zu erkennen. Weiterhin sind ein Stomatozyt (St) und Echinozyten (Ec) zu sehen. Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

4.2.1.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine, runde Zellen ohne Zellkern mit einem Durchmesser von ca. 1-3 µm, im Durchschnitt 1,9 µm. Im Zytoplasma der Thrombozyten zeigen sich deutlich granuläre Strukturen (Granulomer), die von einem helleren Hyalomer umgeben sind. Die meisten Thrombozyten in den untersuchten Blutausstrichen haben, wenn man im Lichtmikroskop durchfokussiert, zytoplasmatische Ausläufer (Pseudopodien). Sie sind aktiviert, wohingegen die inaktivierten Thrombozyten keine Pseudopodien besitzen. Im Blutausstrich vom Kaninchen liegen sie einzeln oder in Gruppen vor. Teilweise können auch große Thrombozyten mit einem Durchmesser von 4,5 bis 9 µm beobachtet werden (siehe Abbildung 4.2). Die Anfärbung mit den verschiedenen Techniken ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. In der Giemsa-Färbung 1:20 konnten keine Thrombozyten sicher identifiziert werden.

Struktur	Diff-Quick	Giemsa 1:11	Giemsa 1:20	May-Grünwald	Pappenheim	HE
Granulomer	lila	lila	-	lila bis violett	lila bis violett	rosa bis helllila
Hyalomer	blassblau	blassgrau bis - lila	-	hellblau bis blassblau	hellblau	blassrosa

Tabelle 4.7: Übersichtsfärbungen der Thrombozyten

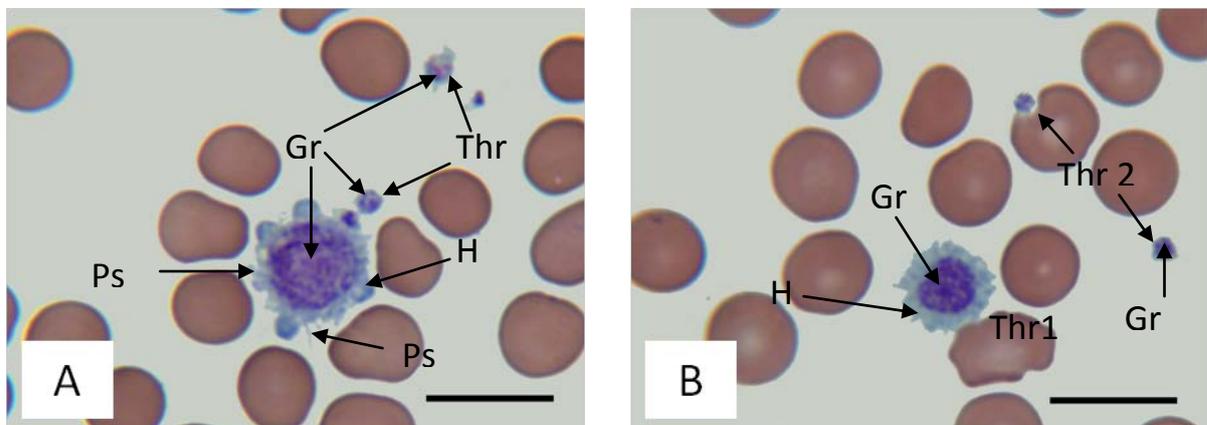


Abbildung 4.2: Übersichtsfärbungen der Thrombozyten

A. Pappenheim. Im Blutausstrich sind ein Riesenthrombozyt mit Pseudopodien (Ps) und weitere Thrombozyten (Thr) von normaler Größe mit Pseudopodien erkennbar. Sie zeigen alle ein violett bis lilafarbenes Granulomer (Gr) und ein hellblaues Hyalomer (H). Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

B. May-Grünwald. Im Blutausstrich sind ein großer Thrombozyt (Thr 1), sowie Thrombozyten (Thr 2) von normaler Größe mit einem violett angefärbten Granulomer (Gr) und einem hellblauen Hyalomer (H) zu erkennen. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 µm.

4.2.1.3 Lymphozyten

Lymphozyten sind in großer Anzahl in allen Blutausstrichen vertreten. Die meist runden Zellen zeigen eine starke Variation in der Größe. Ihr Durchmesser hat eine Variationsbreite von 6,8 bis 15,4 μm , im Durchschnitt 10,2 μm . Die Lymphozyten besitzen einen großen Zellkern, der bei kleinen Lymphozyten nur einen schmalen Zytoplasmasaum erkennen lässt. Bei größeren Lymphozyten ist das Zytoplasma umfangreicher. Meist ist es homogen, kann aber auch marmoriert erscheinen. Bei aktivierten Lymphozyten färbt es sich mittel- bis dunkelblau an. Der Zellkern hat unterschiedliche Form. Er kann kugelförmig, oval oder quaderförmig sein und besitzt manchmal eine leichte Einkerbung. Bei vielen Lymphozyten ist eine gute Differenzierung zwischen Heterochromatin und Euchromatin möglich.

Struktur	Diff-Quick	Giemsa 1:11	Giemsa 1:20	May-Grünwald	Pappenheim	HE
Zellkern	lila bis violett	lila bis dunkellila	mittelblau	dunkellila	dunkellila	violett
Zytoplasma	hellblau bis dunkelblau	hell- bis mittelblau	hellblau bis farblos	hell- bis mittelblau	hell- bis mittelblau	hellrosa

Tabelle 4.8: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten

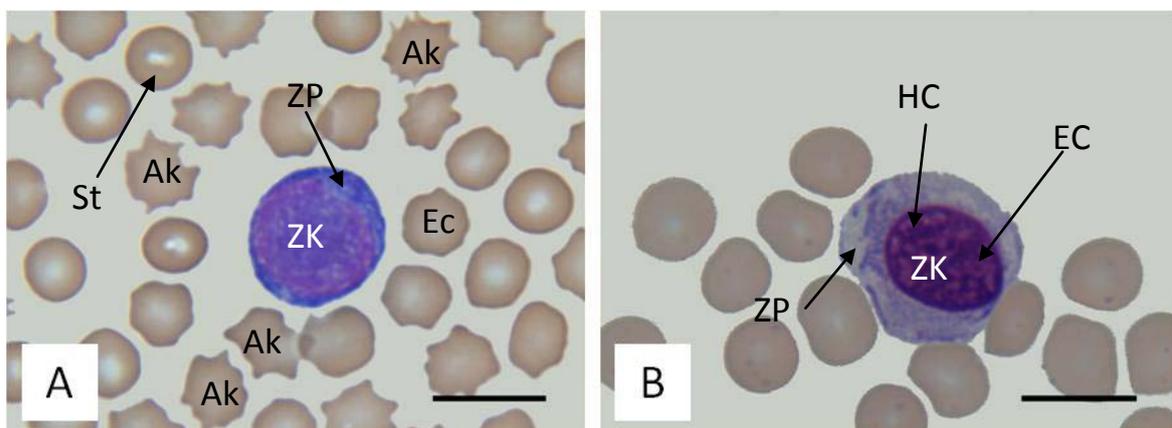


Abbildung 4.3: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten I

A. Diff-Quick. Der Lymphozyt zeigt ein kräftig dunkelblaues Zytoplasma (ZP) und einen lilafarbenen, großen Zellkern (ZK). Es sind zudem ein Stomatozyt (St), ein Echinozyt (Ec) und einige Akanthozyten (Ak) zu erkennen. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 μm .

B. Giemsa 1:11. Der Lymphozyt hat ein helles, violettes, umfangreiches Zytoplasma (ZP). Dieses erscheint leicht marmoriert. Der dunkel-lilafarbene Zellkern (ZK) besitzt einen hohen Anteil an Heterochromatin (HC). Euchromatin (EC). Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μm .

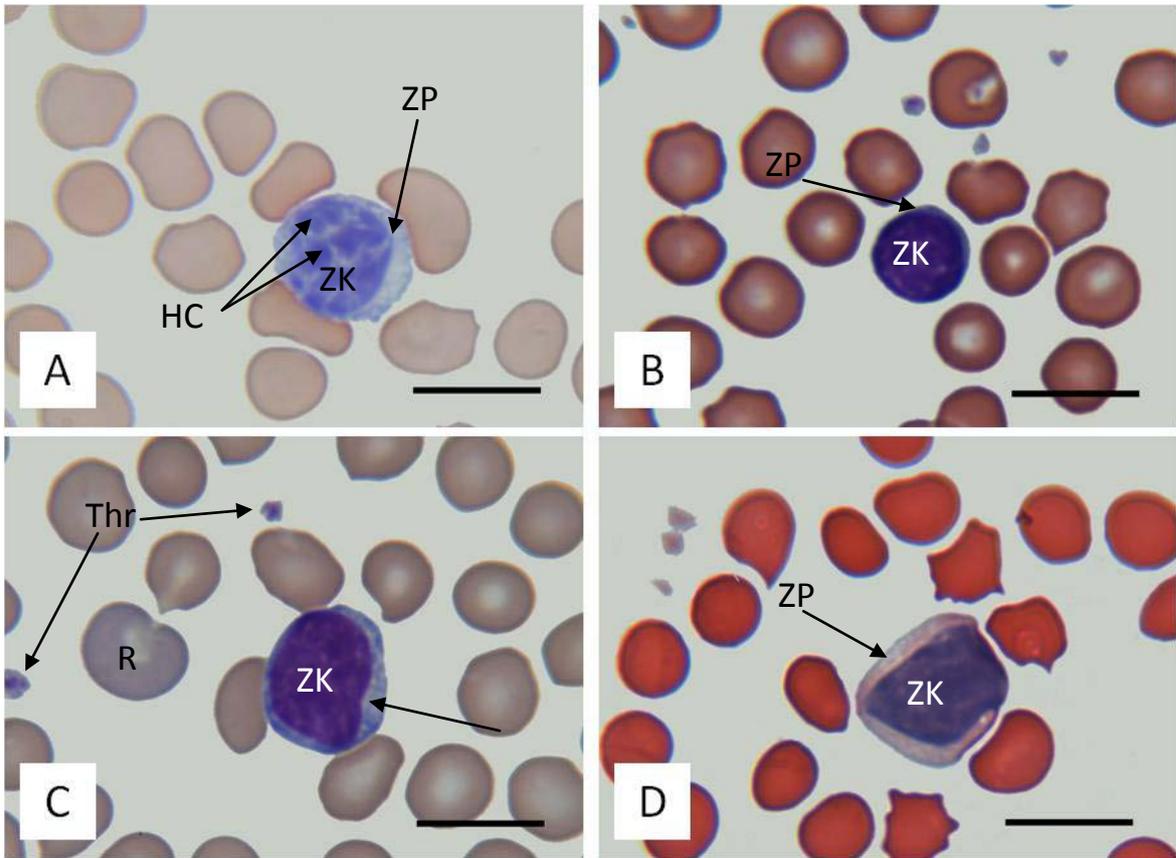


Abbildung 4.4: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten II

A. Giemsa 1:20. Der Lymphozyt weist einen bläulichen Zellkern (ZK) mit viel Heterochromatin (HC) und ein hellblaues Zytoplasma (ZP) auf. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. May-Grünwald. Der Lymphozyt besitzt ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Dies wird durch den dunkel-lilafarbenen Zellkern (ZK) und den schmalen, mittelblauen Zytoplasmasaum (ZP) deutlich. Kaninchen, w, 6-7 Monate. SB = 10 µm.

C. Pappenheim. Der dunkel-lilafarbene Zellkern (ZK) ist leicht eingebuchtet (Pfeil). Im Blutausstrich befinden sich zudem ein bläulicher Erythrozyt (R) und Thrombozyten (Thr). Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 µm.

D. H.E. Der Lymphozyt hat einen quaderförmigen, violetten Zellkern (ZK). Das Zytoplasma (ZP) stellt sich rosafarben dar. Kaninchen, m, 7 Jahre. SB = 10 µm.

4.2.1.4 Monozyten

Der Monozyt ist die größte Blutzelle im Blut des Kaninchens mit einem Durchmesser von 10,8 bis 18,4 µm, im Durchschnitt 15,1 µm. Der Monozyt hat einen großen, pleomorphen Zellkern, der weniger stark kondensiertes Chromatin als das der Granulozyten aufweist. Das teilweise marmoriert erscheinende Zytoplasma ist umfangreich und enthält oft Vakuolen.

Struktur	Diff-Quick	Giemsa 1:11	Giemsa 1:20	May-Grünwald	Pappenheim	HE
Zellkern	lila	rotviolett	lila	lila	rotviolett	violett
Zytoplasma	hell- bis mittelblau	hellblau bis lila	hellblau bis helles lila	hell- bis mittelblau	hell- bis mittelblau	rosa

Tabelle 4.9: Übersichtsfärbungen der Monozyten

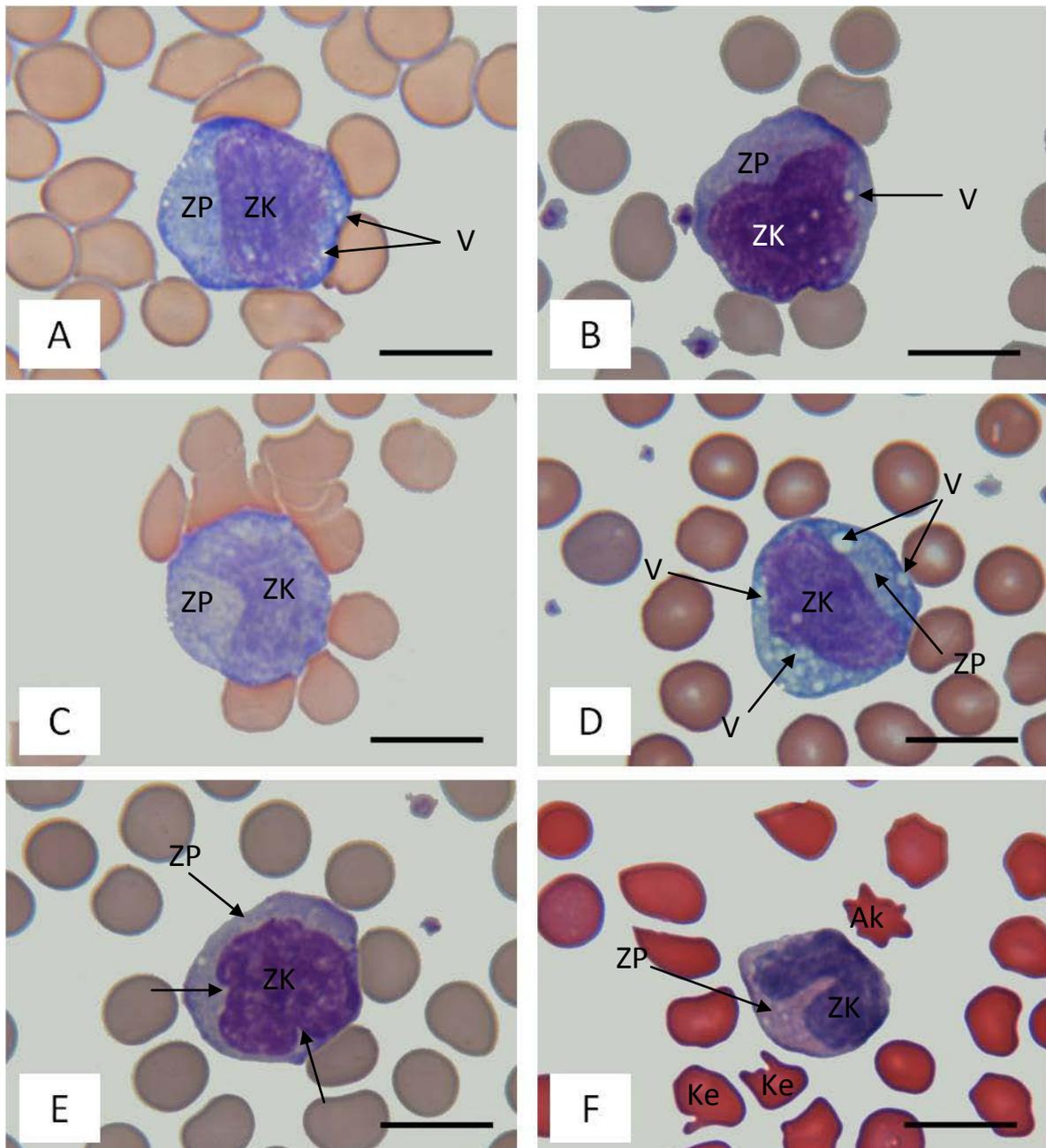


Abbildung 4.5: Übersichtsfärbungen der Monozyten

A. Diff-Quick. Der Monozyt zeigt einen lilafarbenen, pleomorphen Zellkern (ZK) und ein hellblaues Zytoplasma (ZP). Im Zytoplasma sind Vakuolen (V) erkennbar. Kaninchen, m, 12-14 Wochen. SB = 10 µm.

B. Giemsa 1:11. Der Monozyt weist einen plumpen, leicht eingebuchteten Zellkern (ZK) auf. Im Zytoplasma (ZP) ist eine große Vakuole (V) zu erkennen. Kaninchen, w, 6-7 Monate. SB = 10 µm.

C. Giemsa 1:20. Ein großer, pleomorpher Zellkern (ZK) liegt in einem sich hellblau anfärbenden Zytoplasma (ZP). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

D. May-Grünwald. Im Zytoplasma (ZP) ist eine sehr starke Vakuolisierung (V) zu sehen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

E. Pappenheim. Der Zellkern (ZK) ist an mehreren Stellen (Pfeil) leicht eingebuchtet und von pleomorpher Gestalt. ZP = Zytoplasma. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 µm.

F. H.E. Der hufeisenförmige Zellkern (ZK) ist von einem rosafarbenen Zytoplasma (ZP) umgeben. Es sind außerdem ein Akanthozyt (Ak) und zwei Keratozyten (Ke) erkennbar. Kaninchen, m, 7 Jahre. SB = 10 µm.

4.2.1.5 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten sind von den in Blutausstrichen vorzufindenden Granulozyten am häufigsten vertreten. Ihr Durchmesser beträgt 9,8 bis 15,7 µm, im Mittel 12,2 µm. Die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens haben einen mehrfach gelappten Zellkern, dessen Segmente durch feine Chromatinfäden miteinander verbunden sind. Bei manchen segmentkernigen Neutrophilen ist ein trommelschlegelartiger Fortsatz („drumstick“) zu erkennen (siehe Abbildung 4.7). Im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten befinden sich zwei Granulapopulationen, die man in der Giemsa-Färbung 1:11 und in der Pappenheim-Färbung gut differenzieren kann. In diesen sind einige große, violette Granula und viele kleine, rötliche bis pinkfarbige Granula zu erkennen.

Struktur	Diff-Quick	Giemsa 1:11	Giemsa 1:20	May-Grünwald	Pappenheim	HE
Zellkern	dunkelblau	lila bis violett	mittelblau	mittelblau	violett	schwarzviolett
Zytoplasma	hellblau bis blassgrau	blassgrau	rosa	blassgrau	blassblau	rosa
Granula	hellrot bis dunkelpink	feine pinke bis lilafarbene und große violette	teilweise degranuliert, sonst dunkelrot	rötlich bis dunkelpink	rötlich-pink und violett-dunkelblau	degranuliert

Tabelle 4.10: Übersichtsfärbungen der neutrophilen Granulozyten

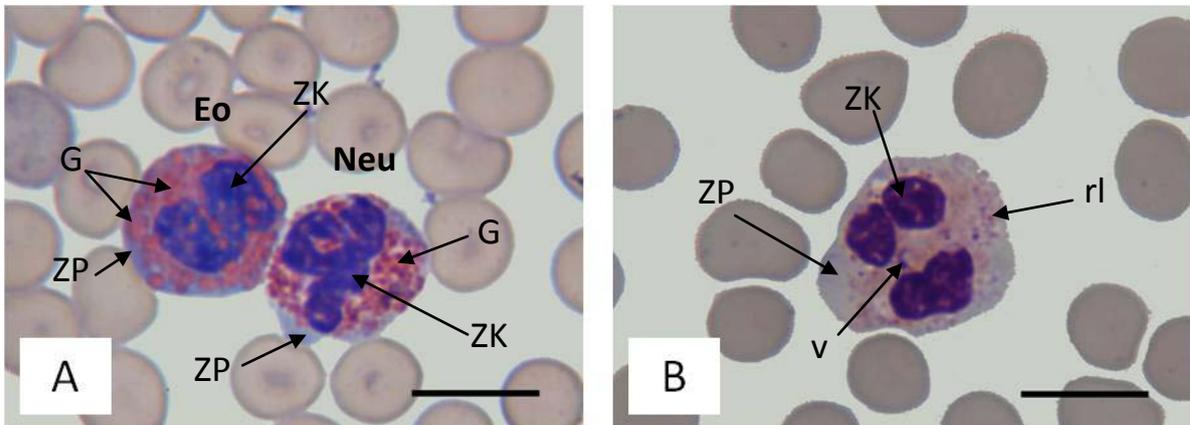


Abbildung 4.6: Übersichtsfärbungen der neutrophilen Granulozyten I

A. Diff-Quick. Der neutrophile Granulozyt (Neu) hat einen mehrfach gelappten, sich dunkelblau anfärbenden Zellkern (ZK). Das Zytoplasma (ZP) ist hellblau. In ihm befinden sich dunkle, pinke bis rötliche Granula (G). Der eosinophile Granulozyt (Eo) zeigt einen zweifach gelappten, dunkelblauen Zellkern (ZK), ein mittelblaues Zytoplasma (ZP) und große, pinkrote Granula (G). Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 10 µm.

B. Giemsa 1:11. Im hellblauen Zytoplasma (ZP) liegt der multipel gelappte, violette Zellkern (ZK). Er ist umgeben von wenigen violetten Granula (v) und einigen rötlich-lila- bis rosafarbenen Granula (rl). Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 µm.

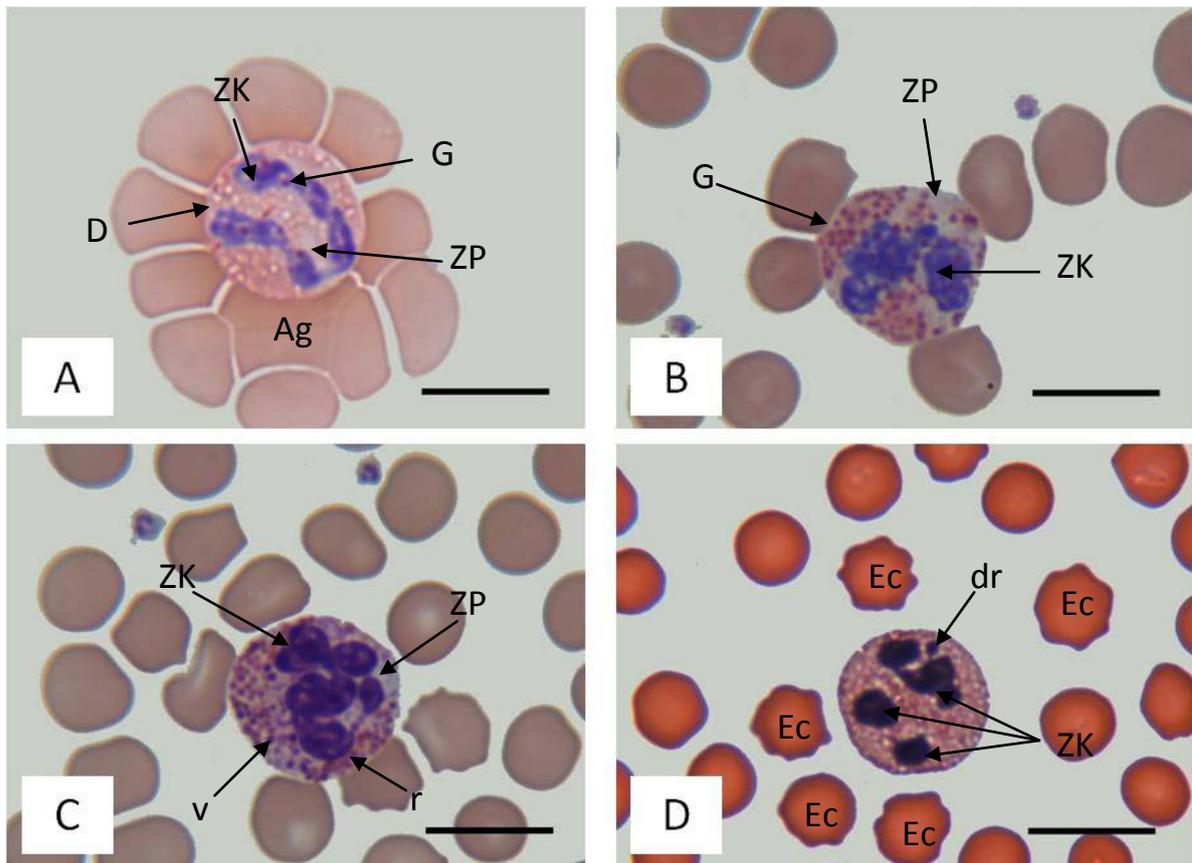


Abbildung 4.7: Übersichtsfärbungen der neutrophilen Granulozyten II

A. Giemsa 1:20. Der neutrophile Granulozyt weist einen vielfach gelappten, lilafarbenen Zellkern (ZK) und ein rosafarbenes Zytoplasma (ZP) auf, in dem wenige dunkelrote Granula (G) zu erkennen sind. Stellen der Degranulation (D) zeigen sich aufgehellt. Die Erythrozyten sind agglutiniert (Ag). Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. May-Grünwald. Der mittelblaue, multipel gelappte Zellkern (ZK) befindet sich in einem hellgrauen Zytoplasma (ZP), in dem hellrote bis dunkelrote Granula vorhanden sind. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 µm.

C. Pappenheim. Der neutrophile Granulozyt zeigt einen multipel gelappten, violetten Zellkern (ZK) und ein blassblaues Zytoplasma (ZP). Im Zytoplasma befinden sich violette (v) und rote (r) Granula. Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

D. H.E. Am multipel gelappten, schwarzvioletten Zellkern (ZK) ist ein trommelschlegelartiger Fortsatz („drumstick“) (dr) zu erkennen. Im rosafarbenen Zytoplasma (ZP) sind aufgrund der Degranulation keine Granula vorhanden. Im Blutausstrich sind mehrere Echinozyten (Ec) zu sehen. Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

4.2.1.6 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten sind große, runde bis ovale Zellen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 13,9 μm (11,5-17,6 μm). Der Zellkern der eosinophilen Granulozyten besteht aus 2-3 Segmenten. Die Segmente sind rundlich oder langgestreckt und oft über schmale Chromatinbrücken miteinander verbunden. Der Rand des Zellkerns stellt sich oft „ausgefranst“ dar. Im Zytoplasma befinden sich bis zu 1 μm große, runde oder auch eckige Granula, die teilweise den Zellkern überdecken. In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse der Färbungen zusammengefasst.

Struktur	Diff-Quick	Giemsa 1:11	Giemsa 1:20	May-Grünwald	Pappenheim	HE
Zellkern	mittelblau	lila	violett	mittelblau	violett	mittelblau bis violett
Zytoplasma	blassblau	klar	lila	hellblau	mittelblau bis lila	hellrosa bis hellgrau
Granula	rot	rot	dunkelrosa	dunkelrosa	hell-rotbraun	ziegelrot

Tabelle 4.11: Übersichtfärbungen der eosinophilen Granulozyten

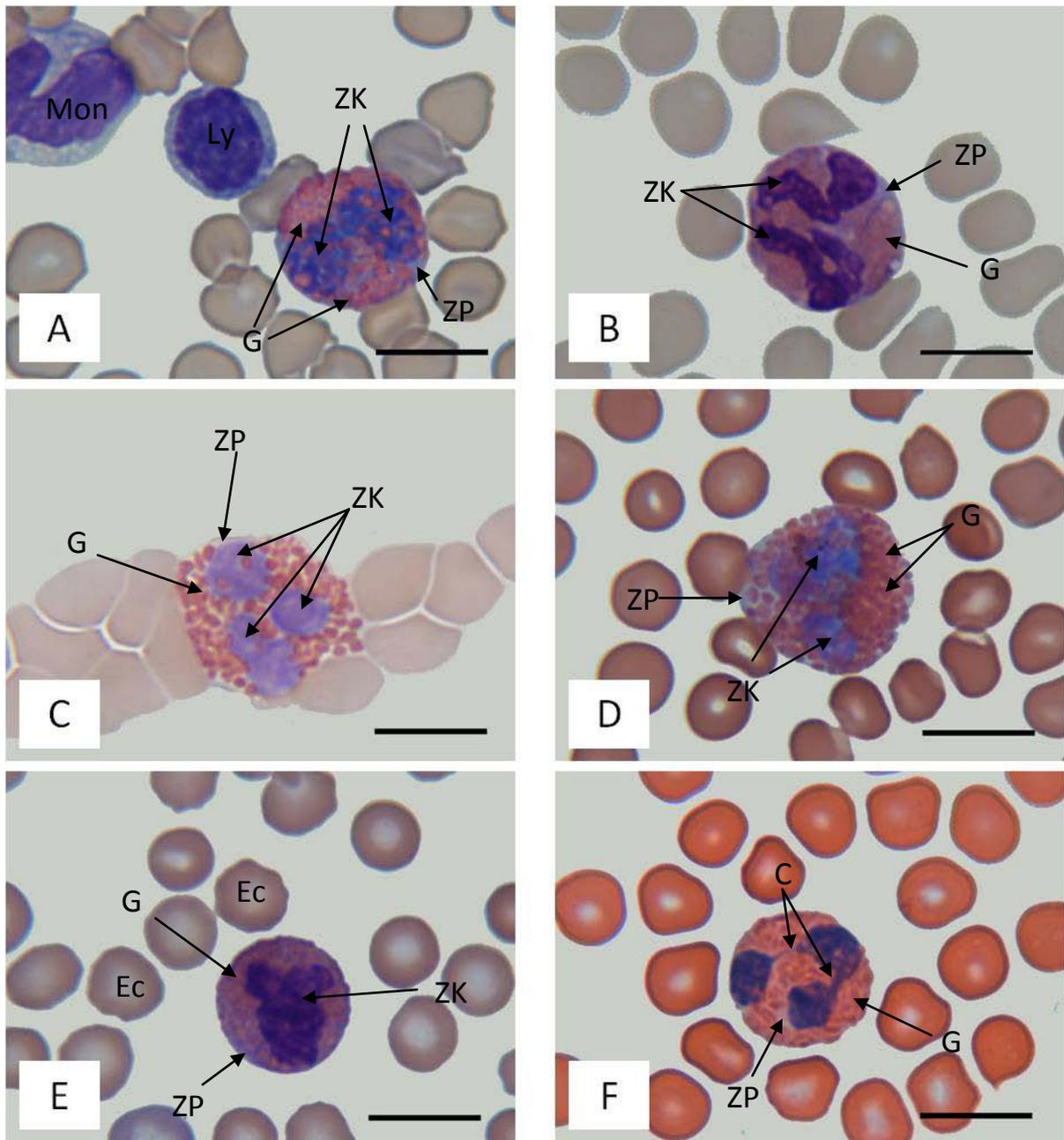


Abbildung 4.8: Übersichtsfärbungen der eosinophilen Granulozyten

A. Diff-Quick. Der eosinophile Granulozyt zeigt einen mittelblauen, zweifach segmentierten Zellkern (ZK) und hellblaues Zytoplasma (ZP). Die großen, roten, teilweise quaderförmigen Granula (G) sind im gesamten Zytoplasma verteilt und bedecken stellenweise den Zellkern. Mon = Monozyt; Ly = Lymphozyt. Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 10 μ m.

B. Giemsa 1:11. Der eosinophile Granulozyt hat einen violetten, langgezogenen Zellkern (ZK) und rosafarbene, große Granula (G), die das lilafarbene Zytoplasma (ZP) ausfüllen. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μ m.

C. Giemsa 1:20. Man kann im eosinophilen Granulozyten einen dreifach segmentierten Zellkern (ZK) und große, rote Granula (G) erkennen. ZP = Zytoplasma. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

D. May-Grünwald. Es sind ein zweifach segmentierter Zellkern (ZK), hellblaues Zytoplasma (ZP) und große, rote Granula (G), die den Zellkern teilweise bedecken, zu sehen. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

E. Pappenheim. Der eosinophile Granulozyt zeigt einen dunkelblauen Zellkern (ZK), lilafarbenes Zytoplasma (ZP) und rosafarbene, große Granula (G). Im Blutaussstrich sind zudem mehrere Echinozyten (Ec) zu sehen. Kaninchen, w, 6-7 Monate. SB = 10 μ m.

F. H.E. Der eosinophile Granulozyt hat einen Zellkern mit drei Segmenten, die durch feine Chromatinbrücken verbunden sind (C). Sein Zytoplasma ist weitgehend farblos und mit großen, hellroten Granula (G) ausgefüllt. Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 10 μ m.

4.2.1.7 Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten sind runde Zellen mit einer Größe von durchschnittlich 13,5 µm (10,6-16,5 µm). Sie besitzen einen oft mehrfach gelappten, plumpen Zellkern von pleomorpher Gestalt. Dieser liegt oft exzentrisch in der Zelle. Im Zytoplasma sind kleine, kugelförmige Granula vorhanden, die teilweise den Zellkern überlagern. In jedem Blutaussstrich konnten basophile Granulozyten festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass es in Abhängigkeit von der Färbung zur Degranulation (H.E.-Färbung) oder zu einer nur sehr schwachen Anfärbung der sich in der Degranulation befindenden Granula kommt (Diff-Quick-Färbung, Giemsa-Färbung 1:11, Giemsa-Färbung 1:20). In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Übersichtsfärbungen dargestellt.

Struktur	Diff-Quick	Giemsa 1:11	Giemsa 1:20	May-Grünwald	Pappenheim	HE
Zellkern	lila bis violett	lila bis violett	hellblau	lila oder hellblau	lila	violett
Zytoplasma	hellblau	hellblau-lila	blassblau	blassblau	hellblau	blassrosa
Granula	degranuliert, teilweise noch lilafarbene Reste vorhanden	dunkles lila	lila	lila bis violett oder blau bis dunkelblau	lila bis dunkelblau	degranuliert

Tabelle 4.12: Übersichtsfärbungen der basophilen Granulozyten

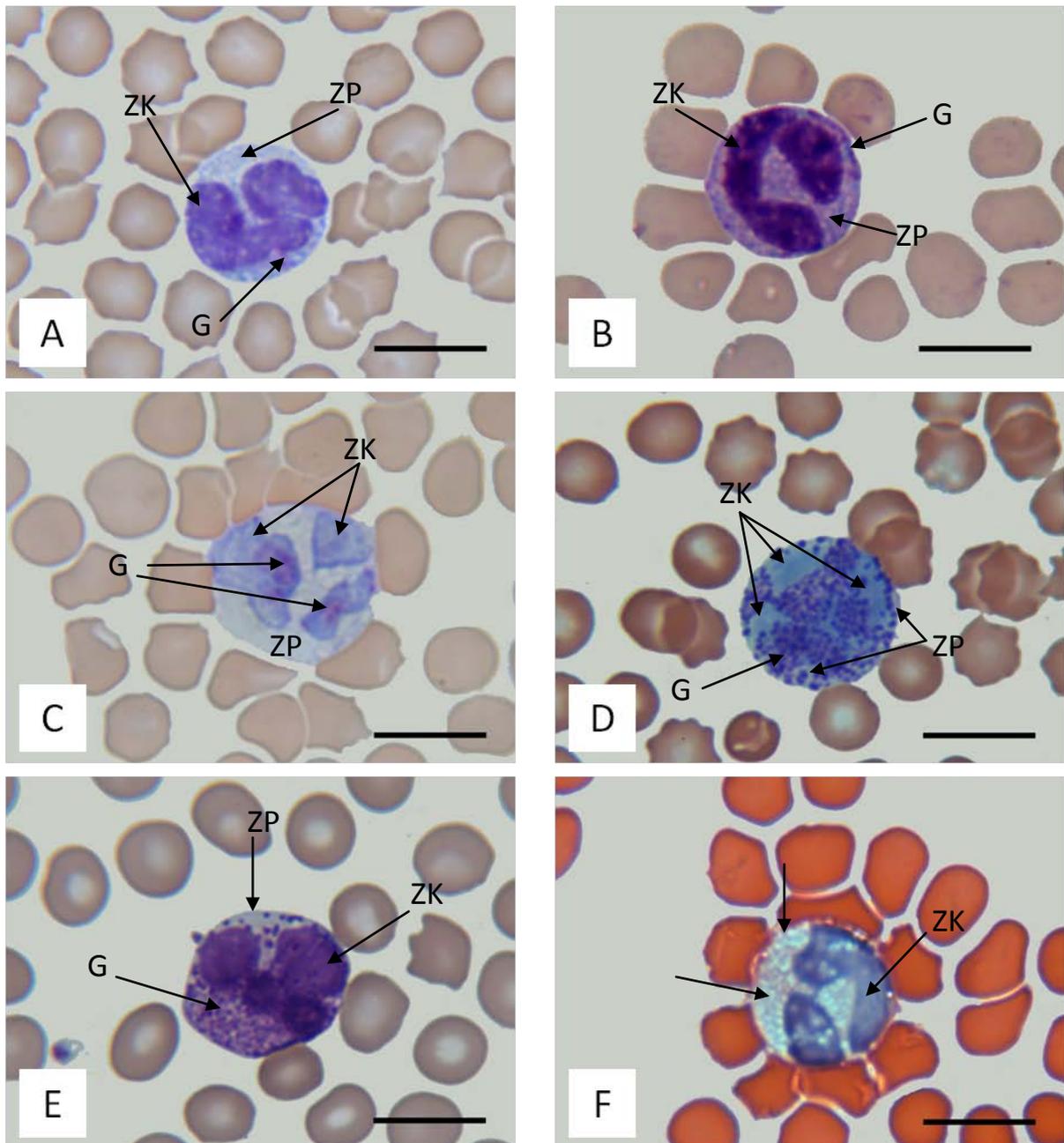


Abbildung 4.9: Übersichtsfärbungen der basophilen Granulozyten

A. Diff-Quick. Der basophile Granulozyt mit seinem plumpen, zweigeklappten Zellkern (ZK) weist nur schwach angefärbte, basophile Granula (G) auf, die teilweise degranuliert sind. ZP = Zytoplasma. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. Giemsa 1:11. Die basophilen Granula (G) befinden sich vor allem im Randbereich der Zelle und überlagern den Zellkern (ZK). ZP = Zytoplasma. Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 10 µm.

C. Giemsa 1:20. Der Zellkern (ZK) des basophilen Granulozyten ist dreifach segmentiert. Im blassblauen Zytoplasma (ZP) befinden sich einige wenige Granula (G). Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 µm.

D. May-Grünwald. Die kräftig blauen Granula (G) des basophilen Granulozyten (Pfeil) füllen das gesamte Zytoplasma (ZP) aus und bedecken teilweise den hellblauen Zellkern (ZK). Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

E. Pappenheim. Der basophile Granulozyt zeigt einen zweifach geklappten Zellkern (ZK), ein hellblaues Zytoplasma (ZP) und zahlreiche lilafarbene bis violette Granula (G). Kaninchen, n, 1,5 Jahre. SB = 10 µm.

F. H.E. Weiße Stellen im Zytoplasma (Pfeil) weisen auf eine Degranulation hin und zeigen die ursprüngliche Lokalisation der Granula. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

4.2.2 Färbung der eosinophilen Granulozyten mit Sirius Red

In der Sirius-Red-Färbung zeigen sowohl die neutrophilen als auch die eosinophilen Granulozyten eine rosafarbene bis kräftig pinkfarbene Anfärbung der Granula. Diese Anfärbung beschränkt sich bei den eosinophilen Granula auf die Matrix und bei den neutrophilen Granulozyten oft auf den Randbereich der Granula. Dabei ist nicht zu erkennen, welche Granulaart der neutrophilen Granulozyten sich anfärbt. Andere Blutzellen zeigen keine positive Reaktion. Das Zytoplasma der Blutzellen ist stets hellgrau, der Zellkern in einem kräftigen Blau angefärbt.

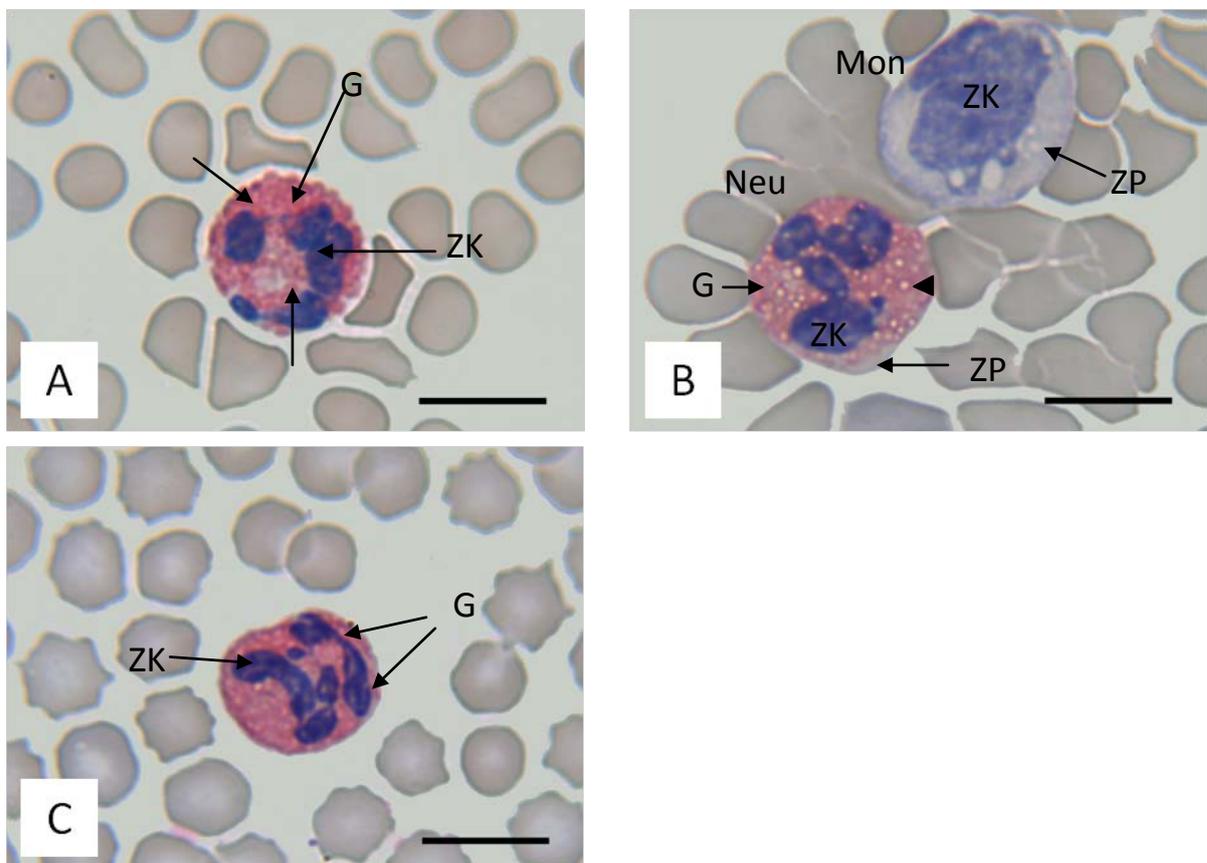


Abbildung 4.10: Sirius-Red-Färbung der Blutzellen des Kaninchens

A. Der eosinophile Granulozyt weist kräftig rote Granula (G) auf. Man kann deutlich erkennen, dass sich die Anfärbung auf die Matrix der eosinophilen Granula beschränkt (Pfeile). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 μ m.

B. Der neutrophile Granulozyt (Neu) ist gut an seinem dunkelblau gefärbten Zellkern (ZK) zu erkennen. Das Zytoplasma (ZP) ist hellgrau. Im Zytoplasma befindliche Granula (G) färben sich mit Sirius Red rosafarben an. Dabei ist bei einigen Granula eine Anfärbung im äußeren Bereich zu erkennen (kleiner Pfeil). Oben rechts im Bild ist außerdem ein Monozyt (Mon), der sich nicht mit Sirius Red anfärben lässt, abgebildet. ZK = Zellkern. ZP Zytoplasma. Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 10 μ m.

C. Der neutrophile Granulozyt zeigt eine kräftig rote Anfärbung der Granula (G) im Zytoplasma. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 10 μ m.

4.2.3 Toluidinblaufärbung der basophilen Granulozyten nach Undritz

Die basophilen Granulozyten zeigen in der Toluidinblaufärbung kräftig violette Granula. Die anderen Blutzellen färben sich nicht an.

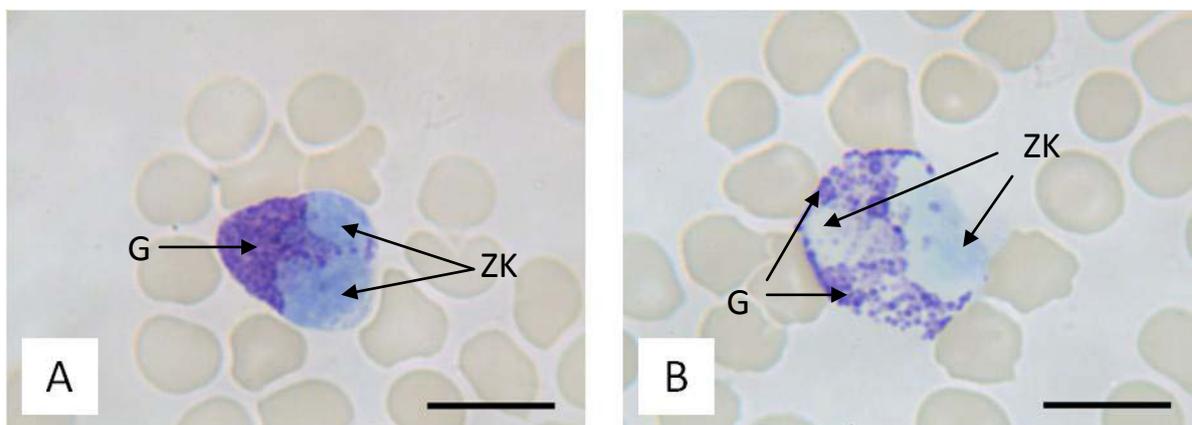


Abbildung 4.11: Toluidinblau-Färbung der basophilen Granulozyten

A. Der basophile Granulozyt ist mit seinen kräftig violetten Granula (G) gut zu differenzieren. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μ m.

B. Der basophile Granulozyt zeigt violette Granula (G), die den blauen Zellkern (ZK) teilweise überlagern. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

4.2.4 Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

In der Periodic-acid-Schiff-Reaktion sind alle Blutzellen, außer den Erythrozyten, Lymphozyten und Monozyten, positiv. Bei den Thrombozyten sind deutlich violette Granula zu erkennen. Die neutrophilen und basophilen Granulozyten sind stets positiv mit einem rosa- bis lilafarbenen Zytoplasma und violetten Granula. Diese sind oft unterhalb der Zellmembran aufgereiht und nur vereinzelt im Zytoplasma zu sehen. Positive Reaktionsprodukte sieht man bei eosinophilen Granulozyten vor allem im Randbereich der Zelle und intergranulär. Die Ergebnisse der PAS-Färbung sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Blutzellen	PAS-Reaktion	Zellkern	Reaktionsprodukte
Erythrozyten	negativ	-	-
Thrombozyten	positiv	-	hellviolette Granula im Hyalomer
Lymphozyten	negativ	blau	-
Monozyten	negativ	blau	-
Neutrophile Granulozyten	positiv	blau	violette Granula vereinzelt im Zytoplasma und gehäuft unterhalb der Zellmembran; rosa- bis lilafarbene Reaktionsprodukte im Zytoplasma.
Eosinophile Granulozyten	positiv	blau	violette Granula intergranulär und unterhalb der Zellmembran
Basophile Granulozyten	positiv	blau	lila bis violette Granula

Tabelle 4.13: Ergebnisse der PAS-Färbung

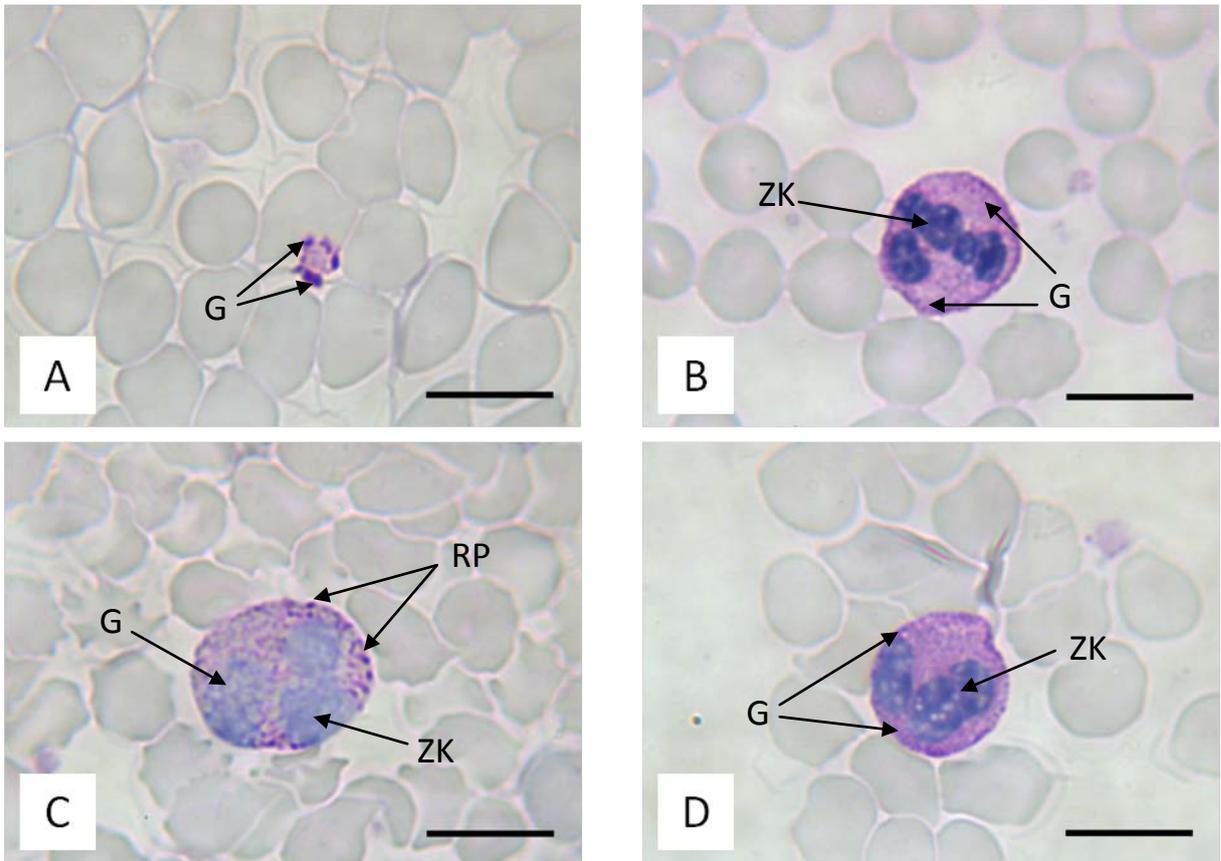


Abbildung 4.12: PAS-Färbung der Blutzellen des Kaninchens

A. Der Thrombozyt zeigt kräftig violette Granula (G) im Hyalomer. Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

B. Im neutrophilen Granulozyten ist eine Ansammlung von rotvioletten Granula (G) unterhalb der Zellmembran zu sehen. Sie sind auch vereinzelt im lila- bis rosafarbenen Zytoplasma identifizierbar. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 µm.

C. Der eosinophile Granulozyt weist kräftig violette Reaktionsprodukte (RP) intergranulär im Zytoplasma und unterhalb der Zellmembran auf. Die eosinophilen Granula (G) sind negativ. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

D. Im lilafarbenen Zytoplasma sind violette Granula (G) zu erkennen, die vor allem im Randbereich der Zelle eine stärkere Anfärbung zeigen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

4.2.5 Alcianblaufärbung zum Nachweis saurer und sulfatierter Mukosubstanzen

Die Alcianblaufärbung wird zum Nachweis saurer und sulfatierter Mukosubstanzen mit verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Bei einem pH-Wert von 2,5 werden saure Mukosubstanzen, bei einem pH-Wert von 1 sulfatierte Mukosubstanzen angefärbt. Die neutrophilen und basophilen Granulozyten zeigen eine deutliche, granuläre Reaktion bei einem pH-Wert von 2,5. Die Thrombozyten besitzen teilweise feine, blassblaue Reaktionsprodukte im Hyalomer. Bei einem pH-Wert von 1 ist eine hellblaue, granuläre Reaktion bei den neutrophilen Granulozyten und eine blassblaue Reaktion im Zytoplasma bei den basophilen Granulozyten vorhanden.

Blutzellen	Alcianblau pH 2,5	Alcianblau pH 1	Zellkern	Reaktionsprodukte pH 2,5	Reaktionsprodukte pH 1
Erythrozyten	negativ	negativ	-	-	-
Thrombozyten	positiv	negativ	-	blassblaue Granula	-
Lymphozyten	negativ	negativ	rosa	-	-
Monozyten	negativ	negativ	rosa	-	-
Neutrophile Granulozyten	positiv	positiv	rosa	kräftig hellblau, granulär im gesamten Zytoplasma	hellblau, granulär im Zytoplasma
Eosinophile Granulozyten	negativ	negativ	rosa	-	-
Basophile Granulozyten	positiv	positiv	rosa	kräftig blau, filamentös im Zytoplasma verteilt, teilweise den Zellkern überlagernd	diffus hellblau, teilweise granulär im Zytoplasma

Tabelle 4.14: Ergebnisse der Alcianblaufärbung

Die Bilder sollen zunächst die Anfärbung der Blutzellen bei einem pH-Wert von 2,5 demonstrieren.

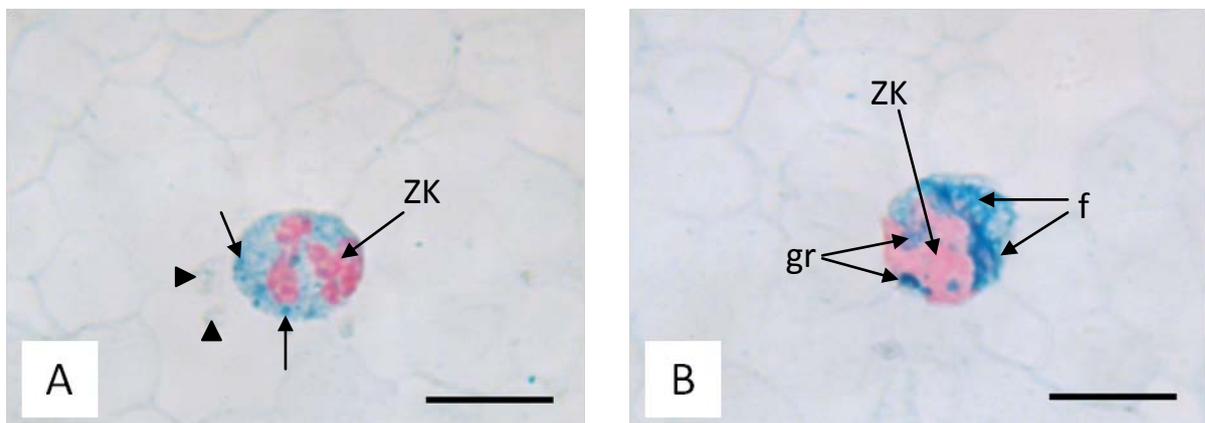


Abbildung 4.13: Alcianblaufärbung pH 2,5

A. Der neutrophile Granulozyt weist eine granuläre, hellblaue bis mittelblaue Anfärbung in seinem Zytoplasma (Pfeil) auf. Die Thrombozyten besitzen blassblaue Reaktionsprodukte im Hyalomer (kleiner Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

B. Hier liegt eine kräftig blaue Anfärbung der sauren Mukosubstanzen im basophilen Granulozyten vor. Diese erscheinen teilweise mehr filamentös (f) als granulär (gr). ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

In den folgenden Bildern ist Anfärbung der neutrophilen und basophilen Granulozyten bei einem pH-Wert von 1 dargestellt. Hierbei ist auffällig, dass es beim neutrophilen Granulozyten zu einer deutlich granulären Reaktion im Zytoplasma kommt, wohingegen der basophile Granulozyt eine diffuse, granuläre Reaktion zeigt.

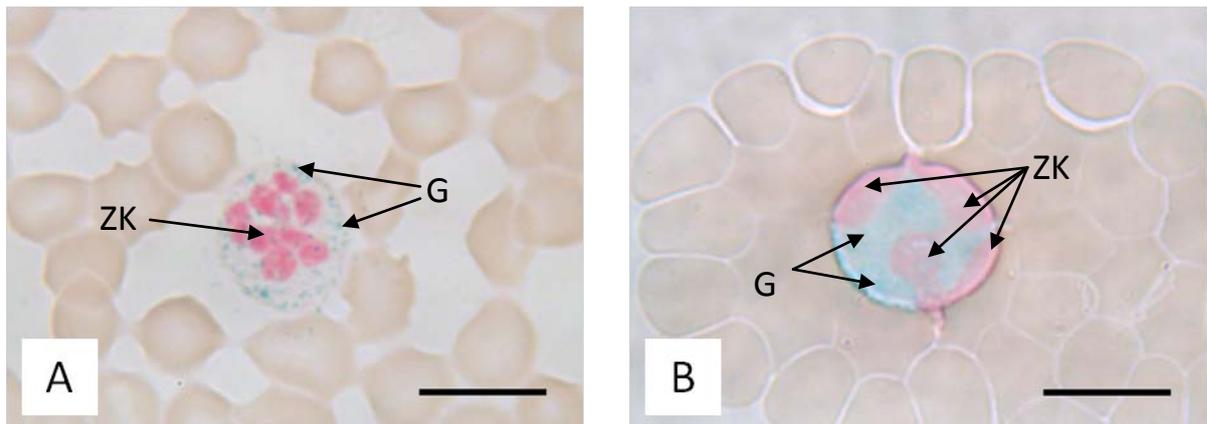


Abbildung 4.14: Alcianblaufärbung pH 1

A. Im Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten befinden sich fein verteilte, hellblaue Granula (G). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 μm .

B. Das Zytoplasma des basophilen Granulozyten ist eine blassblaue, feine Granula (G) zu sehen. Durch seinen randständigen, mehrfach gelappten Zellkern (ZK) ist er gut von den neutrophilen Granulozyten abgrenzbar. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und ihre fotografische Auswertung wurden an Ultradünnschnitten am Zeiss Elektronenmikroskop EM 902 (ZEISS, Oberkochen) durchgeführt. Abgesehen von den basophilen Granulozyten konnten alle Blutzellen im Elektronenmikroskop anhand ihrer Ultrastruktur sicher identifiziert werden.

4.3.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten weisen aufgrund der geringen Dicke der Schnitte in der elektronenmikroskopischen Untersuchung unterschiedliche Form und Größe auf. Sie liegen oft langgestreckt und napfförmig vor. Ihre glatte Zellmembran umschließt ein homogen elektronendichtes Zytoplasma, dem ein Zellkern und Zellorganellen fehlen. Zusätzlich zu ausgereiften Erythrozyten können auch Erythrozytenvorläufer mit Zellkern in den Ultradünnschnitten beobachtet werden. Sie haben ein niedriges Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Der stark kondensierte Zellkern liegt dabei exzentrisch in der Zelle. Zudem sind im Zytoplasma ein paar Mitochondrien zu sehen.

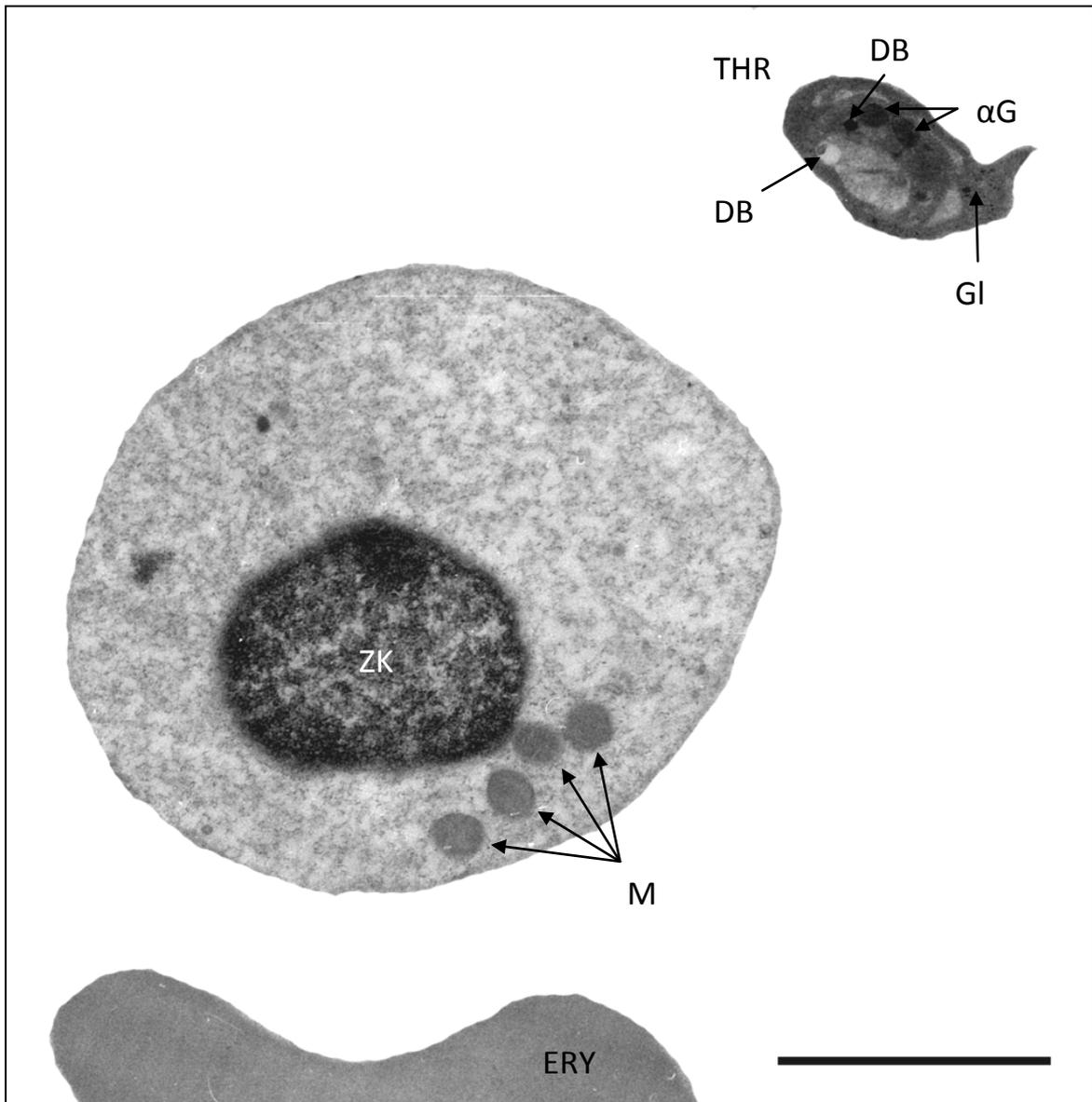


Abbildung 4.15: Erythrozytenvorläufer

Der Erythrozytenvorläufer zeigt einen exzentrisch gelegenen Zellkern (ZK) und Mitochondrien (M) im Zytoplasma. Zudem ist im Bild auch ein Thrombozyt (THR) mit α -Granula (α G), „dense bodies“ (DB) und Glykogengranula (GI) zu sehen. Unten am Bildrand ist ein ausgereifter Erythrozyt (E) zu erkennen. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 2 μ m.

4.3.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten im Blut des Kaninchens sind in den meisten Fällen oval bis rund. Ihre glatte Zellmembran zeigt oft zytoplasmatische Ausstülpungen in Form von Pseudopodien. Im Zytoplasma kann man die großen, elektronendichten α -Granula mit ihrer homogenen Struktur erkennen. Die sogenannten „dense granules“ oder „dense bodies“ sind zahlreich im Zytoplasma der Thrombozyten vorhanden. Sie zeichnen sich durch eine vakuolenähnliche Struktur aus, die von einer Membran umgeben ist und einen stark elektronendichten, sphärischen Körper enthält. Im Zytoplasma befinden sich außerdem Glykogengranula, die teilweise aggregiert vorliegen (siehe Abbildung 4.17). Weiterhin können Vakuolen im Zytoplasma beobachtet werden. Von den zytoskelettalen Elementen sind Mikrotubuli auch schon ohne spezielle Anfärbung elektronenmikroskopisch sichtbar. Sie liegen im Randbereich der Zelle und können in quer angeschnittenen Thrombozyten an den polaren Enden der Zelle identifiziert werden (siehe Abbildung 4.17).

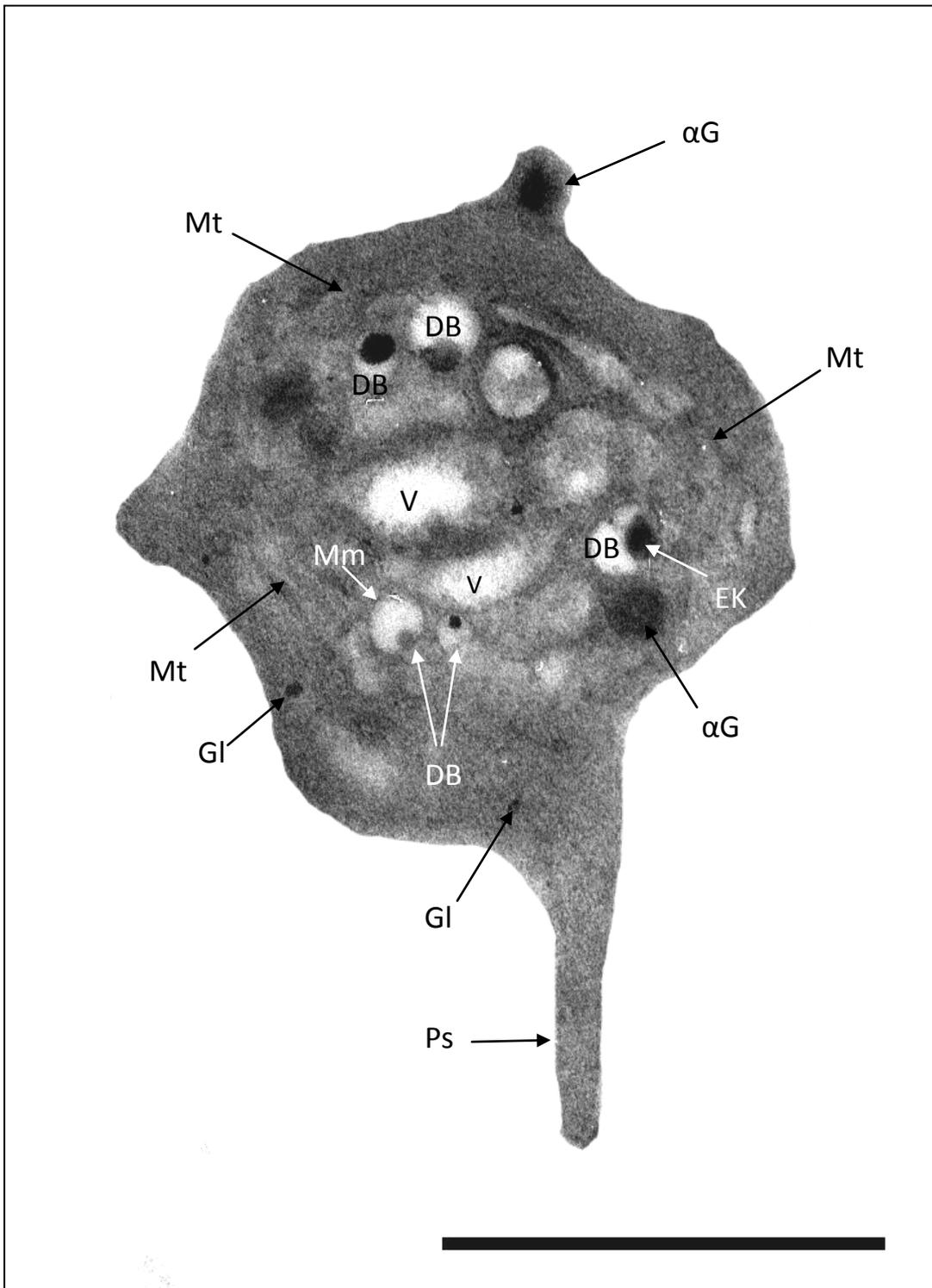


Abbildung 4.16: Thrombozyt I

Der Thrombozyt enthält in seinem Zytoplasma „dense bodies“ (DB), die von einer Membran (Mm) umgeben sind und einen elektronendichten, sphärischen Körper (EK) besitzen, elektronendichte α -Granula (α G) sowie zahlreiche Vakuolen (V). Es können zudem auch einige Glykogengranula (GI) im Zytoplasma identifiziert werden. Anschnitte des Mikrotubulus (Mt), der die Organellen umgibt, sind außerdem vorhanden. Der Thrombozyt hat insgesamt eine sphärische Gestalt, von der sich Pseudopodien (Ps) in die Umgebung erstrecken. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 1 μ m.

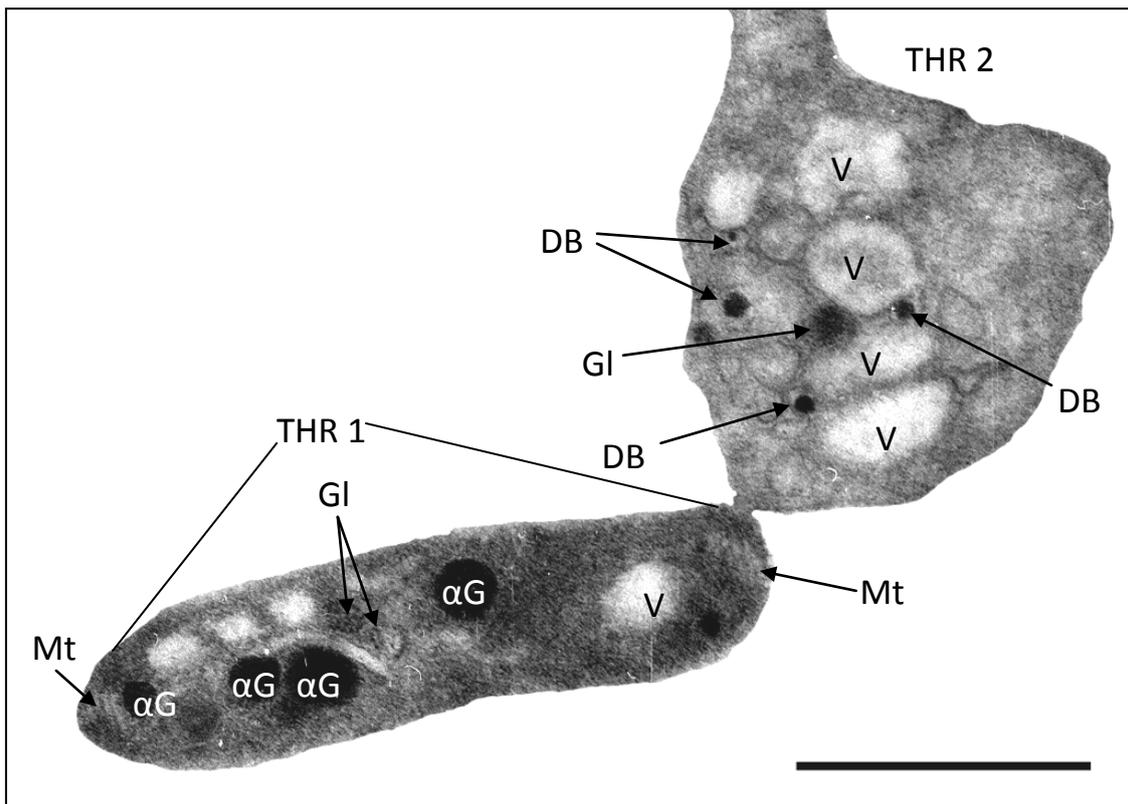


Abbildung 4.17: Zwei Thrombozyten

Im Bild sind zwei Thrombozyten (THR 1 und THR 2) zu sehen. Beide enthalten Vakuolen (V) und Ansammlungen von Glykogengranula (Gl). Im Zytoplasma von THR 1 befinden sich außerdem α -Granula (α G). An den polaren Enden können Anschnitte des Mikrotubulus (Mt) identifiziert werden. THR 2 hingegen weist „dense bodies“ (DB) mit einer deutlichen Membran und einem stark elektronendichten Einschlusskörperchen auf. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 1 μ m.

4.3.3 Lymphozyten

Die Lymphozyten sind insgesamt runde Zellen, von denen sich Pseudopodien in die Umgebung erstrecken. In größeren Lymphozyten zeigt der Zellkern zahlreiche Einbuchtungen. Der Anteil des vor allem im Randbereich des Zellkerns gelegenen Heterochromatins nimmt mit zunehmender Größe des Lymphozyten ab. In größeren Lymphozyten ist zudem ein Nukleolus erkennbar.

Im Zytoplasma des Lymphozyten befinden sich zahlreiche Mitochondrien, Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum und Vakuolen. Der Golgi-Apparat ist relativ klein und kann durch eine Ansammlung von abschnürenden Lysosomen selten identifiziert werden.

In Lymphozyten sind außerdem primäre Lysosomen vorhanden, die einen relativ elektronendichten, feinkörnig-homogenen Inhalt besitzen und kugelförmig sind. Sekundäre Lysosomen (Heterolysosomen) sind heterogene, kugelförmige Zellorganellen, die von einer Doppelmembran begrenzt werden. Sie können in einigen Lymphozyten beobachtet werden (siehe Abbildung 4.19).

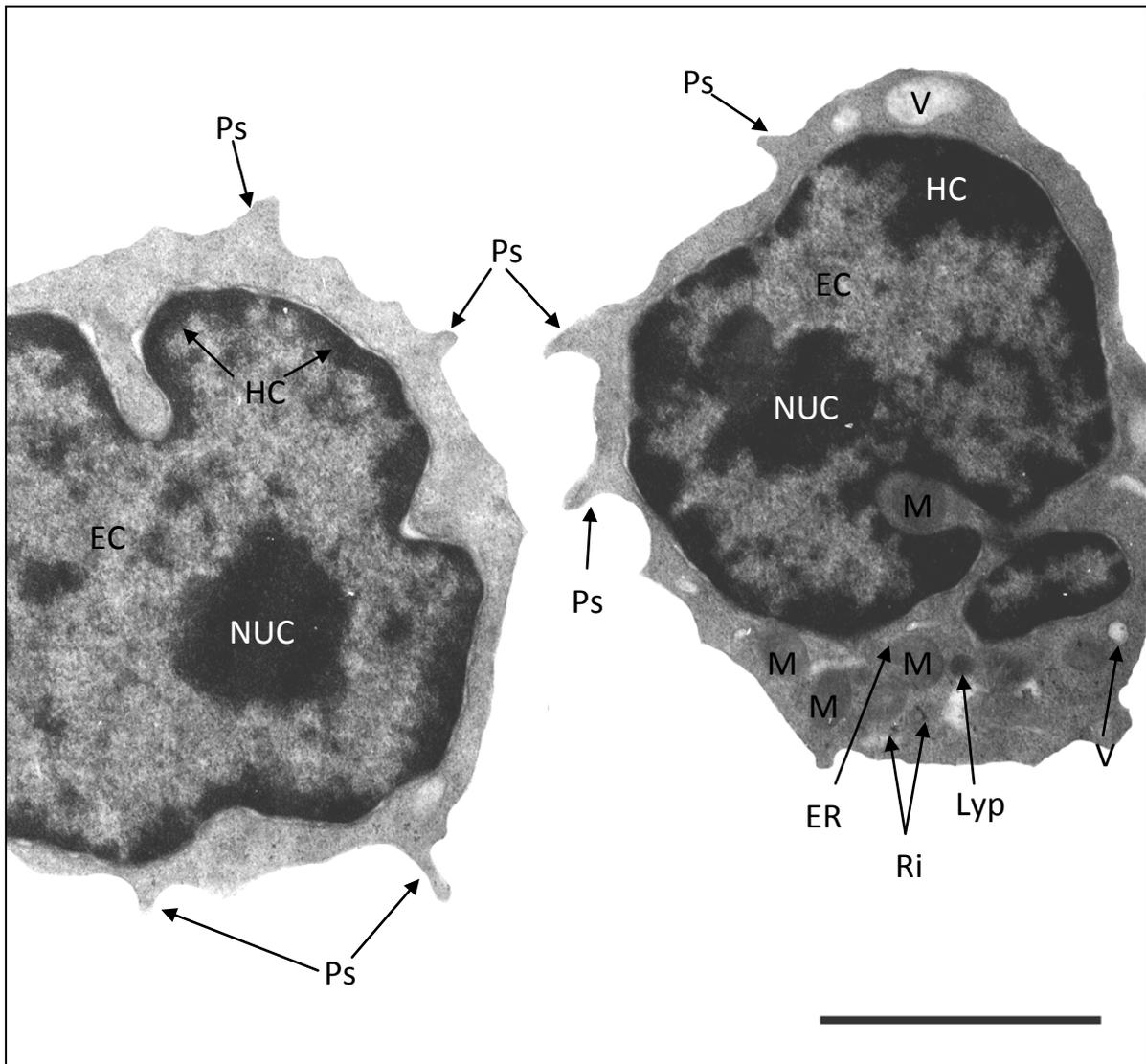


Abbildung 4.18: Zwei Lymphozyten

Die zwei Lymphozyten zeigen einen Zellkern mit einem Nucleolus (NUC) sowie viel Euchromatin (EC) und weniger Heterochromatin (HC). Das Zytoplasma erstreckt sich in Form von Pseudopodien (Ps) in die Umgebung. Im Zytoplasma des rechts im Bild gelegenen Lymphozyten befinden sich Mitochondrien (M), primäre Lysosomen (Lyp) und Vakuolen (V). Weiterhin sind Anschnitte des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Ribosomen (Ri) zu sehen. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 2 μ m.

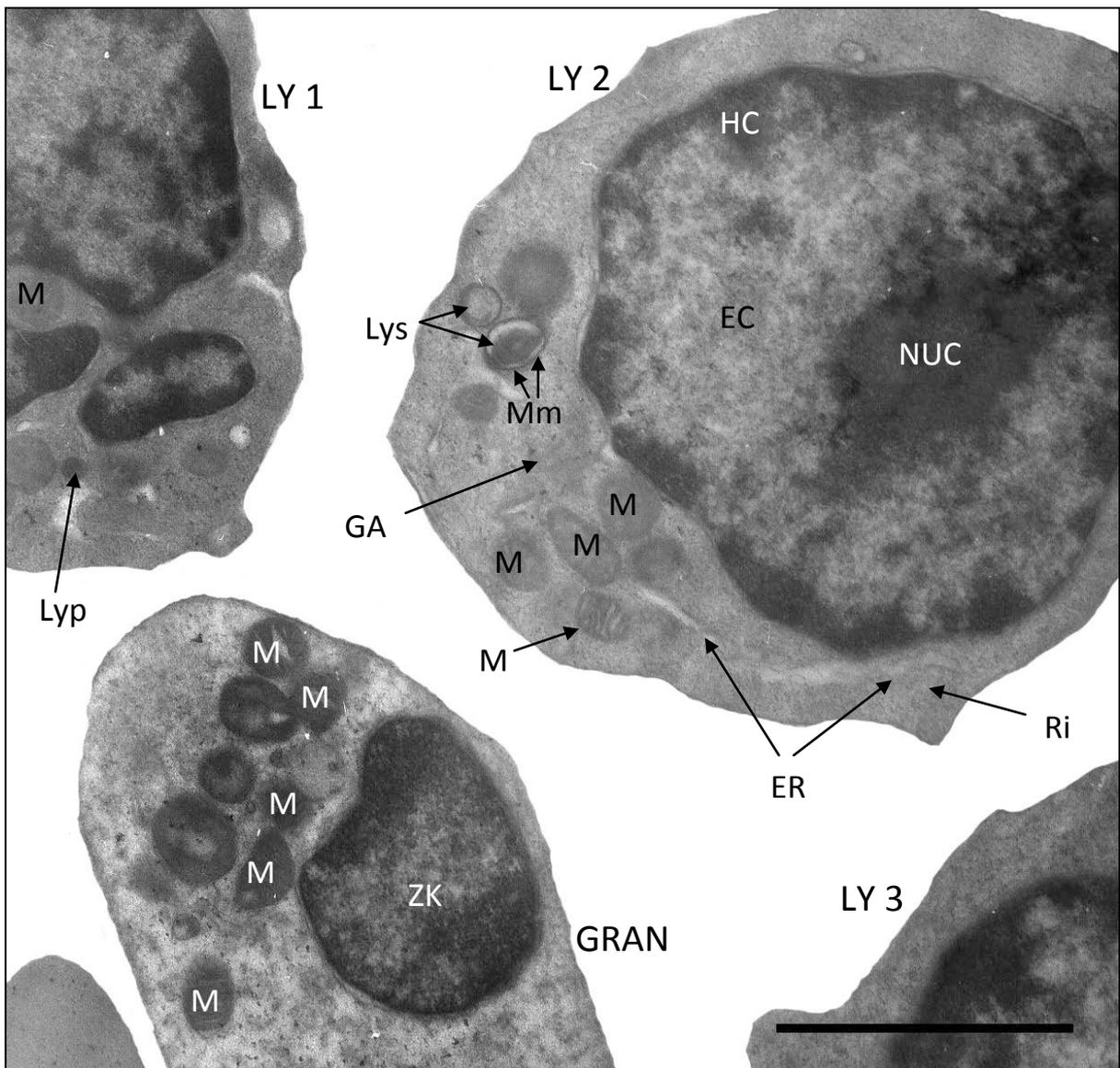


Abbildung 4.19: Lymphozyten und Granulozyt

LY 1 = Lymphozyt 1: Im Zytoplasma des Lymphozyten sind Mitochondrien (M), Ribosomen (Ri) und primäre Lysosomen (Lyp) erkennbar.

LY 2 = Lymphozyt 2: Der Lymphozyt hat keine Pseudopodien. Der Zellkern enthält viel Euchromatin (EC) und wenig Heterochromatin (HC) im Randbereich. Ein Nucleolus (NUC) ist deutlich zu sehen. Im Zytoplasma befinden sich zahlreiche Mitochondrien (M) vom Crista-Typ und Anschnitte des endoplasmatischen Retikulums (ER). Im Bereich des Golgi-Apparates (GA) sind kleine Vesikel erkennbar. Weiterhin befinden sich im Zytoplasma sekundäre Lysosomen (Lys), die von einer Membran (Mm) umgrenzt sind und einen inhomogenen Inhalt zeigen. GRAN = Granulozyt: Der Granulozyt weist zahlreiche Mitochondrien (M) auf. LY 3 = Lymphozyt 3. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 2 μ m.

4.3.4 Monozyten

Der Monozyt ist eine insgesamt runde, je nach Anschnitt auch ovale Zelle mit wenigen Pseudopodien. Der Zellkern ist pleomorph und enthält viel Euchromatin. Heterochromatin ist vor allem im Randbereich des Zellkerns lokalisiert. Teilweise kann ein Nukleolus identifiziert werden. Im Zytoplasma kann man große Mitochondrien und Querschnitte von endoplasmatischem Retikulum mit zahlreichen Ribosomen erkennen. Letztere sind teilweise zu Polyribosomen zusammengelagert. Zisternen des Golgi-Apparates sind zumeist gut ausgeprägt. Die Granula bzw. Lysosomen im Monozyten sind elektronendicht mit homogenem Inhalt. Es sind zudem kleinere, nicht ganz so elektronendichte, unreife Granula vorhanden. Außerdem können Sekretvakuolen beobachtet werden. Sehr gut kann man bei einigen Monozyten auch die innere und äußere Kernmembran (Membrana nuclearis interna und externa) sehen, zwischen denen sich das Spatium perinucleare befindet. Über die Verschlussmembran der Kernporen (Diaphragma pori) steht der Zellkern mit dem Zytoplasma in Verbindung.

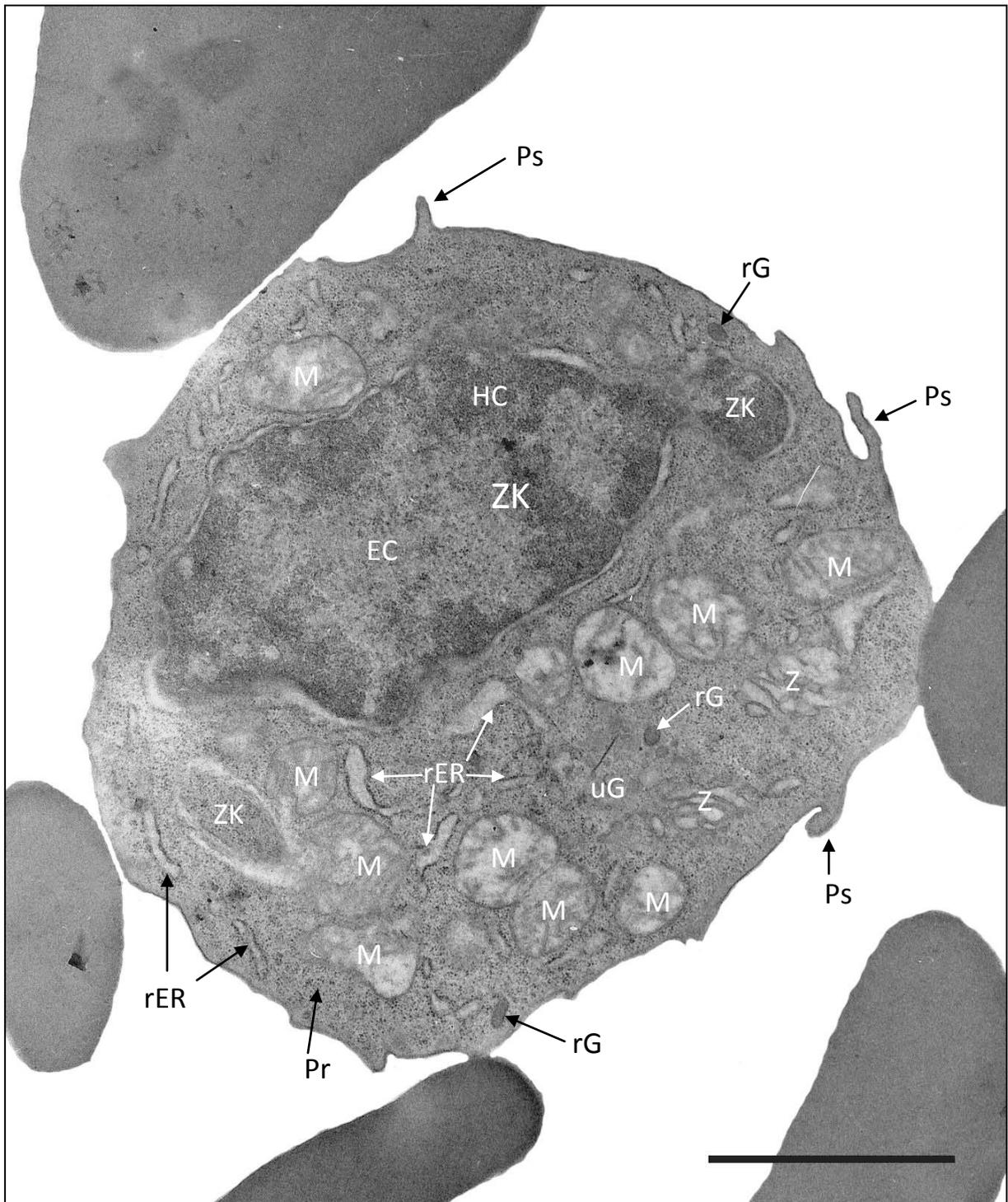


Abbildung 4.20: Monozyt I

Der Zellkern (ZK) des Monozyten ist mehrfach angeschnitten. Er enthält viel Euchromatin (EC) und wenig Heterochromatin (HC). Von der insgesamt runden Zelle erstrecken sich Pseudopodien (Ps) in die Umgebung. Im Zytoplasma finden sich zahlreiche, große Mitochondrien (M) vom Crista-Typ. Weiterhin sind viele Anschnitte des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) und zahlreiche Ribosomen, teilweise auch Polyribosomen (Pr) zu erkennen. Zisternen (Z) des Golgi-Apparates sind außerdem identifizierbar. Vereinzelt sind reife, elektronendichte, homogene Granula (rG) im Zytoplasma zu sehen, außerdem Ansammlungen von unreifen Granula (uG). Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 2 μ m.

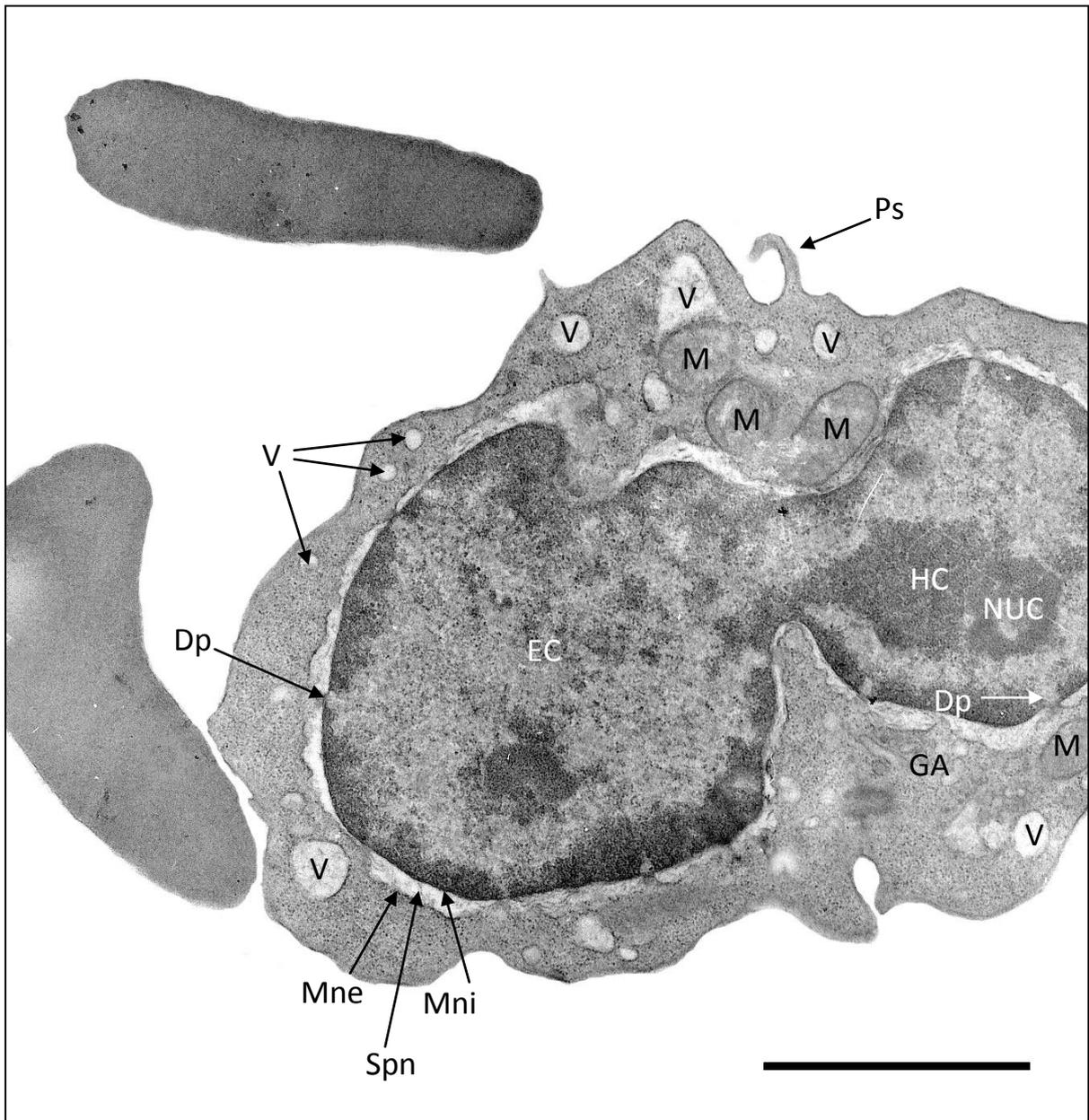


Abbildung 4.21: Monozyt II

Der Monozyt hat einen pleomorphen Zellkern, der viel Euchromatin (EC), aber wenig Heterochromatin (HC) besitzt. Im Zytoplasma sieht man Sekretvakuolen (V), Mitochondrien (M) und zahlreiche Ribosomen. Golgi-Apparat (GA). Diaphragma pori (Dp) = Kernporenverschlussmembran. Membrana nuclearis interna (Mni). Membrana nuclearis externa (Mne). Spatium perinucleare (Spn). Nucleolus (NUC). Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 2 μ m.

4.3.5 Neutrophile Granulozyten

Der neutrophile Granulozyt stellt sich in der Elektronenmikroskopie als runde Zelle mit segmentiertem Zellkern dar. Dieser enthält mehr Heterochromatin als Euchromatin, das sich vor allem im Zentrum des Zellkerns befindet. Das Zytoplasma stülpt sich mit seinen Pseudopodien vor. Im Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten sind drei verschiedene Arten von Granula deutlich voneinander abgrenzbar. Hierbei handelt es sich um die größeren, meist ovalen, elektronendichteren primären Granula, um die zahlreicheren, sekundären Granula und einige wenige, kleine, sehr stark elektronendichte, tertiäre Granula. Die sekundären Granula sind meist rundlich (siehe Abbildung 4.22). Primäre und sekundäre Granula sind oft auch elliptisch oder länglich. Einige sekundäre Granula weisen eine Extraktion ihres Inhalts auf. Die tertiären Granula sind sehr klein und elektronendicht, können jedoch von den zahlreichen Glykogenpartikeln anhand ihrer Größe unterschieden werden. Im Zytoplasma sind außerdem Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum, selten Anschnitte des Golgi-Apparates, zu sehen.

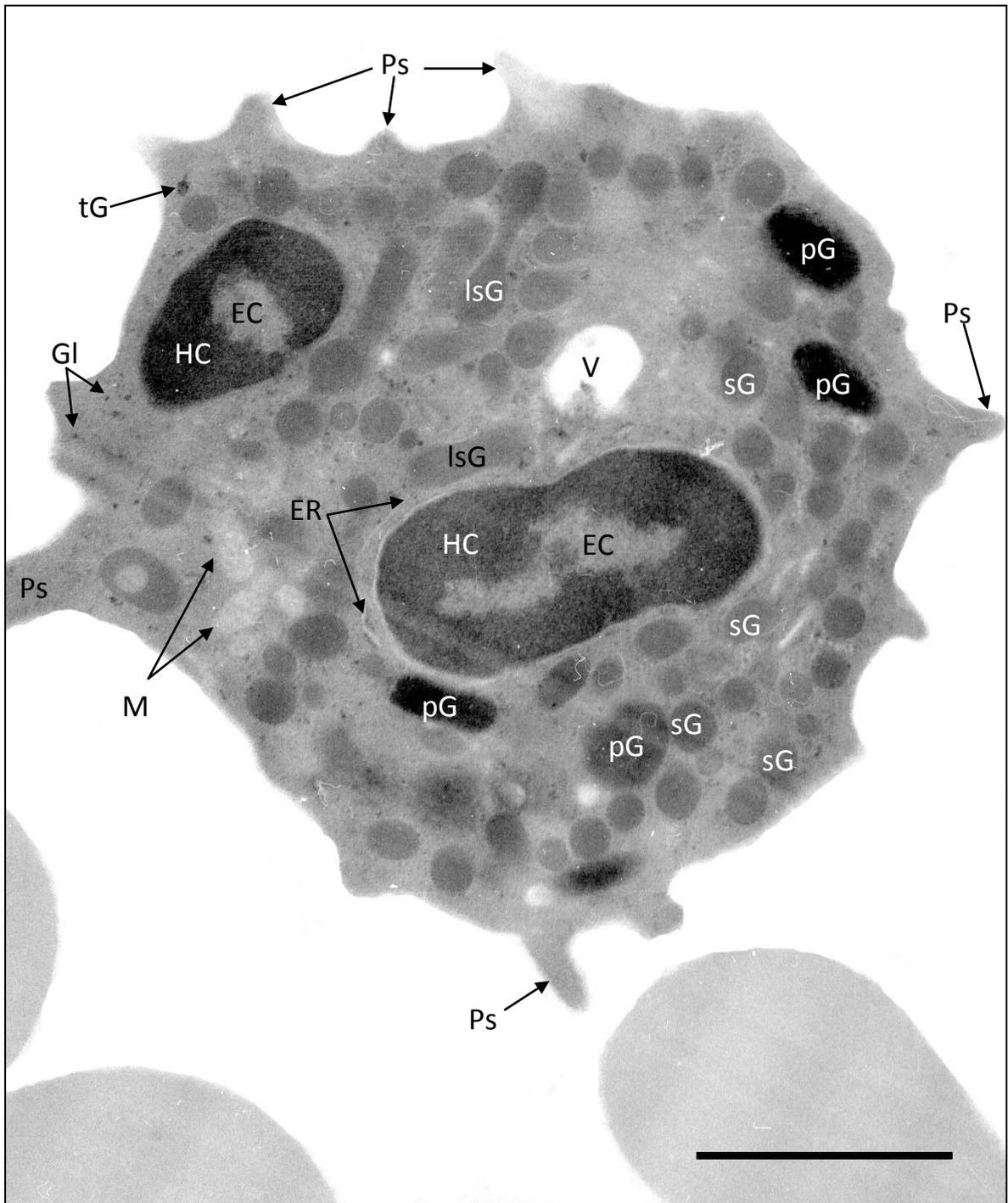


Abbildung 4.22: Neutrophiler Granulozyt I

Der Zellkern des neutrophilen Granulozyten enthält viel Heterochromatin (HC) und wenig Euchromatin (EC). Von seinem Zytoplasma erstrecken sich Pseudopodien (Ps) in die Umgebung. Im Zytoplasma befinden sich wenige stark elektronendichte, primäre Granula (pG). Sie sind elliptisch, teilweise auch von länglicher Form. Sekundäre Granula (sG) sind zahlreich vertreten und zeigen auch längliche Formen (lsG). Tertiäre Granula (tG) können auch beobachtet werden. Weiterhin sind im Zytoplasma Glykogenpartikel (Gl), Mitochondrien (M) und Anschnitte des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu sehen. V = Vakuole. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 1 μm .

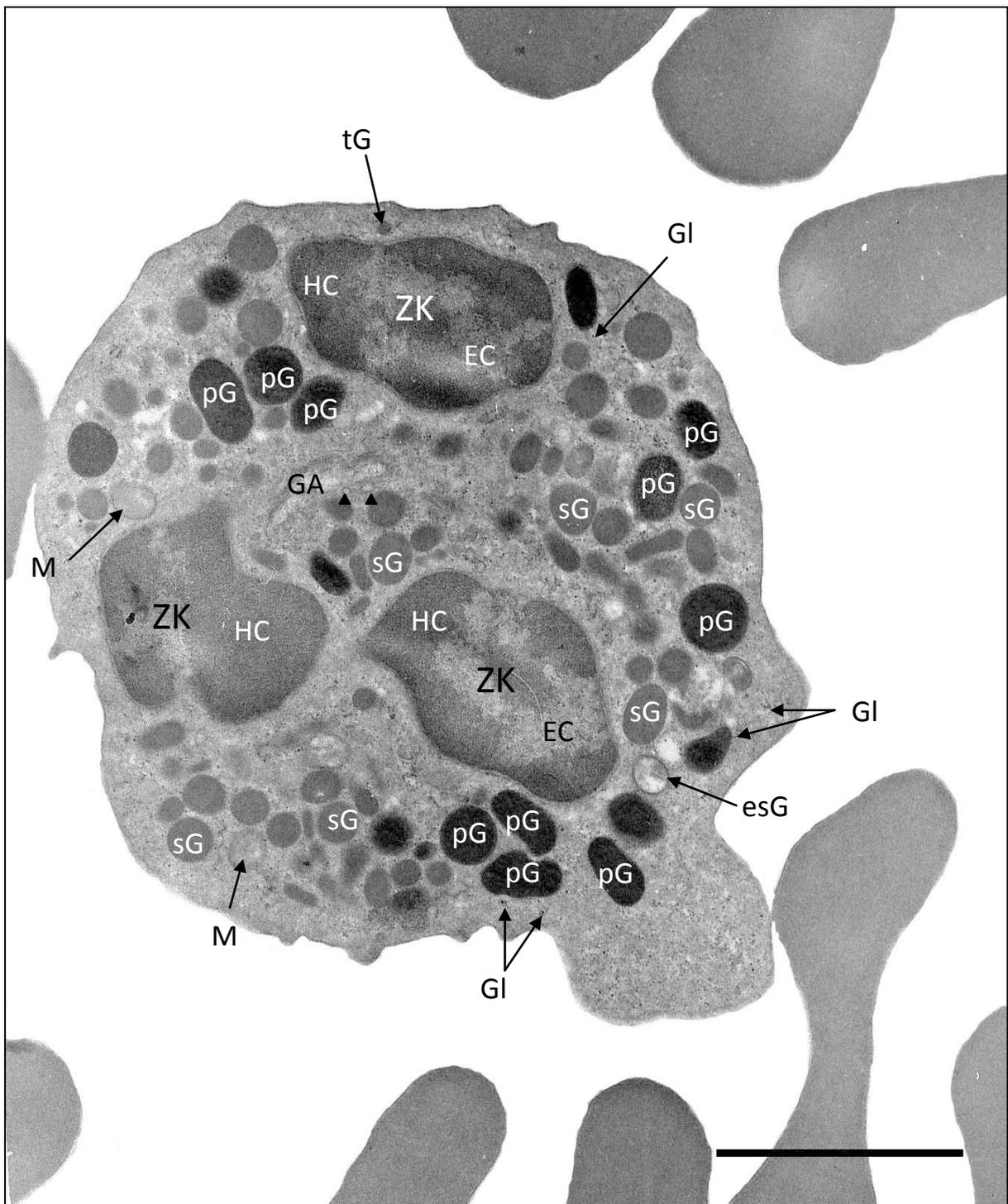


Abbildung 4.23: Neutrophiler Granulozyt II

Der neutrophile Granulozyt hat einen vielfach gelappten Zellkern (ZK) mit wenig Euchromatin (EC) und viel Heterochromatin (HC). Im Zytoplasma befinden sich große, elektronendichte, primäre Granula (pG) von runder oder länglicher Gestalt. Die sekundären Granula (sG) sind zahlreicher und weniger elektronendicht. Zudem sind auch sekundäre Granula mit einer Extraktion ihres Inhalts (esG) zu sehen. Tertiäre Granula (tG) und Mitochondrien (M) sind außerdem vorhanden. Im Zytoplasma ist zudem die Golgi-Apparat (GA) gut zu erkennen. Von diesem schnüren sich kleine Vesikel (kleine Pfeile) ab. Glykogen (GI). Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 2 μ m.

4.3.6 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind große, runde Zellen mit einer glatten Zellmembran und wenigen Pseudopodien. Der zweigeklappte Zellkern ist in zwei gleichmäßig ovale Kernsegmente aufgeteilt. Im Gegensatz zum neutrophilen Granulozyten enthält er mehr Euchromatin, das zentral im Zellkern liegt. Im Zytoplasma kann man die großen, sekundären Granula deutlich erkennen. Sie zeichnen sich durch ihre homogene Struktur von hoher Elektronendichte und ihre teilweise backsteinförmige oder spitzovale Form aus. Im Zytoplasma befinden sich einige Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Anschnitte des Golgi-Apparates und Glykogenpartikel.

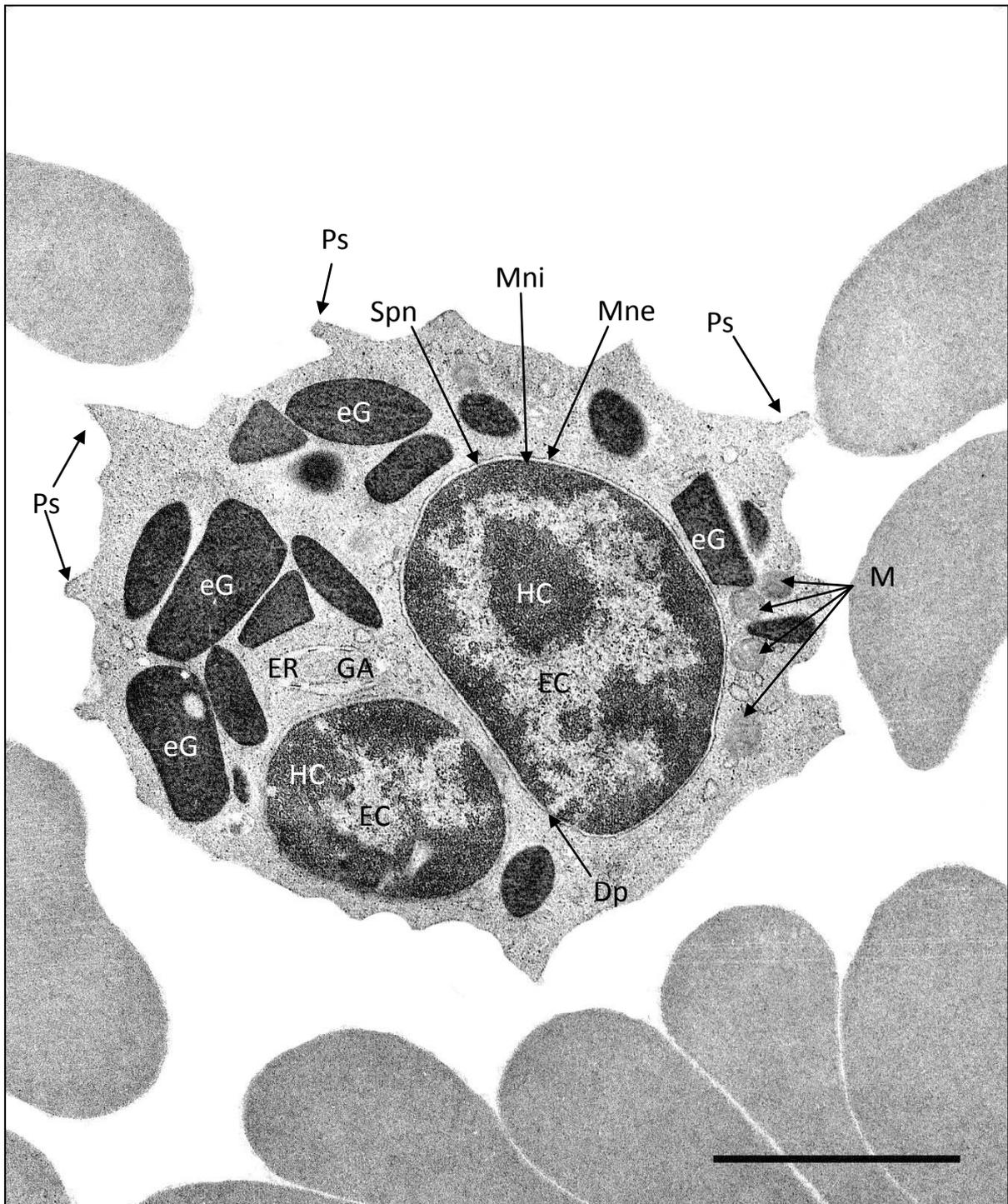


Abbildung 4.24: Eosinophiler Granulozyt

Der eosinophile Granulozyt hat eine glatte Zellmembran. Pseudopodien (Ps) erstrecken sich in die Umgebung. Der Zellkern enthält viel Heterochromatin (HC) und weniger Euchromatin (EC) im Inneren. Im Zytoplasma liegen die homogen elektronendichten, teilweise backsteinförmigen, eosinophilen Granula (eG). Ein gut ausgeprägter Golgi-Apparat (GA), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Mitochondrien (M) sind außerdem vorhanden. Diaphragma pori (Dp) = Kernporenverschlussmembran. Membrana nuclearis interna (Mni). Membrana nuclearis externa (Mne). Spatium perinucleare (Spn). Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 2 µm.

4.4 Enzymhistochemische Untersuchungen

Die Auswertung der enzymhistochemischen Färbungen erfolgte mit dem Lichtmikroskop „Aristoplan“ von der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar). Die Fotoaufnahmen wurden mit einer daran gekoppelten Canon-Powershot-A95-Digitalkamera erstellt.

4.4.1 Nachweis der Peroxidase

Eine positive Reaktion zeigte sich in allen Blutaussstrichen bei neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Dabei fiel die Stärke der Reaktion in ein- und demselben Blutaussstrich bei den einzelnen neutrophilen Granulozyten etwas unterschiedlich aus, war jedoch stets positiv. Bei den eosinophilen Granulozyten war zu sehen, dass die schwarze Anfärbung vor allem in der Matrix der eosinophilen Granula lokalisiert war. Bei den neutrophilen Granulozyten färbten sich die Granula schwarz an.

Blutzellen	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Erythrozyten	negativ	-	-
Thrombozyten	negativ	-	-
Lymphozyten	negativ	-	-
Monozyten	negativ	-	-
Neutrophile Granulozyten	positiv	schwarz	granulär im Zytoplasma
Eosinophile Granulozyten	positiv	schwarz	Matrix der eosinophilen Granula
Basophile Granulozyten	negativ	-	-

Tabelle 4.15: Aktivität der Peroxidase in den Blutzellen des Kaninchens

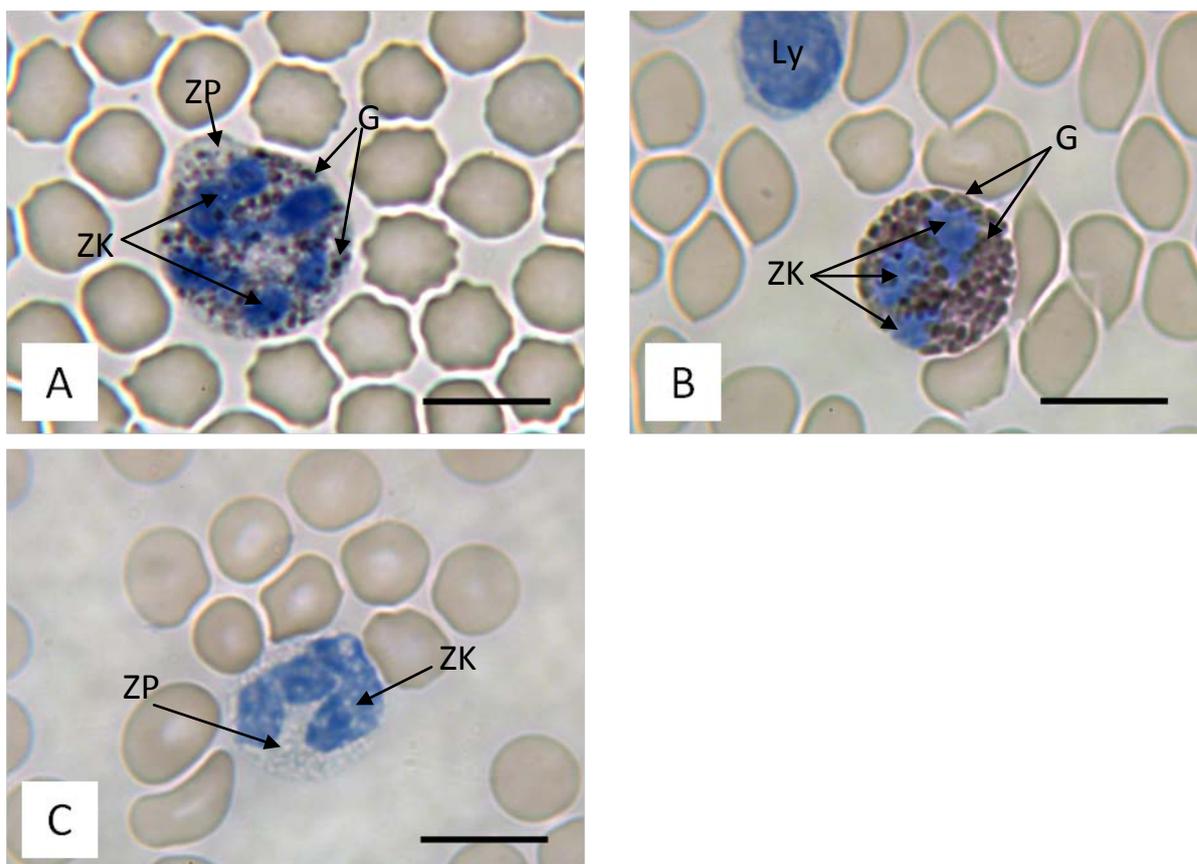


Abbildung 4.25: Aktivität der Peroxidase in den Blutzellen des Kaninchens

A. Der neutrophile Granulozyt zeigt schwarze Peroxidase-positive Granula (G), die im ganzen Zytoplasma (ZP) verteilt sind. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

B. Eosinophiler Granulozyt. Eine deutlich positive Reaktion ist in den eosinophilen Granula (G), vor allem in ihrer Matrix, zu sehen. Im oberen Teil des Bildes ist ein negativer Lymphozyt zu erkennen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

C. Der basophile Granulozyt ist Peroxidase-negativ. ZK = Zellkern. ZP = Zytoplasma. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μ m

4.4.2 Nachweis der sauren Phosphatase

Abgesehen von den Erythrozyten und basophilen Granulozyten zeigten die Blutzellen des Kaninchens in allen Blutaussstrichen eine positive Reaktion.

Blutzellen	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Erythrozyten ¹	negativ	-	-
Thrombozyten	positiv	rötlich	im Hyalomer
Lymphozyten	positiv	orange bis leuchtend rot	fokal im Zytoplasma
Monozyten	positiv	orangerot	fokal im Zytoplasma
Neutrophile Granulozyten	positiv	orangerot	granulär im Zytoplasma verteilt
Eosinophile Granulozyten	positiv	orangerot	im Zytoplasma verteilt
Basophile Granulozyten	negativ	-	-

Tabelle 4.16: Aktivität der sauren Phosphatase in den Blutzellen des Kaninchens

¹ Erythrozytenvorfürer mit Zellkern weisen im Zytoplasma rötliche Reaktionsprodukte auf.

Im Gegensatz zu den reifen Erythrozyten wiesen Erythrozytenvorläufer mit Zellkern eine positive, fokale Reaktion auf (siehe Abbildung 4.26). Positive Retikulozyten konnten in keinem der Blutausstriche identifiziert werden. Die Thrombozyten reagierten im Hyalomere fokal positiv (siehe Abbildung 4.26). Auch die Lymphozyten hatten kräftig gefärbte, umschriebene Reaktionsprodukte im Zytoplasma (siehe Abbildung 4.26). Monozyten waren in allen Blutausstrichen stets positiv, mit einer starken granulären Reaktion (siehe Abbildung 4.26). Mit Hilfe des Nachweises der sauren Phosphatase konnte man außerdem die verschiedenen Granulozytentypen gut voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 4.27). Die beim neutrophilen Granulozyten feinen, granulären Reaktionsprodukte unterschieden sich in ihrer Anfärbung deutlich von den Reaktionsprodukten der eosinophilen Granulozyten, die vor allem intergranulär auftraten. Der basophile Granulozyt war hingegen negativ.

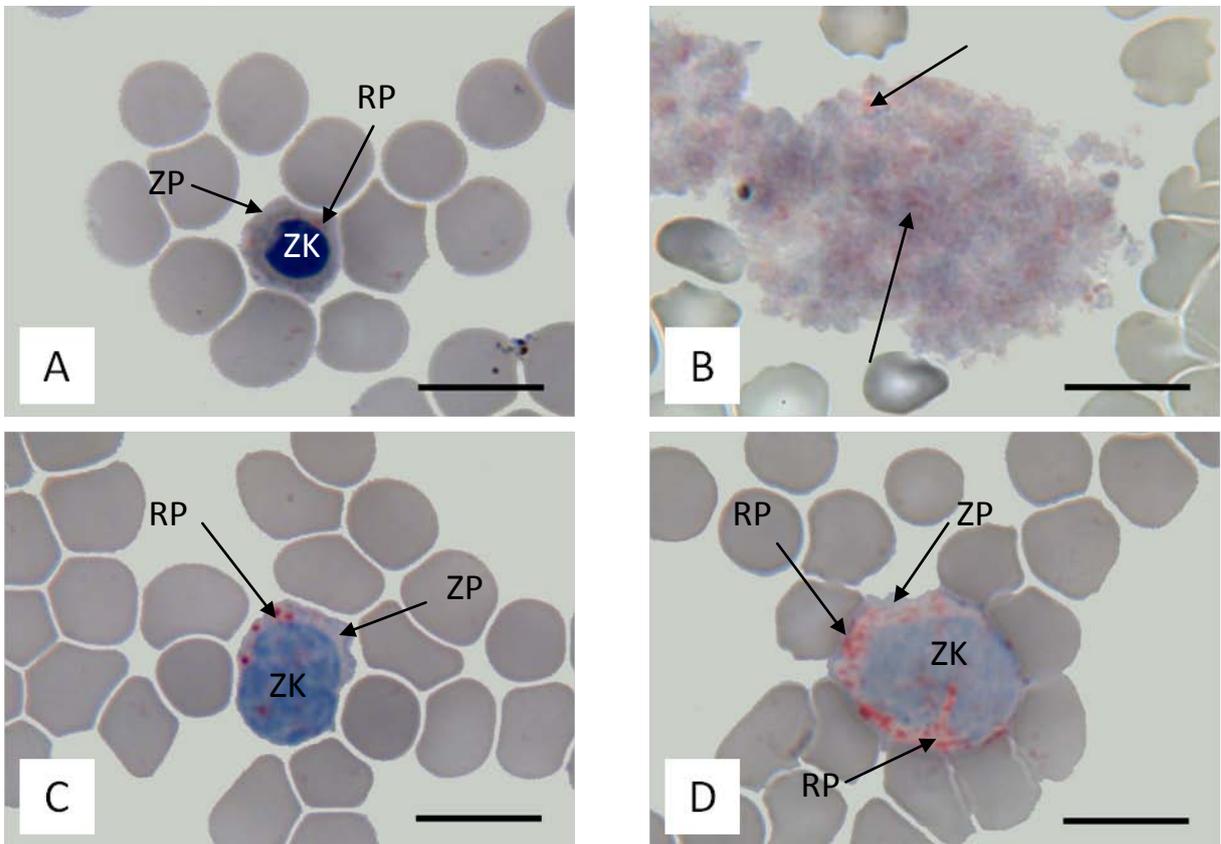


Abbildung 4.26: Saure Phosphatase – Normoblast, Thrombozyten, Lymphozyt, Monozyt

A. Im Zytoplasma (ZP) des Normoblasten befinden sich fokale Reaktionsprodukte (RP). ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

B. Die Thrombozyten zeigen eine fokale, positive Reaktion (Pfeile). Kaninchen, m, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

C. Beim Lymphozyten sind mehrere fokale, dunkelrote Reaktionsprodukte (RP) im Zytoplasma (ZP) zu sehen. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

D. Der Monozyt hat in seinem Zytoplasma (ZP) kräftig hellrote, granuläre Reaktionsprodukte (RP). ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

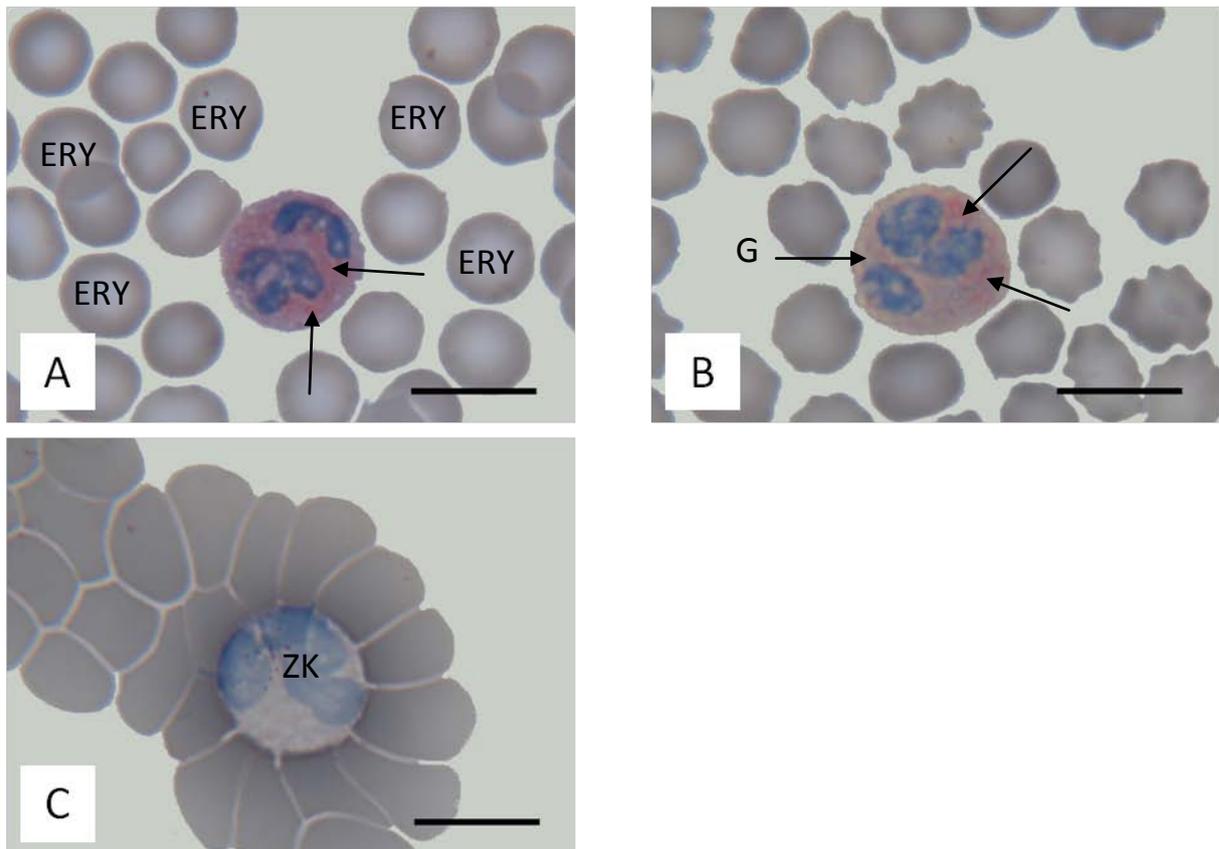


Abbildung 4.27: Saure Phosphatase – Granulozyten

A. Der neutrophile Granulozyt hat kräftig rote Reaktionsprodukte im Zytoplasma (Pfeil). Die Erythrozyten (ERY) im Blutausstrich sind negativ. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μm .

B. Der eosinophile Granulozyt zeigt kräftig hellrote Reaktionsprodukte (Pfeil), die eher intergranulär als in den eosinophilen Granula (G) lokalisiert zu sein scheinen. Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μm .

C. Beim basophilen Granulozyten, der gut an seinem plumpen Zellkern (Zk) zu erkennen ist, ist keine positive Reaktion festzustellen. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μm .

4.4.3 Nachweis der alkalischen Phosphatase

Beim Nachweis der alkalischen Phosphatase waren nur die neutrophilen Granulozyten positiv. Bei dieser Färbung kam es, wie bei dem Nachweis der Peroxidase, zu einer unterschiedlich starken Reaktion der neutrophilen Granulozyten in demselben Blutausstrich. Diese reichte von negativ über schwach positiv bis stark positiv. Dabei waren die Reaktionsprodukte hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und teilweise den Zellkern überdeckend verteilt.

Blutzellen	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Erythrozyten	negativ	-	-
Thrombozyten	negativ	-	-
Lymphozyten	negativ	-	-
Monozyten	negativ	-	-
Neutrophile Granulozyten	positiv	braun	granulär im Zytoplasma
Eosinophile Granulozyten	negativ	-	-
Basophile Granulozyten	negativ	-	-

Tabelle 4.17: Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Blutzellen des Kaninchens

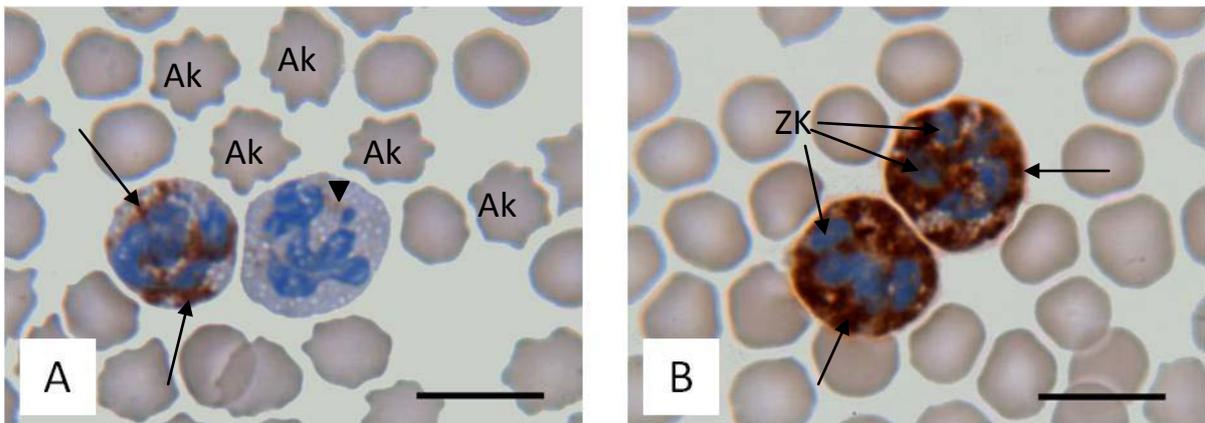


Abbildung 4.28: Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Blutzellen des Kaninchens

A. Im Zytoplasma des linken neutrophilen Granulozyten ist eine stark positive, bräunliche Reaktion zu erkennen (großer Pfeil), wohingegen der neutrophile Granulozyt, rechts im Bild, nur eine sehr schwache Reaktion zeigt (kleiner Pfeil). Im Blutausstrich sind außerdem Akanthozyten (Ak) vorhanden. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 µm.

B. Die zwei neutrophilen Granulozyten sind stark positiv (Pfeil). Die mittelblau angefärbten Zellkerne (ZK) werden stellenweise von den braunen Reaktionsprodukten überlagert. Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

4.4.4 Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase nach Löffler (1961)

Beim Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase zeigten alle Blutzellen, außer den Erythrozyten, eine positive Reaktion. Lediglich die Retikulozyten wiesen blaue Reaktionsprodukte im Zytoplasma auf. Aufgrund der Kernfärbung mit Hämalaun waren die blauen Reaktionsprodukte in den Blutzellen teilweise schwer zu identifizieren. Es konnten jedoch in jedem Blutaussstrich Zellen mit deutlich positiven Reaktionen gefunden werden.

Blutzellen	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Erythrozyten ¹	negativ	--	-
Thrombozyten	positiv	blau	granulär im Hyalomer
Lymphozyten	positiv	blau	fokal im Zytoplasma
Monozyten	positiv	blau	granulär im Zytoplasma
Neutrophile Granulozyten	positiv	blau	granulär im Zytoplasma
Eosinophile Granulozyten	positiv	blau	granulär im Zytoplasma
Basophile Granulozyten	positiv	blau	granulär im Zytoplasma

Tabelle 4.18: Aktivität der Naphthol-AS-Acetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens

¹Aktivität jedoch in Retikulozyten.

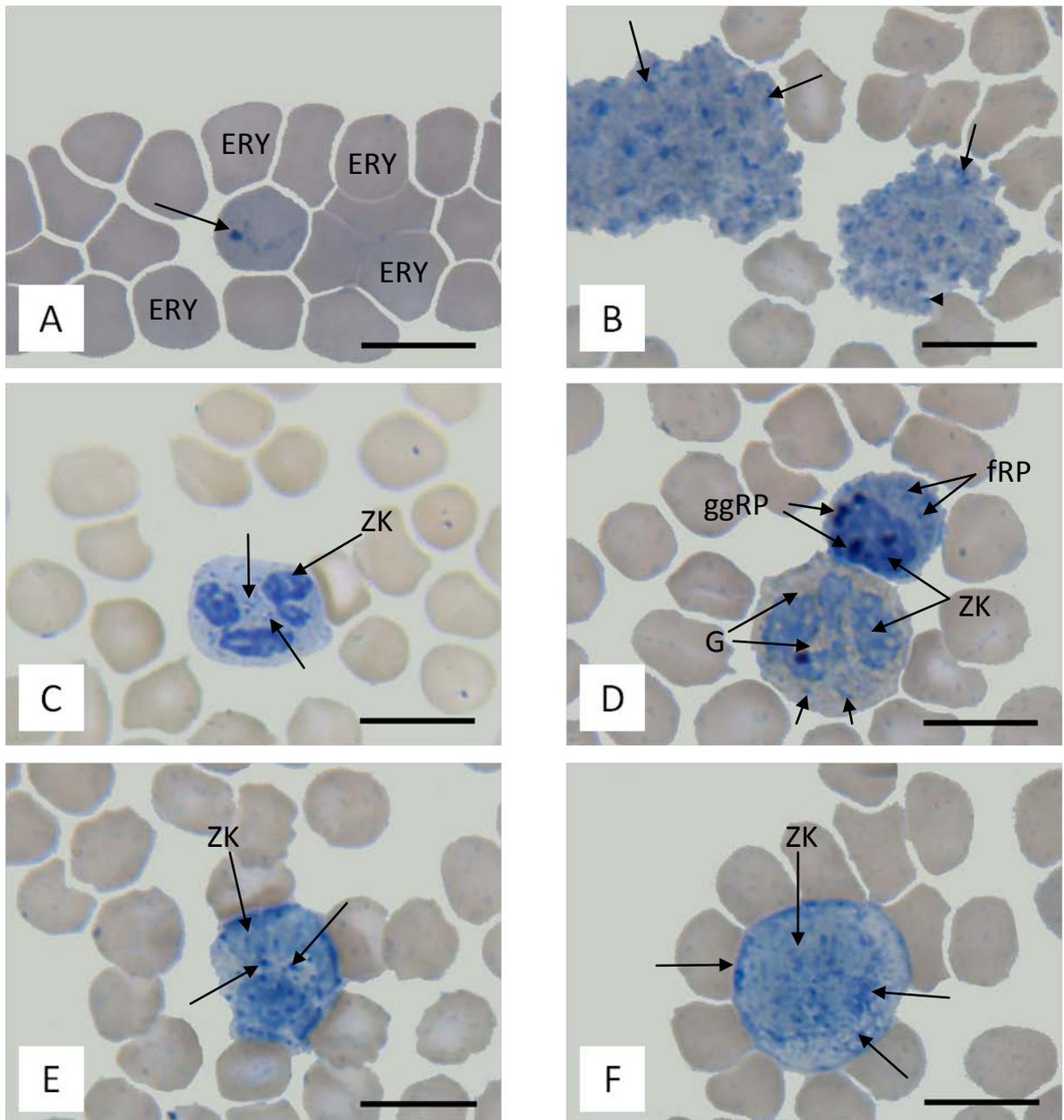


Abbildung 4.29: Aktivität der Naphthol-AS-Acetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens

A. Die Erythrozyten (ERY) sind negativ. Die Retikulozyten, deren Zytoplasma sich insgesamt dunkler anfärbt, zeigen jedoch Stellen positiver Reaktion (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

B. In den Thrombozyten ist eine kräftig blaue, granuläre Reaktion vorhanden (Pfeil), die sich im Hyalomere (kleiner Pfeil) befindet. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Der neutrophile Granulozyt zeigt feine granuläre Reaktionsprodukte im Zytoplasma (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μ m.

D. Der eosinophile Granulozyt unten im Bild ist gut an seinen großen, enzymnegativen Granula (G) zu erkennen. Positive Reaktionsprodukte sind intergranulär (Pfeil) zu sehen. Im Zytoplasma des Lymphozyten befinden sich große, stark positive Reaktionsprodukte (ggRP) und feinere, granuläre Reaktionsprodukte (fgRP). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m

E. Der basophile Granulozyt hat einen plumpen und leicht exzentrisch gelegenen Zellkern (ZK), der von deutlich positiven, granulären Reaktionsprodukten (Pfeil) überlagert wird. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

F. Der Monozyt enthält deutlich positive, granuläre Reaktionsprodukte (Pfeil) im Zytoplasma, die teilweise den Zellkern überlagern (ZK). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.4.5 Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase nach Löffler (1961)

Beim Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase kam es in allen Blutaussstrichen während der Inkubation stellenweise zu einer Präzipitation des Farbstoffes. Trotzdem konnten in jedem Ausstrich positive Blutzellen identifiziert werden. Braunrote Reaktionsprodukte zeigten die Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Teilweise waren die Zellkerne der Blutzellen so stark von Reaktionsprodukten überlagert, dass eine eindeutige Identifizierung nicht möglich war. Bei den Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten konnten auch negative Zellen beobachtet werden. In keinem Blutaussstrich wurde ein positiver basophiler Granulozyt beobachtet. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Blutzellen	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Erythrozyten	negativ	-	-
Thrombozyten	positiv	braunrot oder violett	granulär im Hyalomer
Lymphozyten	positiv/negativ	braunrot bis violett	granulär im gesamten Zytoplasma
Monozyten	positiv	braunrot bis dunkelrot	im gesamten Zytoplasma, verstärkt am Einschnitt des Zellkerns
Neutrophile Granulozyten	positiv	braunrot	granulär im gesamten Zytoplasma den Zellkern teilweise überdeckend
Eosinophile Granulozyten	positiv/negativ	braunrot	im Zytoplasma
Basophile Granulozyten	negativ	-	-

Tabelle 4.19: Aktivität der α -Naphthyl-Acetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens

In den folgenden Bildern werden Blutzellen gezeigt, bei denen die Reaktion teilweise nicht so stark ausgefallen ist, sodass eine sichere Differenzierung der Blutzellen möglich war.

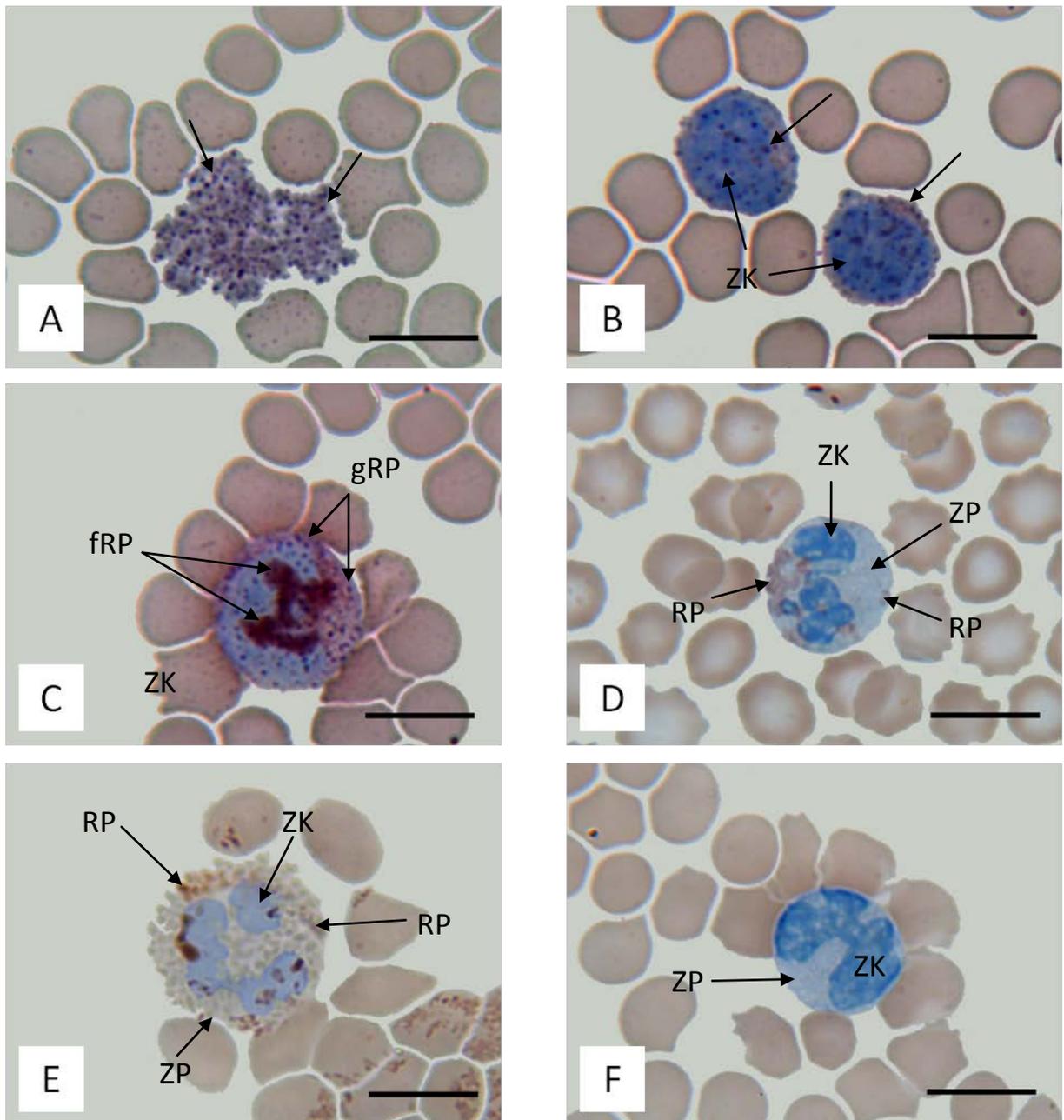


Abbildung 4.30: Aktivität der α Naphthyl-Acetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens

A. Die Thrombozyten zeigen eine deutlich positive, granuläre Reaktion (Pfeil). Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

B. Im gesamten Zytoplasma der Lymphozyten sind violettrote, granuläre Reaktionsprodukte zu erkennen (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

C. Die Reaktionsprodukte im Monozyten sind zum einen granulär (gRP), zum anderen ist im Bereich der Einkerbung des Zellkerns eine verstärkte, flächige Ablagerung von Reaktionsprodukten zu erkennen (fRP). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

D. Der neutrophile Granulozyt weist wenig braunrote Reaktionsprodukte (RP) im Zytoplasma (ZP) auf. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

E. Der eosinophile Granulozyt zeigt nur wenig Reaktionsprodukte (RP). ZP = Zytoplasma. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

F. Der basophile Granulozyt ist negativ. Sein Zellkern (ZK) ist plump und liegt exzentrisch in der Zelle. ZP = Zytoplasma. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μ m.

4.4.6 Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

nach Moloney u. Mitarbeiter (1960)

Beim Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase kam es bei Verwendung des Michaelis-Barbital-Natrium-Puffers zur Ausfällung der Substrat-Farbstoffverbindung, sodass keine Bindung an die Blutzellen erfolgte. Alternativ wurde daraufhin die Färbung erneut mit PBS-Puffer durchgeführt. Hier zeigten sich positive Reaktionen bei einem pH-Wert von 6,5 und 7,4. Deutlich positive Reaktionen waren bei der Kombination von Hämalaun und Fast Blue (pH 6,5) sowie bei Kernechtrot und Fast Blue bei einem pH-Wert von 7,4 zu sehen. Die Anfärbung mit Kernechtrot bei einem pH-Wert von 6,5 war sehr viel schwächer als bei pH 7,4, sodass nur letztere für die Auswertung berücksichtigt wird.

Blutzellen	Enzymaktivität pH 7,4	Kernfärbung (Kernechtrot)	Art der Anfärbung (Fast Blue BB)	Lokalisation
Erythrozyten	-	-	-	-
Thrombozyten	positiv	-	blassblau	fokal im Hyalomer
Lymphozyten	negativ	blassrosa	-	-
Monozyten	negativ	blassrosa	-	-
Neutrophile Granulozyten	positiv	blassrosa	kräftig hellblau	granulär im Zytoplasma
Eosinophile Granulozyten	negativ	blassrosa	-	-
Basophile Granulozyten	negativ	blassrosa	-	-

Tabelle 4.20: Aktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase bei einem pH-Wert von 7,4 in den Blutzellen des Kaninchens

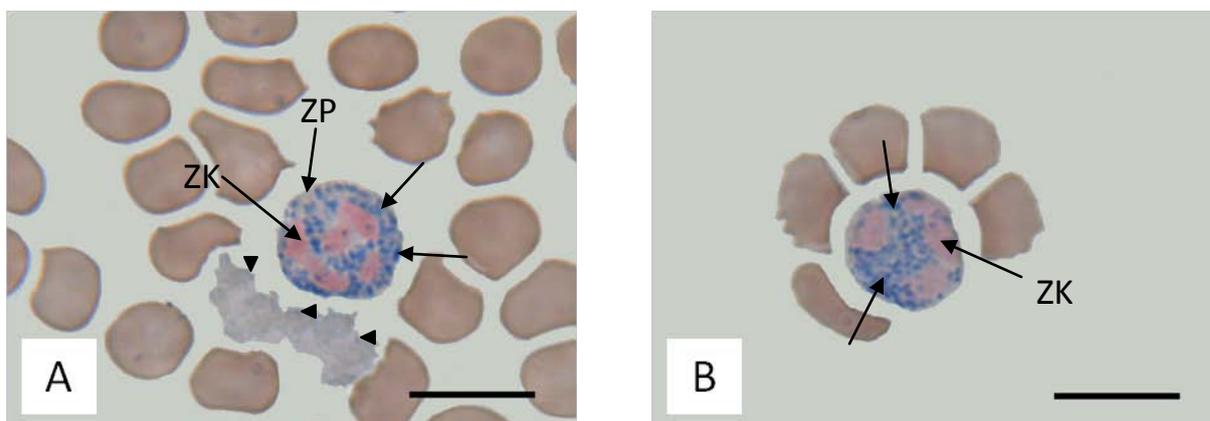


Abbildung 4.31: Aktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase bei einem pH-Wert von 7,4

A. Der neutrophile Granulozyt zeigt granuläre Reaktionsprodukte (Pfeil) im Zytoplasma (ZP). In den Thrombozyten sind auch granuläre, jedoch schwächer angefärbte Reaktionsprodukte im Hyalomer zu sehen (kleiner Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

B. Der neutrophile Granulozyt weist zahlreiche Chloracetat-Esterase-positiv Granula (Pfeil) in seinem Zytoplasma auf. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

Blutzellen	Enzymaktivität pH 6,5	Kernfärbung (Hämalaun)	Art der Anfärbung (Fast Blue BB)	Lokalisation
Erythrozyten	-	-	-	-
Thrombozyten	positiv	-	blau	feine Granula
Lymphozyten	negativ/positiv	blau	braun/blau	feine Granula
Monozyten	negativ	blau	-	-
Neutrophile Granulozyten	positiv	blau	braun/blau	granulär im Zytoplasma
Eosinophile Granulozyten	negativ	blau	-	-
Basophile Granulozyten	negativ	blau	-	-

Tabelle 4.21: Aktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase bei einem pH-Wert von 6,5 in den Blutzellen des Kaninchens

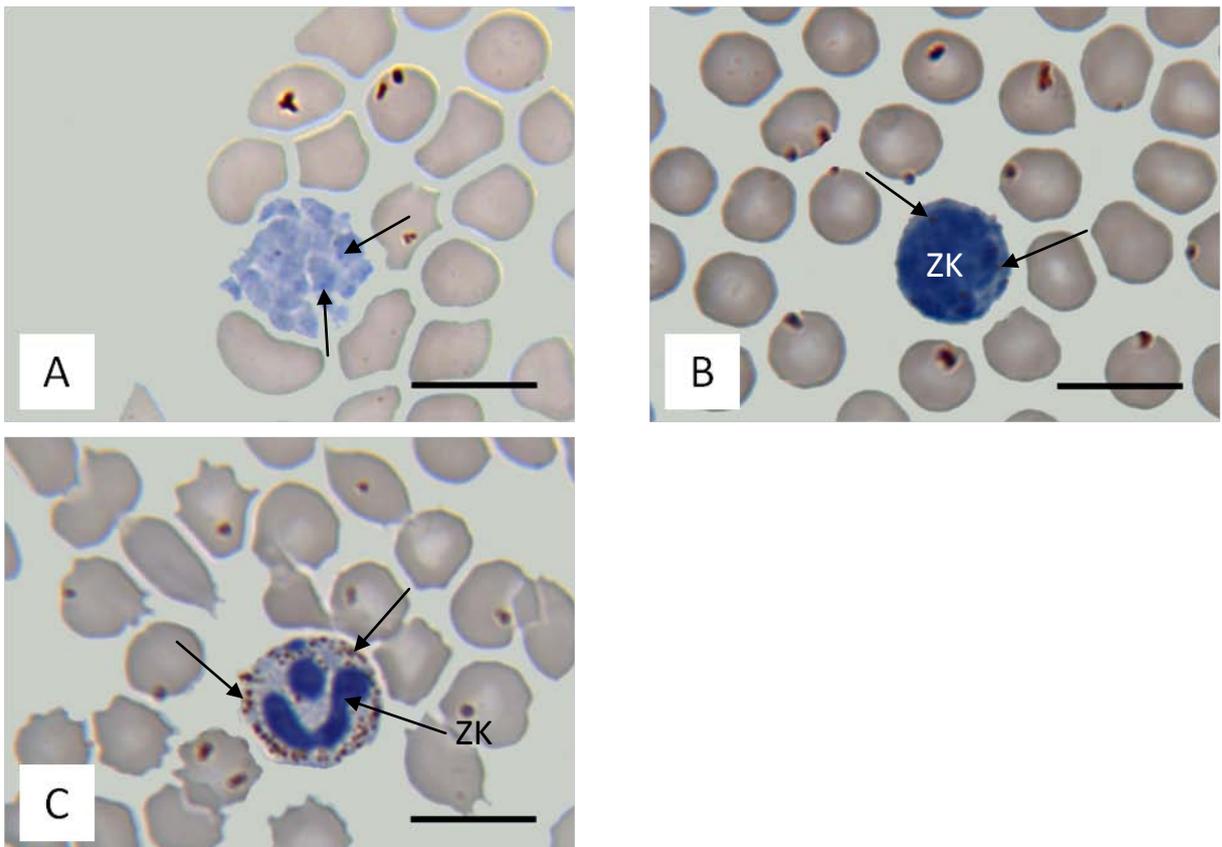


Abbildung 4.32: Aktivität der Chloracetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens bei pH 6,5

A. Im Hyalomere des Thrombozyten sind granuläre Reaktionsprodukte (Pfeil) zu sehen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. Feine granuläre Reaktionsprodukte sind im Lymphozyten im Zytoplasma verteilt (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

C. Der neutrophile Granulozyt zeigt deutliche, braune Granula in seinem Zytoplasma (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

4.4.7 Nachweis der β -Glucuronidase

Die Reaktion der Blutzellen beim Nachweis der β -Glucuronidase fiel sehr unterschiedlich aus. Die Erythrozyten waren stets negativ, Thrombozyten stets schwach positiv. Die Lymphozyten hingegen waren, abhängig von der Lokalisation im Blutaussstrich und der Blutprobe, positiv oder negativ. Dies konnte auch bei den neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Stets positiv hingegen waren die eosinophilen Granulozyten mit teilweise kräftig roten Granula. Die basophilen Granulozyten zeigten, wie auch die neutrophilen Granulozyten, nur eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma. Die stärkste Reaktion von allen Blutzellen war bei den Monozyten zu sehen. Sie wiesen ein kräftig rot angefärbtes Zytoplasma und teilweise auch dunkelrot angefärbte Granula auf.

Blutzellen	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Erythrozyten ¹	negativ	-	-
Thrombozyten	schwach positiv	blassrot	granulär im Hyalomer
Lymphozyten	positiv/negativ	rot bis rosa	fokal oder granulär
Monozyten	stark positiv	leuchtend rot bis dunkelrot	granulär und im Zytoplasma
Neutrophile Granulozyten	schwach positiv/negativ	rosa	Zytoplasma
Eosinophile Granulozyten	stark positiv	rot	eosinophile Granula
Basophile Granulozyten	schwach positiv	helles Orange	Zytoplasma

Tabelle 4.22: Aktivität der β -Glucuronidase in den Blutzellen des Kaninchens

¹In den Retikulozyten ist rotes Reaktionsprodukt im Zytoplasma zu sehen.

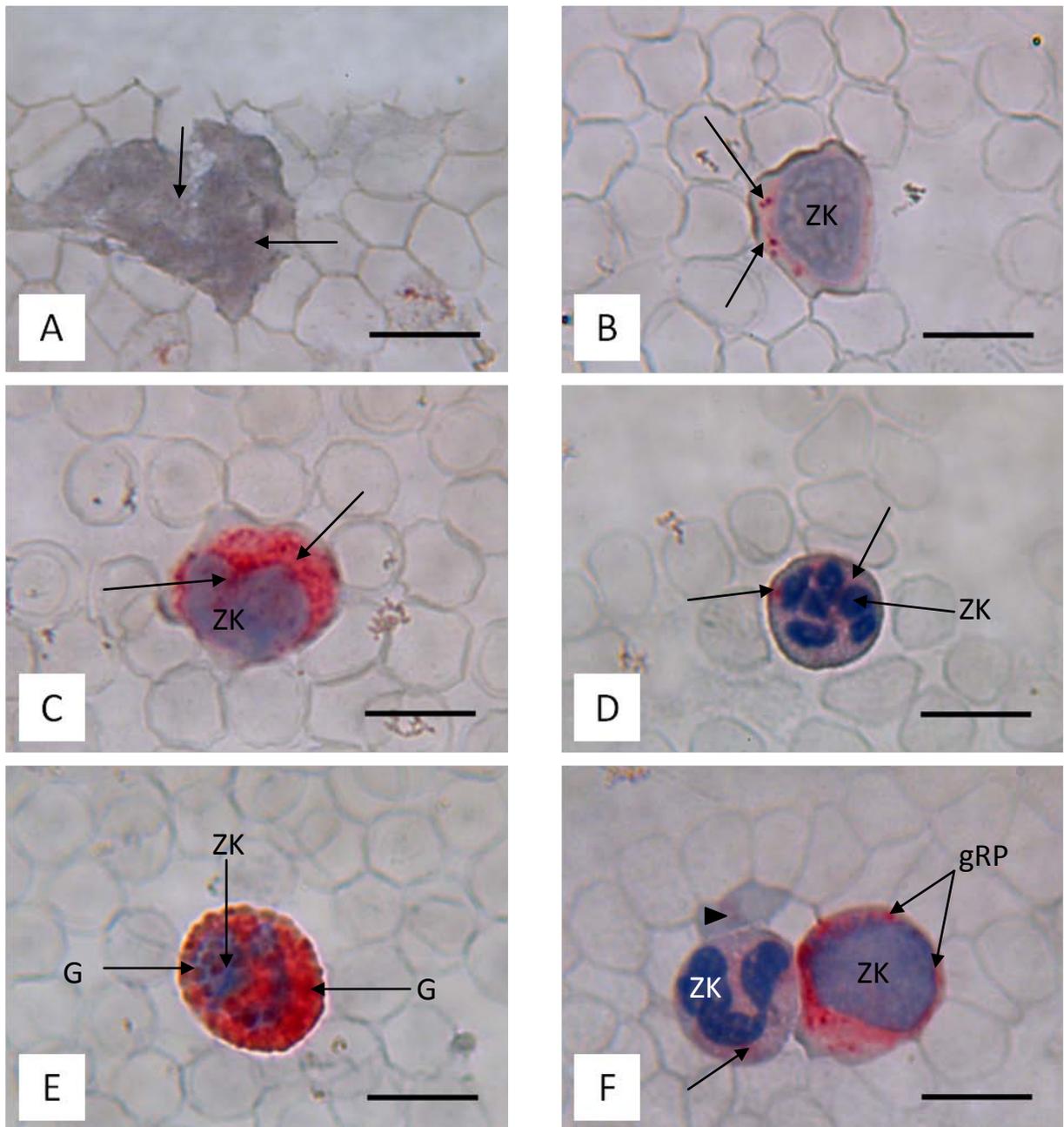


Abbildung 4.33: Aktivität der β -Glucuronidase in den Blutzellen des Kaninchens

A. In den Thrombozyten sind feine, blassrote Granula zu erkennen (Pfeile). Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

B. Im Lymphozyten befinden sich im Zytoplasma granuläre Reaktionsprodukte (Pfeile). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Positive, granuläre Reaktionsprodukte (Pfeil) sind im Zytoplasma des Monozyten vor allem in Zellkernnähe bzw. überdecken teilweise den Zellkern (ZK). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

D. Eine diffuse, blassrote Reaktion (Pfeil) ist im Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten vorhanden. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Die Granula (G) des eosinophilen Granulozyten zeigen eine stark positive Reaktion. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

F. Links im Bild ist ein basophiler Granulozyt mit einer diffusen Anfärbung des Zytoplasmas zu sehen (Pfeil). Der rechts davon gelegene kleine Monozyt hat viele, stark positive, granuläre Reaktionsprodukte im Zytoplasma (gRP). Der oberhalb des basophilen Granulozyten gelegene Retikulozyt weist rötliche Reaktionsprodukte im Zytoplasma auf (kleiner Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.5 Glykohistochemische Untersuchungen

Im Folgenden werden in den Tabellen die Ergebnisse der Untersuchung fixierter Blutausrichre in Schwarz und unfixierter Blutausrichre in Rot in Tabellen angezeigt. Dabei wird die Stärke der Fluoreszenz in eine negative (0), unspezifische (+/-), schwach positive (1+), eine deutlich bzw. mittlere positive (2+) und eine stark positive (3+) Reaktion eingeteilt. Die Auswertung der Blutausrichre erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20) der Firma Leitz, Wetzlar. Die Fotoaufnahmen wurden zum einen an diesem Mikroskop mit der Progress®CF-cool Kamera (JENOPTIK, Jena), zum anderen an dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop CLSM 510 Meta (ZEISS, Oberkochen) aufgenommen.

4.5.1 Glukose- und Mannose-spezifische Lektine

4.5.1.1 Bindung von Concanavalin Agglutinin

In den meisten unfixierten und fixierten Blutausrichren konnte eine Bindung von Con A-FITC an die Erythrozyten-Membran festgestellt werden (siehe hierzu auch Tabelle 4.23). Eine Bindung von Con A im Zytoplasma war nicht vorhanden. In einem unfixierten Blutausrichr konnte ein Normoblast identifiziert werden, der eine mittlere positive Fluoreszenz der Membran und eine Aufhellung des Zytoplasmas aufwies. Bei den Thrombozyten zeigte sich eine schwach bis deutlich positive Anfärbung des Zytoplasmas, bei einigen auch eine sehr starke Reaktion des Granulomers. In fast allen Ausrichren erfolgte eine Bindung von Con A im Hyalomer der Thrombozyten, wohingegen in nur wenigen Thrombozyten eine schwache bis mittlere Fluoreszenz an der Zellmembran vorhanden war. In fixierten Blutausrichren hatten die Lymphozyten meist eine stark positive, umschriebene Fluoreszenz im Zytoplasma, wohingegen in unfixierten Blutausrichren stets eine Bindung an die Zellmembran der Lymphozyten erfolgte und weniger im Zytoplasma. Bei allen neutrophilen Granulozyten fand eine stark positive Bindung von Con A an die Granula statt. Desweiteren war das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten stets positiv, jedoch immer schwächer als die Granula. Bei lediglich ca. 20 % der neutrophilen Granulozyten konnte in fixierten Blutausrichren eine Bindung an die Zellmembran beobachtet werden, bei unfixierten war über die Hälfte positiv. Bei den eosinophilen Granulozyten war keine Bindung von Con A im Zytoplasma zu sehen, sondern vor allem an die Granula und zu ca. 50 % in fixierten Blutausrichren auch an die Zellmembran. Im Gegensatz dazu war das Zytoplasma der basophilen Granulozyten bei ca. der Hälfte positiv, wohingegen die Zellmembran sich weitestgehend negativ zeigte. Die Granula waren mit beiden Fixationsmethoden

stets stark positiv. Bei den Monozyten konnte keine spezifische Bindung an die Zellmembran nachgewiesen werden. In fixierten Blutaussstrichen band Con A-FITC in vielen Fällen im Zytoplasma, wohingegen in luftgetrockneten Blutaussstrichen keine Bindung von Con A im Zytoplasma erfolgte. In allen Blutaussstrichen ist zusätzlich eine starke Hintergrundfärbung vorhanden.

Con A	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	14,28 %		7,14 %	35,71 %	42,85 %	85,71 %
Zytoplasma	100 %				100 %	0 %
	100 %					0 %
Thrombozyten						
Zytoplasma			57,14 %	28,57 %	14,28 %	100 %
			100 %			100 %
Granulomer	64,29 %			7,14 %	28,57 %	35,71 %
				100 %		100 %
Lymphozyten						
Membran	78,57 %		14,28 %	7,14 %		21,42 %
				33,33 %	66,67 %	100 %
Zytoplasma	7,14 %		50 %	28,57 %	14,28 %	92,86 %
	66,67 %			33,33 %		33,33 %
Neutrophile Granulozyten						
Membran	78,57 %		7,14 %	7,14 %	7,14 %	21,42 %
	33,33 %			66,67 %		66,67 %
Granula					100 %	100 %
					100 %	100 %
Zytoplasma	7,14 %	28,57 %	64,29 %			64,29 %
	33,33 %		33,33 %	33,33 %		66,67 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	45,45 %		9,09 %	18,18 %	27,27 %	54,54 %
	100 %					0 %
Granula	9,09 %			27,27 %	63,64 %	90,9 %
					100 %	100 %
Zytoplasma	90,91 %				9,09 %	9,09 %
	100 %					0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	81,81 %		9,09 %		9,09 %	18,18 %
	33,33 %			33,33 %	33,33 %	66,67 %
Granula				9,09 %	90,9 %	100 %
					100 %	100 %
Zytoplasma	36,36 %		18,18 %	45,45 %		63,64 %
	66,67 %				33,33 %	33,33 %
Monozyten						
Membran	92,3 %		7,69 %			7,69 %
	66,67 %			33,33 %		33,33 %
Zytoplasma	23,08 %	7,69 %	46,15 %	15,38 %	7,69 %	69,23 %
	100 %					0 %
Vakuolen	7,69 %		7,69 %		84,62 %	92,3 %
					100 %	100 %

Tabelle 4.23: Auswertung der Bindung von Con A-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

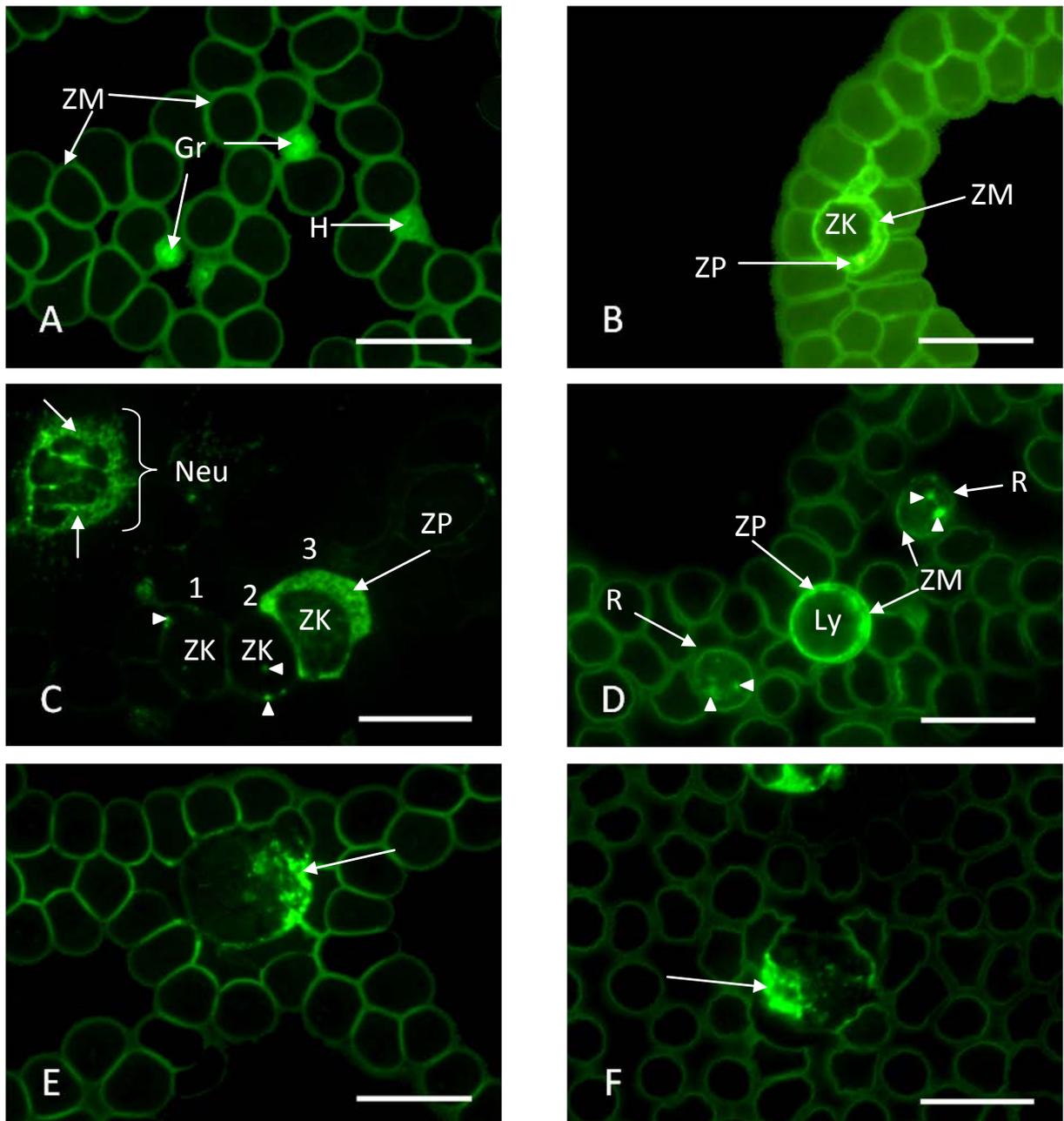


Abbildung 4.34: Bindung von Con A-FITC an die Blutzellen des Kaninchens I

A. Erythrozyten und Thrombozyten, Methanol-fixiert. Die Zellmembran (ZM) der Erythrozyten sowie das Granulomer (Gr) der Thrombozyten sind stark positiv. Das Hyalomere (H) der Thrombozyten ist schwach positiv. Kaninchen, m, 12-14 Wochen. SB = 10 μ m.

B. Erythrozyten und Normoblast, unfixiert. Die Erythrozyten zeigen eine stark positive Reaktion ihrer Zellmembran. Die Zellmembran (ZM) und das Zytoplasma (ZP) des Normoblasten, der anhand seines exzentrisch gelegenen Zellkerns gut zu erkennen ist, sind stark positiv. Zellkern (ZK). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Lymphozyten und neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die drei Lymphozyten (1, 2, 3) zeigen unterschiedlich starke Reaktionen. Bei Lymphozyt 3 ist das gesamte Zytoplasma (ZP) stark positiv, wohingegen die anderen beiden Lymphozyten nur eine fokale, 3+ positive Fluoreszenz (kleine Pfeile) im Zytoplasma zeigen. Zellkern (ZK). Zudem befindet sich oben links im Bild zusätzlich ein neutrophiler Granulozyt (Neu) mit starker Fluoreszenz der Granula (Pfeile). Kaninchen, m, 12-14 Wochen. SB = 10 μ m.

D. Lymphozyt und Retikulozyten, unfixiert. In der Mitte des Bildes ist ein Lymphozyt (Ly) zu sehen, dessen Zellmembran (ZM) und Anteile im Zytoplasma (ZP) stark positiv sind. Zudem sind in dem Ausstrich zwei Retikulozyten (R), die an ihrem fehlenden Zellkern und fokaler, starker Fluoreszenz im Zytoplasma (kleine Pfeile) zu erkennen sind. Ihre Zellmembran (ZM) ist auch stark fluoreszierend. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Monozyt, Methanol-fixiert. Eine starke Fluoreszenz ist im Zytoplasma (Pfeil) vorhanden. Kaninchen, m, 12-14 Wochen. SB = 10 μ m.

F. Monozyt, unfixiert. Eine starke Fluoreszenz ist im Zytoplasma zu sehen (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

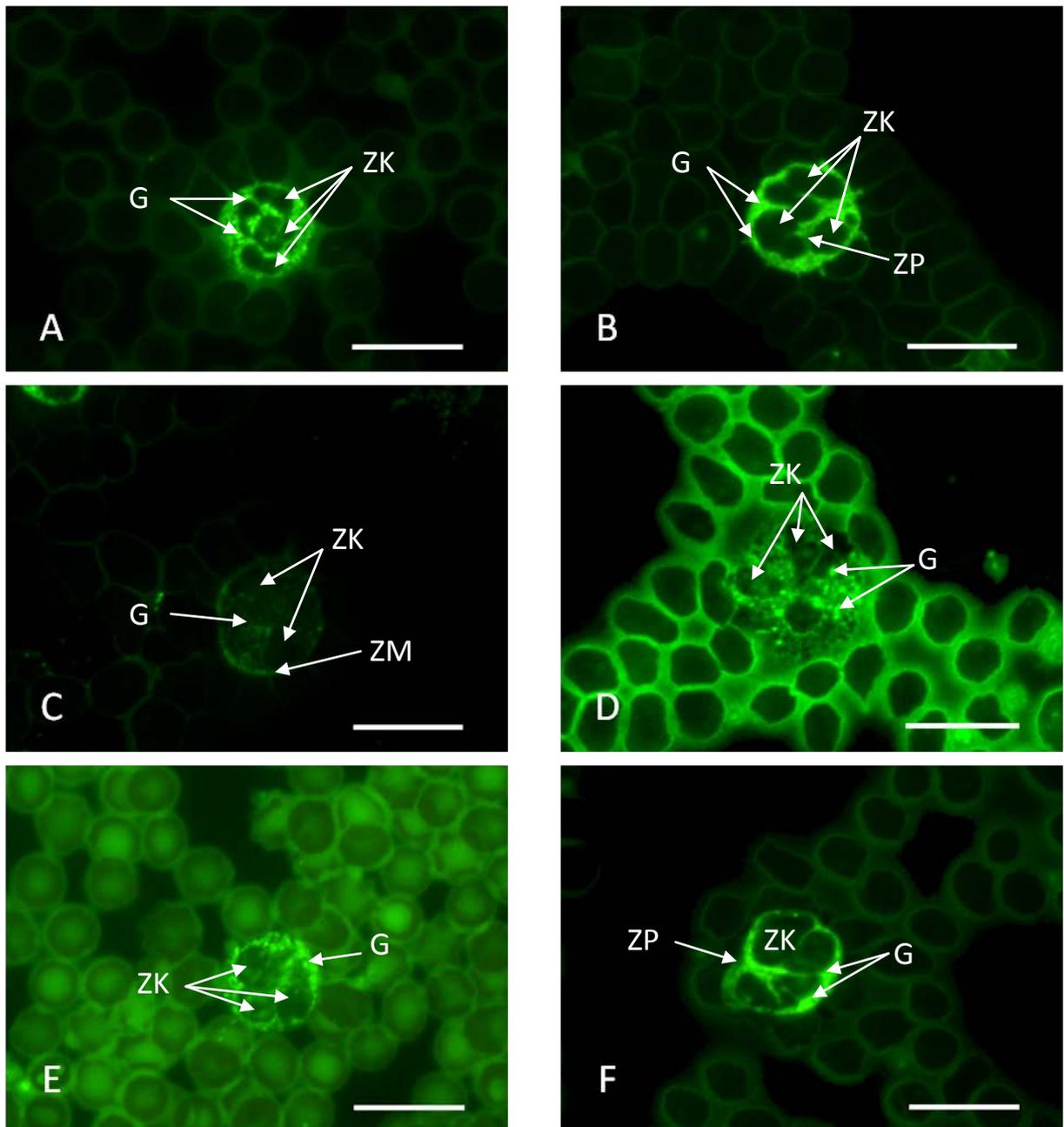


Abbildung 4.35: Bindung von Con A-FITC an die Blutzellen des Kaninchens II

A. Neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

B. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Es ist eine starke Fluoreszenz der Granula (G) und eine schwache Fluoreszenz des Zytoplasmas (ZP) zu sehen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

C. Eosinophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die Zellmembran (ZM) und die Granula (G) zeigen eine Fluoreszenz. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 12-14 Wochen. SB = 10 µm.

D. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Die eosinophilen Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

E. Basophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Der basophile Granulozyt weist einen dreifach gelappten Zellkern (ZK) und eine starke Fluoreszenz der basophilen Granula (G) auf. Kaninchen, w, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

F. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Im schwach positiven Zytoplasma (ZP) liegen die basophilen Granula (G), die eine starke Fluoreszenz zeigen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

4.5.1.2 Bindung von Lens culinaris Agglutinin

Die Bindung von LCA-FITC an die Erythrozyten zeigte sich sehr unterschiedlich bei fixierten und unfixierten Ausstrichen (siehe hierzu auch Tabelle 4.24.). Bei fixierten Blutausstrichen war die Zellmembran der Erythrozyten vor allem negativ, wohingegen sie bei unfixierten Ausstrichen stets schwach bis stark positiv war. Auch bei den Thrombozyten konnte ein wesentlicher Unterschied zwischen fixierten und unfixierten Blutausstrichen festgestellt werden, da bei letzteren sowohl im Zytoplasma als auch im Granulomer eine eindeutig positive Reaktion zu finden war. Ausgeprägte, positive, fokale Fluoreszenzen befanden sich bei Lymphozyten fixierter und unfixierter Ausstriche im Zytoplasma. Die Zellmembran der Lymphozyten färbte sich bei 50 % der Zellen an. Bei den Granulozyten ist ein relativ klares Bild zu erkennen. Die Granula sind meist stark positiv, wohingegen das Zytoplasma und die Zellmembran oft negativ sind. Auch bei den Monozyten wurden Unterschiede in der Anfärbung zwischen fixierten und unfixierten Blutausstrichen sichtbar. In fixierten Ausstrichen war bei wenigen Monozyten die Zellmembran LCA-positiv. Im Gegensatz dazu war die Zellmembran der Monozyten in den unfixierten Ausstrichen stets deutlich positiv. Zudem sind im überwiegenden Teil der Blutausstriche das Zytoplasma negativ und die im Zytoplasma vorhandenen Vakuolen positiv.

LCA	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	64,28 %	14,29 %	21,42 %			21,42 % 100 % ¹
Zytoplasma	78,57 % 100 %	21,42 %				0 % 0 %
Thrombozyten						
Zytoplasma	57,14 %		42,86 % 100 %			42,86 % 100 %
Granulomer	57,14 %			7,14 %	35,71 % 100 %	42,86 % 100 %
Lymphozyten						
Membran	50 % 33,33 %		21,42 %	7,14 % 33,33 %	21,42 % 33,33 %	50 % 66,67 %
Zytoplasma	42,86 %	14,29 %	28,57 % 66,67 %	7,14 % 33,33 %		35,71 % ² 100 % ³
Neutrophile Granulozyten						
Membran	100 % 66,67 %					0 % 33,33 %
Granula				14,29 %	85,71 % 100 %	100 % 100 %
Zytoplasma	50 % 100 %		21,42 %	21,42 %	7,14 %	50 % 0 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 66,67 %					0 % 33,33 %
Granula			11,11 %	44,44 %	44,44 % 100 %	100 % 100 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula			7,69 %	38,46 %	53,85 % 100 %	100 % 100 %
Zytoplasma	69,23 % 100 %		23,08 %	7,69 %		30,77 % 0 %
Monozyten						
Membran	76,92 %		15,38 %		7,69 %	23,08 % 100 %
Zytoplasma	76,92 % 100 %	7,69 %	7,69 %	7,69 %		15,38 % 0 %
Vakuolen	30,77 %		15,38 %	23,08 %	30,77 % 100 %	69,23 % 100 %

Tabelle 4.24: Auswertung der Bindung von LCA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

¹In unfixierten Blutaussstrichen zeigten die Erythrozyten eine positive Reaktion von 1+ bis 3+.

²Bei ca. 35 % der Lymphozyten in fixierten Blutaussstrichen kam es fokal im Zytoplasma zu einer Fluoreszenz von 3+, bei ca. 20% der Lymphozyten in fixierten Blutaussstrichen von 2+.

³In allen unfixierten Blutaussstrichen kam es in den Lymphozyten fokal zu einer 3+-positiven Reaktion.

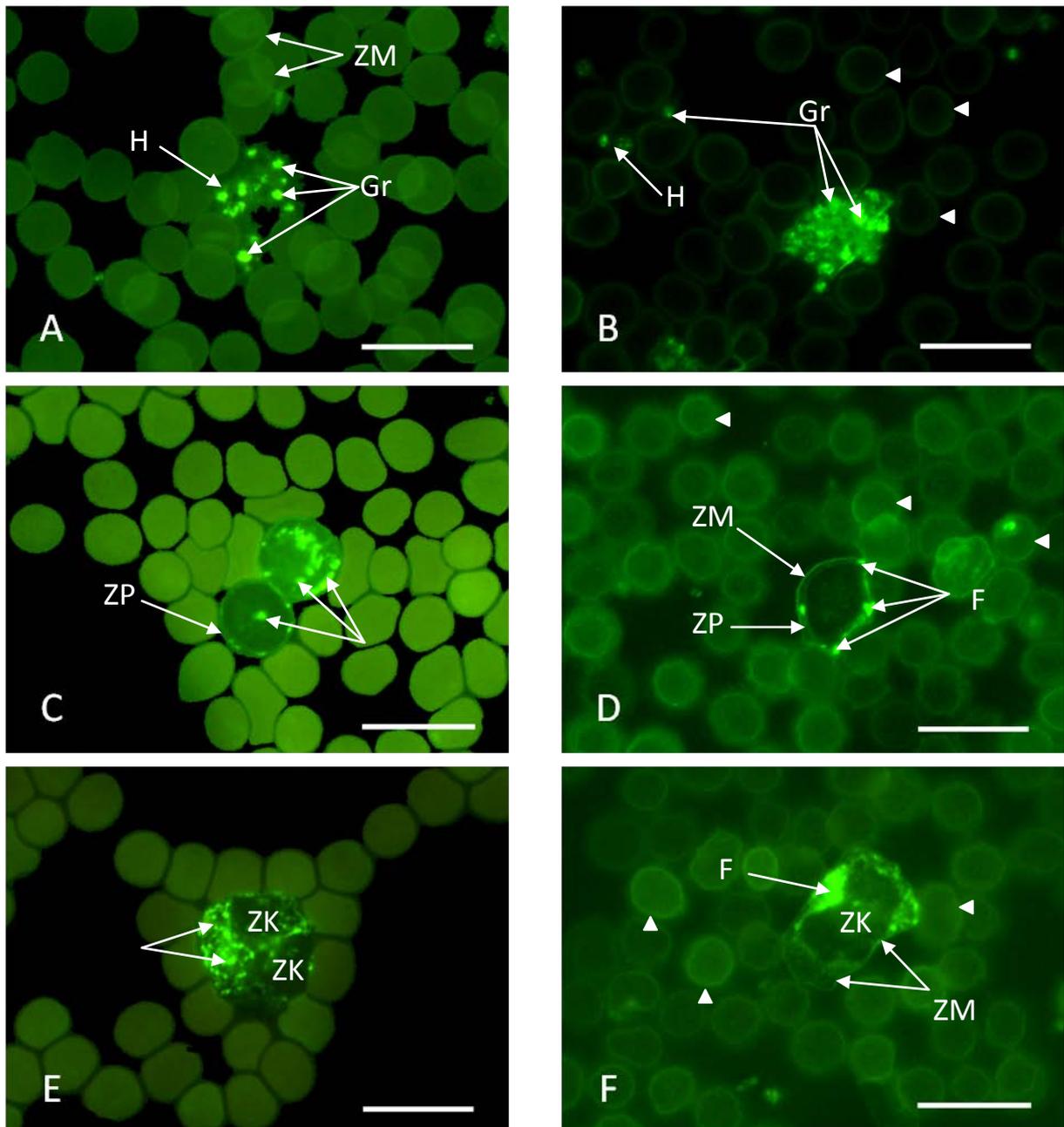


Abbildung 4.36: Bindung von LCA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens I

A. Erythrozyten und Thrombozyten, Methanol-fixiert. Die Zellmembran (ZM) der Erythrozyten ist schwach positiv. In den Thrombozyten zeigt das Granulomer (Gr) eine stark positive Fluoreszenz, wohingegen sich das Hyalomer (H) nur schwach anfärbte. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μ m.

B. Erythrozyten und Thrombozyten, unfixiert. Die Zellmembran der Erythrozyten ist deutlich positiv (kleine Pfeile). In den Thrombozyten ist das Granulomer (Gr) durch seine stark positive Reaktion gut zu erkennen. Das Hyalomer (H) ist hingegen schwach positiv. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Lymphozyten, Methanol-fixiert. Es sind stark positive, umschriebene, fluoreszierende Areale (Pfeile) im Zytoplasma (ZP) zu sehen. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 μ m.

D. Lymphozyt, unfixiert. Die Zellmembran (ZM) des Lymphozyten ist deutlich positiv. Im schwach positiven Zytoplasma (ZP) sind stark positive, umschriebene fluoreszierende Bezirke (F) zu sehen. Zellmembran der Erythrozyten (kleine Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Monozyt, Methanol-fixiert. Im Zytoplasma befinden sich stark positive, vakuoläre Strukturen (Pfeile). ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μ m.

F. Monozyt, unfixiert. Der Monozyt zeigt eine deutliche Bindung von LCA-FITC an die Zellmembran (ZM). Im Zytoplasma ist außerdem eine stark positive Fluoreszenz (F) zu sehen. ZK = Zellkern. Die Zellmembran der Erythrozyten ist auch LCA-positiv (kleine Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

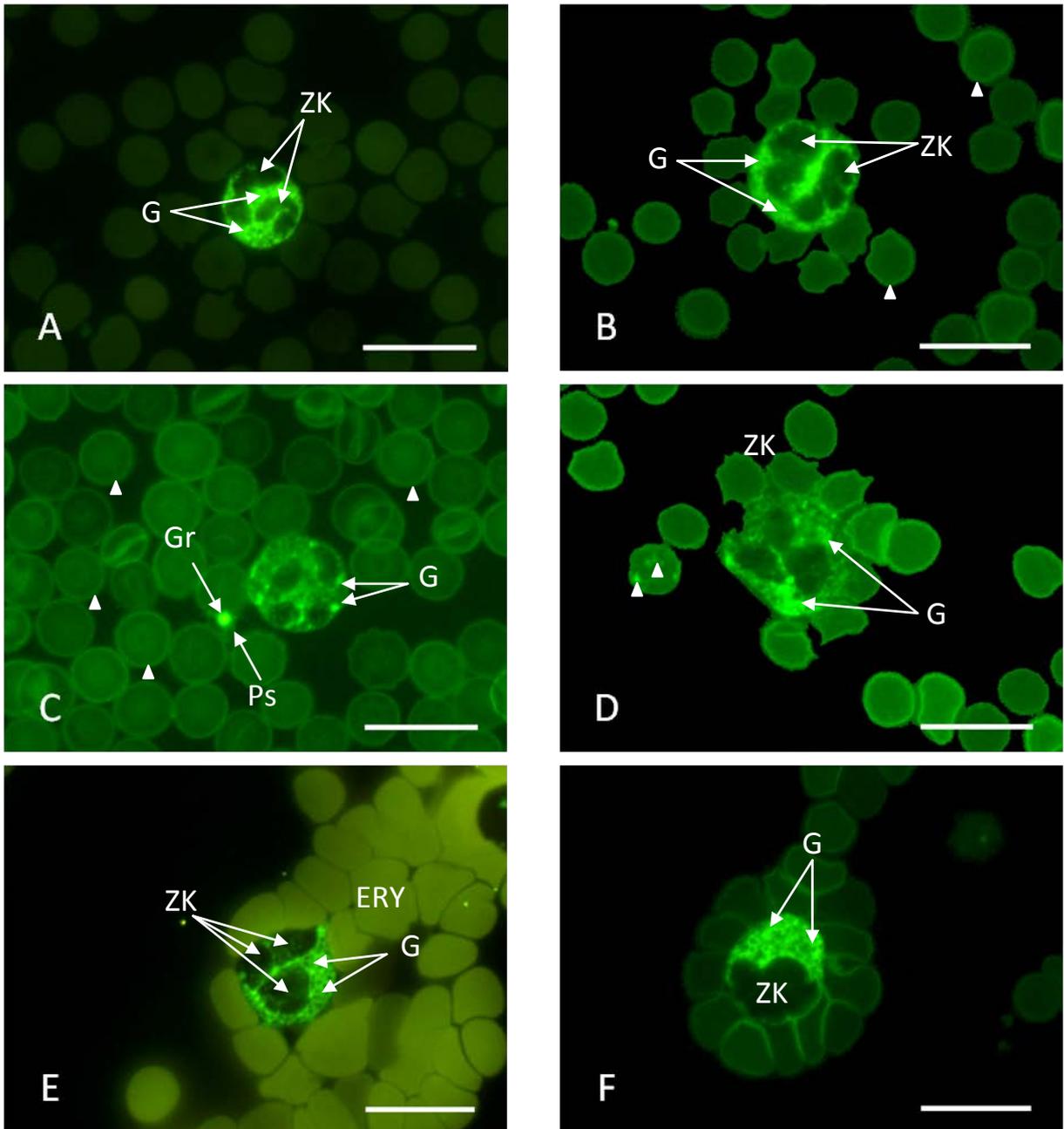


Abbildung 4.37: Bindung von LCA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens II

A. Neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die neutrophilen Granula (G) besitzen eine stark positive Fluoreszenz. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 μ m.

B. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Der neutrophile Granulozyt weist stark positive Granula (G) auf. ZK = Zellkern. Die Erythrozyten haben eine deutlich positive Zellmembran (kleine Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Eosinophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die eosinophilen Granula (G) zeigen eine starke Fluoreszenz. Auch das Granulomer (Gr) des Thrombozyten ist stark positiv, wohingegen die Pseudopodien (Ps) nur eine schwache Fluoreszenz aufweisen. Die Zellmembran der Erythrozyten ist deutlich fluoreszierend (kleine Pfeile). Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μ m.

D. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Die eosinophilen Granula (G) sind stark positiv. Es ist außerdem ein Retikulozyt mit fokaler Fluoreszenz im Zytoplasma zu sehen (kleine Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Basophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die basophilen Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Die Erythrozyten (ERY) sind negativ. Kaninchen, m, 12-14 Wochen. SB = 10 μ m.

F. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Die Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.5.1.3 Bindung von *Pisum sativum* agglutinin

Bei der Bindung von PSA-FITC an die Blutzellen gab es Unterschiede zwischen fixierten und unfixierten Ausstrichen und innerhalb der fixierten Ausstriche (siehe hierzu auch Tabelle 4.25). Deutlich war dies beispielsweise bei den Erythrozyten zu erkennen, wo bei unfixierten Ausstrichen die Zellmembran schwach PSA-positiv war, während sie sich bei fixierten Ausstrichen ausschließlich negativ zeigte. Auch die Thrombozyten waren bei unfixierten Ausstrichen deutlich positiv, wohingegen sie bei fixierten Ausstrichen vorwiegend negativ waren. Ebenso zeigten die Lymphozyten starke Unterschiede in der PSA-Anfärbung der Zellmembran in Abhängigkeit von der Fixierung. In fixierten Ausstrichen war die Zellmembran ausschließlich negativ, wohingegen sie bei unfixierten Ausstrichen eine deutliche bis starke Fluoreszenz aufwies. Bei den Granulozyten waren kaum Abweichungen zwischen fixierten und unfixierten Blutausstrichen auszumachen. Bei ihnen war stets eine positive Reaktion der Granula und eine negative Reaktion des Zytoplasmas und der Zellmembran vorhanden. Bei den Monozyten manifestierte sich die Auswirkung der Fixationsart wieder in der Reaktion der Zellmembran, die bei unfixierten Ausstrichen immer positiv, bei allen fixierten Ausstrichen dagegen negativ war. Das Zytoplasma war weitgehend negativ. Die vakuolären Strukturen im Zytoplasma der Monozyten waren bei allen unfixierten Blutausstrichen positiv, jedoch bei sehr wenigen Monozyten in fixierten Ausstrichen.

PSA	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten¹						
Membran	100 %	33,33 %	66,67 %			0 % 66,67 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Thrombozyten						
Zytoplasma	50 %	21,42 %	21,42 % 100 %	7,14 %		28,56 % 100 %
Granulomer	85,71 %				14,29 % 100 %	14,29 % 100 %
Lymphozyten						
Membran	100 %			66,67 %	33,33 %	0 % 100 %
Zytoplasma	64,28 % 66,67 %	21,42 %	14,29 % 33,33 %			14,29 % ² 33,33 % ³
Neutrophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	7,14 %		35,71 %	64,28 %		92,86 % 100 %
Zytoplasma	35,71 % 100 %		57,14 %	7,14 %		64,28 % 0 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	91,67 %		66,67 %	33,33 %	8,33 %	8,33 % 100 %
Zytoplasma	83,33 % 100 %	8,33 %	8,33 %			8,33 % 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	42,86 %		28,57 %	21,42 %	7,14 % 100 %	57,14 % 100 %
Zytoplasma	35,71 % 100 %	28,57 %	35,71 %			35,71 % 0 %
Monozyten						
Membran	100 %		66,67 %	33,33 %		0 % 100 %
Zytoplasma	71,43 % 100 %	14,29 %	14,29 %			14,29 % 0 %
Vakuolen	85,71 %			14,29 % 100 %		14,29 % 100 %

Tabelle 4.25: Auswertung der Bindung von PSA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

¹In einem Blutaussstrich konnte zudem ein negativer Normoblast identifiziert werden.²Einzelne Lymphozyten zeigten eine Fluoreszenz des Zytoplasmas von 3+. Bei ca. 20 % der Lymphozyten war fokal im Zytoplasma eine Fluoreszenz von 2+ vorhanden, in einem Ausstrich von 1+.³In unfixierten Blutaussstrichen konnte im Zytoplasma der Lymphozyten eine fokale Fluoreszenz von 2+ festgestellt werden.

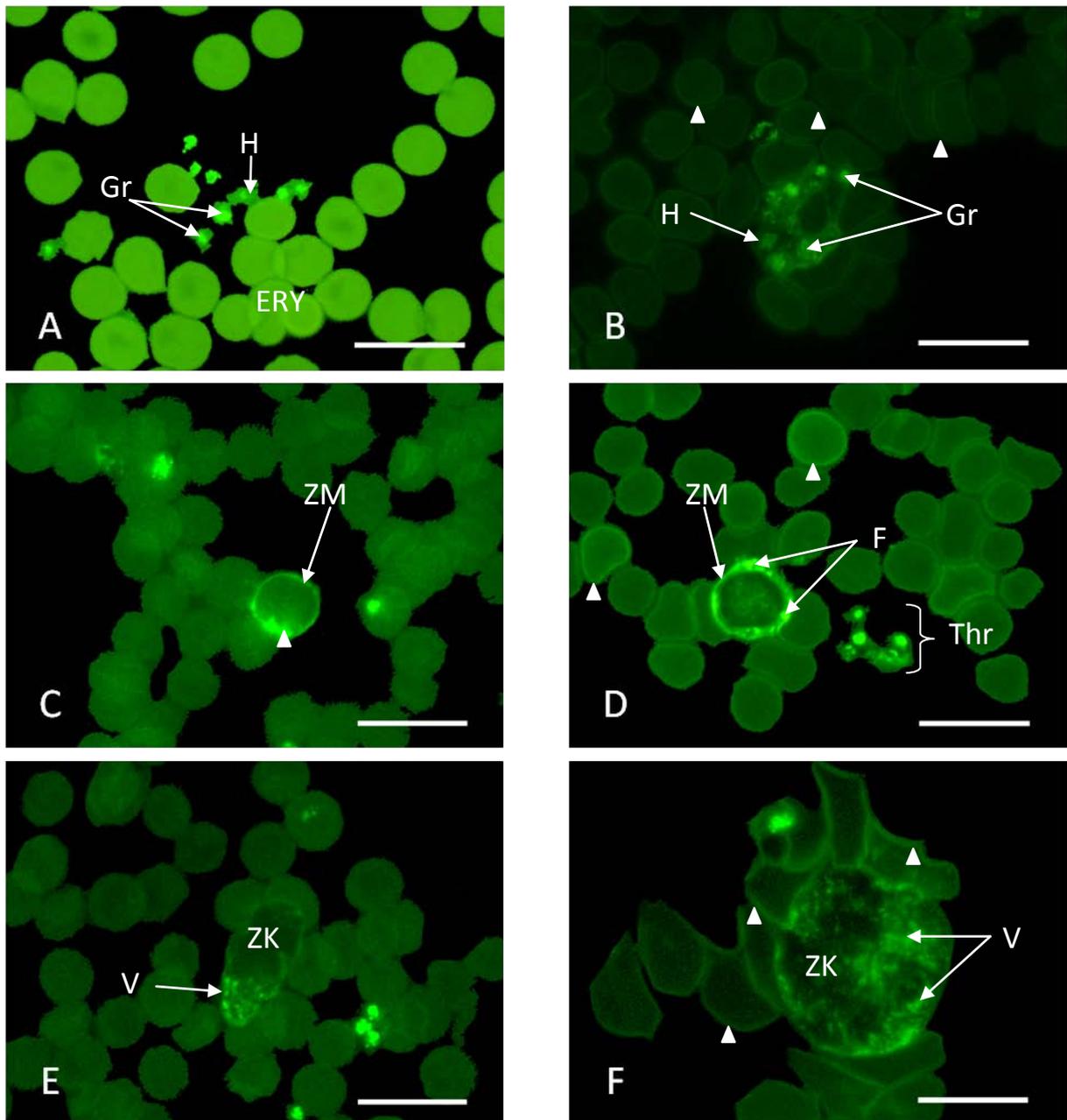


Abbildung 4.38: Bindung von PSA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens I

A. Erythrozyten und Thrombozyten, Methanol-fixiert. Erythrozyten (ERY) sind negativ. Die Thrombozyten hingegen zeigen eine stark positive Reaktion des Granulomers (Gr) und eine schwach positive Reaktion des Hyalomers (H). Kaninchen, m, adult. SB = 10 μ m.

B. Erythrozyten und Thrombozyten, unfixiert. In den Erythrozyten ist eine schwach positive Reaktion der Zellmembran zu sehen (kleine Pfeile). In den Thrombozyten ist das Granulomer (Gr) stark positiv, das Hyalomere (H) schwach positiv. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Lymphozyt, Methanol-fixiert. Die Zellmembran (ZM) ist stark positiv. Im Zytoplasma ist außerdem fokal eine starke Fluoreszenz zu sehen (kleiner Pfeil). Kaninchen, m, adult. SB = 10 μ m.

D. Lymphozyt, unfixiert. Bei den Lymphozyten ist die Zellmembran (ZM) stark positiv. Eine stark positive, umschriebene Fluoreszenz (F) ist auch im Zytoplasma zu erkennen. Die Erythrozyten haben eine schwach positive Zellmembran (kleine Pfeile). Zudem sind Thrombozyten (Thr) mit den bereits beschriebenen Färbeeigenschaften zu sehen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Monozyt, Methanol-fixiert. Im Zytoplasma sind positive, vakuoläre Strukturen (V) zu erkennen. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μ m.

F. Monozyt, unfixiert. Im Zytoplasma befinden sich stark positive, vakuoläre Strukturen (V). ZK = Zellkern. Kleine Pfeile = Zellmembran der Erythrozyten. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

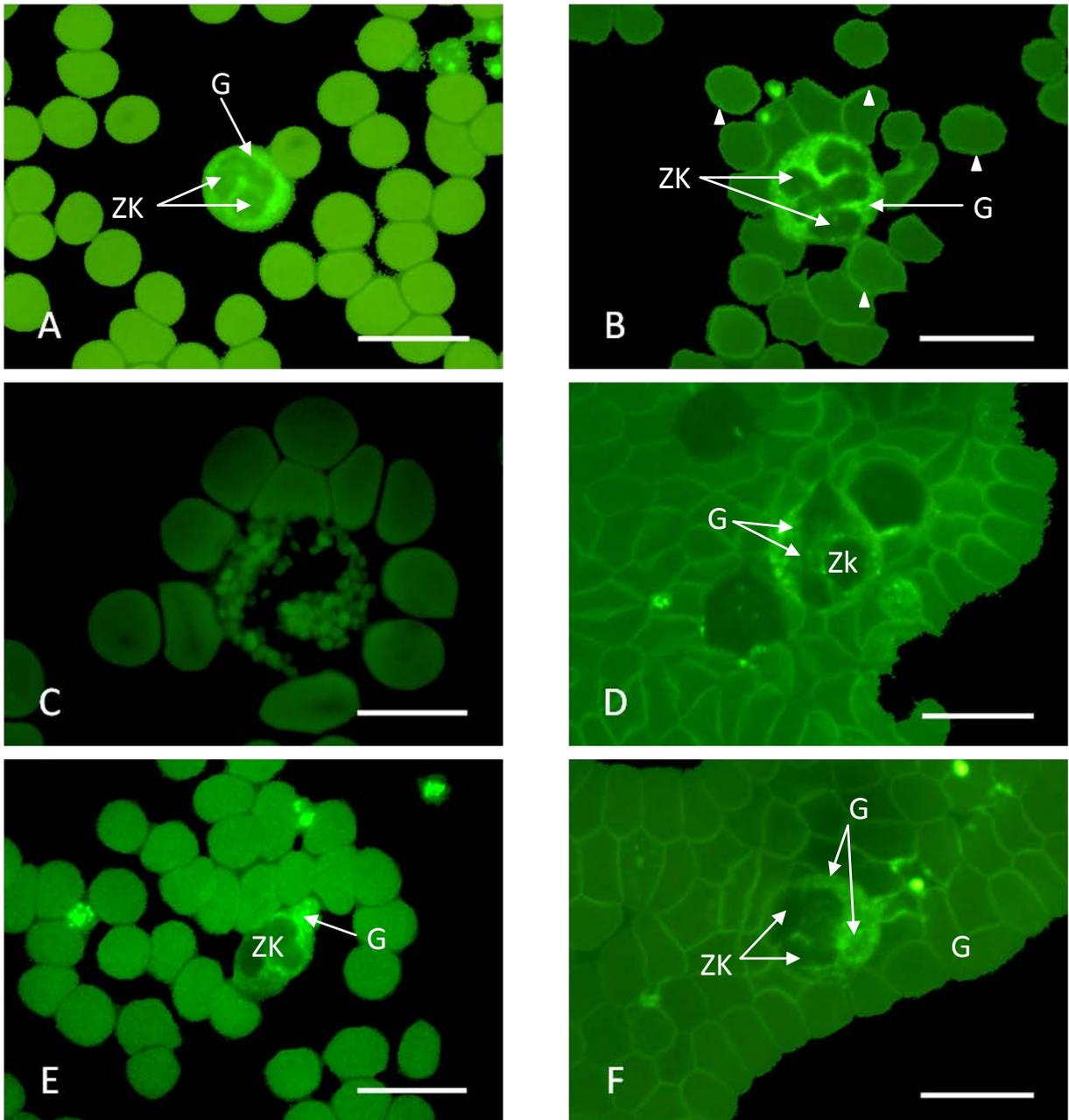


Abbildung 4.39: Bindung von PSA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens II

A. Neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die neutrophilen Granula (G) sind stark positiv. Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

B. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Die neutrophilen Granula (G) weisen eine starke Fluoreszenz auf. Die Zellmembran der Erythrozyten zeigt eine schwache Anfärbung (kleine Pfeile). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

C. Eosinophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Es ist keine Fluoreszenz im eosinophilen Granulozyten zu sehen. Kaninchen, w, 6-12 Monate. SB = 10 µm.

D. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Die eosinophilen Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

E. Basophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Im Zytoplasma liegen die stark Fluoreszenz-positiven, basophilen Granula (G). ZK = Zellkern. Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

F. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Die basophilen Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

4.5.2 Galaktose-spezifische Lektine

4.5.2.1 Bindung von Peanut Agglutinin

In unfixierten Ausstrichen und dem größten Anteil der fixierten Blutausstriche erfolgte keine Bindung von PNA-FITC an die Blutzellen. Selten war eine unspezifische Reaktion in neutrophilen und basophilen Granulozyten in fixierten Blutausstrichen zu sehen.

4.5.2.2 Bindung von Ricinus communis Agglutinin

Bei den Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, basophilen Granulozyten und Monozyten erfolgte keine Bindung von RCA-FITC. Die neutrophilen Granulozyten zeigten in einigen unfixierten Blutausstrichen eine fraglich positive Reaktion der Granula und des Zytoplasmas. In wenigen Ausstrichen waren die Granula der eosinophilen Granulozyten schwach positiv. In keinem der unfixierten Blutausstriche war eine positive Reaktion zu sehen. Somit liegt keine spezifische Bindung von RCA-FITC vor.

4.5.2.3 Bindung von Sambucus nigra Agglutinin

Bei der Hälfte der fixierten Blutausstriche war nur an umschriebenen Stellen Fluoreszenz vorhanden, die dort jedoch sehr stark war. Die anderen fixierten Blutausstriche zeigten sich komplett negativ. Insgesamt gesehen war bei unfixierten Ausstrichen eine stärkere Fluoreszenz an der Zellmembran der Erythrozyten zu sehen als bei fixierten Ausstrichen. Die Thrombozyten waren dagegen bei beiden Methoden negativ. Im Unterschied zu den fixierten Ausstrichen war eine deutliche Fluoreszenz des Zytoplasmas der Lymphozyten bei unfixierten Ausstrichen zu erkennen. Die Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten waren in unfixierten Ausstrichen stets deutlich bis stark positiv, wohingegen sie in fixierten Ausstrichen sehr selten Fluoreszenz aufwiesen. Auffällig war weiterhin die Anfärbung der Membran und des Zytoplasmas der neutrophilen und basophilen Granulozyten in unfixierten Ausstrichen, die sich in fixierten Ausstrichen meist negativ darstellten. Zudem waren die basophilen Granula bei den unfixierten Ausstrichen häufiger positiv als bei fixierten. Die Monozyten besaßen sowohl in unfixierten als auch in fixierten Ausstrichen nur in Einzelfällen Fluoreszenz (siehe hierzu auch Tabelle 4.26).

SNA	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten¹						
Membran	50 %		30 %	20 %		50 % 100 %
Zytoplasma	100 % 100%					0 % 0%
Thrombozyten						
Zytoplasma	100 % 75 %		25 %			0 % 25%
Granulomer	100 % 100 %					0 % 0 %
Lymphozyten						
Membran	70 % 75 %		20 %	10 %		30 % 25 %
Zytoplasma	100 %	25 %	25 %	50 %		0 % 75 %
Neutrophile Granulozyten						
Membran	50 %		10 %	30 %	10 %	50 % 100 %
Granula	90 %		10 %		100 %	10 % 100 %
Zytoplasma	100 % 50 %		25 %	25 %		0 % ² 50 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	85,71 % 75 %			14,29 %		14,29 % 25 %
Granula	100 %				33,33 %	0 % 100 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	66,67 %		22,22 %	11,11 %		33,33 % 100 %
Granula	88,89 % 50 %		11,11 % 25 %	25 %		11,11 % 50 %
Zytoplasma	100 %		75 %	25 %		0 % 100 %
Monozyten						
Membran	62,5 % 75 %		37,5 %			37,5 % 25 %
Zytoplasma	75 % 50 %	25 %	50 %			0 % 50 %
Vakuolen	100 % 75 %				25 %	0 % 25 %

Tabelle 4.26: Auswertung der Bindung von SNA an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

¹In einem unfixierten Blutaussstrich konnte ein Erythrozyt mit Zellkern identifiziert werden. Er zeigte eine Fluoreszenz der Zellmembran und eine Fluoreszenz um den Zellkern von 3+.

²In fixierten Blutaussstrichen zeigten ca. 20 % der neutrophilen Granulozyten fokal im Zytoplasma eine Fluoreszenz von 3+.

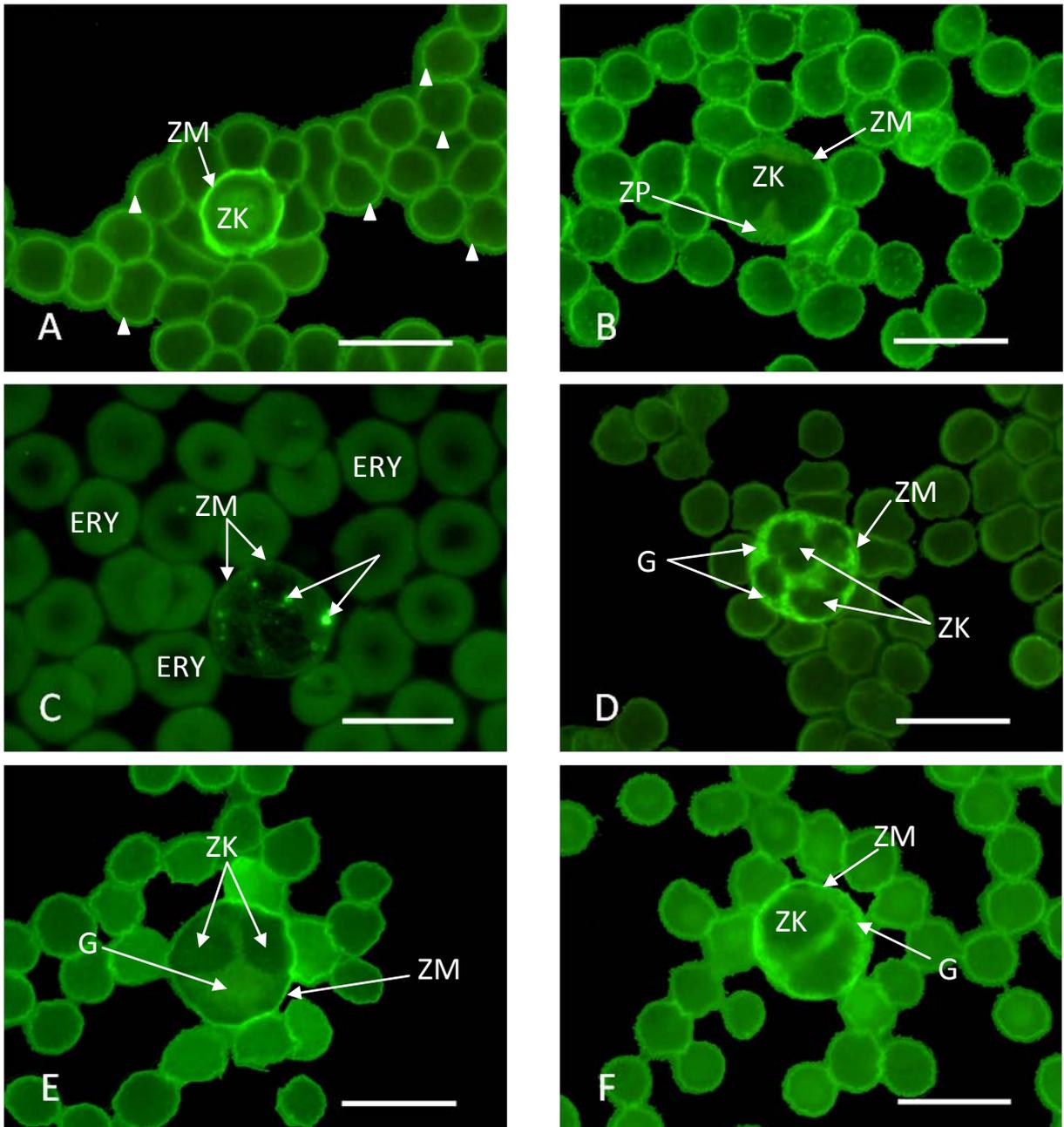


Abbildung 4.40: Bindung von SNA an die Blutzellen des Kaninchens

A. Erythrozyten und Lymphozyt, unfixiert. Die Zellmembran der Erythrozyten (kleine Pfeile) und des Lymphozyten (ZM) ist stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

B. Monozyt, unfixiert. Der Monozyt besitzt ein schwach positives Zytoplasma (ZP) und eine ebenso schwach positive Zellmembran (ZM). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Im Gegensatz zu den unfixierten Blutausstrichen sind die Erythrozyten (ERY) hier negativ. Im Zytoplasma, das von einer schwach positiven Zellmembran (ZM) umgeben ist, befinden sich stark positive Areale (Pfeile). Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

D. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Die Granula (G) im Zytoplasma sind stark positiv. Zudem ist eine schwache Fluoreszenz der Zellmembran zu erkennen (ZM). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Die Zellmembran (ZM) des eosinophilen Granulozyten ist stark positiv. Im Gegensatz dazu weisen die eosinophilen Granula (G) keine Fluoreszenz auf. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

F. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Der plumpe Zellkern (ZK) ist von einem Zytoplasma mit deutlich positiven Granula (G) umgeben, das von einer Fluoreszenz-positiven Zellmembran (ZM) begrenzt wird. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.5.2.4 Bindung von *Viscum album* Agglutinin

In fixierten Blutausstrichen kam es kaum zu einer Bindung von VAA an die Blutzellen. Selten zeigten neutrophile Granulozyten eine deutliche Bindung von VAA an die Zellmembran und an die Granula. In unfixierten Blutausstrichen erfolgte keine Bindung von VAA (siehe hierzu auch Tabelle 4.27).

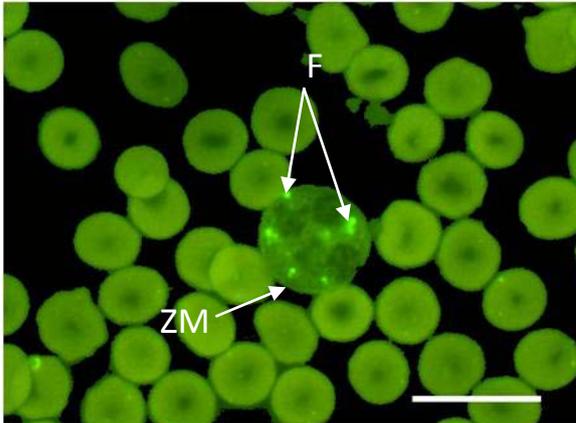


Abbildung 4.41: Bindung von VAA an neutrophile Granulozyten des Kaninchens

Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Im Zytoplasma sind fokal stark positive Fluoreszenzen (F) zu sehen. Die Zellmembran (ZM) ist schwach VAA-positiv. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

VAA	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Thrombozyten						
Zytoplasma	90 % 100 %	10 %				0 % 0 %
Granulomer	100 % 100 %					0 % 0 %
Lymphozyten						
Membran	70 % 100 %	10 %	20 %			20 % 0 %
Zytoplasma	90 % 100 %	10 %				0 % 0 %
Neutrophile Granulozyten						
Membran	80 % 100 %			20 %		20 % 0 %
Granula	60 % 100 %	30 %		10 %		10 % 0 %
Zytoplasma	50 % 100 %	40 %	10 %			10 % ¹ 0 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	87,5 % 100 %	12,5 %				0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % ² 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	60 % 100 %	30 %			10 %	10 % 0 %
Zytoplasma	60 % 100 %	30 %				0 % ³ 0 %
Monozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Vakuolen	100 % 100 %					0 % 0 %

Tabelle 4.27: Auswertung der Bindung von VAA an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

¹Bei 10% der neutrophilen Granulozyten kam es im Zytoplasma zu einer fokalen Reaktion von 3+.

²Bei 10% der eosinophilen Granulozyten war eine fokale Fluoreszenz von 3+ vorhanden.

³Bei 10% der basophilen Granulozyten zeigte sich fokal im Zytoplasma eine Fluoreszenz von 1+.

4.5.3 N-Acetylglukosamin-spezifische Lektine

4.5.3.1 Bindung von Wheat germ Agglutinin

Der Großteil der Erythrozyten fixierter Blutausstriche zeigte keine Bindung von WGA-FITC (siehe hierzu auch Tabelle 4.28). Bei 7 % der Erythrozyten kam es zu fokaler Fluoreszenz von mittlerer Stärke und bei einigen Blutausstrichen war eine schwache Fluoreszenz der Zellmembran zu sehen. Im Gegensatz dazu waren die Zellmembranen der Erythrozyten in unfixierten Blutausstrichen stets positiv. Bei Thrombozyten fixierter Blutausstriche war kaum Fluoreszenz festzustellen. Bei der Bindung von WGA-FITC an die Lymphozyten konnten unterschiedliche Reaktionen beobachtet werden. Im Zytoplasma war teilweise eine stark positive, fokale Fluoreszenz zu sehen, aber es waren auch Lymphozyten mit einem nur schwach angefärbten oder negativen Zytoplasma erkennbar. Bei der Fluoreszenz der Zellmembran reichte das Spektrum von negativ bis hin zu 2+-positiv. Diese Unterschiede konnten auch im gleichen Blutausstrich beobachtet werden. Möglicherweise handelt es sich um Lymphozyten in unterschiedlichen Funktionsstadien. Auch bei den unfixierten Blutausstrichen waren starke Unterschiede vorhanden. Diese Eigenschaft der Lymphozyten wird unten noch einmal genauer betrachtet (siehe Tabelle 4.29). Die Granulozyten wiesen alle positive Granula auf. Unterschiede bestanden vor allem in der Anfärbbarkeit der Zellmembran und des Zytoplasmas. Bei neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wurde die Auswirkung der Fixierung deutlich, da in unfixierten Blutausstrichen die Zellmembran meist deutlich positiv war, wohingegen sie bei fixierten Ausstrichen keine Fluoreszenz zeigte. Basophile Granulozyten hatten in fixierten Blutausstrichen ein ausschließlich positives Zytoplasma. Im Gegensatz dazu war das Zytoplasma in unfixierten Ausstrichen immer negativ. Die Vakuolen im Zytoplasma der Monozyten waren in allen Blutausstrichen deutlich positiv. Unterschiede zwischen den fixierten und unfixierten Ausstrichen bestanden hier auch wieder bezüglich der Reaktion der Zellmembran und des Zytoplasmas.

WGA	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	78,57 % 100 %		21,43 % 33,33 %	66,67 %		21,43 % 100 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % ¹ 0 % ¹
Thrombozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	64,29 % 100 %			7,14 %	28,57 %	35,71 % 0 %
Lymphozyten						
Membran	Keine Aussage zu treffen. Siehe oben.					
Zytoplasma						
Neutrophile Granulozyten						
Membran	100 % 33,33 %			66,67 %		0 % 66,67 %
Granula				7,14 %	92,86 % 100 %	100 % 100 %
Zytoplasma	33,33 %		66,67 %	64,29 %	35,71 %	100 % 66,67 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	92,86%				7,14% 100 %	7,14 % 100 %
Granula				37,5 %	62,5 % 100 %	100 % 100 %
Zytoplasma	37,5 % 100 %		12,5 %	50 %		62,5 % 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	100 % 66,67 %			33,33%		0 % 33,33 %
Granula					100 % 100 %	100 % 100 %
Zytoplasma	100 %		42,86 %	57,14 %		100 % 0 %
Monozyten						
Membran	64,29 %			35,71 % 33,33 %	33,33 %	35,71 % 100 %
Zytoplasma	66,67 %		28,57 % 33,33 %	71,43 %		100 % 33,33 %
Vakuolen				7,14 %	92,86 % 100 %	100 % 100 %

Tabelle 4.28: Auswertung der Bindung von WGA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

¹Bei ca. 14 % der Erythrozyten in fixierten Ausstrichen und allen unfixierten Blutaussstrichen kam es zu einer fokalen Fluoreszenz von 2+-3+ im Zytoplasma.

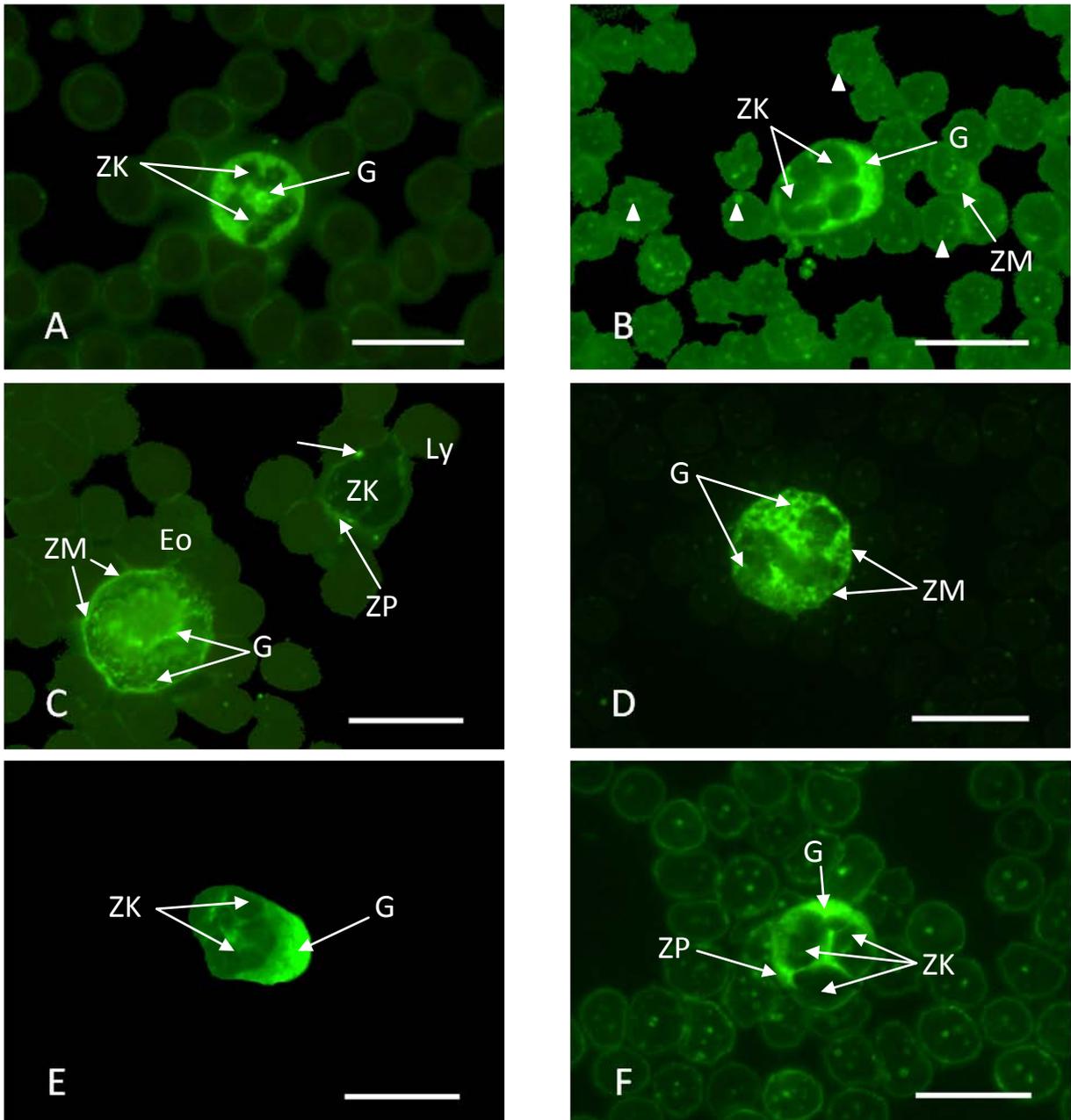


Abbildung 4.42: Bindung von WGA-FITC an die Granulozyten des Kaninchens

A. Neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die Granula (G) sind stark positiv. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 µm.

B. Erythrozyten und neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Die Zellmembran (ZM) der Erythrozyten ist WGA-positiv. Im Zytoplasma befinden sich außerdem fokale, stark positive Anfärbungen (kleine Pfeile). Der neutrophile Granulozyt zeigt zudem 3+-positive Granula (G). Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

C. Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, Methanol-fixiert. Beim eosinophilen Granulozyten (Eo) ist eine stark positive Fluoreszenz der Zellmembran (ZM) zu sehen. Auch die eosinophilen Granula (G) sind Fluoreszenz-positiv. Der Lymphozyt (Ly) oben rechts im Bild weist ein schwach angefarbtes Zytoplasma (ZP) mit stark positiven, fokalen Anfärbungen (Pfeil) auf. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 µm.

D. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Beim eosinophilen Granulozyten ist eine positive Reaktion der Zellmembran (ZM) und der Granula (G) zu beobachten. Bei letzteren beschränkt sich die Fluoreszenz vor allem auf die Matrix. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

E. Basophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Eine sehr starke Fluoreszenz der basophilen Granula ist zu erkennen. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 µm.

F. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Im basophilen Granulozyten ist das Zytoplasma (ZP) deutlich positiv. Die Granula (G) zeigen eine Fluoreszenz von 3+. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

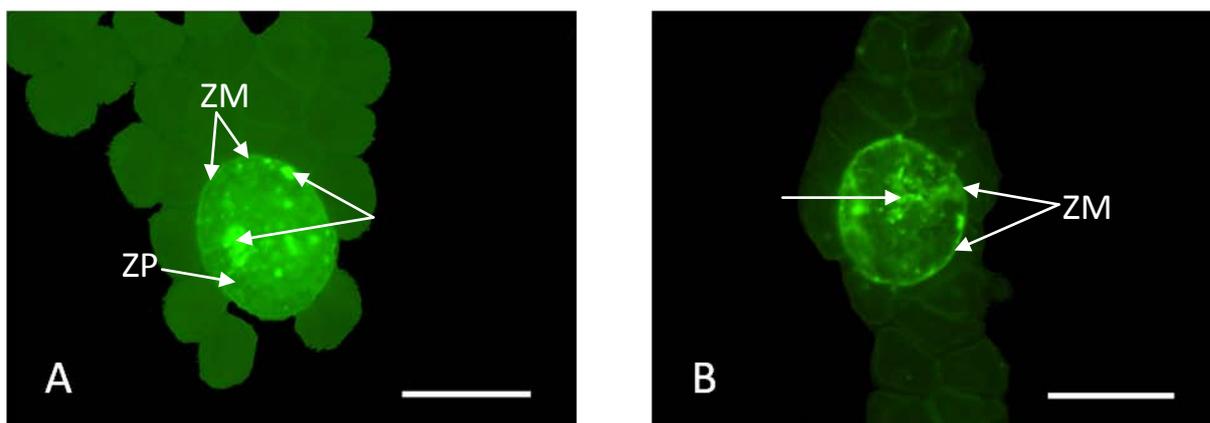


Abbildung 4.43: Bindung von WGA-FITC an die Monozyten des Kaninchens

A. Monozyt, Methanol-fixiert. Im schwach positiven Zytosoma (ZP) befinden sich stark positive, vakuoläre Strukturen (Pfeile). Die Zellmembran (ZM) ist deutlich positiv. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 µm.

B. Monozyt, unfixiert. Die stark positive Zellmembran (ZM) umgibt ein Zytosoma, in dem zahlreiche stark positive, granuläre bzw. fokale, fluoreszierende Areale (Pfeil) zu sehen sind. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

Die Lymphozyten zeigten stark unterschiedliche Reaktionen bei der Bindung von WGA-FITC. Deshalb wurden exemplarisch in zwei Blutausstrichen je zehn Lymphozyten nach dem Zufallsprinzip beurteilt. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Reaktion der Lymphozyten	Prozentualer Anteil der Lymphozyten
negativ	20 %
3 + im Zytosoma	25 %
Zytosoma +/-; fokale im Zytosoma 1+	5 %
Zytosoma +/-; fokale im Zytosoma 2+	5 %
Zytosoma +/-; fokale im Zytosoma 3+	10 %
Zytosoma 1+; fokale im Zytosoma 2+	5 %
Zytosoma 1+; fokale im Zytosoma 3+	5 %
Fokal im Zytosoma 1+	5 %
Fokal im Zytosoma 2+	5 %
Membran 3+; Zytosoma 1+	5 %
Membran 3+; fokale im Zytosoma 3+	5 %
Membran 3+; Zytosoma 2+; fokale im Zytosoma 3+	5 %

Tabelle 4.29: Auswertung der Bindung von WGA-FITC an die Lymphozyten des Kaninchens

Die Ergebnisse in der Tabelle zeigen, dass die Bindung von WGA-FITC an die Lymphozyten individuell sehr unterschiedlich ist. Einen etwas höheren Prozentsatz sieht man lediglich bei den negativen Lymphozyten und einer stark positiven, fokalen Reaktion im Zytosoma. Die folgenden Bilder sollen die Unterschiede exemplarisch darstellen.

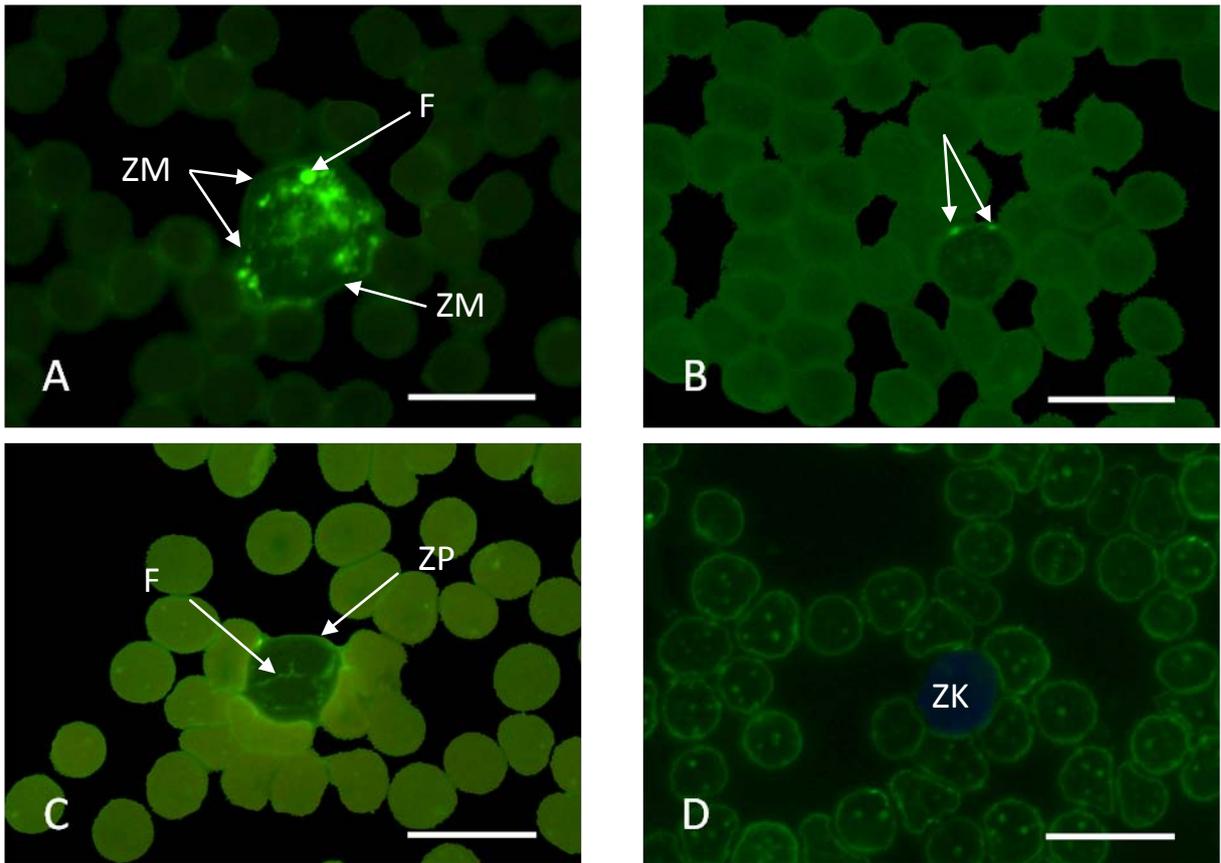


Abbildung 4.44: Bindung von WGA-FITC an die Lymphozyten des Kaninchens

A. Methanol-fixiert. Der Lymphozyt zeigt stark positive, teilweise granuläre Fluoreszenz (F) im Zytoplasma. Die Zellmembran (ZM) ist schwach positiv. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

B. Methanol-fixiert. Im Zytoplasma des Lymphozyten befinden sich zwei fokale, WGA-positive Anfärbungen (Pfeile). Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μ m.

C. Methanol-fixiert. Im Zytoplasma des Lymphozyten sind feine, eher filamentöse Fluoreszenzen (F) zu beobachten als auch ein positiv angefarbtes Zytoplasma (ZP). Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

D. Unfixiert. Der Lymphozyt ist negativ. Sein Zellkern (ZK) ist an der DAPI-Kernfärbung zu erkennen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.5.3.2 Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert

Die Erythrozyten zeigten bei der Anfärbung mit WGAs-FITC hauptsächlich negative Reaktionen in fixierten Blutaussstrichen (siehe hierzu auch Tabelle 4.30). Im Gegensatz dazu waren in unfixierten Blutaussstrichen immer fokale, stark positive Anfärbungen im Zytoplasma der Erythrozyten zu sehen. Auch die Zellmembran war in diesen Blutaussstrichen, mit Ausnahme der Fahne des Blutaussstrichs, deutlich positiv. Bei den Thrombozyten kam es in zwei fixierten Blutaussstrichen zu einer schwach positiven Reaktion des Granulomers. In unfixierten Ausstrichen waren sie jedoch stets negativ. Bei der Auswertung der Lymphozyten konnten unterschiedliche Reaktionen in ein und demselben Blutaussstrich bei beiden Fixationsarten beobachtet werden. Diese Reaktionen umfassten von negativ bis stark positiv alle Abstufungen. Vor allem fokal kam es in vielen Lymphozyten im Zytoplasma zu einer sehr starken Reaktion. Da sich die Lymphozyten im gleichen Blutaussstrich unterschiedlich angefärbt hatten, konnte in diesem Fall keine genauere Aussage über die Bindung von WGAs-FITC an die Lymphozyten des Kaninchens getroffen werden (vergleiche auch Reaktion der Lymphozyten bei WGA). Bei den Monozyten kam es in allen unfixierten Blutaussstrichen zu einer ausgeprägten positiven Reaktion, wohingegen die Bindung von WGAs bei fixierten Blutaussstrichen sehr unterschiedlich war. Bei allen Granulozyten wiesen die Granula eine positive Reaktion auf, wohingegen das Zytoplasma unterschiedliche Reaktionen zeigte. Bei unfixierten Blutaussstrichen konnte bei den eosinophilen und basophilen Granulozyten auch eine Bindung an die Zellmembran beobachtet werden.

WGAs	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	100 %				100 %	0 % 100 %
Zytoplasma	100 % 100 % ¹					0 % 0 %
Thrombozyten						
Zytoplasma	100 % 100%					0 % 0 %
Granulomer	85,71 % 100 %		14,29 %			14,29 % 0 %
Lymphozyten						
Membran	Keine Aussage zu treffen. Siehe oben.					
Zytoplasma						
Neutrophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula			7,14 %	50 % 66,67 %	42,86 % 33,33 %	100 % 100 %
Zytoplasma	14,29 %		28,57 % 100 %	42,86 %	14,29 %	85,71 % 100 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 66,67 %			33,33 %		0 % 33,33 %
Granula			8,33 %	33,33 %	58,33 % 100 %	100 % 100 %
Zytoplasma	58,33 % 66,67 %		33,33 % 33,33 %	8,33 %		41,66 % 33,33 %
Basophile Granulozyten						
Membran	46,15 % 33,33 %		15,38 %	30,77 %	7,69 % 66,67 %	53,85 % 66,67 %
Granula			7,69 %	30,77 %	61,54 % 100 %	100 % 100 %
Zytoplasma	30,77 % 100 %		53,85 %	15,38 %		69,23 % 0 %
Monozyten						
Membran	42,86 %			35,71 % 100 %	21,43 %	57,14 % 100 %
Zytoplasma	71,43 % 25 %		21,43 % 75 %	7,14 %		28,57 % 75 %
Vakuolen	14,29 %			14,26 %	71,43 % 100 %	85,71 % 100 %

Tabelle 4.30: Auswertung der Bindung von WGAs-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

¹fokal im Zytoplasma 3+.

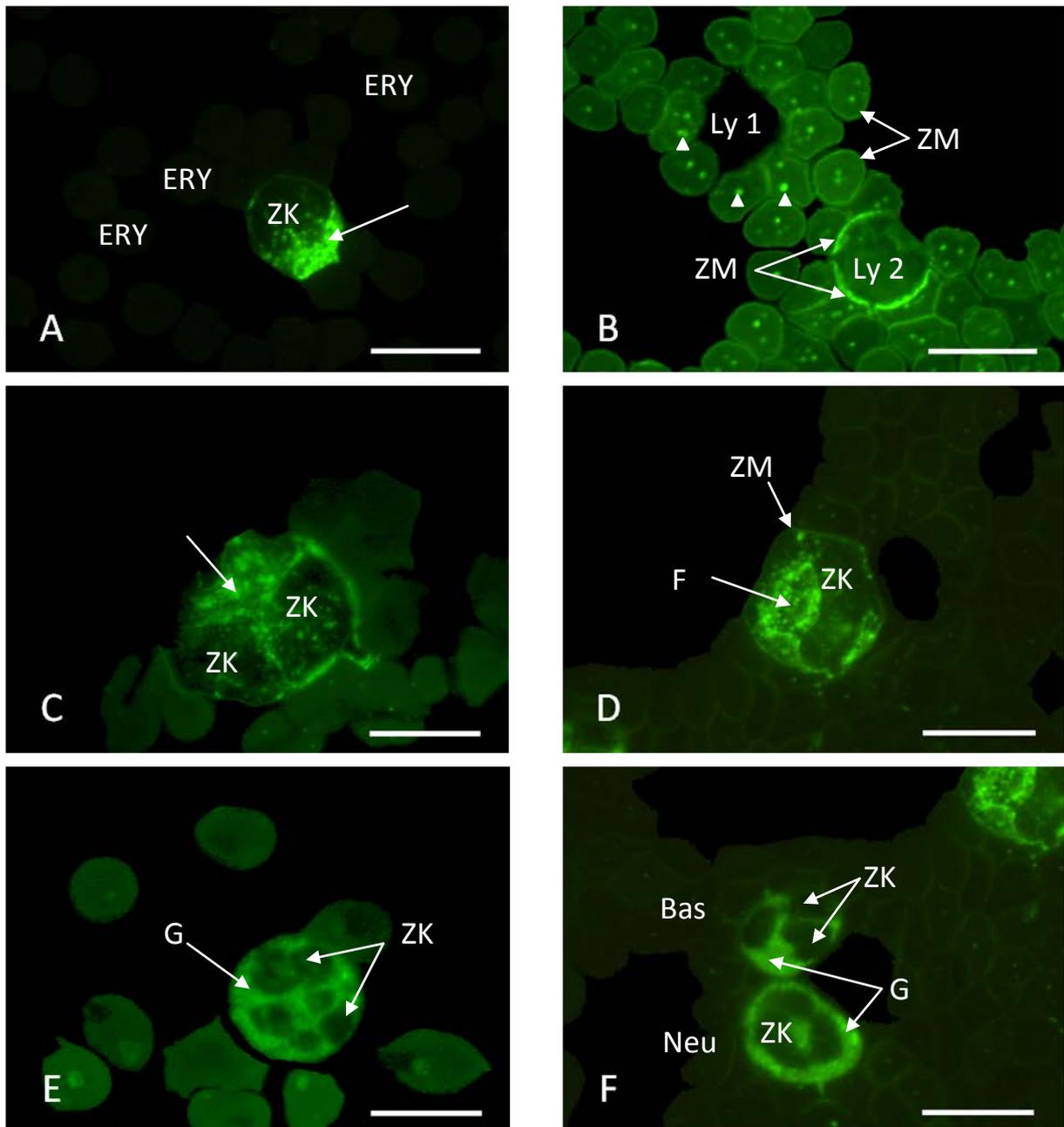


Abbildung 4.45: Bindung von WGAs-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

A. Lymphozyt, Methanol-fixiert. Im Lymphozyten ist eine stark positive, granuläre Reaktion zu sehen (Pfeil). Die Erythrozyten (ERY) haben sich nicht angefärbt. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

B. Erythrozyten und zwei Lymphozyten, unfixiert. Die Zellmembran (ZM) der Erythrozyten ist deutlich positiv. Im Zytoplasma befinden sich zudem stark positive, umschriebene Anfarbungen (kleine Pfeile). In diesem Bild sind außerdem ein komplett negativer Lymphozyt (Ly 1) und ein Lymphozyt (Ly 2) mit einer stark positiven Reaktion der Zellmembran (ZM) zu sehen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Monozyt, Methanol-fixiert. Im Monozyten haben sich vakuoläre Strukturen (Pfeil) stark positiv angefärbt. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μ m.

D. Monozyt, unfixiert. Im Zytoplasma befinden sich sehr viele granuläre bzw. fokale Fluoreszenzen (F). Die Zellmembran (ZM) ist schwach positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die Granula (G) des neutrophilen Granulozyten sind deutlich positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 4,5 Jahre. SB = 10 μ m.

F. Basophiler und neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Sowohl der basophile Granulozyt (Bas) als auch der neutrophile Granulozyt (Neu) zeigen eine deutliche Fluoreszenz ihrer Granula (G). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

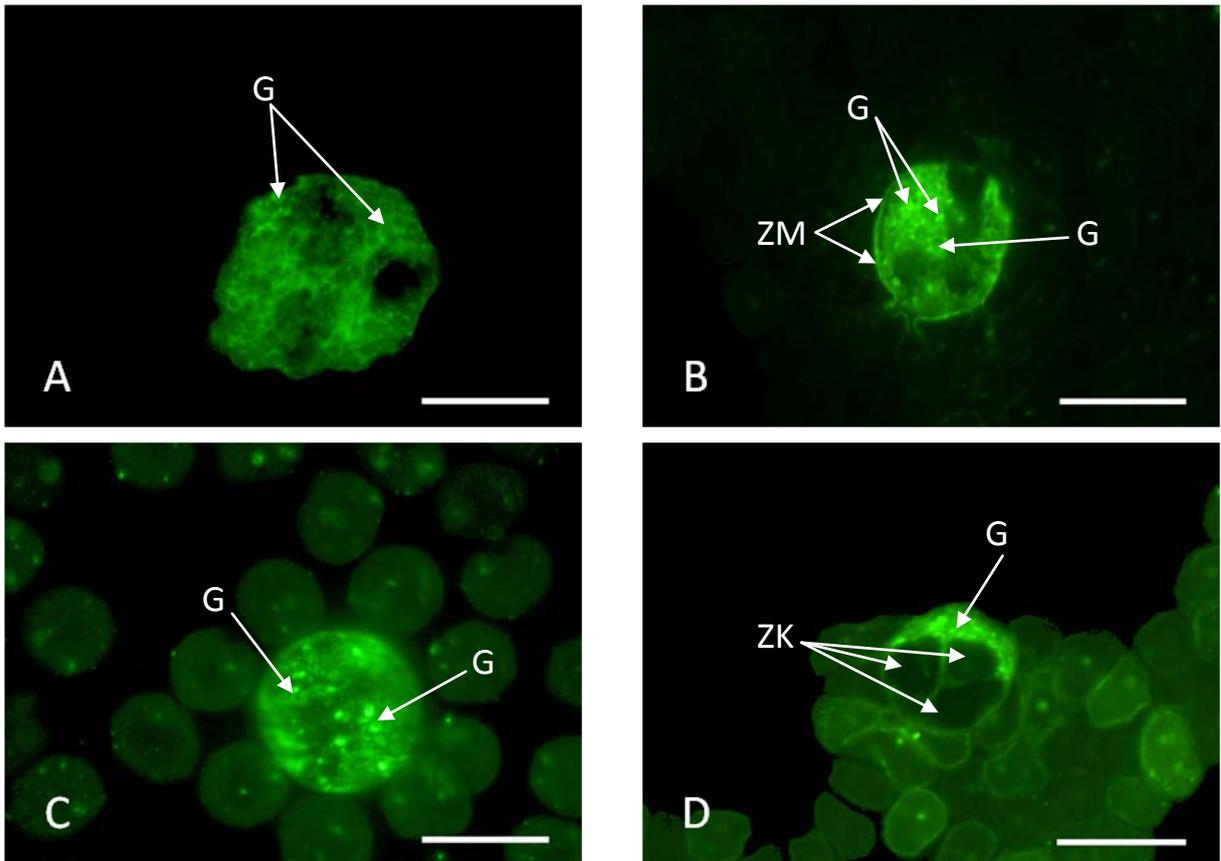


Abbildung 4.46: Bindung von WGs-FITC an die eosinophilen und basophilen Granulozyten

A. Eosinophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die Granula (G) des eosinophilen Granulozyten sind deutlich positiv. Dabei beschränkt sich die Fluoreszenz vor allem auf den Randbereich der eosinophilen Granula. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μm .

B. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Eine stark positive Fluoreszenz der eosinophilen Granula (G) und der Zellmembran (ZM) ist zu sehen. Die Fluoreszenz in den Granula scheint vor allem in der Matrix lokalisiert zu sein. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

C. Basophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die stark positiven, basophilen Granula (G) sind im gesamten Zytoplasma verteilt und überlagern den Zellkern. Kaninchen, w, 1,5 Jahre. SB = 10 μm .

D. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Die Granula (G) des basophilen Granulozyten sind stark positiv. Der Zellkern (ZK) ist hier gut zu erkennen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

4.5.4 N-Acetylgalaktosamin-spezifische Lektine

Lediglich bei GSL-1 und SNA (siehe Kapitel 4.5.2.3 Bindung von Sambucus nigra Agglutinin) kam es zu einer Bindung des Lektins an die Blutzellen des Kaninchens. Bei anderen für N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektine war keine positive Reaktion vorhanden.

4.5.4.1 Bindung von Griffonia simplicifolia I Agglutinin

Die Erythrozyten zeigten kaum eine Bindung von GSL-1-FITC an die Zellmembran. Dafür war im Zytoplasma stets eine starke, fokale Fluoreszenz zu erkennen. Die Thrombozyten waren immer negativ. In unfixierten Blutaussstrichen konnten vereinzelt positive Reaktionen an der Zellmembran oder im Zytoplasma der Lymphozyten gesehen werden. Monozyten hingegen waren überwiegend negativ. Eindeutig positive Reaktionen waren bei den Granulozyten zu beobachten. Auffällig war hierbei, dass auch die Bindung an neutrophile und basophile Granulozyten von der Fixationsart abhängig ist. Die Zellmembran war in allen Methanol-fixierten Blutaussstrichen negativ, wohingegen bei unfixierten Ausstrichen eine deutliche bis stark positive Fluoreszenz vorhanden war. Auch die Fluoreszenz der Granula und des Zytoplasmas dieser beiden Zelltypen war stärker bei unfixierten Ausstrichen bzw. stets positiv. Im Gegensatz dazu war der Anteil der positiven Reaktionen des Zytoplasmas und der Granula dieser Zelltypen in fixierten Ausstrichen sehr gering. Die eosinophilen Granulozyten wiesen in unfixierten Blutaussstrichen stets eine schwache Fluoreszenz der Granula auf, wohingegen in nur einem fixierten Blutaussstrich eine schwach positive Reaktion der Granula erkennbar war (siehe hierzu auch Tabelle 4.31).

GSL-1	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	100 % 66,67 %		33,33 %			0 % 33,33 %
Zytoplasma	100 % 100 % ¹					0 % 0 % ¹
Thrombozyten						
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Granulomer	100 % 100 %					0 % 0 %
Lymphozyten						
Membran	100 % 66,67 %				33,33 %	0 % 33,33 %
Zytoplasma	92,86 % 33,33 %	33,33 %	7,14 % 33,33 %			7,14 % 33,33 % ²
Neutrophile Granulozyten						
Membran	100 %			33,33 %	66,67 %	0 % 100 %
Granula	42,86 %	21,43 %	21,43 % 33,33 %	14,29 % 66,67 %		35,71 % 100 %
Zytoplasma	71,43 %	21,43 %	7,14 % 33,33 %	66,67 %		7,14 % 100 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	72,73 %	18,18 %	9,09 % 100 %			9,09 % 100 %
Zytoplasma	72,73 % 100 %	18,18 %				0 % 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	100 %			33,33 %	66,67 %	0 % 100 %
Granula	57,14 %		28,57 % 66,67 %	14,29 %	33,33 %	42,86 % 100 %
Zytoplasma	92,86 % 33,33 %		7,14 % 66,67 %			7,14 % 66,67 %
Monozyten						
Membran	92,86 % 100 %		7,14 %			7,14 % 0 %
Zytoplasma	100 %	100 %				0 % 0 %
Vakuolen	100 % 100 %					0 % 0 %

Tabelle 4.31: Auswertung der Bindung von GSL-1-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutausschnitte; Rot: Unfixierte Blutausschnitte.

¹Bei allen unfixierten Blutausschnitten zeigte sich in den Erythrozyten eine starke, fokale Fluoreszenz von 3+.

²In unfixierten Blutausschnitten kam es bei ca. 14 % der Lymphozyten zu einer fokalen Reaktion von 2+ im Zytoplasma.

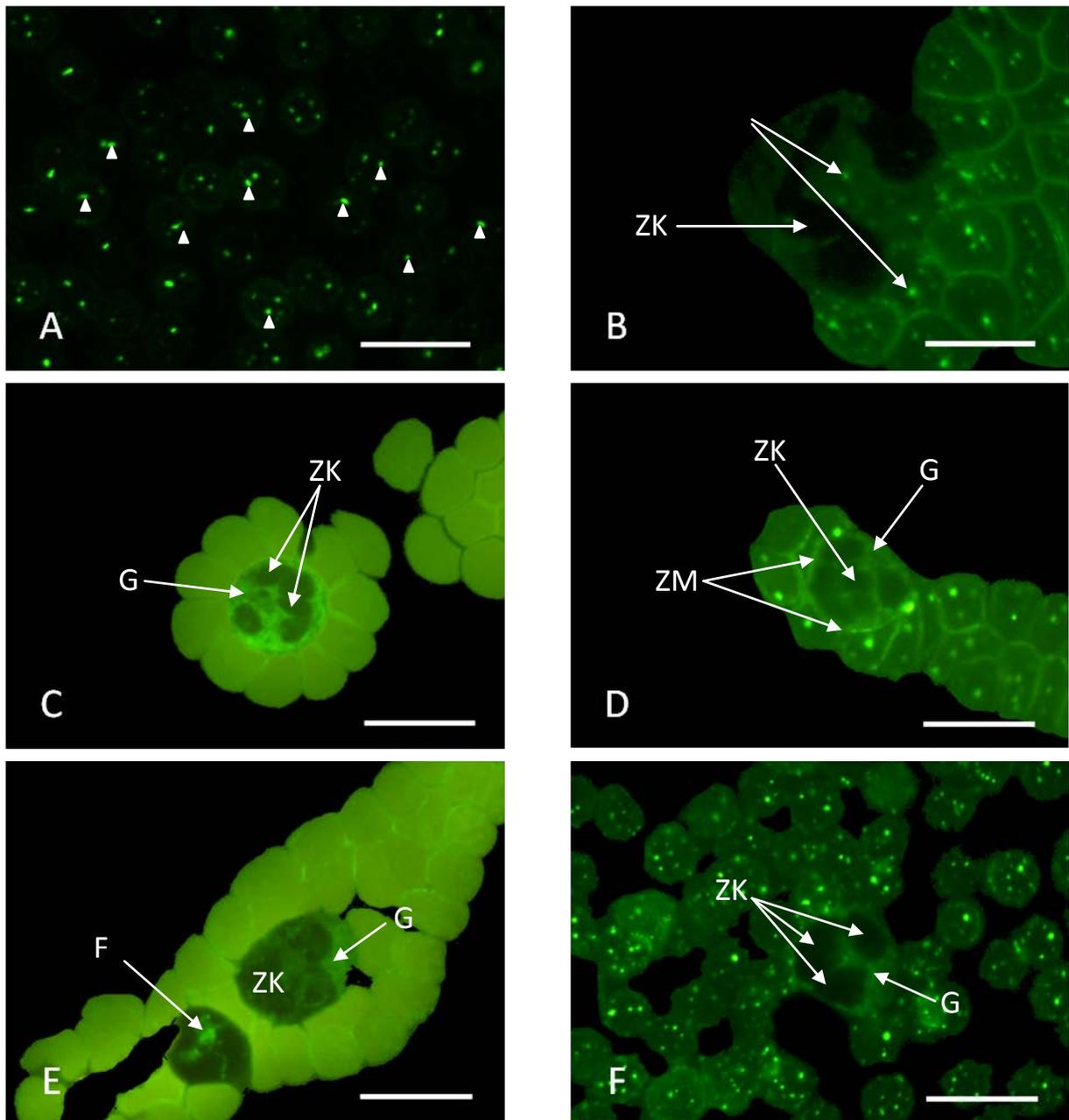


Abbildung 4.47: Bindung von GSL-1-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

A. Erythrozyten, unfixiert. Im Zytoplasma der Erythrozyten befinden sich stark positive, fokale Anfärbungen (kleine Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

B. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Im Zytoplasma sind vereinzelt fokale, GSL-1-positive Areale zu erkennen (Pfeile). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die Granula (G) zeigen eine positive Reaktion. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

D. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Die Granula (G) und die Zellmembran (ZM) des neutrophilen Granulozyten sind GSL-1-positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Basophiler Granulozyt und Lymphozyt, Methanol-fixiert. Die basophilen Granula (G) zeigen eine schwache Fluoreszenz. Im Lymphozyten sind fokale stark positive Fluoreszenzen (F) zu erkennen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

F. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Die basophilen Granula (G) sind deutlich positiv. Die Erythrozyten weisen stark positive Reaktionsprodukte (kleine Pfeile) auf. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.5.4.2 Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin

In den meisten fixierten und allen unfixierten Blutaussstrichen war keine Bindung von DBA-FITC festzustellen. Eine unspezifische Bindung von DBA-FITC an die Granula und das Zytoplasma der neutrophilen und basophilen Granulozyten konnte selten nachgewiesen werden.

4.5.4.3 Bindung von Soybean Agglutinin

Es konnte keine spezifische Bindung von SBA-FITC in fixierten und unfixierten Blutaussstrichen an die Blutzellen nachgewiesen werden.

4.5.4.4 Bindung von Sophora japonica Agglutinin

Sowohl in fixierten und unfixierten Blutaussstrichen konnte keine spezifische Bindung von SJA-FITC an die Blutzellen nachgewiesen werden.

4.5.5 Fukose-spezifische Lektine

4.5.5.1 Bindung von Ulex europaeus I Agglutinin

Eine spezifische Bindung von UEA-1-FITC an die Blutzellen konnte weder in fixierten noch in unfixierten Blutaussstrichen festgestellt werden. Eine unspezifische Fluoreszenz des Zytoplasmas war bei ca. 20 % der Granulozyten und ca. 7 % der Monozyten zu beobachten.

4.5.6 Für komplexe Kohlenhydrate spezifische Lektine

4.5.6.1 Bindung von Maackia amurensis I Agglutinin

Die Blutzellen der fixierten Blutaussstriche waren bei der Anfärbung mit MAA-1-FITC kaum positiv. Lediglich in zwei Ausstrichen konnte Fluoreszenz nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Blutzellen in Blutaussstrichen ohne Methanolfixierung teilweise eine deutlich positive Reaktion (siehe hierzu auch Tabelle 4.32).

MAA	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	100 % 75 %		25 %			0 % 25 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Thrombozyten						
Zytoplasma	80 % 25 %	10 %		10 % 25 %	50 %	10 % 75 %
Granulomer	100 % 25 %			50 %	25 %	0 % 75 %
Lymphozyten						
Membran	90 % 100 %		10 %			10 % 0 %
Zytoplasma	100 %		100 %			0 % 100 % ¹
Neutrophile Granulozyten						
Membran	90 % 100 %			10 %		10 % 0 %
Granula	90 %		10 % 50 %		50 %	10 % 100 %
Zytoplasma	90 %		10 % 50 %	50 %		10 % 100 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	100 % 75 %				25 %	0 % 25 %
Zytoplasma	100 % 25 %			75 %		0 % 75 %
Basophile Granulozyten						
Membran	80 % 100 %		10 %	10 %		20 % 0 %
Granula	90 %			10 % 25 %	75 %	10 % 100 %
Zytoplasma	90 %		10 % 50 %	50 %		10 % 100 %
Monozyten						
Membran	100 % 75 %				25 %	0 % 25 %
Zytoplasma	100 %		75 %	25 %		0 % 100 %
Vakuolen	100 % 100 %					0 % 0 %

Tabelle 4.32: Auswertung der Bindung von MAA-1 an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

¹In unfixierten Blutaussstrich zeigten ca. 25 % der Lymphozyten eine fokale Fluoreszenz im Zytoplasma von 2+-3+.

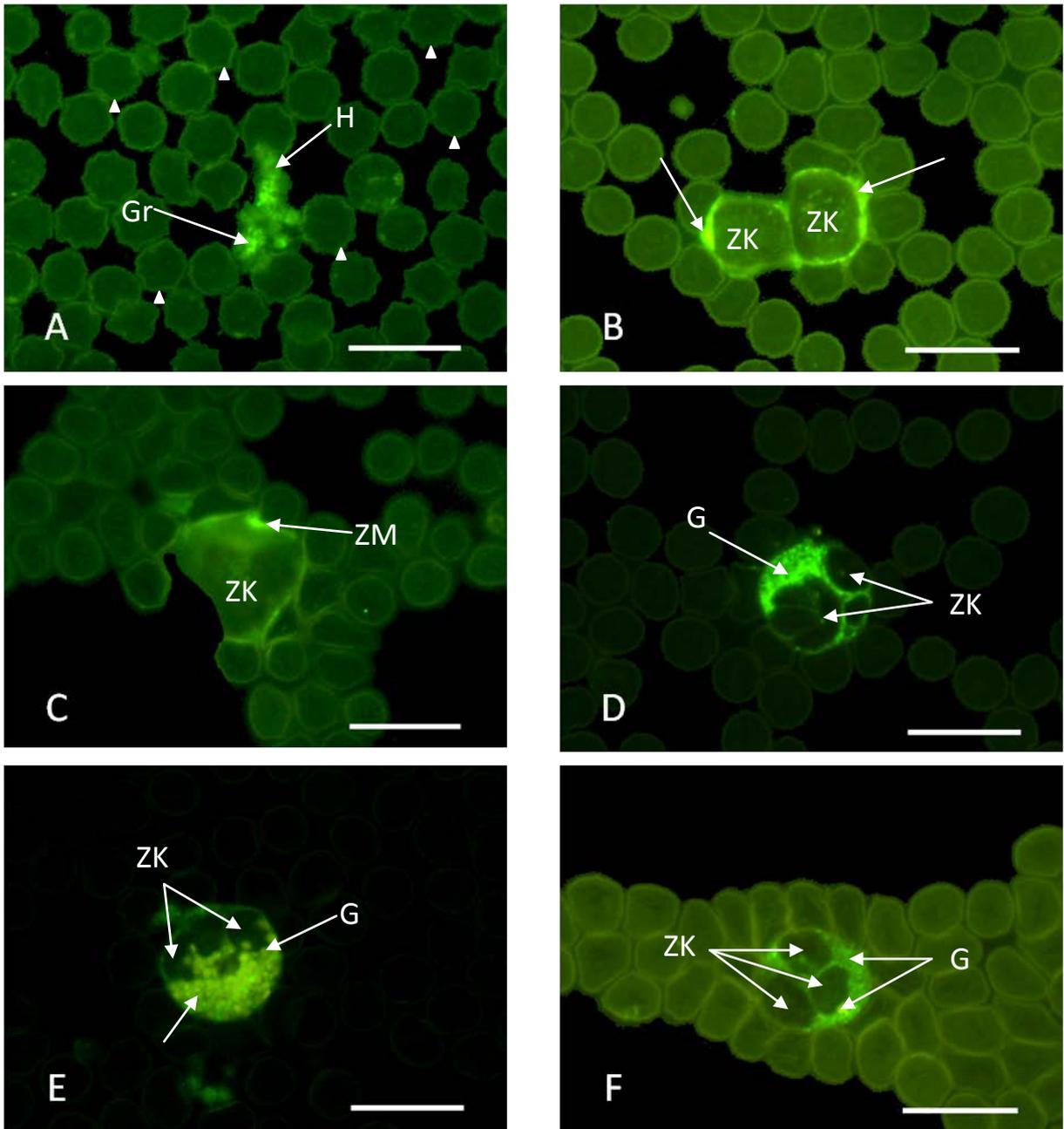


Abbildung 4.48: Bindung von MAA-1 an die Blutzellen des Kaninchens

A. Erythrozyten und Thrombozyten, unfixiert. Die Erythrozyten zeigen eine schwache Fluoreszenz der Zellmembran (kleine Pfeile). In den Thrombozyten ist das Granulomer (Gr) 3+-positiv, das Hyalomer (H) 2+-positiv. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

B. Lymphozyten, unfixiert. Im Zytoplasma sind stark MAA-1-positive Areale (Pfeile) zu erkennen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Monozyt, unfixiert. Bei diesem Monozyten ist eine stark positive Fluoreszenz der Zellmembran (ZM) zu sehen, die keine Schlüsse auf die Reaktion der vakuolären Strukturen im Zytoplasma zulässt. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

D. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Die Granula (G) des neutrophilen Granulozyten weisen eine stark positive Fluoreszenz auf. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Im Zytoplasma ist eine deutliche, intergranuläre Fluoreszenz zu sehen (Pfeil). G = Granula. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

F. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Die basophilen Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.5.6.2 Bindung von Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuko

Es erfolgte kaum eine Bindung von PHA-L-FITC an die Erythrozyten und Thrombozyten in den fixierten Blutaussstrichen. In diesen konnte auch keine Fluoreszenz der Lymphozyten beobachtet werden, wohingegen bei den unfixierten Blutaussstrichen vor allem eine fokale Fluoreszenz im Zytoplasma vorhanden war. Die Membran der Granulozyten zeigte keine positive Reaktion, wohingegen die Granula, vor allem in den unfixierten Blutaussstrichen, deutlich positiv waren. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten war in beiden Fixationsvarianten positiv. Eine Fluoreszenz der eosinophilen Granulozyten zeigte sich vor allem in unfixierten Ausstrichen, seltener in fixierten Blutaussstrichen. Im Gegensatz dazu konnte ein Unterschied in der Fixierungsmethode bei der Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der basophilen Granulozyten beobachtet werden. Es erschien in fixierten Blutaussstrichen negativ und in unfixierten Blutaussstrichen größtenteils positiv. Die Monozyten wiesen in fixierten Blutaussstrichen kaum Fluoreszenz auf. In unfixierten Blutaussstrichen jedoch band PHA-L an vakuoläre Strukturen im Zytoplasma und auch an die Zellmembran (siehe Tabelle 4.33).

PHA-L	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	100 % 10 %		70 %	20 %		0 % 90 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Thrombozyten						
Membran	100 % 66,67 %		33,33 %			0 % 33,33 %
Granula	100 % 66,67 %				33,33 %	0 % 33,33 %
Lymphozyten						
Membran	92,56 % 100 %			7,14 %		7,14 % 0 %
Zytoplasma	92,56 % 33,33 %		7,14 % 66,67 %			7,14 % 66,67 % ¹
Neutrophile Granulozyten						
Membran	85,71 % 100 %		7,14 %	7,14 %		14,29 % 0 %
Granula	64,29 %		28,57 %	7,14 % 100 %		35,71 % 100 %
Zytoplasma	14,29 % 33,33 %		71,43 %	66,67 %	7,14 %	78,57 % 66,67 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	50 %		16,67 %	33,33 % 100 %		50 % 100 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	100 %				100 %	0 % 100 %
Zytoplasma	100 % 33,33 %		66,67 %			0 % 66,67 %
Monozyten						
Membran	100 % 66,67 %			33,33 %		0 % 33,33 %
Zytoplasma	91,67 % 100 %	8,33 %				8,33 % 0 %
Vakuolen	100 % 33,33 %		33,33 %	33,33 %		0 % 66,67 %

Tabelle 4.33: Auswertung der Bindung von PHA-L-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

¹In unfixierten Blutaussstrichen zeigten ca. 33 % der Lymphozyten eine positive, fokale Reaktion von 2+.

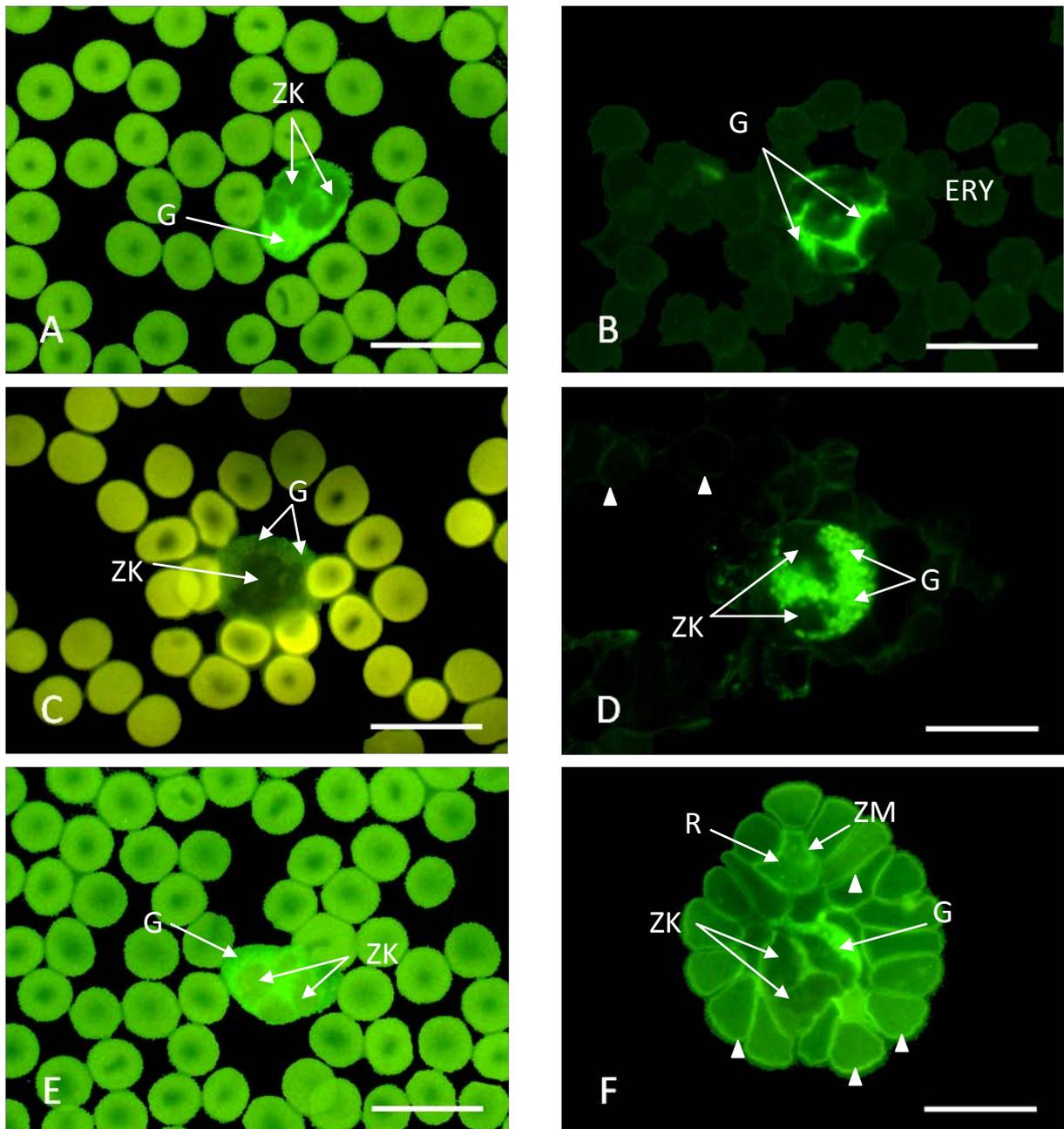


Abbildung 4.49: Bindung von PHA-L-FITC an die Granulozyten des Kaninchen

A. Neutrophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die neutrophilen Granula (G) sind Fluoreszenz-positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μ m.

B. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Die neutrophilen Granula (G) zeigen eine sehr starke Fluoreszenz. Die Erythrozyten (ERY) sind negativ. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Eosinophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die großen Granula (G) des eosinophilen Granulozyten weisen eine schwach positive Fluoreszenz auf. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 1,5 Jahre. SB = 10 μ m.

D. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Die eosinophilen Granula (G) sind schwach positiv. Zudem sind Erythrozyten mit einer schwach positiven Fluoreszenz der Zellmembran zu sehen (kleine Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. Basophiler Granulozyt, Methanol-fixiert. Die basophilen Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 6-7 Monate. SB = 10 μ m.

F. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Bei den Erythrozyten kann man die schwach positive Zellmembran (kleine Pfeile) gut erkennen. Zudem befindet sich ein Retikulozyt (R) im Bild, der eine fein granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma aufweist und dessen Zellmembran stärker fluoresziert als bei den reifen Erythrozyten. Der basophile Granulozyt mit seinem plumpen Zellkern hat zahlreiche, stark positive Granula (G) in seinem Zytoplasma. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

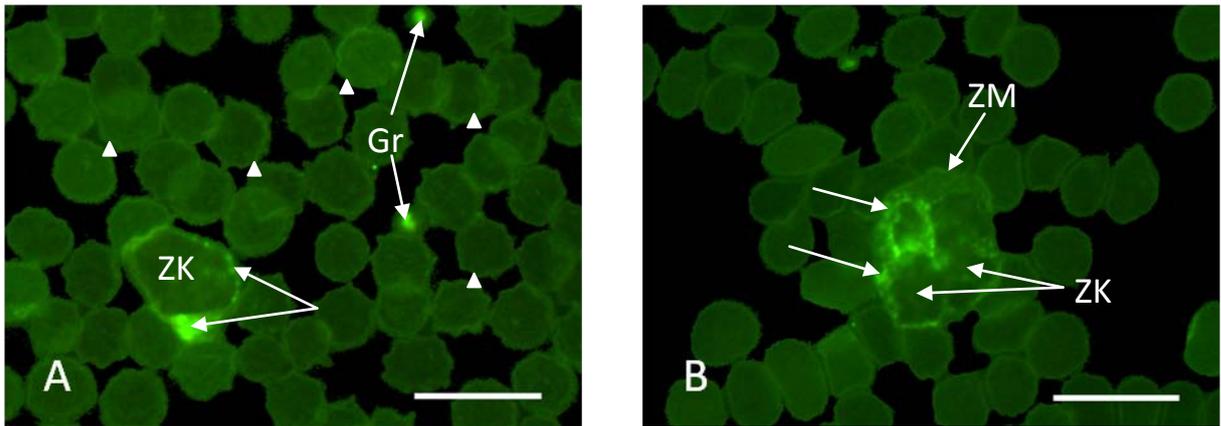


Abbildung 4.50: Bindung von PHA-L-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

A. Erythrozyten, Lymphozyt und Thrombozyten, unfixiert. Die Zellmembran der Erythrozyten ist schwach positiv (kleine Pfeile). Im Zytoplasma des Lymphozyten befinden sich stark positive, fokale Anfärbungen (Pfeile). Auch das Granulomer (Gr) der Thrombozyten zeigt eine starke Fluoreszenz. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B. Monozyt, unfixiert. Im Zytoplasma des Monozyten befinden sich zahlreiche, granuläre, PHA-L-positive Areale (Pfeile). Die Zellmembran (ZM) ist stellenweise schwach positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

4.5.6.3 Bindung von Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro

Es erfolgte kaum eine Bindung von PHA-E-FITC bei fixierten und unfixierten Ausstrichen an Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Monozyten. Bei den neutrophilen und basophilen Granulozyten waren das Zytoplasma und die Granula vor allem in unfixierten Ausstrichen positiv. In der Tabelle 4.34 ist die Auswertung der Bindung von PHA-E an die Blutzellen des Kaninchens aufgeführt.

PHA-E	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Thrombozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	100 % 100 %					0 % 0 %
Lymphozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	92,86 % 100 %	7,14 %				0 % 0 %
Neutrophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	71,43 % 33,33 %	7,14 %	21,42 % 66,67 %			21,42 % 66,67 %
Zytoplasma	71,43 % 33,33 %	28,57 %	66,67 %			0 % 66,67 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	92,31 % 100 %			7,69 %		7,69 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	78,57 % 33,33 %	7,14 %	14,29 % 66,67 %			14,29 % 66,67 %
Zytoplasma	92,86 % 33,33 %	7,14 %	66,67 %			0 % 66,67 %
Monozyten						
Membran	100 % 66,67 %		33,33 %			0 % 33,33 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Vakuolen	100 % 66,67 %		33,33 %			0 % 33,33 %

Tabelle 4.34: Auswertung der Bindung von PHA-E-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

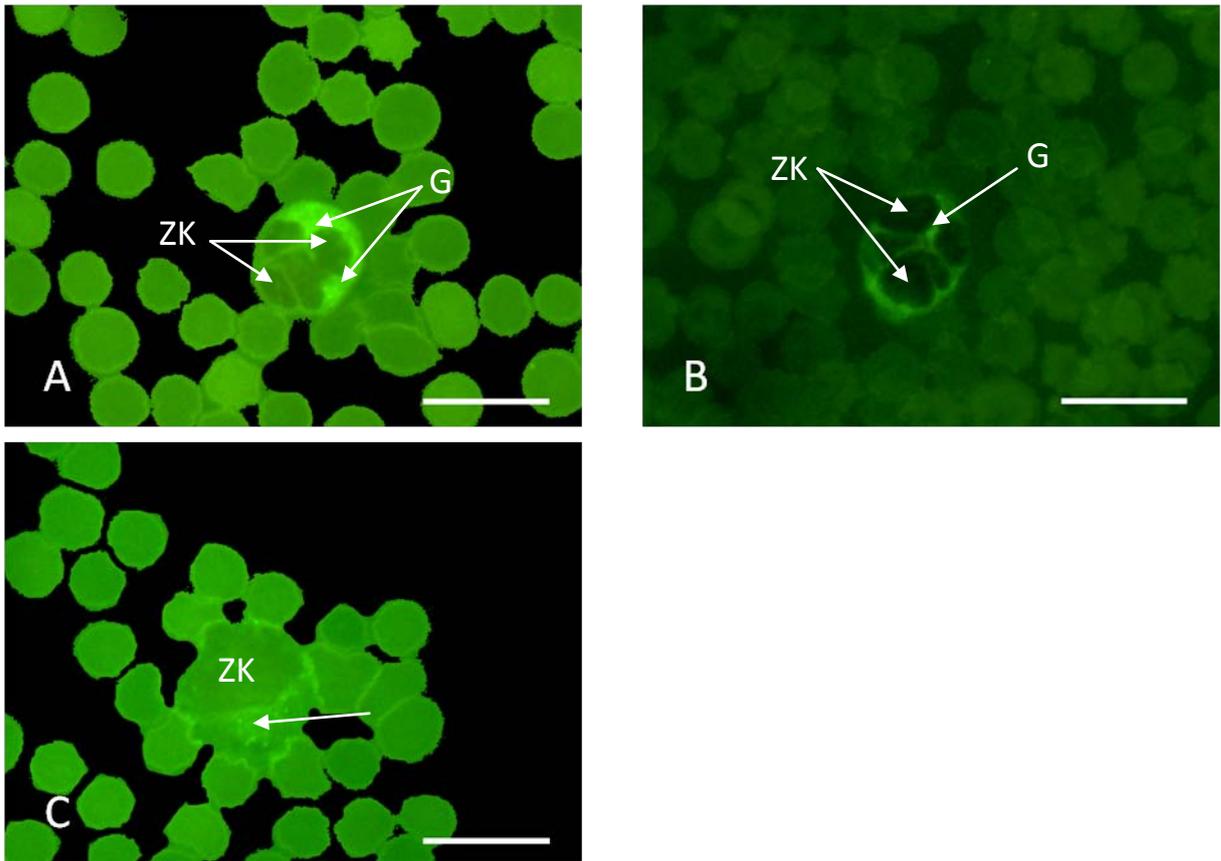


Abbildung 4.51: Bindung von PHA-E-FITC an die Blutzellen des Kaninchens

A. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Die neutrophilen Granula (G) sind stark positiv. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Im Zytoplasma ist eine stark positive Reaktion der basophilen Granula (G) zu sehen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

C. Monozyt, unfixiert. Der Monozyt zeigt eine granuläre, stark positive Reaktion (Pfeil) im Zytoplasma. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

4.5.7 Bindung von Galektinen

Die Bindung der Galektine an die Blutzellen des Kaninchens wurde bei einer Konzentration von 10 µg/ml untersucht. Bei den Galektinen (Galectin-3 truncated, Galectin-3 full length und Galectin-9) kam es weder in fixierten noch in unfixierten Blutaussstrichen zu einer Bindung an die Blutzellen des Kaninchens.

4.5.7.1 Bindung von Galektin-1

Bei Verwendung von Galektin-1 konnte nur bei wenigen Blutaussstrichen eine Fluoreszenz in den Blutzellen festgestellt werden (siehe Tabelle 4.35.). Diese war zumeist sehr schwach und beschränkte sich vor allem auf die neutrophilen und basophilen Granulozyten. Lediglich bei einem neutrophilen Granulozyten war eine ausgeprägtere Fluoreszenz auszumachen. Die Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten zeigten keine spezifische Bindung von Galektin-1. In einem fixierten Blutaussstrich war eine schwache Reaktion der eosinophilen Granula zu sehen.

Gal-1	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Thrombozyten						
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 10 %
Granula	100 % 100 %					0 % 0 %
Lymphozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	90 % 100 %	10 %				0 % 0 %
Neutrophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	90 % 50 %	10 % 40 %		10 %		0 % 10 %
Zytoplasma	100 % 50 %	40 %	10 %			0 % 10 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	90 % 100 %	10 %				0 % 0 %
Zytoplasma	90 % 100 %		10 %			10 % 0 %
Basophile Granulozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	90 % 40 %		10 % 60 %			10 % 60 %
Zytoplasma	100 % 40 %	60 %				0 % 0 %
Monozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Vakuolen	100 % 100 %					0 % 0 %

Tabelle 4.35: Auswertung der Bindung von Galektin-1 an die Blutzellen des Kaninchens
Schwarz: Fixierte Blutaussstriche; Rot: Unfixierte Blutaussstriche.

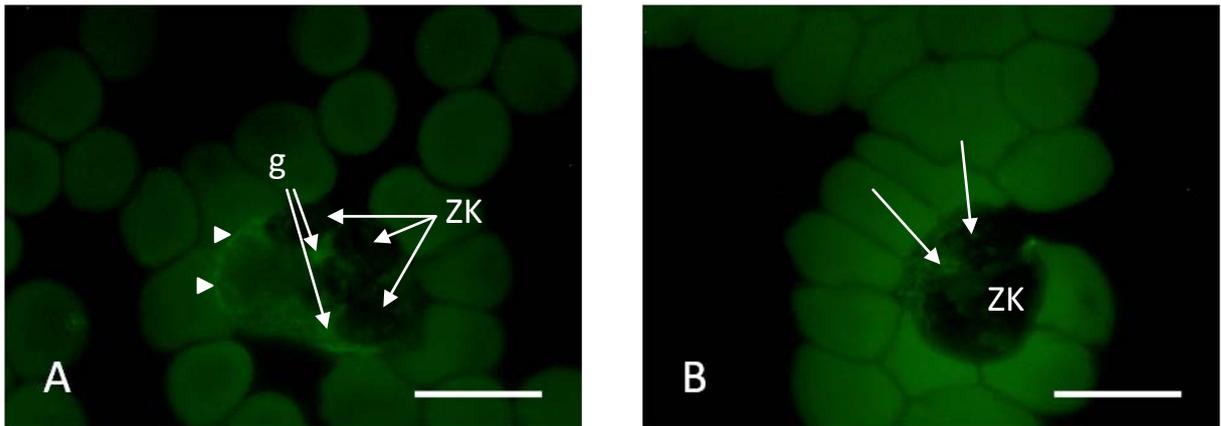


Abbildung 4.52: Bindung von Galektin-1 an die Blutzellen des Kaninchens

A. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Eine deutliche Fluoreszenz ist teilweise granulär (g) im Zytoplasma, stellenweise auch direkt unterhalb der Zellmembran im Zytoplasma (kleiner Pfeil) zu sehen. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Es ist eine schwache Fluoreszenz der basophilen Granula zu erkennen (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

4.5.7.2 Bindung von Galektin-8

Galektin-8 zeigte vor allem in unfixierten Blutausstrichen in den neutrophilen und basophilen Granulozyten eine starke Bindung an die Zellmembran, vereinzelt auch an die Granula. In eosinophilen Granulozyten erfolgte die Bindung meist granulär im Zytoplasma. Dabei entsprachen die granulären, fluoreszierenden Strukturen in ihrer Größe und Form nicht den eosinophilen Granula. Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten waren stets negativ. In einem Blutausstrich war eine schwache, granuläre Fluoreszenz in den Monozyten zu erkennen (siehe Tabelle 4.36.).

Gal-8	Stärke der Reaktion					Prozentualer Anteil der positiven Strukturen
	0	+/-	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Thrombozyten						
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Granula	100 % 100 %					0 % 0 %
Lymphozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Neutrophile Granulozyten						
Membran	80 % 20 %			10%	10 % 70 %	20 % 70 %
Granula	70 % 80 %		20 %	10%	10 % 10 %	30 % 20 %
Zytoplasma	90 % 90 %	10 %	10 %			0 % ¹ 10 % ²
Eosinophile Granulozyten						
Membran	80 % 100 %			10 %	10 %	20 % 0 %
Granula	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 % ³
Basophile Granulozyten						
Membran	80 % 30 %		10 %		10 % 70 %	20 % 70 %
Granula	60 % 80 %		30 %	10 %	10 % 10 %	40 % 20 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Monozyten						
Membran	100 % 100 %					0 % 0 %
Zytoplasma	100 % 100 %					0 % 0 %
Vakuolen	100 % 90 %		10 %			0 % 10 %

Tabelle 4.36: Auswertung der Bindung von Galektin-8 an die Blutzellen des Kaninchens

¹Bei ca. 10 % der neutrophilen Granulozyten fokal im Zytoplasma 2+.

²Bei 20 % der neutrophilen Granulozyten fokal im Zytoplasma 3+.

³Im Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten zeigte sich jedoch eine granuläre Fluoreszenz, die von ihrer Ausprägung nicht den eosinophilen Granula entspricht.

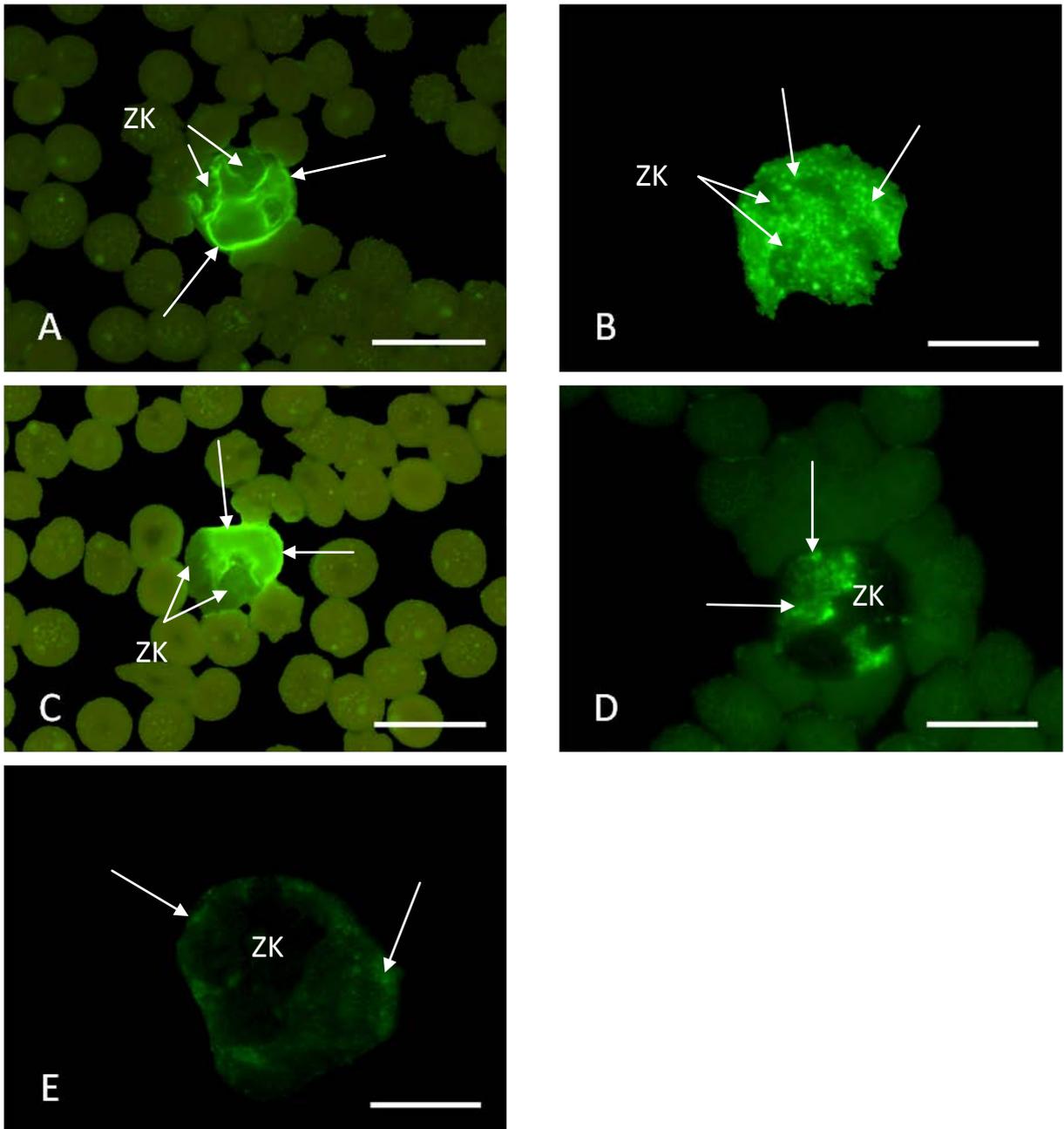


Abbildung 4.53: Bindung von Galektin-8 an die Blutzellen des Kaninchens

A. Neutrophiler Granulozyt, unfixiert. Es ist eine stark positive Fluoreszenz der Zellmembran zu sehen (Pfeile). Ob eine Bindung im Zytoplasma oder an die Granula vorliegt, kann somit nicht beurteilt werden. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 7 Jahre. SB = 10 μ m.

B. Eosinophiler Granulozyt, unfixiert. Im eosinophilen Granulozyten ist eine granuläre Fluoreszenz (Pfeil) erkennbar, die jedoch bezüglich Größe und Form nicht den eosinophilen Granula entspricht. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Die Zellmembran zeigt eine sehr starke Fluoreszenz (Pfeil). Aufgrund dessen kann die Bindung von Galektin-8 im Zytoplasma und an die Granula nicht beurteilt werden. ZK = Zellkern. Kaninchen, m, 7 Jahre. SB = 10 μ m.

D. Basophiler Granulozyt, unfixiert. Die basophilen Granula weisen eine stark positive Fluoreszenz auf (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 μ m.

E. Monozyt, unfixiert. Eine schwach granuläre Fluoreszenz ist im Zytoplasma zu sehen (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.5.8 Inhibition mit Hemmzuckern

Die Lektine WGA, WGAs, Con A, LCA und PSA wurden vor dem Auftragen auf die Blutausrich mit dem entsprechenden Hemmzucker inkubiert und anschließend erneut auf ihre Bindungsfähigkeit untersucht. In keinem der Blutausrich kam es zu einer Bindung des Lektins an die verschiedenen Strukturen in den Blutzellen.

4.5.9 Vorbehandlung mit Neuraminidase

Bei den Lektinen GSL-1, PNA, RCA₁₂₀, DBA, SJA und SBA wurde untersucht, ob eine vorangehende Inkubation mit Neuraminidase das Bindungsmuster verändert (siehe Tabelle 4.37.). Abgesehen von GSL-1 banden die anderen Lektine vorher nicht an die Blutzellen. Bei der Bindung von GSL-1 an die Blutzellen der Kaninchen ist vor allem auffällig, dass kein Unterschied zwischen der Bindung an die Granulozyten in diesen Blutausrich und den Methanol-fixierten Blutausrich ohne Neuraminidase-Vorbehandlung bestand. Ein eindeutigeres Ergebnis lieferten hier die Thrombozyten, die in den Blutausrich ohne Neuraminidasebehandlung immer negativ waren, nach Vorbehandlung mit Neuraminidase aber eine Fluoreszenz aufwiesen. Insgesamt waren die Erythrozyten in allen Blutausrich negativ. Die Thrombozyten hingegen zeigten in den mit Neuraminidase-vorbehandelten Blutausrich stets eine Fluoreszenz. Abgesehen von Färbungen mit SBA und DBA hatten die Lymphozyten oft eine schwache Fluoreszenz im Zytoplasma, selten auch an der Zellmembran. Die Monozyten hingegen waren meist negativ. Die neutrophilen Granulozyten wiesen vor allem positive Granula oder auch ein schwach positives Zytoplasma bei der Zugabe von PNA, SJA, RCA und GSL-1 auf. Die eosinophilen Granulozyten waren meist negativ. Nur bei SJA-FITC konnte in einem Blutausrich eine Bindung an die eosinophilen Granula beobachtet werden. In den basophilen Granulozyten hingegen waren zumeist positive Granula oder ein schwach positives Zytoplasma zu sehen, außer in den Blutausrich, auf die SBA und DBA aufgetragen wurden.

	ERY	THR	LY	MON	NEU	EO	BAS
SBA							
1	Neg	H 1+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	H 1+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	H 1+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
PNA							
1	Neg	H 1+	ZP 1+	Neg	G 2+	Neg	G 1+
2	Neg	H 1+	ZP 1+	Neg	G 1+, ZP 1+	Neg	-
3	Neg	H 1+	ZP 1+	Neg	G 1+, ZP 1+	Neg	-
SJA							
1	Neg	H 1+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	H 1+/2+	ZP 1+, ZM 1+	Neg	G 1+	G 1+	-
3	Neg	H 1+	ZP 1+	Neg	G 1+	Neg	ZP 1+
GSL-1							
1	Neg	H 2+	ZP 1+	Neg	G 1+, ZP 1+	Neg	ZP 1+
2	Neg	H 1+	ZP 1+	Neg	G +/-	Neg	G 1+
3	Neg	H 1+	ZP 1+	Neg	G 1+	Neg	G 1+
RCA							
1	Neg	H 1+	ZP 1+	Neg	G 1+	Neg	G 1+
2	Neg	H 1+	ZP 1+	ZP 1+	G 1+/2+	Neg	G 1+
3	Neg	H 1+	Neg	Neg	G 1+	Neg	G 1+
DBA							
1	Neg	H 1+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	H 1+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	H 1+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Tabelle 4.37: Auswertung der Bindung der Lektine GSL-1, PNA, RCA₁₂₀, DBA, SJA und SBA an die Blutzellen des Kaninchens nach Neuraminidase-Vorbehandlung

ERY = Erythrozyten; LY = Lymphozyten; MON = Monozyten; NEU = Neutrophile Granulozyten; EO = Eosinophile Granulozyten; BAS = Basophile Granulozyten; Neg = negativ; - = nicht identifizierbar; H = Hyalomer; ZP = Zytoplasma; ZM = Zellmembran; G = Granula.

Die nachfolgenden Bilder sollen exemplarisch die glykohistochemische Anfärbung der einzelnen Blutzelltypen verdeutlichen.

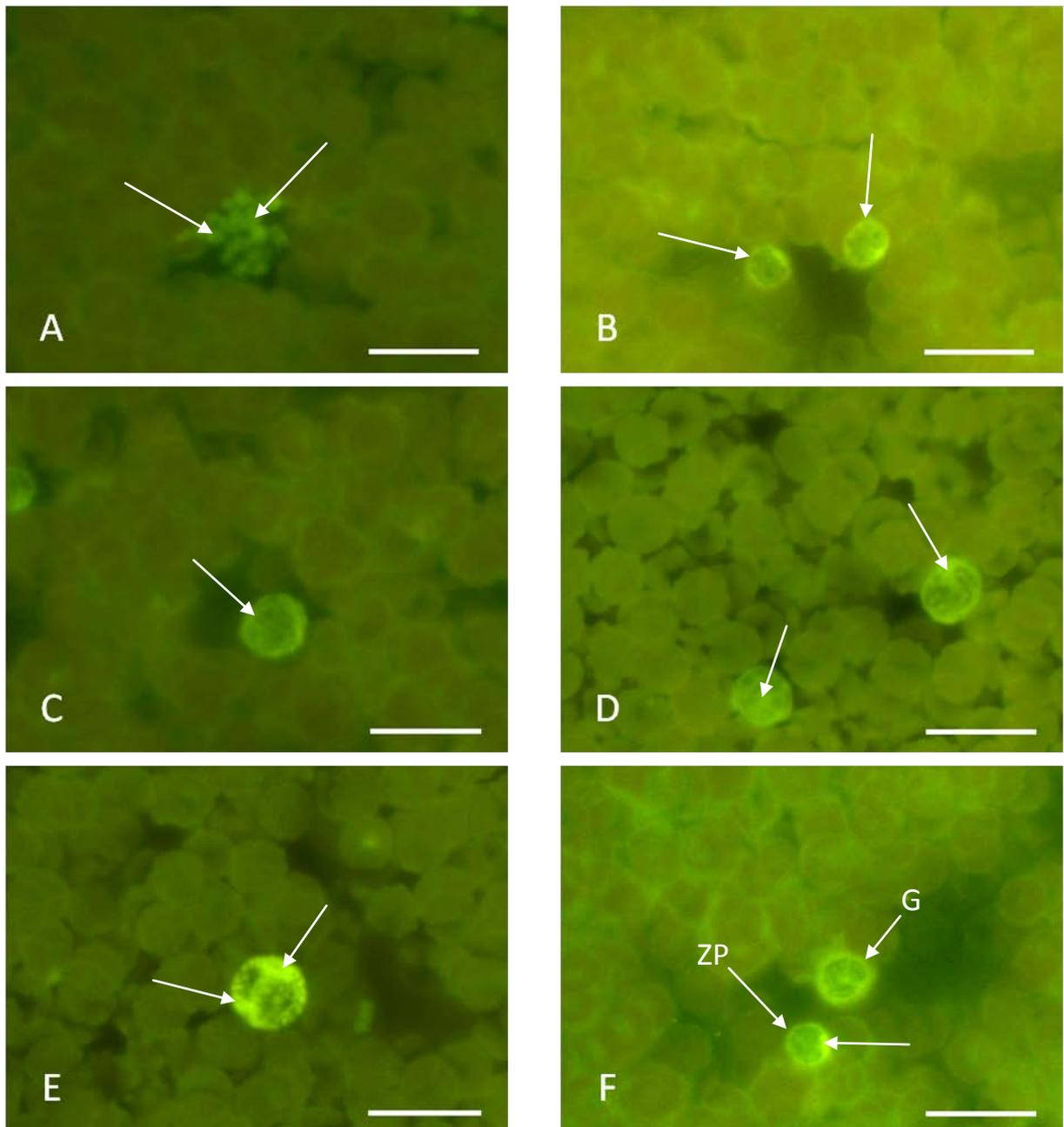


Abbildung 4.54: Bindung verschiedener Lektine an die Blutzellen des Kaninchens nach Vorbehandlung mit Neuraminidase

A. RCA-FITC. Thrombozyten. Die Thrombozyten zeigen eine positive Reaktion des Zytoplasmas (Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

B. RCA-FITC. Lymphozyten. Das Zytoplasma der zwei Lymphozyten ist schwach positiv (Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. RCA-FITC. Monozyt. Im Zytoplasma des Monozyten ist eine Fluoreszenz zu sehen (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

D. SJA-FITC. Neutrophile Granulozyten. Im Zytoplasma der beiden neutrophilen Granulozyten sind die Granula mit einer deutlichen Fluoreszenz erkennbar (Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

E. SJA-FITC. Eosinophiler Granulozyt. Die eosinophilen Granula sind schwach positiv (Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

F. RCA-FITC. Basophiler Granulozyt und Lymphozyt. Im Zytoplasma des basophilen Granulozyten befinden sich Fluoreszenz-positive Granula (G). Das Zytoplasma (ZP) des Lymphozyten ist positiv und enthält stark positive Areale (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

4.6 Immunhistochemische und histochemische Untersuchungen

Für die immunhistochemischen und histochemischen Untersuchungen wurden je zehn luftgetrocknete Blutausstriche der Kaninchen verwendet, für die Doppelfärbungen je fünf. Die Auswertung wurde am Fluoreszenzmikroskop Dialux 20 (LEITZ, Wetzlar) durchgeführt. Die Fotos wurden mit der Progres[®]CF cool Kamera (JENOPTIK, Jena) aufgenommen.

4.6.1 Immunhistochemischer Nachweis von spezifischen Antigenen der Lymphozyten und basophilen Granulozyten

Es wurden fünf Antikörper auf ihre Bindung an Lymphozyten und basophile Granulozyten untersucht. Die Sichtbarmachung der Primärantikörper erfolgte mit FITC-markierten Sekundärantikörpern. Die Kernfärbung wurde auch hier mit DAPI vorgenommen. Die Bindung von ISC29E an CD8⁺-T-Lymphozyten, RTH1A an CD4⁺-T-Lymphozyten und RACT30A an B-Lymphozyten zeigte sich in den Blutausstrichen jeweils nur an einem Teil der Lymphozyten. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst.

Antikörper	Anteil positiver Lymphozyten	Anteil negativer Lymphozyten	Stärke der Fluoreszenz bei positiven Lymphozyten
ISC29	26 %	64 %	2+
RTH1A	46 %	54 %	2+
RACT30A	46 %	54 %	3+

Tabelle 4.38: Bindung der Antikörper ISC29E, RTH1A und RACT30A an die Lymphozyten

Die Bindung der Antikörper erfolgte nur an Lymphozyten. Eine Bindung an andere Blutzellen fand nicht statt.

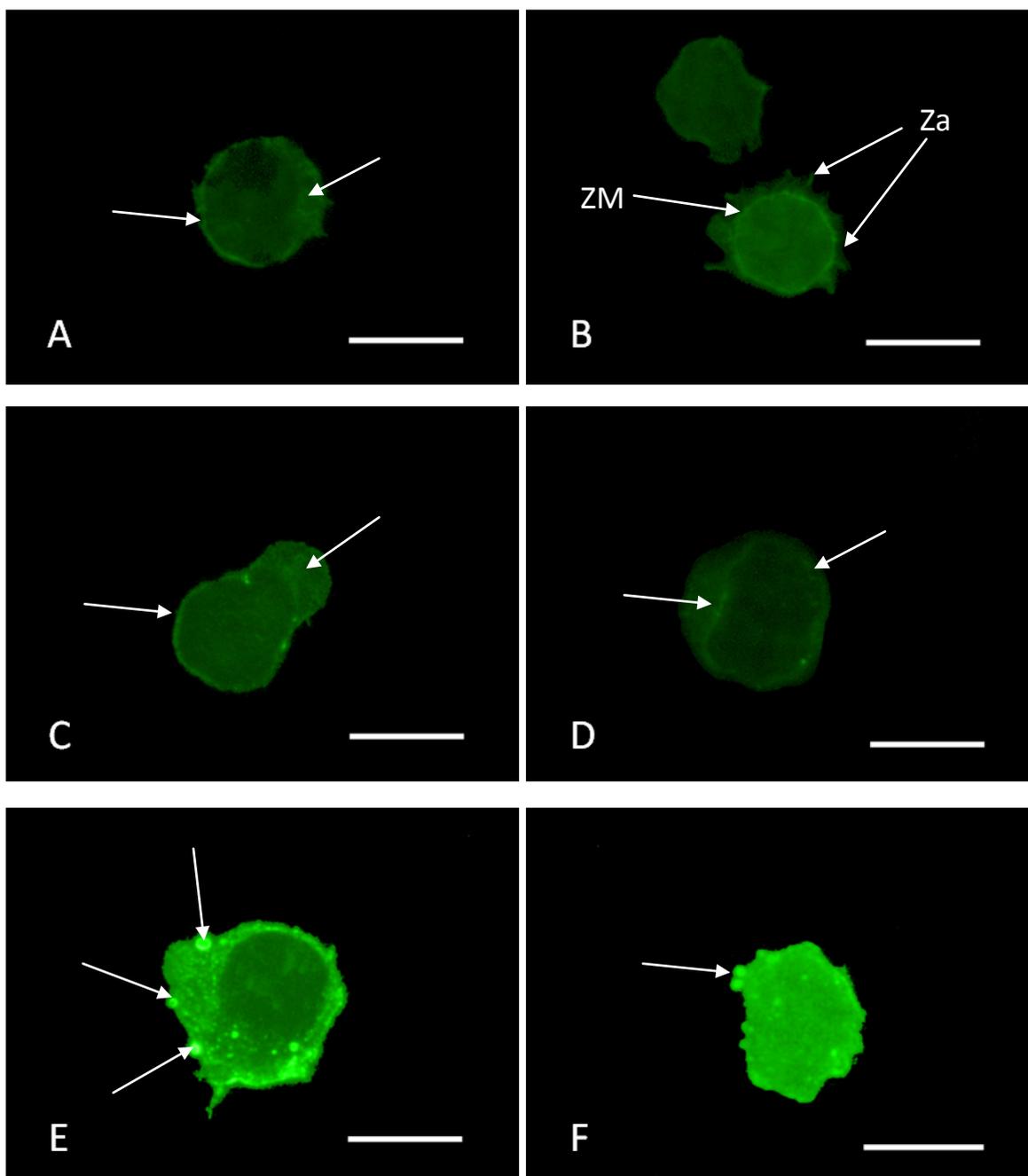


Abbildung 4.55: Bindung der Antikörper ISC29E, RTH1A und RACT20A an die Lymphozyten

A. ISC29E. Der Lymphozyt weist in seiner Zellmembran eine positive Reaktion von mittlerer Stärke (Pfeile) auf. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. ISC29E. Die zwei Lymphozyten sind 2+-positiv. Der im Bild unten abgebildete Lymphozyt zeigt außerdem eine deutliche Reaktion an der Zellmembran (ZM) und feine Zytoplasmaausläufer (Za). Kaninchen, m, adult. SB = 10 µm.

C. RTH1A. Nach Inkubation mit dem Antikörper RTH1A kommt es zu einer mittelgradigen Fluoreszenz der Zellmembran der Lymphozyten. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

D. RTH1A. Eine mittelgradige Fluoreszenz ist auch hier an der Zellmembran zu sehen. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 µm.

E.-F. RACT20A. Beide Lymphozyten zeigen eine Bindung des Antikörpers mit einer starken Fluoreszenz. Auffällig hierbei ist, dass es in umschriebenen Bezirken der Zellmembran zu einer besonders intensiven Bindung (Pfeile) kommt. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

Zusätzlich wurden die Antikörper MRB61A (gegen basophile Granulozyten und T-Lymphozyten) sowie RACT20A (gegen basophile Granulozyten, CD4⁺-T-Lymphozyten und T-Lymphozyten-Subpopulationen) getestet. Dabei zeigte MRB61A eine schwache Bindung an T-Lymphozyten und basophile Granulozyten bei einer Konzentration von 1:20. Bei Konzentrationen von 1:40 und 1:68 konnte keine Bindung an die Blutzellen nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Fluoreszenz konnten zudem keine aussagekräftigen Fotos erstellt werden und eine Beurteilung der Bindung an die basophilen Granulozyten und T-Lymphozyten nicht erfolgen. Der Antikörper RACT30A hingegen zeichnete sich durch eine Fluoreszenzstärke von 3+ an der Zellmembran der basophilen Granulozyten und einer Fluoreszenz von 2+ an CD4⁺-Lymphozyten und T-Lymphozyten-Subpopulationen aus. Von insgesamt 50 ausgezählten Lymphozyten waren hier 8 % positiv.

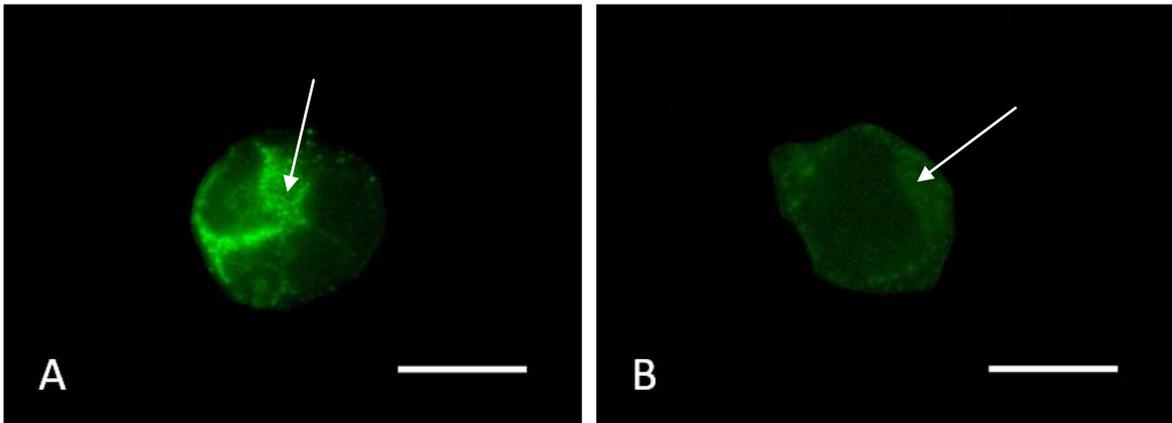


Abbildung 4.56: Bindung von RACT20A an basophile Granulozyten und Lymphozyten

A. Der basophile Granulozyt zeigt eine granuläre, starke Fluoreszenz (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. Die Bindung von RACT20A an einen Lymphozyten (Fluoreszenzintensität 2+) (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

4.6.2 Immunhistochemischer und histochemischer Nachweis zytoskelettaler Elemente

Beim Nachweis der zytoskelettalen Elemente (Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli) erfolgte eine Beurteilung der Fluoreszenz mit folgendem semiquantitativen Bewertungsschema: negativ, schwach positiv (+), deutlich positiv (++) und stark positiv (+++). Dabei war das Aktinbindende Toxin Phalloidin aus *Amanita phalloides* direkt mit TRITC gekoppelt, wohingegen beim Nachweis der Intermediärfilamente Vimentin und Cytokeratin und beim Nachweis von Tubulin ein mit FITC gekoppelter Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war, verwendet wurde. Bei der Inkubation mit dem gegen Cytokeratine gerichteten Antikörper kam es bei keinem der verschiedenen Blutzelltypen zu einer positiven Reaktion.

4.6.2.1 Histochemischer Nachweis von F-Aktin

F-Aktin kann mit Phalloidin-TRITC in allen Blutzellen nachgewiesen werden. Die Stärke der Fluoreszenz ist jedoch unterschiedlich, wie man aus der nachfolgenden Tabelle entnehmen kann.

F-Aktin	Positive Reaktion				Prozentualer Anteil der positiven Blutzellen in den Blutaussstrichen
	negativ	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten	0 %	100 %	0 %	0 %	100 %
Thrombozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Lymphozyten	0 %	0 %	10 %	90 %	100 %
Monozyten	0 %	0 %	11,1 %	88,89 %	100 %
Neutrophile Granulozyten	0 %	0 %	50 %	50 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0 %	0 %	37,5 %	62,5 %	100 %
Basophile Granulozyten	0 %	0 %	40 %	60 %	100 %

Tabelle 4.39: Histochemischer Nachweis von F-Aktin in den Blutzellen des Kaninchens

In Erythrozyten bilden Aktinfilamente einen Ring unterhalb der Zellmembran. In den Thrombozyten ziehen die stark positiven Aktinfilamente deutlich in die Pseudopodien hinein und sind auch im Hyalomer oft ringförmig um das Granulomer angeordnet. In Lymphozyten hat die Fluoreszenz unterschiedliche Ausprägung und lässt die Lokalisation von Aktinfilamenten im Zytoplasma gut erkennen. In den Monozyten sowie den neutrophilen und basophilen Granulozyten ist die Fluoreszenz

über die ganze Zelle verteilt und granulär bzw. fokal stärker ausgeprägt. In eosinophilen Granulozyten kann man die eosinophilen Granula deutlich durch das sie umgebende Aktin identifizieren.

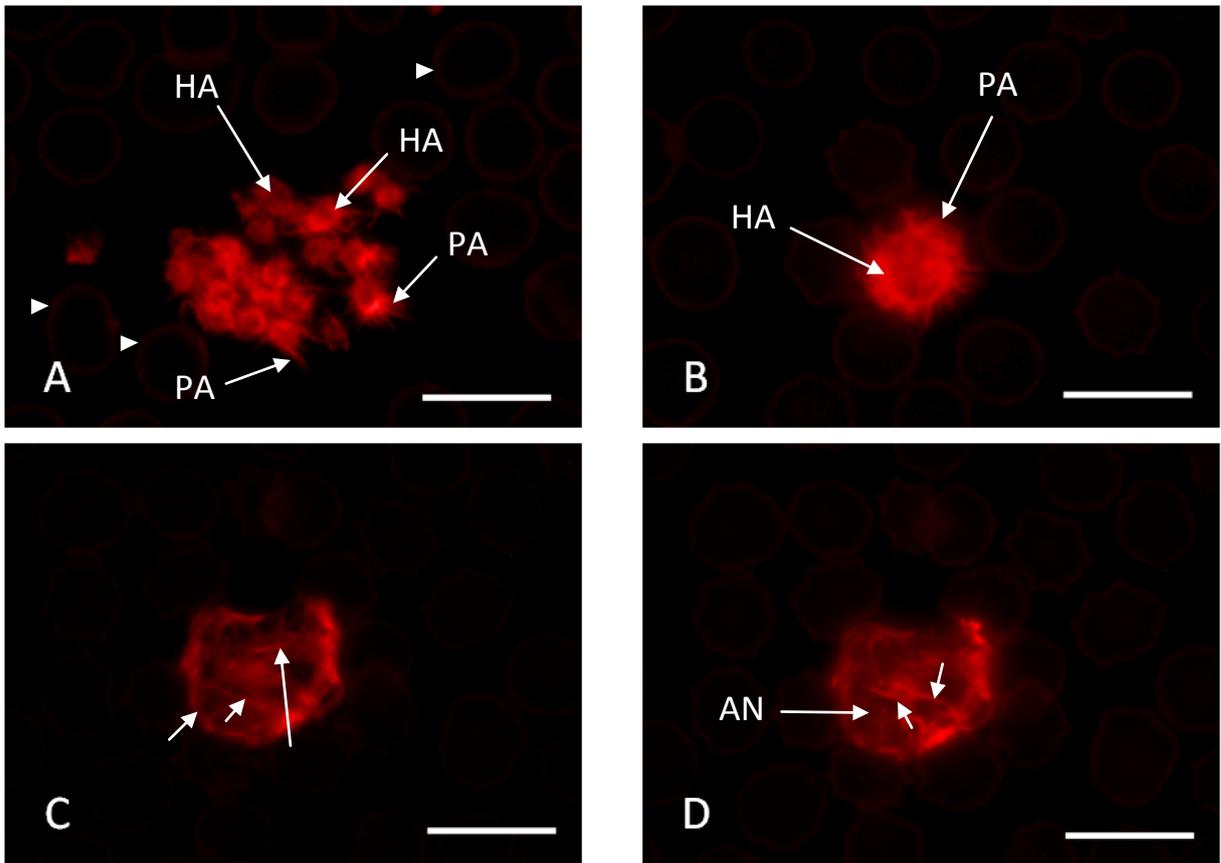


Abbildung 4.57: Nachweis von F-Aktin in den Blutzellen I

A. Die Erythrozyten zeigen eine schwache Fluoreszenz, die sich ringförmig unterhalb der Zellmembran befindet (kleine Pfeile). Die Thrombozyten sind stark positiv. Aktin ist bei ihnen um das Granulomer herum im Hyalomer (HA) sowie in den Pseudopodien (PA) lokalisiert. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

B. Der Riesenthrombozyt weist eine stark positive Fluoreszenz auf. Die Aktinfilamente sind im Hyalomer ringförmig um das Granulomer angeordnet (HA) und reichen bis in die Pseudopodien (PA) hinein. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

C. Der Lymphozyt ist stark positiv. Aktinfilamente durchspannen das Zytoplasma (Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

D. Durch Fokussieren verschiedener Ebenen im Fluoreszenzmikroskop soll das Aktinnetzwerk (AN) der Aktinfilamente (Pfeile) in einer weiteren Ebene im Lymphozyten demonstriert werden. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μ m.

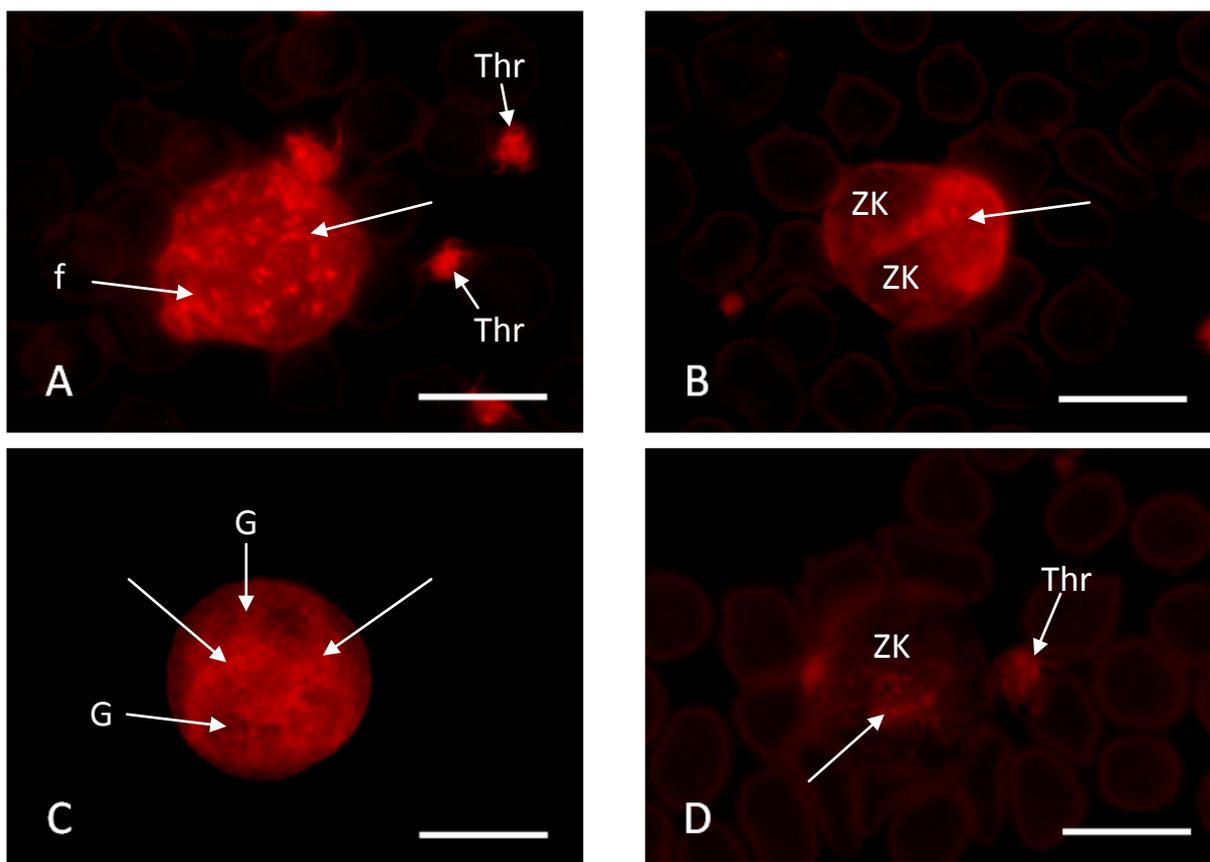


Abbildung 4.58: Nachweis von F-Aktin in den Blutzellen II

A. Der Monozyt zeigt eine starke Fluoreszenz im Zytoplasma (Pfeil), die den Zellkern vollständig überlagert und teilweise filamentös (f) ausgeprägt ist. Thr = Thrombozyten. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

B. F-Aktin-positive Areale (Pfeil) ordnen sich deutlich um den Zellkern (ZK) des neutrophilen Granulozyten an. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

C. Eine gut ausgeprägte Fluoreszenz (Pfeile) im Zytoplasma um die Granula (G) herum ist im eosinophilen Granulozyten zu sehen. Sie erstreckt sich bis unterhalb der Zellmembran. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

D. Eine deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma (Pfeil) des basophilen Granulozyten ist vor allem im zellkernfreien Bereich vorhanden. ZK = Zellkern; Thr = Thrombozyt. Kaninchen, w, adult. SB = 10µm.

4.6.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Vimentin kann, außer in den Erythrozyten, in allen Blutzellen des Kaninchens nachgewiesen werden. In diesen Blutzellen bildet Vimentin ein Netzwerk von Intermediärfilamenten, das sich um den Zellkern und im Fall der eosinophilen Granulozyten deutlich um die Granula legt. Die Thrombozyten verhalten sich in den Blutaussstrichen unterschiedlich. In acht von zehn Blutaussstrichen konnte kein Vimentin-positiver Thrombozyt identifiziert werden. In zwei Blutaussstrichen hingegen zeigten Thrombozyten eine stellenweise schwache bis deutlich positive Fluoreszenz, die sich ringförmig unterhalb der Zellmembran oder filamentös im Zytoplasma ausbreitete. Bei den Thrombozyten wird in der folgenden Tabelle nur die Reaktion der Mehrheit der Zellen berücksichtigt, die negativ war. Die Immunfluoreszenz bei den anderen Blutzellen, abgesehen von den Erythrozyten, war stets stark positiv.

Vimentin	Positive Reaktion			Prozentualer Anteil der positiven Blutzellen in den Blutaussstrichen
	negativ	1 (+)	2 (++)	
Erythrozyten	100 %	0 %	0 %	0 %
Thrombozyten	100 %	0 %	0 %	0 % ¹
Lymphozyten	0 %	0 %	0 %	100 %
Monozyten	0 %	0 %	20 %	80 %
Neutrophile Granulozyten	0 %	0 %	0 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0 %	0 %	22,22 %	77,78 %
Basophile Granulozyten	0 %	0 %	0 %	100 %

Tabelle 4.40: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin in den Blutzellen des Kaninchens

¹In zwei Blutaussstrichen war stellenweise eine 3+-positive Fluoreszenz in den Thrombozyten zu sehen.

Die nachfolgenden Bilder sollen die zum einen die positive Reaktion der Blutzellen aufzeigen, zum anderen die dreidimensionale Ausbreitung der Intermediärfilamente in den Zellen verdeutlichen.

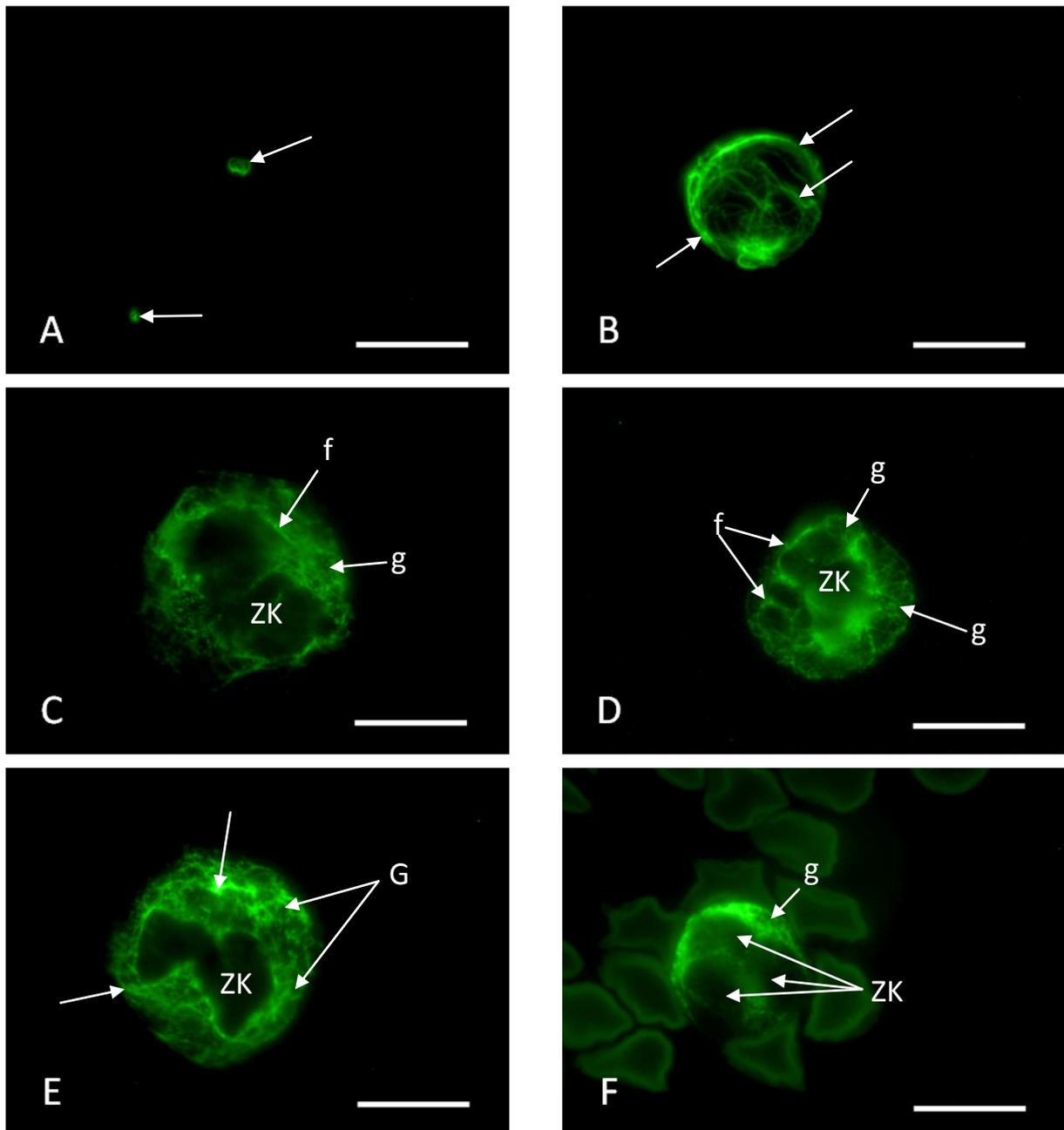


Abbildung 4.59: Nachweis von Vimentin in den Blutzellen des Kaninchens

A. In den Thrombozyten sieht man deutlich filamentöse Strukturen (Pfeil), die die Zelle durchziehen. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 μm .

B. Im Lymphozyten kann man die dreidimensionale Ausbreitung der Vimentinfilamente (V) sehr gut erkennen. Kaninchen, m, adult. SB = 10 μm .

C. Das Vimentin im Monozyten erscheint sowohl granulär (g) als auch filamentös (f) vorhanden zu sein. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

D. Im neutrophilen Granulozyten sind die Segmente des Zellkerns (ZK), um die Vimentin lokalisiert ist, gut zu sehen. Dabei ist die Fluoreszenz sowohl von granulärer (g) als auch von filamentöser (f) Ausprägung. Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 μm .

E. Im eosinophilen Granulozyten sind der Zellkern (ZK) und die von Vimentin (Pfeile) umgebenen Granula (G) gut zu erkennen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

F. Im basophilen Granulozyten ist eine mehr granuläre Fluoreszenz (g) vorhanden. ZK = Zellkern. Kaninchen, w, 7 Jahre. SB = 10 μm .

4.6.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

Eine Bindung des Antikörpers gegen Tubulin erfolgte nur bei vier der zehn Blutaussstriche. Erythrozyten waren ausschließlich negativ. In lediglich zwei Blutaussstrichen zeigte sich auch eine deutliche Immunfluoreszenz der Granulozyten. Stets stark positiv hingegen waren die Thrombozyten mit einem fluoreszierenden Ring unterhalb der Zellmembran. In einigen Thrombozyten erstreckten sich auch Mikrotubuli bis in die Pseudopodien. Die Lymphozyten waren in allen vier Blutaussstrichen positiv, jedoch von unterschiedlicher Stärke. In einem Blutaussstrich war auch eine deutliche Fluoreszenz der Monozyten auszumachen. In der nachfolgenden Tabelle wird die Immunfluoreszenz nach Inkubation mit einem Antikörper gegen Tubulin bei den einzelnen Blutzellen in den positiven Blutaussstrichen noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Tubulin	Positive Reaktion				Prozentualer Anteil der positiven Blutzellen in den Blutaussstrichen
	negativ	1 (+)	2 (++)	3 (+++)	
Erythrozyten	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Thrombozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Lymphozyten	0 %	25 %	25 %	50 %	100 %
Monozyten	75 %	0 %	25 %	0 %	25 %
Neutrophile Granulozyten	75 %	0 %	25 %	0 %	25 %
Eosinophile Granulozyten	75 %	0 %	0 %	25 %	25 %
Basophile Granulozyten	50 %	25 %	0 %	25 %	50 %

Tabelle 4.41: Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens

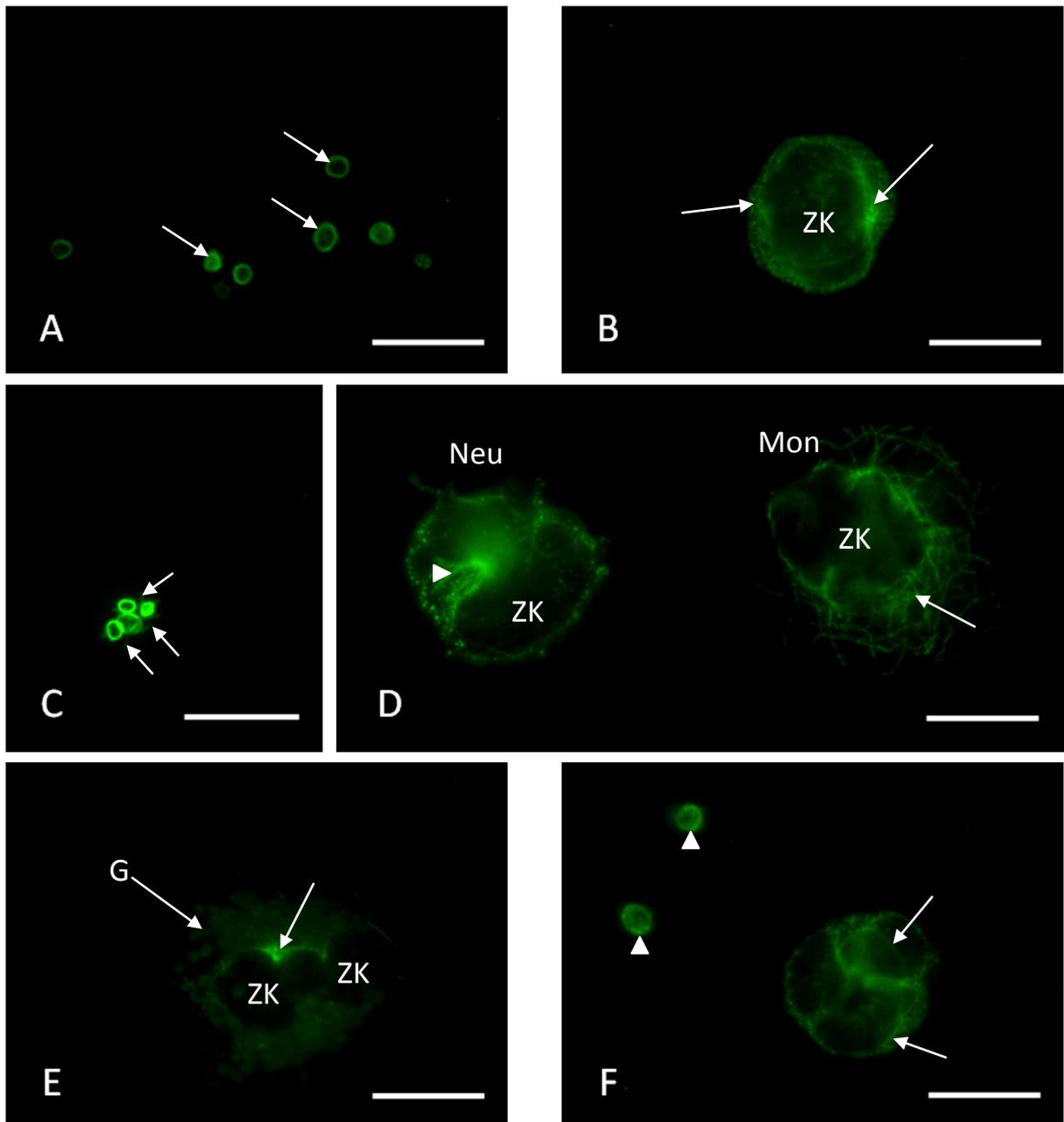


Abbildung 4.60: Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens

A. Immunreaktives Tubulin läßt sich in einem ringförmigen Bereich unter der Zellmembran (Pfeile) bei den Thrombozyten nachweisen. Kaninchen, m, 4,5 Jahre. SB = 10 µm.

B. Eine deutliche Immunfärbung auf Tubulin befindet sich im Zytoplasma des Lymphozyten (Pfeile). Der Zellkern (ZK) ist durch die Anordnung der Mikrotubuli gut zu erkennen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

C. In den Pseudopodien der aktivierten Thrombozyten befindet sich Tubulin (Pfeile). Kaninchen, w, 1 Jahr. SB = 10 µm.

D. Der neutrophile Granulozyt (Neu) links im Bild weist eine deutliche Immunfluoreszenz (kurzer Pfeil) auf, die den Zellkern (ZK) umgibt. Bei dem im Bild rechts gelegenen Monozyten (Mon) sind mikrotubuläre, deutlich fluoreszierende Strukturen zu erkennen (Pfeile), die auch hier den Zellkern (ZK) umgeben. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

E. Der eosinophile Granulozyt zeigt eine lokalisierte Fluoreszenz (Pfeil). Seine eosinophilen Granula (G) und der Zellkern (ZK) sind gut zu erkennen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

F. Eine deutliche, teilweise mikrotubuläre Fluoreszenz (Pfeil) im Zytoplasma ist im basophilen Granulozyten zu sehen. Der Zellkern ist nicht klar abzugrenzen. Die Thrombozyten oben links im Bild haben eine stark positive, ringförmige Fluoreszenz (kleine Pfeile) unterhalb der Zellmembran. Kaninchen, w, adult. SB = 10 µm.

4.6.2.4 Doppelfärbung von Aktin und Vimentin

Bei der Doppelfärbung von Aktin und Vimentin kam es in nur zwei von fünf Blutausstrichen zu einer gleichzeitigen Anfärbung der Blutzellen mit dem Antikörper für Vimentin und Phalloidin-TRITC. Dabei zeigten in einem dieser Ausstriche die Blutzellen entweder eine Bindung von Phalloidin oder eine Bindung des Vimentin-Antikörpers, jedoch keine gleichzeitige Bindung beider Markierungen. Diese Doppelbindung konnte in nur einem Blutausstrich beobachtet werden. In den restlichen Blutausstrichen kam es zu keiner Bindung des Vimentin-Antikörpers, sondern lediglich zu einer Bindung des Phalloidins.

In der folgenden Tabelle wird die Bindung von Phalloidin-TRITC und Anti-Tubulin in den 5 verschiedenen Blutausstrichen dargestellt.

Blutausstrich		Ery	Thr	Ly	Neu	Bas	Eo	Mon
1 ¹	Aktin	+	+++	+++	++	+++	n.a.	++
	Vimentin	-	-	-	+++	+++	-	-
2	Aktin	+	+++	+++	++	++	++	+++
	Vimentin	-	-	-	-	-	-	-
3	Aktin	+	+++	+++	++	++	+++	+++
	Vimentin	-	-	-	-	-	-	-
4	Aktin	+	+++	+++	++	++	n.a.	n.a.
	Vimentin	-	-	-	-	-	-	-
5 ²	Aktin	+	+++	++	++	++	++	++
	Vimentin	-	-	-	+++	+++	n.a.	n.a.

Tabelle 4.42: Bindung von Phalloidin-TRITC und Anti-Vimentin an die Blutzellen des Kaninchens

Ery = Erythrozyten; Thr = Thrombozyten; Ly = Lymphozyten, Neu = Neutrophile Granulozyten; Bas = Basophile Granulozyten; Eo = Eosinophile Granulozyten; Mon = Monozyten.

¹ Eine gleichzeitige Bindung von Phalloidin und Anti-Vimentin konnte bei den neutrophilen und basophilen Granulozyten beobachtet werden.

² Es konnte keine gleichzeitige Bindung von Phalloidin und Anti-Vimentin an eine der Blutzellen beobachtet werden.

- = negativ; + = schwach positiv; ++ = deutlich positiv; +++ = stark positiv; n.a.= nicht auffindbar.

Die folgenden Bilder zeigen einen neutrophilen und einen basophilen Granulozyten, bei denen eine Doppelmarkierung von Tubulin und Aktin erfolgte.

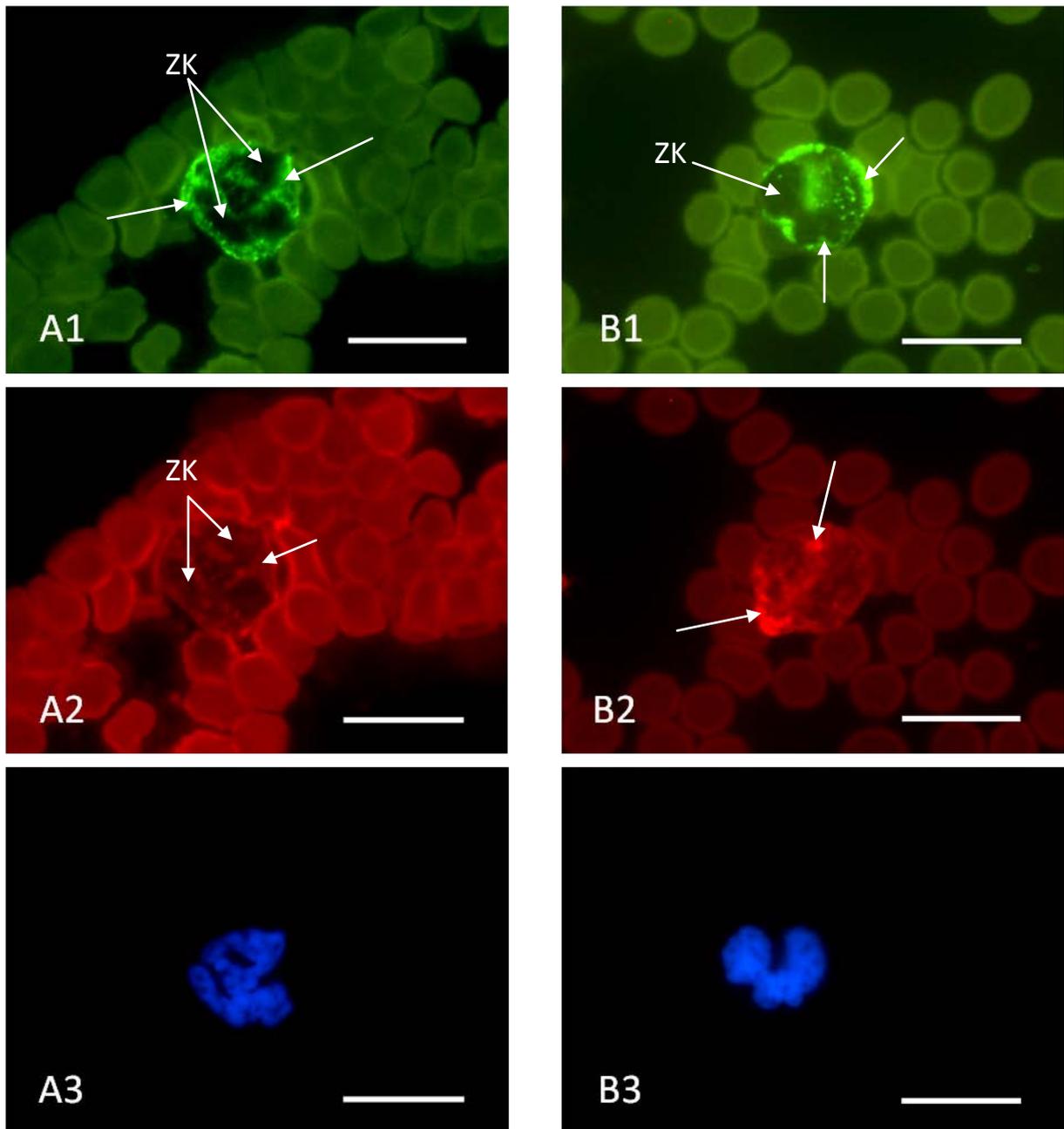


Abbildung 4.61: Doppelfärbung von Aktin – Vimentin an Blutzellen bei Kaninchens

A1. Anti-Vimentin-FITC. Neutrophiler Granulozyt. Eine deutliche, eher granuläre Fluoreszenz (Pfeil) ist im Zytoplasma um den Zellkern (ZK) herum zu sehen. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

A2. Phalloidin-TRITC. Neutrophiler Granulozyt. Das Zytoplasma weist nur eine schwache Fluoreszenz auf (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

A3. DAPI-Kernfärbung. Der Zellkern des neutrophilen Granulozyten ist stark segmentiert. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B1. Anti-Vimentin-FITC. Basophiler Granulozyt. Vimentin zeigt sich im Zytoplasma als vor allem globuläre oder granuläre Strukturen (Pfeil), die um den Zellkern (ZK) angeordnet sind. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B2. Phalloidin-TRITC. Basophiler Granulozyt. Im Zytoplasma ist eine diffuse Verteilung der fluoreszierenden Strukturen vorhanden (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B3. DAPI-Kernfärbung. Zellkern des basophilen Granulozyten ist zweifach segmentiert. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

4.6.2.5 Doppelfärbung von Aktin und Tubulin

Bei der Doppelfärbung von Aktin und Tubulin konnte in drei von fünf Blutaussstrichen eine gleichzeitige Anfärbung von Blutzellen beobachtet werden. In diesen Blutaussstrichen wiesen vor allem die Thrombozyten und Lymphozyten eine gleichzeitige Darstellung des Aktins und des Tubulins auf. In zwei Blutaussstrichen konnte dies auch bei Monozyten und neutrophilen Granulozyten gezeigt werden. Häufig war jedoch eine gleichzeitige Darstellung von Aktin und Tubulin nicht möglich. In einem Retikulozyten war eine Immunfluoreszenz von Tubulin im Zytoplasma vorhanden (Abb. 4.64).

In der folgenden Tabelle wird die Darstellung von Aktin und Tubulin bei den verschiedenen Blutaussstrichen gezeigt.

Blutaussstrich		Ery	Thr	Ly	Neu	Bas	Eo	Mon
1	Aktin	+	+++	++	+++	++	+++	+++
	Tubulin	-	-	-	-	-	-	-
2	Aktin	+	+++	+++	++	++	n.a.	++
	Tubulin	-	(+++) ¹	+++	+	-	n.a.	+++
3	Aktin	+	+++	+++	++	+++	n.a.	++
	Tubulin	-	-	-	-	-	n.a.	-
4	Aktin	+	+++	+++	+++	+	+++	+
	Tubulin	-	+++	++	++	-	+++	+
5	Aktin	+	+++	+++	++	++	++	+++
	Tubulin	-	(+++) ¹	++	-	-	-	-

Tabelle 4.43: Bindung von Phalloidin-TRITC und Anti-Tubulin an die Blutzellen des Kaninchens

¹ Stellenweise zeigen sich einzelne Thrombozyten, die eine starke Fluoreszenz haben.

Ery = Erythrozyten; Thr = Thrombozyten; Ly = Lymphozyten; Neu = Neutrophile Granulozyten; Bas = Basophile Granulozyten; Eo = Eosinophile Granulozyten; Mon = Monozyten.

- = negativ; + = schwach positiv; ++ = deutlich positiv; +++ = stark positiv; n.a. = nicht auffindbar.

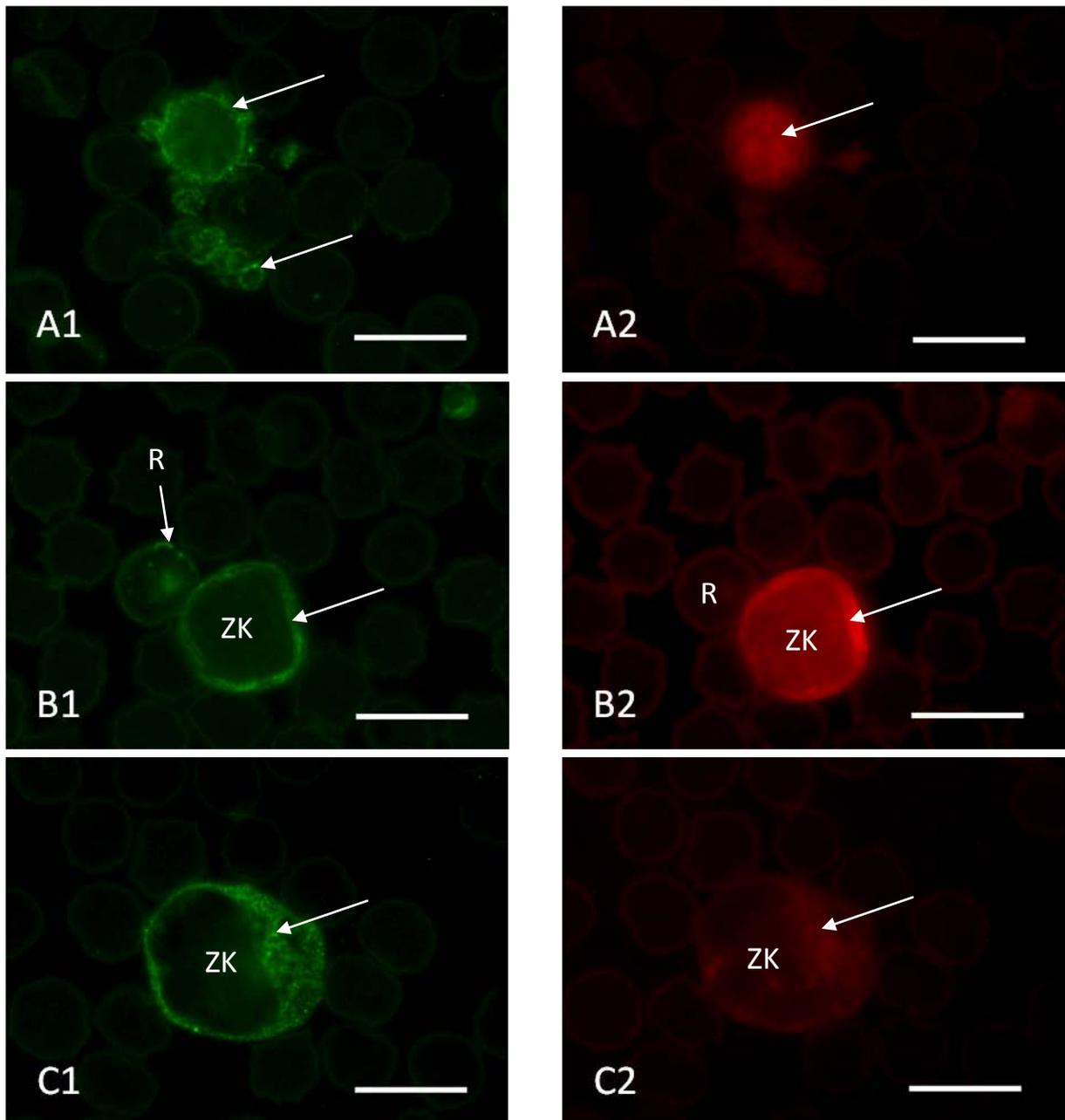


Abbildung 4.62. : Doppelfärbung von Aktin und Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens I

A1. Anti-Tubulin-FITC. Thrombozyten. Eine positive Reaktion ist vor allem unterhalb der Zellmembran in Form eines Ringes zu sehen (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

A2. Phalloidin-TRITC. Thrombozyten. Aktin ist diffus im Hyalomere verteilt (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B1. Anti-Tubulin-FITC. Der Lymphozyt zeigt eine positive Reaktion (Pfeil) vor allem im Zytoplasma um den Zellkern (ZK) herum. Zudem ist ein Retikulozyt (R) im Bild, der auch im Zytoplasma fluoreszierende Stellen besitzt. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B2. Phalloidin-TRITC. Das Zytoplasma des Lymphozyten weist eine diffuse Fluoreszenz auf (Pfeil). Der Retikulozyt © ist negativ. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

C1. Anti-Tubulin-FITC. Monozyt. Eine eher granuläre Fluoreszenz ist im Zytoplasma vorhanden (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

C2. Phalloidin-TRITC. Monozyt. Stellen positiver Fluoreszenz sind diffus im gesamten Zytoplasma verteilt (Pfeil). ZK = Zellkern. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

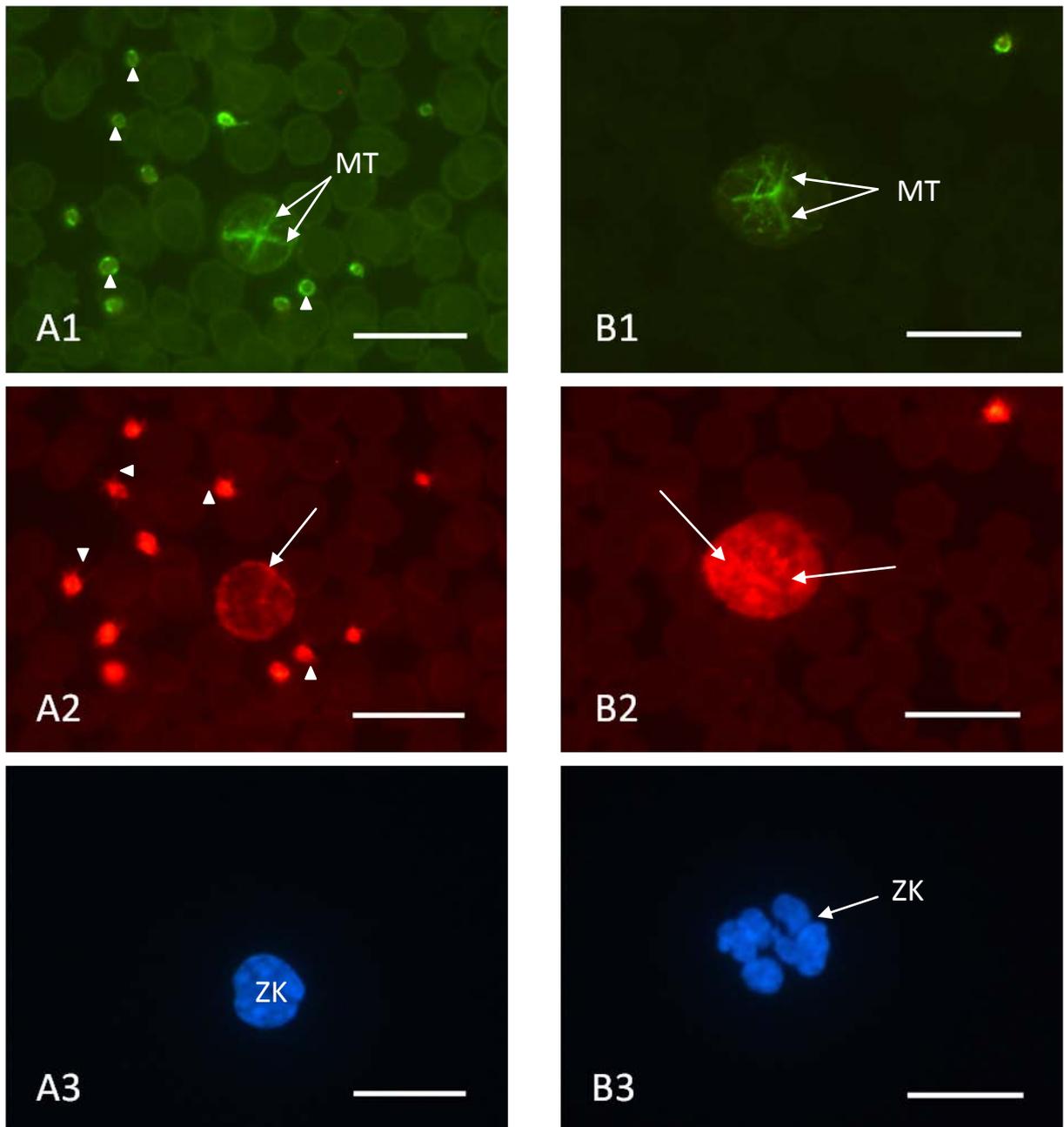


Abbildung 4.63: Doppelfärbung von Aktin und Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens II

A1. Anti-Tubulin-FITC. Lymphozyt und Thrombozyten. Im Zytoplasma des Lymphozyten ziehen die Mikrotubuli (MT) von der Zellmitte zur Plasmamembran. In den Thrombozyten ist die Fluoreszenz kreisförmig unterhalb der Zellmembran angeordnet (kleine Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

A2. Phalloidin-TRITC. Lymphozyt und Thrombozyten. Im Zytoplasma ist eine starke Fluoreszenz vorhanden (Pfeil). In den Thrombozyten sieht man deutlich die Ausbreitung des Aktinnetzwerkes bis in die Pseudopodien (kleine Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

A3. DAPI-Kernfärbung. Zellkern des Lymphozyten (ZK). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B1. Anti-Tubulin-FITC. Neutrophiler Granulozyt. Im Zytoplasma befinden sich Mikrotubuli (MT), die ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Sie ziehen von der Zellmitte zur Plasmamembran. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B2. Phalloidin-TRITC. Neutrophiler Granulozyt. Das gesamte Zytoplasma zeigt eine starke Fluoreszenz (Pfeile). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

B3. DAPI-Kernfärbung. Zellkern (ZK) des neutrophilen Granulozyten mit starker Segmentierung. Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

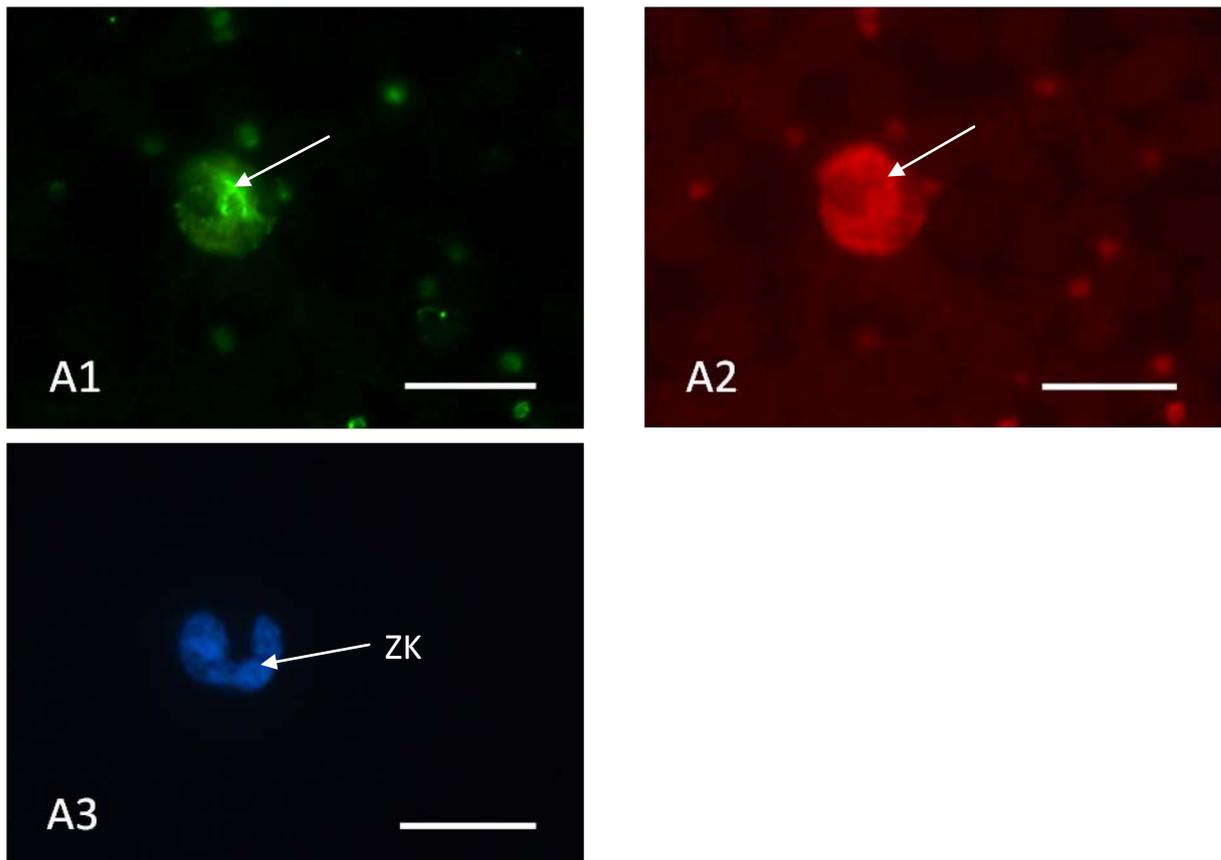


Abbildung 4.64: Doppelfärbung von Aktin und Tubulin bei einem eosinophilen Granulozyten

A1. Anti-Tubulin-FITC. Im Zytoplasma sieht man kräftig fluoreszierende Mikrotubuli (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

A2. Phalloidin-TRITC. Im gesamten Zytoplasma ist eine starke Fluoreszenz vorhanden (Pfeil). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

A3. DAPI-Kernfärbung. Der Zellkern (ZK) ist nur wenig segmentiert (bandförmig). Kaninchen, w, adult. SB = 10 μm .

Kapitel 5

5 Diskussion

5.1 Blutproben

Für die vorliegenden, durchgeführten Untersuchungen wurde das Blut von 44 gesunden Kaninchen verschiedener Rassen und Nutzungsrichtungen verwendet. Um den Gesundheitsstatus der Tiere zu erfassen, wurden zusätzlich zum Differentialblutbild verschiedene Serumparameter überprüft. Außerdem erfolgte bei einigen Masttieren auch eine Schlachtkörperuntersuchung. Von den untersuchten Kaninchen waren 16 Tiere männlich und 28 Tiere weiblich.

Bei der Auswertung der Blutbilder der einzelnen Kaninchen waren die Laborwerte der ersten zehn Tiere auffällig. Sie zeigten vor allem Veränderungen in der Thrombozytenzahl und im weißen Blutbild in Form einer Thrombozytopenie und Leukopenie. Von den Serumparametern waren vor allem Chloridionen und Kaliumionen leicht erhöht. Diese Veränderungen im Blut sind durch die Art der Blutentnahme zu erklären. Das Blut dieser Kaninchen wurde bei der Schlachtung während der Entblutungsphase in den EDTA- und Serumprobenröhrchen aufgefangen. Das dadurch mechanisch beeinflusste Blut, zeigte daraufhin eine leichte Gerinnung. Dies ist mit dem im Gegensatz zum Menschen ausgeprägteren intrinsischen Gerinnungssystem des Kaninchens zu erklären. Sie haben eine höhere Aktivität der Gerinnungsfaktoren V, VIII, IX, X, XI und XIII sowie eine höhere oder ähnliche Aktivität von Faktor I, II und XII als der Mensch. Zusätzlich zeigen Kaninchen eine erhöhte Thrombozytenretention (*Dodds, 2000*). Da die vom Amtstierarzt durchgeführte Schlachtier-Untersuchung ohne Befund war, wurde davon ausgegangen, dass auch diese Tiere gesund sind und nur aufgrund der Art der Probenahme eine Veränderung der Laborparameter erfolgte.

Einige wenige der anderen Tiere zeigten Abweichungen im prozentualen Anteil oder absoluten Anzahl der einzelnen Leukozyten. Stets befand sich jedoch die absolute Anzahl bzw. der prozentuale Anteil im Referenzbereich. Die Anzahl der Erythrozyten betrug im Durchschnitt $6,07 \times 10^6/\mu\text{l}$, der prozentuale

Anteil der Retikulozyten 2,93 % und ihre absolute Anzahl im Blut der Kaninchen $0,18 \times 10^6/\mu\text{l}$. Die Thrombozyten waren mit durchschnittlich $371,41 \times 10^3/\mu\text{l}$ im Blut vertreten. Die Gesamtleukozytenzahl betrug im Durchschnitt $7,33 \times 10^3/\mu\text{l}$. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten daran war im Durchschnitt 58,57 %, der der neutrophilen Granulozyten 28,4 %, der der Monozyten 7,82 %, der der basophilen Granulozyten 3,83 % und der der eosinophilen Granulozyten 1,32 %. Hierbei wurden nur die Werte der Kaninchen berücksichtigt, bei denen keine Verfälschung der Parameter aufgrund der Art der Probenahme erfolgte. Die Werte entsprechen denen in der Literatur (siehe Anhang B).

Bei einigen Tieren konnten erhöhte Werte der Alanin-Aminotransferase (ALT) beobachtet werden. Da die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) jedoch nie erhöht war und als wesentlich sensitiver in der Leberdiagnostik gilt als die ALT (*Hein und Hartmann, 2005*), ist eine Lebererkrankung unwahrscheinlich. Die ALT ist beim Kaninchen wenig gewebespezifisch. Sie kommt beispielsweise auch im Gewebe des Herzens vor (*Jenkins, 2000*). Bei einem Kaninchen wurde ein erhöhter Glukosewert festgestellt. Der daraufhin überprüfte Fruktosaminwert lag jedoch im Referenzbereich. Eine Erhöhung der Glukose im Blut ist beim Kaninchen oft stressbedingt, da die ACTH-Ausschüttung während der Blutentnahme eine Erhöhung des Kortisolspiegels und in Folge dessen Veränderungen im Protein- und Kohlenhydratstoffwechsel mit sich bringt (*Hein und Hartmann, 2005*). Die Elektrolyte lagen meist im Referenzbereich, teilweise leicht darunter oder darüber.

Daher kann angenommen werden, dass alle Kaninchen, deren Blut histologisch untersucht wurde, gesund waren und somit die Blutzellen ein physiologisches Verhalten in den verschiedenen Färbungen zeigten.

Die Werte des Differentialblutbildes von 23 weiblichen und 9 männlichen Tieren zeigten keine signifikanten Unterschiede. Eine weitere Messreihe mit einer größeren Anzahl an Tieren könnte hier eventuell mehr Aufschluss geben, da die Test-Ergebnisse z.B. für die Erythrozytenanzahl, den Hämoglobinwert oder die Lymphozytenanzahl das Signifikanzniveau von 5% fast erreichten.

5.2 Lichtmikroskopie

Die Erythrozyten des Kaninchens stellten sich, wie in der Literatur beschrieben, als kernlose, bikonkave, scheibchenförmige Zellen dar. Der Durchmesser der Erythrozyten des Kaninchens schwankte in meinen Untersuchungen zwischen 5 und $7,4 \mu\text{m}$ und betrug im Durchschnitt $6,2 \mu\text{m}$. Dies stimmt mit den Angaben von anderen Autoren wie Schermer (1958), Sanderson und Phillips (1981) und Melillo (2007) überein, die eine Schwankungsbreite von $5,0\text{-}7,9 \mu\text{m}$ angeben (*Schermer, 1958; Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007*). Die Dicke der Erythrozyten beträgt $2,15 \mu\text{m}$

(*Hawkey und Dennett, 1990*), 2,4 μm (*Schermer, 1958*) bzw. 2,15-2,4 μm (*Melillo, 2007*) beim Kaninchen. Eine Anisozytose, bei der die Mikrozyten ein Viertel des Durchmessers eines normalen Erythrozyten besitzen (*Moore, 2000*), tritt bei 1-2 % der Erythrozyten des Kaninchens auf und wird bei gesunden Kaninchen als normal angesehen (*Dodds, 2000; Jenkins, 2008*). Sie ist bei Labortieren, Katzen und Rindern üblich (*Jenkins, 2008; Reagan, 2008*).

Genauere morphometrische Untersuchungen von Erythrozyten des Kaninchens wurden von Poljičak-Milas et al. (2009) durchgeführt. Sie verglichen verschiedene morphologische Charakteristika der Erythrozyten zwischen männlichen und weiblichen Tieren, darunter die Zellfläche, den Zellumfang, die maximale und minimale Achsenlänge, die konvexe Fläche, die Länge und Breite der Zelle. Sie stellten fest, dass bei weiblichen Tieren die Erythrozytenoberfläche signifikant größer als bei männlichen Tieren und die Konvexität ihrer Erythrozyten stärker ausgeprägt ist. Abgesehen von Zellumfang und Zellbreite waren die evaluierten Parameter bei den weiblichen Tieren signifikant höher als bei den männlichen Tieren (*Poljičak-Milas et al., 2009*).

Die Erythrozyten zeigten in den Übersichtsfärbungen eine rötliche Farbe, abhängig von der Art der Färbung. Ihr homogenes Zytoplasma besitzt aufgrund ihrer bikonkaven Form eine zentrale Aufhellung (*Campbell und Ellis, 2007; Reagan, 2008*), die in meinen Blutausstrichen oft beobachtet wurde. Sie wird beim Kaninchen als moderat bezeichnet (*Reagan, 2008*). Weiterhin waren polychrome Erythrozyten in allen Blutausstrichen erkennbar. Ihre blaue Anfärbung resultiert aus dem Vorkommen von Zellorganellen wie Ribosomen, die in den unreifen Zellen noch präsent sind (*Thrall, 2004*). Beim Kaninchen sind sie aufgrund der kurzen Lebensspanne der Erythrozyten und ihrem hohen Umsatz in großem Umfang im Blutausstrich vertreten (*Melillo, 2007; Harcourt-Brown, 2008; Reagan, 2008*) und werden daher als physiologisch im Blut von gesunden Kaninchen angesehen (*Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Melillo, 2007*). Der prozentuale Anteil der Retikulozyten an der Erythrozytenanzahl im Blut beträgt 1-2 % (*Mitruka und Rawnsley, 1981; Dodds, 2000; Moore, 2000*), 2-4 % (*Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007*) oder 2-5 % (*Marshall, 2008*). In den eigenen Laboruntersuchungen reichte der prozentuale Anteil der Retikulozyten im Blut von 1,27 bis 2,4 % und liegt somit im Bereich, der von den genannten Autoren angegeben wurde. Das Vorkommen von einigen Erythrozyten mit Zellkern im Blutausstrich liegt im Referenzbereich und ist kein Zeichen für zelluläre Regeneration beim Kaninchen (*Melillo, 2007*). Aufgrund ihrer morphologischen und färberischen Eigenschaften in den Übersichtsfärbungen mit einem stark kondensierten, exzentrisch gelegenen Zellkern und einem graublauen bis graurötlichen Zytoplasma handelte es sich in meiner Arbeit um Normoblasten, die frühzeitig aus dem Knochenmark entlassen wurden. Die im Lichtmikroskop beobachteten Erythrozyten ohne zentrale Aufhellung werden auch als Sphärozyten bezeichnet (*Thrall, 2004; Reagan, 2008*). Sie sind charakteristisch für den Verlust der Antikörper- oder Komplement-tragenden Membranen durch Makrophagen (*Jain, 1993; Thrall, 2004; Reagan, 2008*). Durch den Verlust der Membran kann die

Zelle ihre diskoide Form nicht aufrechterhalten, so dass eine kugelige Zelle ohne zentrale Aufhellung entsteht (*Reagan, 2008*). Die Sphärozyten sind allgemein Indikatoren für eine immunvermittelte Anämie (*Jain, 1993; Thrall, 2004*). Ein paar dieser Zellen können jedoch auch in Blutaussstrichen ohne vorhergehende Schädigung der Erythrozyten durch den Membranabbau beobachtet werden (*Reagan, 2008*). Die vor allem in der Fahne des Blutaussstrichs beobachtete Agglutination von Erythrozyten kommt durch Verknüpfung von Antikörpern auf der Erythrozytenoberfläche zustande (*Reagan, 2008*). Erythrozyten mit unphysiologischen Formen werden als Poikilozyten bezeichnet (*Jain, 1993; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Reagan, 2008*). In meinen Blutaussstrichen konnten zahlreiche verschiedene Veränderungen der Zellform beobachtet werden. Dazu gehörten unter anderem auch die Stomatozyten mit einer ovalen oder länglichen zentralen Aufhellung. Sie sind zumeist Artefakte von zu dick ausgestrichenen Blutzellen, können aber auch aufgrund eines zu niedrigen pH-Wertes, eines erhöhten Wassergehalts in den Erythrozyten oder durch amphipathische Medikamente hervorgerufen werden (*Harvey, 2008*). Ein paar Stomatozyten im Blutaussstrich sind vernachlässigbar (*Thrall, 2004*). Auch Dacryozyten (tränenförmige Erythrozyten) waren in den Blutaussstrichen zu sehen. Die Ursache der Zellverformung ist unbekannt (*Reagan, 2008*), jedoch wird vermutet, dass sie aus dem Umbau der zytoskelettalen Proteine bei der Passage von Kapillaren resultiert. Zudem können Dacryozyten auch ein Artefakt von zu langsamem Trocknen in Blutaussstrichen sein (*Banks, 1986; Jain, 1993*). Akanthozythen mit ihren unregelmäßigen Ausläufern von variabler Länge und Durchmesser konnten in den Blutaussstrichen regelmäßig beobachtet werden. Sie sind das Ergebnis von Veränderungen der Cholesterol- und Phospholipidkonzentration (*Thrall, 2004*). Da jedoch keine Hinweise auf eine Leberfunktionsstörung bei den untersuchten Tieren aufgrund der normalen Serumparameter bestanden, kann angenommen werden, dass es sich in diesem Fall um präparationsbedingte Artefakte handeln muss. Echinozyten zeigten im Gegensatz zu Akanthozyten viele kurze, in Form und Größe einheitliche Ausläufer. Sie werden auch als stechapfelförmige Erythrozyten bezeichnet (*Schermer, 1958*). Diese kamen zahlreich in den Blutaussstrichen der Kaninchen vor und werden als charakteristisch für das Kaninchenblut angesehen (*Schermer, 1958; Mitruka und Rawnsley, 1981; Sanderson und Phillips, 1981; Moore, 2000*). Echinozyten bilden sich meist als Artefakt in Blutaussstrichen als Folge eines zu hohen EDTA-Gehalts in den Probenahmeröhrchen, ungeeigneter Herstellung des Blutaussstrichs oder zu langer Lagerung von Blutproben vor dem Ausstreichen. Sie entstehen, wenn die äußere Lipidschicht der Membran im Gegensatz zur inneren Lipidschicht an Masse zunimmt. Dies kann auch durch die Dehydratation der Erythrozyten, einen zu hohen pH-Wert, zu hohen intrazellulären Kalziumgehalt und einen Rückgang der ATP-Konzentration hervorgerufen werden (*Harvey, 2008*). Keratozyten, die selten in meinen Blutaussstrichen zu sehen waren, stammen von membranbeschädigten Erythrozyten, bei denen sich zunächst eine Vakuole bildet, die rupturiert. Sie entstehen durch physikalische oder chemische

Einwirkungen (*Jain, 1993*). Howell-Jolly-Körperchen, die beim Kaninchen bisweilen beobachtet werden können (*Sanderson und Phillips, 1981; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Harcourt-Brown, 2008; Jenkins, 2008*), konnte ich in keinem meiner Ausstriche identifizieren. Die Erythrozyten zeigten weder in der PAS-Färbung noch bei der Alcianblaufärbung eine positive Reaktion.

Die Thrombozyten sind kleine, runde, zellkernlose Gebilde mit einem Durchmesser von 1-3 µm, im Durchschnitt 1,9 µm. Dies wurde auch bereits von anderen Autoren beschrieben (*Schermer, 1958; Sanderson und Phillips, 1981*). Sie treten in den Blutausstrichen vereinzelt oder auch in aggregierter Form auf. Im Blut des Kaninchens findet man jedoch zu 0,1-0,3% (*Silver und Silver, 1971*) auch größere Formen (*Silver und Silver, 1971; Sanderson und Phillips, 1981*). Solche konnte ich auch in meiner Arbeit beobachten. Sie hatten einen Durchmesser von 4,9-9 µm. Die Thrombozyten zeigten in den Blutausstrichen zumeist eine Ausbildung von Pseudopodien. Dies weist auf eine Aktivierung der Thrombozyten hin (*White, 1987*). Strukturell unterscheidet man bei Thrombozyten ein Granulomer und ein Hyalomer (*Sinowatz und Hees, 2000*). Das hell und transparent erscheinende Hyalomer enthält Mikrotubuli, Mikrofilamente, Glykogen sowie verschiedene Vesikel (*White, 2006*), die sich im Lichtmikroskop nicht darstellen lassen. Die Granula der Thrombozyten hingegen, die mit Zellorganellen wie den Lysosomen und den Mitochondrien zum Granulomer gehören (*White, 2006*), lassen sich deutlich anfärben, sodass eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Strukturen auch lichtmikroskopisch möglich ist. In der PAS-Färbung waren positive Granula im Hyalomer darstellbar. Sie färbten sich teilweise nur schwach an. Im Gegensatz zu den Granulozyten ist die Menge an PAS-positivem Material gering. Dies wurde auch bereits von Jain (1969) in den Thrombozyten des Kaninchens beobachtet (*Jain, 1969*). Saure Mukosubstanz ist in der Glykokalyx und auf verschiedenen zytoplasmatischen Vakuolen wie auch im Nukleoid der Thrombozyten des Kaninchens mit dialysiertem Eisen nachweisbar (*Spicer et al., 1969*). Der Begriff Mukosubstanz umfasst dabei alle mit Proteinen gekoppelten Kohlenhydrate wie Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane, Glyko- und Mukoproteine (*Romeis, 1989*). Bei der Alcianblaufärbung bei einem pH-Wert von 2,5 war bei den Thrombozyten eine positive Reaktion in Form von blassblauen Granula zu sehen. Aufgrund der fehlenden Reaktivität bei einem pH-Wert von 1 kann man darauf schließen, dass Thrombozyten des Kaninchens saure Mukosubstanzen, aber keine sulfatierten Mukosubstanzen enthalten.

Die Lymphozyten stellten sich in meinen Untersuchungen als runde, zellkernhaltige Zellen mit einem beim Kaninchen durchschnittlichen Durchmesser von 10,2 µm dar. Dieser reichte von 6,8 bis 15,4 µm. Aufgrund dessen kann man beim Kaninchen große und kleine Lymphozyten unterscheiden (*Harkness und Wagner, 1995*), wobei die kleinen Lymphozyten im Blut dominieren (*Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Harcourt-Brown, 2008; Jenkins, 2008*). Nach Literaturangaben haben die kleinen Lymphozyten einen Durchmesser von 7-10 µm (*Sanderson und Phillips, 1981; Harcourt-Brown, 2008*), die großen Lymphozyten einen Durchmesser von 10-15 µm (*Sanderson und Phillips, 1981*). In diesen

Untersuchungen besaßen die Lymphozyten einen großen Zellkern, der bei kleinen Lymphozyten nur einen schmalen Zytoplasmasaum erkennen ließ. Bei größeren Lymphozyten war das Zytoplasma stärker ausgeprägt. Der Zellkern der Lymphozyten des Kaninchens hatte unterschiedliche Form. Er war kugelförmig, oval oder quaderförmig und zeigte manchmal eine leichte Einkerbung, was auch bei Sanderson und Phillips (1981) angegeben wird (*Sanderson und Phillips, 1981*). Bei vielen Lymphozyten war eine gute Differenzierung zwischen Heterochromatin und Euchromatin möglich. Das Zytoplasma der Lymphozyten war meist homogen, zeigte sich jedoch manchmal mit einer marmorierten Struktur. Bei aktivierten Lymphozyten färbte es sich mittel- bis dunkelblau an. Die Färbung des Zytoplasmas ist abhängig von dem Gehalt an freien Ribosomen, Polyribosomen und / oder rauem endoplasmatischem Retikulum und variiert in Abhängigkeit von der Aktivität der Zelle (*Jain, 1993*). Bei Lymphozyten mit hoher Aktivität, die Proteine synthetisieren, ist das Zytoplasma in den Standardfärbungen durch den hohen Gehalt an Ribosomen dunkelblau, wohingegen inaktive Lymphozyten ein helles Zytoplasma zeigen (*Jain, 1993; Lester et al., 2005*). Auch Sanderson und Phillips (1981) beobachteten in Standardfärbungen eine mittlere bis tiefe Blaufärbung des Zytoplasmas (*Sanderson und Phillips, 1981*). Azurophile Granula, wie sie in der Literatur in großen, teilweise auch kleinen Lymphozyten beschrieben werden (*Sanderson und Phillips, 1981; Benson und Paul-Murphy, 1999; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007*), waren in meinen Blutaussstrichen in den Übersichtsfärbungen nicht zu sehen. In der PAS-Färbung waren die Lymphozyten stets negativ, was mit den Ergebnissen von Jain (1993) übereinstimmt (*Jain, 1993*). Auch in der Alcianblaufärbung waren die Lymphozyten des Kaninchens stets negativ.

Monozyten waren auch in meinen Untersuchungen die größten Blutzellen im Blut der Kaninchen mit einem Durchmesser von 10,8 bis 18,4 µm. Im Durchschnitt waren sie 15,1 µm groß. Dies stimmt mit dem in der Literatur angegebenen Durchmesser von ca. 15-18 µm für die Monozyten des Kaninchens überein (*Moore, 2000; Melillo, 2007; Jenkins, 2008*). Hinsichtlich der Form des Zellkerns variieren die Beschreibungen in der Literatur von rund bis oval (*Campbell und Ellis, 2007*) oder gelappt (*Schermer, 1958; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007*) bis hin zu bohnen- oder hufeisenförmig (*Moore, 2000; Melillo, 2007*) oder auch nierenförmig (*Oka et al., 1982*). Diese Vielfalt an Formen konnte ich auch in meinen Blutaussstrichen beobachten. Der Zellkern war stets von einem umfangreichen Zytoplasma umgeben, das sich in allen Übersichtsfärbungen sehr hell anfärbte. Dieses erschien zum Teil wolkig oder marmoriert (*Schermer, 1958; Campbell und Ellis, 2007; Melillo, 2007*). Die im Zytoplasma teilweise zahlreich vorkommenden Vakuolen wurden auch schon von anderen Autoren beobachtet (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Moore, 2000; Quesenberry, 2004; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007*). Azurophile Granula, die in den Romanowsky-Färbungen im Zytoplasma des Monozyten zu sehen sein sollen (*Campbell und Ellis, 2007*), ließen sich in den Blutaussstrichen der Kaninchen meiner

Arbeit nicht darstellen. Sowohl in der PAS-Färbung als auch in der Alcianblau-Färbung waren die Monozyten stets negativ.

Die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens verhalten sich in Romanowsky-Färbungen nicht neutral, sondern eosinophil (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974; Sanderson und Phillips, 1981; Jain, 1993; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007*), weshalb sie auch als pseudoeosinophile (*Schermer, 1958*) amphophile, azidophile oder heterophile Granulozyten bezeichnet werden (*Kozma et al., 1974; Sanderson und Phillips, 1981; Harkness und Wagner, 1995; Benson und Paul-Murphy, 1999; Jenkins, 2008*). Elektronenmikroskopisch, funktionell und biochemisch entsprechen die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens denen der anderen Säugetiere (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974; Sanderson und Phillips, 1981; Dodds, 2000; Quesenberry, 2004; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Jenkins, 2008*).

Die neutrophilen Granulozyten waren unter den Granulozyten in meinen Blutaussstrichen am häufigsten vertreten. Ihr Durchmesser betrug 9,8 bis 15,7 µm, im Durchschnitt 12,2 µm. Diese Spannbreite stimmt auch mit den Angaben in der Literatur überein (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Sanderson und Phillips, 1981; Hein und Hartmann, 2005; Melillo, 2007; Marshall, 2008*). Die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens hatten einen multipel gelappten Zellkern, dessen Segmente durch feine Chromatinfäden miteinander verbunden waren. Bei manchen neutrophilen Granulozyten war in meinen Untersuchungen ein trommelschlegelartiger Fortsatz („drumstick“) zu erkennen. Dieser ist beim weiblichen Kaninchen in neutrophilen Granulozyten stets vorhanden (*Kozma et al., 1974; Jain, 1993; Harkness und Wagner, 1995*) und stellt ein inaktiviertes X-Chromatin dar (*Jain, 1993*). Im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten befanden sich zwei Granulapopulationen, die ich in der Giemsa-Färbung (1:11) und in der Pappenheim-Färbung gut erkennen konnte. Die primären und sekundären Granula entstammen verschiedenen Bereichen des Golgi-Apparates und haben daher unterschiedliche Funktionen (*Benson und Paul-Murphy, 1999*). In der Literatur werden die primären Granula von den meisten Autoren in Romanowsky-Färbungen als groß, mit dunkelroten bis pinkfarbigen Granula definiert, wohingegen die sekundären Granula als klein und pinkfarben beschrieben werden (*Baggiolini et al., 1970; Sanderson und Phillips, 1981; Parmley, 1988; Jain, 1993; Harkness und Wagner, 1995; Benson und Paul-Murphy, 1999; Dodds, 2000; Moore, 2000; Melillo, 2007*). Die einzigen Autoren, die dem widersprechen, sind Thrall (2004) und Campbell und Ellis (2007) (*Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007*). Dies kann jedoch als wenig wahrscheinlich betrachtet werden, da zum einen auch in meinen Untersuchungen mit der Pappenheim-Färbung und der Giemsa-Färbung (1:11) eine Unterscheidung zwischen primären und sekundären Granula möglich war, bei denen viele, kleine, rosafarbene bis kräftig pinkfarbene Granula und weniger häufig vorkommende, größere, violette Granula zu sehen waren. Zum anderen konnte ich dies auch durch meine ultrastrukturellen Untersuchungen feststellen,

die eine eindeutige Unterteilung in primäre und sekundäre Granula zulassen und so die Auffassung der meisten Autoren bestätigen. Die primären Granula der neutrophilen Granulozyten haben einen Durchmesser von 0,5-0,8 μm (*Baggiolini et al., 1970*) oder 0,3-0,8 μm (*Parmley, 1988*), die sekundären Granula einen Durchmesser von 0,25-0,4 μm (*Baggiolini et al., 1970*) bzw. 0,25-0,5 μm (*Parmley, 1988*). Der prozentuale Anteil der primären Granula an der gesamten Granulapopulation beträgt 25-40 % (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*), der der sekundären Granula 80-90 % (*Benson und Paul-Murphy, 1999*). Diese Verteilung konnte ich auch in der Pappenheim- und Giemsa-Färbung (1:11) beobachten. In der Sirius-Red-Färbung zeigten die neutrophilen Granulozyten eine deutliche Anfärbung im Randbereich der Granula. Dies widerspricht den Literaturangaben, denen zufolge ausschließlich eine Anfärbung der eosinophilen Granulozyten erfolgt (*Wehrend et al., 2004*). Laut Literatur beruht diese Annahme jedoch auf Untersuchungen an Rindern, Schafen und Pferden (*Wehrend et al., 2004*), deren neutrophile Granulozyten sich auch in Übersichtsfärbungen neutral verhalten. Im Gegensatz dazu verhalten sich die neutrophilen Granulozyten von Kaninchen, wie oben bereits erwähnt, nicht neutral in Standardfärbungen, sondern eosinophil, was eine Anfärbung der Granula in der Sirius-Red-Färbung erklärt. In der PAS-Färbung waren granuläre Reaktionsprodukte im rosa- bis lilafarbenen Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten zu sehen. Auch bei Jain (1969) zeigen die neutrophilen Granulozyten des Kaninchens viele positive, purpurrote Granula ähnlicher Größe (*Jain, 1969*). Glykogenpartikel wurden in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens mit der „periodic acid-thiocarbohydrazid-silver proteinate“ (PA-TCH-SP)-Methode nachgewiesen. Während der Entwicklung des neutrophilen Granulozyten im Knochenmark nimmt der Glykogengehalt in der Zelle zu. Bereits im Myelozyten kann man einzelne Glykogenpartikel erkennen. In ausgereiften neutrophilen Granulozyten sind große Ansammlungen von Glykogenpartikeln zu beobachten (*Murata et al., 1978*). Saure Mukosubstanzen in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens können mit dialysiertem Eisen ultrastrukturell auf der Oberfläche der Plasmamembran, im Golgi-Komplex und in den primären und tertiären Granula nachgewiesen werden (*Hardin und Spicer, 1971*). In den lichtmikroskopischen Untersuchungen meiner Arbeit waren in der Alcianblaufärbung, sowohl bei einem pH-Wert von 2,5 zum Nachweis saurer Mukosubstanzen als auch bei einem pH-Wert von 1 zum Nachweis sulfatierter Mukosubstanzen, kräftig hellblaue, granuläre Reaktionsprodukte im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten zu sehen. Sulfatierte Mukopolysaccharide und ein hoher Gehalt an „Basic Protein“ wurden von Horn und Spicer (1964) in den azurophilen Granula mit Hilfe der Autoradiographie nachgewiesen (*Horn und Spicer, 1964*). Bei Untersuchungen auf verschiedene komplexe Kohlenhydratstrukturen wurde festgestellt, dass vor allem in den tertiären Granula der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens komplexe Kohlenhydratstrukturen vorkommen. Dazu zählen Kohlenhydrate mit sulfatierten und carboxylierten Gruppen, Glykokonjugate mit vizinalen Glykolen wie Glykogen und Glykoproteine. Eine nur schwache Reaktion ist in reifen primären und

sekundären Granula beim Nachweis von Glykokonjugaten sowie bei Pyroantimonat-reaktiven Kationen wie Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ und Histamin zu beobachten (*Parmley et al., 1979*).

Die eosinophilen Granulozyten zeigten sich in meinen Untersuchungen als große, runde bis ovale Zellen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 13,9 µm (11,5-17,6 µm). In der Literatur werden ähnliche Werte für den Durchmesser der eosinophilen Granulozyten angegeben. Der Zellkern der eosinophilen Granulozyten bestand in meiner Arbeit stets aus zwei bis drei Segmenten. In der Literatur wird dieser als zweigelappt und U- bzw. hufeisenförmig beschrieben (*Sanderson und Phillips, 1981; Benson und Paul-Murphy, 1999; Moore, 2000; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Melillo, 2007; Jenkins, 2008*). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bei allen eosinophilen Granulozyten feststellen. Die Segmente waren zum Teil rundlich und oft über schmale Chromatinbrücken miteinander verbunden oder auch langgestreckt und U- oder auch hufeisenförmig angeordnet. Der Rand des Zellkerns stellte sich außerdem oft „ausgefranst“ dar. Charakteristisch für die eosinophilen Granulozyten sind die zytoplasmatischen, eosinophilen Granula, die das Zytoplasma ausfüllen (*Schermer, 1958; Kozma et al., 1974; Sanderson und Phillips, 1981; Benson und Paul-Murphy, 1999; Moore, 2000; Jenkins, 2008*), sodass sie der Zelle ein orange-pinkfarbiges, schaumiges Aussehen verleihen (*Sanderson und Phillips, 1981; Melillo, 2007*). Mit einem Durchmesser von bis zu 1 µm ließen sie sich in meinen Übersichtsfärbungen kräftig rot bis pink anfärben. Sie sind somit drei- bis viermal so groß wie die Granula der neutrophilen Granulozyten (*Kozma et al., 1974; Harkness und Wagner, 1995*) und hatten in meinen Untersuchungen eine runde bis eckige, teilweise backsteinartige Form. In der Hämalaun-Eosin-(H.E.)-Färbung färbten sich in meinen Untersuchungen wie auch bei Shanklin et al. (1977) (*Shanklin et al., 1977*) nur die Granula der eosinophilen Granulozyten an, sodass man sie sehr gut von anderen Granulozytenpopulationen unterscheiden konnte. Im Gegensatz dazu war die Sirius-Red-Färbung für die gezielte Darstellung eosinophiler Granulozyten beim Kaninchen eher ungeeignet, da sich hier auch die Granula der neutrophilen Granulozyten rosafarben bis rot anfärbten. Eine Anfärbung der eosinophilen Granula erfolgte dabei im Randbereich der Granula. Weitere Färbungen, die der Differenzierung der eosinophilen Granulozyten dienen, sind Giemsa-Urea, Eosin-Urea (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*) und die modifizierte Undritz II Färbung (*Shanklin et al., 1977*). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten PAS-Reaktion zeigten die eosinophilen Granulozyten granuläre Reaktionsprodukte intergranulär im Zytoplasma. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Hermansky (1970) und Jain (1993) überein (*Jain, 1969; Hermansky et al., 1970*). Auch mit der PATCH-SP-Reaktion („periodic acid thiosemicarbazide-thiocarbohydrazide-silver proteinate procedure“) wurde Glykogen in den eosinophilen Granulozyten des Kaninchens nachgewiesen, die aber nur halb so viel Glykogen wie die neutrophilen Granulozyten enthalten (*Murata et al., 1978*). In Untersuchungen auf komplexe Kohlenhydrate der eosinophilen Granulozyten des Kaninchens ist eine mittlere Reaktivität der elektronendichten Granula auf Glykokonjugate mit

vizinalen Glykolen vorhanden (*Parmley et al., 1979*). In der Alcianblaufärbung waren die eosinophilen Granulozyten stets negativ.

Das Kaninchen ist eine der wenigen Säugetierspezies, bei denen die basophilen Granulozyten in mäßiger (*Moore, 2000*) bzw. nach Angaben eines anderen Autors (*Melillo, 2007*) in großer Menge im Blut vorkommen. In meinen Untersuchungen stellten sie sich als runde Zellen mit einer Größe von durchschnittlich 13,5 µm (10,6-16,5 µm) dar. Sie sind 8-12 µm (*Melillo, 2007*) bzw. 10-15 µm (*Sanderson und Phillips, 1981*) groß. Nach Schermer (1958) und Jenkins (2008) entsprechen sie in ihrer Größe ungefähr den neutrophilen Granulozyten (*Schermer, 1958; Jenkins, 2008*). In meinen Untersuchungen besaßen sie einen oft mehrfach gelappten, plumpen Zellkern von pleomorpher Gestalt. Er war jedoch weniger segmentiert als der Zellkern der neutrophilen Granulozyten (*Melillo, 2007; Reagan, 2008*), manchmal auch langgestreckt (*Sanderson und Phillips, 1981*). Im Zytoplasma waren kleine, kugelförmige Granula vorhanden, die teilweise den Zellkern überlagerten. Die das Zytoplasma dicht bepackenden Granula (*Moore, 2000*) sind in Romanowsky-Färbungen stark basophil (*Campbell und Ellis, 2007*). Die Farbe der Granula war auch in meinen Färbungen, in denen es zu einer Anfärbung der basophilen Granulozyten kam, wie in der Literatur beschrieben, violett bzw. tiefviolett (*Sanderson und Phillips, 1981; Moore, 2000; Melillo, 2007*), teilweise auch lila bzw. purpurfarben (*Quesenberry, 2004; Reagan, 2008*) oder blau bis dunkelblau (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Harcourt-Brown, 2008*). In der H.E.-Färbung kam es zu einer Degranulation der basophilen Granulozyten. Eine sehr schwache Anfärbung der sich in der Degranulation befindenden Granula erfolgte bei der Diff-Quick-Färbung, Giemsa-Färbung (1:11) und Giemsa-Färbung (1:20). Dieses Phänomen wurde bereits von Lester et al. (2005) in Bezug auf die neutrophilen Granulozyten beschrieben. Es wurde von ihnen vor allem bei schnellen Romanowsky-Färbungen mit einer Fixationszeit von 5-10 Sekunden beobachtet (*Lester et al., 2005*). Dies konnte ich in meinen Untersuchungen jedoch nie bei den neutrophilen Granulozyten, sondern nur bei den basophilen Granulozyten feststellen. Aus diesem Grund vermute ich, dass es sich bei den von Lester (2005) als degranulierte neutrophile Granulozyten bezeichneten Zellen um basophile Granulozyten handelte. In der Toluidinblaufärbung zum gezielten Nachweis von basophilen Granulozyten färben sich die Granula kräftig lila bis violett an. Diese Eigenschaft, sich in einem anderen Farbton als des in der Färbelösung angebotenen Farbstoffs anzufärben, wird als Metachromasie bezeichnet und kommt vor allem in Zellen mit einem hohen Gehalt an sauren Mukopolysacchariden vor (*Pschyrembel, 2007*). In der PAS-Färbung finden sich zahlreiche violette bis lilafarbene Granula im rosa- bis lilafarbenen Zytoplasma der basophilen Granulozyten. Sie sind somit PAS-positiv. Bereits Murata et al. (1978) konnten mit Hilfe zytochemischer Methoden Glykogenpartikel in den basophilen Granulozyten nachweisen, die in größerer Anzahl bei reifen Basophilen als bei unreifen Zellen vorkommen (*Murata et al., 1978*).

Beim Kaninchen befinden sich verschiedene Glykokonjugate in den basophilen Granulozyten (*Sakakibara und Eguchi, 1985b*). Saure Mukopolysaccharide sind an der Zellmembran und in den basophilen Granula lokalisiert (*Hardin und Spicer, 1971; Clark et al., 1977*), zu denen vor allem Chondroitinsulfat zählt, das am häufigsten in basophilen Granulozyten des Kaninchens vorkommt (*Clark et al., 1977*). In der Alcianblaufärbung mit einem pH-Wert von 2,5 zur Anfärbung saurer Mukopolysaccharide zeigten die basophilen Granulozyten eine kräftig blaue, eher filamentöse als granuläre Anfärbung von Zytoplasmastrukturen. In den basophilen Granula besteht auch eine Reaktivität gegenüber sulfatierten Glykokonjugaten. Bei der Alcianblaufärbung mit einem pH-Wert von 1 zum Nachweis sulfatierter Mukopolysaccharide war eine schwach blassblaue, granuläre Reaktion in den basophilen Granulozyten zu sehen. Allgemein nimmt die positive Reaktion gegenüber sulfatierten Glykokonjugaten mit zunehmendem Reifungsstadium der basophilen Granulozyten ab. Wie beim Menschen werden die basophilen Granula beim Kaninchen anhand des Verteilungsbildes von sauren Mukopolysacchariden und sulfatierten Glykokonjugaten in drei Typen mit einer Gesamtreaktion des Granulums, einer Reaktion nur an der Peripherie und keiner Reaktivität nach Versetzen mit dialysiertem Eisen untergliedert. Diese Verteilung entspricht dem Reifungszustand der Granula und nimmt mit zunehmender Reifung ab bis hin zur Reaktionslosigkeit (*Sakakibara und Eguchi, 1985b*). Dies konnte ich in meinen Untersuchungen jedoch nicht beobachten. Perjodsäure-reaktive Glykokonjugate in den basophilen Granula können mittels der PA-TCH-SP („periodate-thiocalbohydrazide-silver proteinate“)-Methode demonstriert werden (*Eguchi, 1991*).

Die kleinen Granula enthalten im Gegensatz zu den basophilen Granula keine sauren Mukopolysaccharide sowie keine sulfatierten Glykokonjugate, sondern neutrale Glykokonjugate (*Sakakibara und Eguchi, 1985a*).

5.3 Elektronenmikroskopie

Ultrastrukturell konnten die Blutzellen bis auf den basophilen Granulozyten sicher identifiziert und charakterisiert werden.

Die Erythrozyten wiesen aufgrund der Ultradünnschnitte von 40-60 nm in der elektronenmikroskopischen Untersuchung unterschiedliche Form und Größe auf. Sie reichte von langgestreckt über scheibenförmig bzw. napfförmig bis hin zu rund. Eine glatte Zellmembran, beim Kaninchen eine Lipiddoppelmembran aus 5,3 % Glykolipiden, 65,8 % Phospholipiden und 28,9 % Cholesterol (*Wessels und Veerkamp, 1973*), umschließt ein homogenes Zytoplasma, in dem bei reifen Erythrozyten weder Zellorganellen noch ein Zellkern zu sehen sind. Im Zytoplasma des reifen Erythrozyten befindet sich vor allem Hämoglobin, das einen Anteil von 90 % am zytoplasmatischen

Protein ausmacht. Dieses wird von den Erythrozyten-Vorläufern und den Retikulozyten synthetisiert und im Zytoplasma akkumuliert (*Harvey, 2008*).

Zusätzlich zu ausgereiften Erythrozyten konnten im Blut auch Erythrozytenvorläufer mit einem exzentrisch gelegenen, stark kondensierten, runden oder ovalen Zellkern identifiziert werden. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis der Zellen war stets gering. Im Zytoplasma waren oft Mitochondrien vorhanden.

Thrombozyten zeigten in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterschiedliche Formen von oval bis rund. Stets handelte es sich um aktivierte Thrombozyten, bei denen sich das Zytoplasma als Pseudopodien in die Umgebung erstreckte. Ruhende Thrombozyten haben eine scheiben- oder linsenförmige Gestalt mit einer glatten Oberfläche und einer leicht konvexen Kontur (*Jain, 1993*). Die glatte Zellmembran der Thrombozyten des Kaninchens besteht, wie bei allen Säugetieren, aus Phospholipiden (*Hashizume et al., 1994*). Sie setzt sich beim Kaninchen zu 31 % aus Phosphatidylcholin, zu 32 % aus Phosphatidylethanolamin, zu 12 % aus Phosphatidylserin, zu 3 % aus Phosphatidylinositol und zu 22 % aus Sphingomyelin zusammen (*Packham et al., 1992*). In ruhenden Thrombozyten ist in der Zellmembran auch cAMP lokalisiert, um die Aktivität der Kalziumpumpe zu regulieren (*Jain, 1993*). Die Zellmembran weist außerdem eine gut ausgebildete Glykokalyx auf (*Jain, 1993; Tablin, 2000*). Sie setzt sich aus Kohlenhydratketten zusammen, die in kovalenter Verbindung mit Membranlipiden und -proteinen stehen (*Wiesner und Ribbeck, 2000*). Dabei sind vor allem die Glykoproteine wichtig für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Beim Kaninchen gibt es insgesamt 3-4 Hauptglykoproteine (*Jain, 1993*). Das Glykoprotein GPIIb/IIIa ist eines dieser Hauptglykoproteine. Es unterscheidet sich von dem des Menschen in funktionellen Aspekten. Auf der Zellmembran befindet sich beim Kaninchen außerdem ein C3b-Rezeptor, jedoch kein Fc-Rezeptor für IgG, der beim Menschen vorkommt (*Packham et al., 1992*). Das vor allem auf Spektrin basierende Membranskelett ist mit Aktinfilamenten verknüpft, die vom Zytoplasma zur Plasmamembran ziehen (*Hartwig, 2006*). Auch Intermediärfilamente (*Tablin, 2000*) und ein Mikrotubulus sind in den Thrombozyten vorhanden (*Hartwig, 2006*). Bei meinen ultrastrukturellen Untersuchungen der Thrombozyten des Kaninchens konnten Anschnitte des Mikrotubulus, der sich mit einer Länge von ca. 100 µm acht- bis zwölfmal um sich selbst windet (*Hartwig, 2006*), identifiziert werden. Der Mikrotubulus lag vor allem im Randbereich der Zelle und war in quer angeschnittenen Thrombozyten an den polaren Enden der Zelle zu sehen. Er hat in den Thrombozyten des Kaninchens einen Durchmesser von ca. 7 nm Dicke (*Silver und McKinstry, 1967*). Von den Granulapopulationen in den Thrombozyten konnten die α-Granula und die elektronendichten Granula („dense bodies“) im Zytoplasma identifiziert werden. Die α-Granula besaßen im Elektronenmikroskop eine homogen elektronendichte Struktur. Sie haben beim Kaninchen einen Durchmesser von 400 nm (*Bak et al., 1969; Spicer et al., 1969*). Eine ellipsoide, exzentrische Stelle von etwas geringerer Elektronendichte

und einer Größe von 0,25 µm, die als Nukleoid bezeichnet wird (*Spicer et al., 1969*), konnte ich in meinen ultrastrukturellen Untersuchungen nicht beobachten. Die Proteine der α-Granula des Kaninchens können aufgrund der geringen Kreuzreaktion mit Antikörpern, die gegen menschliche Proteine erzeugt wurden, nur schwer bestimmt werden (*Packham et al., 1992*). Trotzdem wurde der Plättchenfaktor 4 von Thomas et al. (1970) (*Thomas et al., 1970*) in Thrombozyten des Kaninchens nachgewiesen. Abgesehen vom Plättchenfaktor 4 ist zudem P-Selektin beim Kaninchen in den α-Granula der Thrombozyten vorhanden. Es ist in der Zellmembran von ruhenden Thrombozyten gespeichert. Beim Kaninchen hat es ein Molekulargewicht von 117 ± 7 kDa und stimmt mit der Sequenz des humanen P-Selektins um 74 % überein. Nach Aktivierung der Thrombozyten und Freisetzung des Granulainhalts wird es an der Oberfläche des OCS und der Pseudopodien exprimiert. Es gehört zur Selektinfamilie und dient als membrangebundener Rezeptor für P-Selektin-Liganden. P-Selektin fördert unter anderem Interaktionen zwischen aktivierten Thrombozyten und Leukozyten (*Reed et al., 1998*). Die zweite gut zu erkennende Granulapopulation in den Thrombozyten des Kaninchens waren die „dense granules“. Sie zeichneten sich durch eine vakuolenähnliche Struktur aus, die von einer Membran umgeben war und einen stark elektronendichten, kugeligen Körper enthielt. Sie soll beim Kaninchen 50-150 nm (*Tranzer et al., 1966*) bzw. 170 nm (*Bak et al., 1969*) groß sein. Im Durchschnitt kommen 3-5 dieser Granula in einem Thrombozyten des Kaninchens vor (*Bak et al., 1969*). Auch in dieser Arbeit waren in einem Anschnitt eines Thrombozyten in der Regel 3-5 „dense bodies“ zu sehen. Vereinzelt war die Anzahl dieser, mit bis zu sieben, pro Thrombozyt höher als von anderen Autoren beschrieben. In den „dense bodies“ befinden sich Serotonin (*Tranzer et al., 1966; Meyers et al., 1982; Packham et al., 1992*), Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , Nukleotide sowie Histamin (*Meyers et al., 1982; Packham et al., 1992*). Der Serotonin- und Histamingehalt in den „dense bodies“ des Kaninchens ist höher als beim Menschen (*Packham et al., 1992*). Eine Besonderheit der Thrombozyten des Kaninchens ist die in situ Produktion von Histamin durch eine Decarboxylierung von Histidin zu Histamin. Der Hauptanteil, so wird angenommen, wird vor allem in den Megakaryozyten im Knochenmark gebildet (*Da Prada et al., 1981*). Ein weiterer Inhaltsstoff der „dense bodies“ bei Kaninchen ist Synaptophysin. Es dient zur Bildung spezifischer Kanäle in den „dense bodies“ zur Exozytose von Serotonin (*Bähler et al., 1990*). Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Normetanephrin, p-Oktopamin und m-Oktopamin wurden von Da Prada et al. (1981) in den Thrombozyten des Kaninchens nachgewiesen (*Da Prada et al., 1981*). Im Zytoplasma der Thrombozyten konnte ich in meiner Arbeit zahlreiche Glykogengranula, die sich teilweise in Gruppen zusammenlagerten, beobachten. Sie dienen als erste Ressource für den Energiemetabolismus der ruhenden Thrombozyten (*Tablin, 2000*). Im Vergleich zum Kaninchen besitzen die Thrombozyten des Menschen dreimal so viel Glykogen (*Bak et al., 1969*). Glykosomen, die von einer Einheitsmembran umgeben sind und bei Thrombozyten des Menschen beobachtet wurden (*White, 2006*), als auch

Mitochondrien, Anschnitte des OCS oder DTS konnten in meiner Arbeit nicht bzw. nicht eindeutig identifiziert werden. Weiterhin konnten weder das endoplasmatische Retikulum noch der Golgi-Apparat nachgewiesen werden. Dies entspricht auch den Beobachtungen von Jain (1993) (*Jain, 1993*).

In meinen ultrastrukturellen Untersuchungen zeigten sich die Lymphozyten als insgesamt runde Zellen, von denen sich Pseudopodien in die Umgebung erstreckten. In größeren Lymphozyten hatte der Zellkern stets zahlreiche Einbuchtungen. Wie auch bei Steffens (2000) beschrieben, nahm der Anteil des im Randbereich des Zellkerns lokalisierten Heterochromatins mit zunehmender Größe des Lymphozyten ab. In diesen großen Lymphozyten war immer ein Nukleolus zu erkennen. Zellkerne mit zwei Nukleoli (*Steffens, 2000*) wurden nicht von mir beobachtet. Die glatte Zellmembran umgab ein Zytoplasma, in dem Mitochondrien, Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum und Vakuolen zu sehen waren. Der Golgi-Apparat konnte durch eine Ansammlung von abschnürenden Lysosomen in wenigen Anschnitten identifiziert werden. In den großen Lymphozyten befanden sich zum einen primäre, zum anderen aber auch sekundäre Lysosomen. Die primären Lysosomen hatten einen relativ elektronendichten, feinkörnig-homogenen Inhalt und waren kugelförmig. Sie enthalten Hydrolasen wie saure Phosphatase, Cathepsin, Glucuronidase und Ribonuclease (*Wiesner und Ribbeck, 2000*). Die sekundären Lysosomen oder auch Heterolysosomen stellten sich als heterogene, kugelförmige Zellorganellen mit einer deutlichen Membran dar. Sie entstehen durch Verschmelzung der primären Lysosomen mit Phagosomen. Sie enthalten als intrazelluläre Verdauungsorganellen vielfältige Innenstrukturen und unterliegen während des Verdauungsprozesses einem intensiven Strukturwandel (*Wiesner und Ribbeck, 2000*). Im Großen und Ganzen stimmten meine Beobachtungen mit denen in der Literatur für Lymphozyten von anderen Säugetieren beschriebenen Befunden überein.

Der Monozyt zeigte sich in meinen ultrastrukturellen Untersuchungen je nach Anschnitt als eine runde oder ovale Zelle mit wenigen Pseudopodien. Die Form des Zellkerns variierte in den Ultradünnschnitten von oval bis rund zu nieren- und schmetterlingsförmig mit teilweise tiefen Einbuchtungen, wie in der Literatur beschrieben (*Schermer, 1958; Oka et al., 1982; Moore, 2000; Thrall, 2004; Campbell und Ellis, 2007; Melillo, 2007*). Der Zellkern enthielt zudem viel Euchromatin und wenig Heterochromatin, wobei letzteres vor allem im Randbereich lokalisiert war. Bei einigen Monozyten waren die innere und äußere Kernmembran sowie das zwischen diesen liegende Spatium perinucleare gut zu erkennen. Über die Kernporenverschlussmembran steht der Zellkern mit dem Zytoplasma in direkter Verbindung. Sie umgibt die Kernporen, die dem Austausch von Stoffen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma und dem Austritt ribosomaler RNA ins Zytoplasma dienen (*Sinowatz und Hees, 2000*). Diese konnten in einigen Monozyten gut dargestellt werden. Im Zytoplasma befanden sich zudem Granula mit homogen elektronendichtem Inhalt. Nach Nichols et al. (1971) können bis zu 50 Granula in einem Monozyten des Kaninchens identifiziert werden (*Nichols et*

al., 1971). Laut Oka et al. sind 18-50 Granula im Monozyten des Kaninchens zählbar, die eine Tendenz zur Bildung von Clustern zeigen (Oka et al., 1982). Im Bereich des Golgi-Apparates konnte ich auch unreife, weniger elektronendichte Granula beobachten, was darauf schließen lässt, dass die Granula auch in zirkulierenden Zellen gebildet werden (Nichols et al., 1971). Im Zytoplasma waren außerdem zahlreiche große Mitochondrien vom Crista-Typ, endoplasmatisches Retikulum und viele Vakuolen zu sehen. Ribosomen lagerten sich im Zytoplasma oft zu Polyribosomen zusammen.

Die neutrophilen Granulozyten stellten sich in meinen Untersuchungen als runde Zellen mit einer glatten Zellmembran und einigen Pseudopodien dar. Mikrovilli, die sich bei verschiedenen Tierspezies auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten befinden (Steffens, 2000), konnten in meiner Arbeit beim Kaninchen nicht identifiziert werden. Der Zellkern enthielt vor allem Heterochromatin im Randbereich, während Euchromatin vor allem im Zentrum des Zellkerns lokalisiert war. Im Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten konnte ich zahlreiche Glykogenpartikel, Mitochondrien, Anschnitte des endoplasmatischen Retikulums und teilweise auch Anschnitte des Golgi-Apparates bzw. Stapel von Golgi-Lamellen (Spicer et al., 1968) sehen. Dominiert wurde das Zytoplasma jedoch von den drei Granulapopulationen, die als primäre (azurophile), sekundäre (spezifische) und tertiäre Granula bezeichnet werden (Dunn et al., 1968). Die primären Granula zeigten sich in meinen Untersuchungen als die größten zytoplasmatischen Strukturen mit hoher Elektronendichte. Dies stimmt mit Untersuchungen von Baggolini (1970) überein (Baggiolini et al., 1970). Die sekundären Granula kamen in größerer Anzahl vor und waren weniger elektronendicht und kleiner als die primären Granula. Primäre und sekundäre Granula lagen sowohl rund als auch elliptisch oder in länglicher Form vor. Dies konnten auch Wetzel et al. (1967a) in den primären und sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens beobachten. Sie führten dies auf das Alter der Zellen im Blut zurück (Wetzel et al., 1967a). Auch tertiäre Granula waren in den Anschnitten von neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Sie waren stark elektronendicht und von pleomorpher Gestalt (Jain, 1993). In meinen Blutausstrichen waren keine tertiären Granula zu sehen, die eine Tendenz zur Bildung von Clustern zeigten (Wetzel et al., 1967a; Spicer et al., 1968). Tertiäre Granula können in den Vorläuferzellen der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens nicht identifiziert werden. Sie sind erst in den reiferen Zellen zu erkennen, wobei nicht geklärt ist, ob sie parallel mit den sekundären Granula oder erst später in Erscheinung treten (Wetzel et al., 1967a).

Wetzel et al. (1967a) wiesen zudem die Abhängigkeit der Elektronendichte der Granula bzw. die Abhängigkeit des Unterschieds zwischen der Elektronendichte von primären und sekundären Granula von der Fixationsmethode nach. Bei der Verwendung von Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid, wie auch in meiner Arbeit, zeigten die primären Granula eine homogen elektronendichte Struktur. Durch die Fixation mit Glutaraldehyd kam es außerdem zu geringeren Kontrastunterschieden zwischen primären und sekundären Granula (Wetzel et al., 1967a). Diese geringen Kontrastunterschiede konnte

ich in meiner Arbeit nur bedingt nachvollziehen. Tertiäre Granula konnten von Wetzel et al. (1967a) mit dieser Methode nicht so leicht differenziert werden, da der Unterschied in der Elektronendichte zwischen diesen und den sekundären Granula sehr gering war (Wetzel et al., 1967a). Dies könnte auch erklären, weshalb ich in den Anschnitten der neutrophilen Granulozyten nur wenige tertiäre Granula sicher identifizieren konnte. Um dies zu vermeiden, hätte möglicherweise eine alleinige Verwendung von Osmiumtetroxid (Wetzel et al., 1967a) für eine bessere Darstellung der tertiären Granula ausgereicht.

Eosinophile Granulozyten waren in meinen Untersuchungen große, runde Zellen mit einer glatten Zellmembran und wenigen Pseudopodien. Der Zellkern war, wie in der Literatur angegeben (Young, 2000), zweig gelappt mit zwei gleichmäßig ovalen Kernsegmenten. Im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten enthielt er mehr Euchromatin, das mittig im Zellkern lag. Im Zytoplasma befanden sich die großen, eosinophilen Granula, die sich durch eine hohe, homogene Elektronendichte und ihre backsteinartige oder spitzovale Form auszeichneten. Sie haben einen Durchmesser von 0,5-0,9 µm (Parmley et al., 1982) bis ca. 1 µm (Osbaldiston und Sullivan, 1978b). Laut Literatur sollen sie beim Kaninchen deutlich in zwei Kompartimente, den elektronendichten, kristalloiden Zellkern und die klare Matrix, unterteilt sein (Spicer et al., 1968; Young, 2000; Thrall, 2004), wobei sich das Kristalloid nadelförmig zeigt (Parmley et al., 1982; Thrall, 2004). Dies konnte ich in meinen Anschnitten von eosinophilen Granulozyten nicht beobachten. Hier waren die eosinophilen Granula stets homogen elektronendicht, wie auch von Jain (1993) beschrieben (Jain, 1993). Weitere Granulapopulationen, wie die primären Granula, die kleinen, elektronendichten Granula und Mikrogranula, konnten in den Anschnitten der eosinophilen Granulozyten nicht sicher identifiziert werden.

Grundsätzlich sollen sich beim Kaninchen kristalloid-freie, membrangebundene primäre Granula mit ca. zehn Stück pro Zellprofil zeigen (Bainton und Farquhar, 1970). Eine weitere Granulapopulation sind die kleinen, elektronendichten Granula (Young, 2000), die jedoch in der Literatur nicht näher beschrieben werden. Die kleinen Mikrogranula sind nur beim eosinophilen Granulozyten auszumachen (Steffens, 2000) und wurden bereits 1973 von Schäfer et al. nachgewiesen (Schäfer et al., 1973). Sie kommen beim Kaninchen nur bei reifen eosinophilen Granulozyten im Blut und Gewebe vor. Beim Kaninchen sind sie hantelförmig mit einem Durchmesser von ca. 25-180 nm. Ihr im Vergleich zum Zytoplasma relativ elektronendichter Inhalt ist von einer Membran umgeben (Schäfer et al., 1973). Weiterhin konnte ich Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Anschnitte des Golgi-Apparates und Glykogenpartikel im Zytoplasma beobachten.

5.4 Enzymhistochemie

Bei den enzymhistochemischen Untersuchungen wurden die Blutzellen des Kaninchens in nativen, maximal zwei Tage alten Blutaussstrichen auf die Aktivität von Peroxidase, saurer Phosphatase, alkalischer Phosphatase, α -Naphthyl-Acetat-Esterase, Naphthol-AS-Acetat-Esterase, Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase und β -Glucuronidase untersucht. Für die ersten drei Enzyme wurden fertige Enzymkits von MERCK, Darmstadt verwendet. Diese beruhen auf simultanen Azokopplungsreaktionen. Auch die Esterasen und die β -Glucuronidase wurden mit Hilfe simultaner Azokopplungsreaktionen in den Blutzellen des Kaninchens dargestellt, wobei hier keine fertigen Enzymkits, sondern ein Versuchsaufbau nach Schmalzl und Braunsteiner (1968) im Fall der Esterasen (*Schmalzl und Braunsteiner, 1968*) und im Fall der β -Glucuronidase nach Lojda et al. (1979) (*Lojda et al., 1979*) durchgeführt wurden. Bei der simultanen Azokopplung wird das freierdende Naphthol mit einem Diazoniumsalz gekoppelt, welches nach Zugabe eines unlöslichen Azofarbstoffes einen farbigen Niederschlag zeigt (*Stobbe, 1970*).

Im Blut sind neutrophile und eosinophile Granulozyten des Kaninchens die einzigen Blutzellen, die sich beim Nachweis der Peroxidase positiv verhalten (*Bainton und Farquhar, 1968; Dunn et al., 1968; Fey und Kuntze, 1970; Rausch und Moore, 1975; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Ferencik et al., 1982; Zellmer und Shannon, 1983*). Diese Befunde stehen jedoch im Widerspruch zu der Aussage von Raskin und Valenciano (2000), dass die Peroxidase in den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens nicht vorhanden sei (*Raskin und Valenciano, 2000*). Da die neutrophilen als auch eosinophilen Granulozyten in meiner Arbeit eindeutig positiv waren, ist davon auszugehen, dass diese Behauptung unwahrscheinlich ist. In meinen Untersuchungen zeigten die neutrophilen Granulozyten regelmäßig eine granuläre Reaktion im Zytoplasma, die sich allerdings von Zelle zu Zelle in ihrer Intensität unterschied. Elektronenmikroskopische Untersuchungen lokalisieren die Peroxidase in den primären (*Dunn et al., 1968; Zellmer und Shannon, 1983*) und tertiären (*Zellmer und Shannon, 1983*) Granula der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens. Bei den eosinophilen Granulozyten kann man bereits lichtmikroskopisch die Lokalisation der Peroxidase in den spezifischen Granula erkennen (*Bainton und Farquhar, 1968; Dunn et al., 1968; Osbaldiston und Sullivan, 1978b*), die bei Säugetieren in der Matrix der eosinophilen Granula vorliegt (*Young, 2000*). Auch in meinen Untersuchungen war eine Reaktion, vor allem im Randbereich der spezifischen Granula, zu sehen. Nach Dunn et al. (1968) kann man die Peroxidase zusätzlich elektronenmikroskopisch im rauen endoplasmatischen Retikulum der eosinophilen Granulozyten nachweisen (*Dunn et al., 1968*). Die

Aussage von Jain (1993), dass auch basophile Granulozyten des Kaninchens Peroxidase besitzen (*Jain, 1993*), konnte weder in meiner noch in Arbeiten anderer Autoren bestätigt werden.

Die saure Phosphatase konnte ich in meinen Untersuchungen in den Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten darstellen. Die Erythrozyten und basophilen Granulozyten hingegen waren negativ. Lediglich die Normoblasten, die in einigen Blutaussstrichen beim Kaninchen zu finden waren, hatten positive Reaktionsprodukte im Zytoplasma. Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen von Wetzel et al. (1967b) überein, die bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Blutzellen auf saure Phosphatase zytoplasmatische Einschlüsse in den Retikulozyten und nahezu reifen Erythrozyten mit Zellkern beobachteten, jedoch keine Reaktion in ausgereiften Erythrozyten (*Wetzel et al., 1967b*). In den Thrombozyten sind die feinkörnigen Reaktionsprodukte im Hyalomer lokalisiert. In welchem der Granula sie vorhanden sind, ist bei Untersuchungen am Kaninchenblut umstritten. Nach Bak et al. (1969) befindet sich die saure Phosphatase in den α -Granula, nach Wetzel et al. (1967b) in den elektronendichten Granula (*Wetzel et al., 1967b; Bak et al., 1969*). Nach Aussagen von Jain (1993) sowie Bentfeld und Bainton (1975) liegt es jedoch nahe, dass die saure Phosphatase in den lysosomalen Granula lokalisiert ist, da dies eindeutig bei anderen Säugetieren nachgewiesen wurde (*Bentfeld und Bainton, 1975b; Jain, 1993*). Zudem gehört die saure Phosphatase zu der Enzymgruppe der Hydrolasen und wird als Markerenzym der Lysosomen angesehen (*Lojda et al., 1979; Borgers und Verheyen, 1985*). Dies konnte jedoch in meiner Arbeit aufgrund der Verwendung lichtmikroskopischer Methoden nicht näher evaluiert werden. Die Lymphozyten zeigten beim Nachweis der sauren Phosphatase kräftig gefärbte einzelne Granula im Zytoplasma, wohingegen die Monozyten viele fein verteilte Granula aufwiesen. Dies konnte auch lichtmikroskopisch von Fey und Kuntze (1970) sowie von Micheev und Suchanov (1972) beobachtet werden (*Fey und Kuntze, 1970; Micheev und Suchanov, 1972*). Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben in den mononukleären Blutzellen eine positive Reaktion in den Granula sowie in den Vesikeln und Vakuolen des Golgi-Apparates (*Wetzel et al., 1967b*). Nach Nichols et al. (1971) sind bei den Monozyten außerdem Reaktionsprodukte in den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums und in unreifen Granula von Promonozyten vorhanden, jedoch nicht immer in den reifen Granula (*Nichols et al., 1971*). Bei den neutrophilen Granulozyten war eine hauptsächlich diffuse Reaktion im Zytoplasma zu sehen, was mit Beobachtungen von Micheev und Suchanov (1972) übereinstimmt (*Micheev und Suchanov, 1972*). Nach Untersuchungen anderer Autoren befindet sich die saure Phosphatase in den primären (*Wetzel et al., 1967b; Spicer et al., 1968; Osbaldiston und Sullivan, 1978b*) und tertiären Granula (*Wetzel et al., 1967b; Spicer et al., 1968; Parmley et al., 1979*). Dabei ist bei den rein lichtmikroskopischen Nachweisen von Osbaldiston und Sullivan (1978b) fraglich, ob diese eine exakte Unterscheidung der primären und sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten des Kaninchens zulassen. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie

kann außerdem eine Aktivität der sauren Phosphatase in den Golgi-Säckchen und- vesikeln (*Wetzel et al., 1967b*) bzw. im Golgi-Apparat (*Spicer et al., 1968*) ausgemacht werden. Die eosinophilen Granulozyten wiesen in meinen Untersuchungen intergranuläre Reaktionsprodukte auf. Ob auch eine Aktivität in den spezifischen Granula vorliegt, konnte mit der lichtmikroskopischen Untersuchung nicht sicher geklärt werden. Micheev und Suchanov (1972) bezeichnen jedoch in lichtmikroskopischen Untersuchungen die Aktivität der sauren Phosphatase als eindeutig intergranulär (*Micheev und Suchanov, 1972*). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen hingegen wurde eine Aktivität der sauren Phosphatase in den eosinophilen Granula festgestellt (*Seeman und Palade, 1967; Wetzel et al., 1967b*). Die basophilen Granulozyten waren in den eigenen Untersuchungen stets negativ. Im Gegensatz dazu färbten sich die basophilen Granulozyten bei lichtmikroskopischen Untersuchungen von Micheev und Suchanov (1972) diffus im Zytoplasma an (*Micheev und Suchanov, 1972*). Wetzel et al. (1967b) konnten zudem saure Phosphatase elektronenmikroskopisch in den Säckchen des Golgi-Apparates und damit assoziierten Vesikeln nachweisen (*Wetzel et al., 1967b*). Eine Aktivität wurde außerdem auch in den basophilen Granula festgestellt (*Komiyama und Spicer, 1974; Parmley et al., 1979*), wobei Komiyama und Spicer (1974) eine positive Reaktion nur mit dem Gomori-Medium, nicht aber mit der Barka-Anderson-Methode erzielen konnten. Inwiefern die Nachweismethoden Einfluss auf die Reaktivität der sauren Phosphatase in den basophilen Granulozyten haben, wurde nicht geklärt (*Komiyama und Spicer, 1974*).

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase gelang in meinen Untersuchungen nur bei den neutrophilen Granulozyten. Dies stimmt auch mit den Angaben in der Literatur überein (*Wetzel et al., 1967b; Fey und Kuntze, 1970; Rausch und Moore, 1975; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Jain, 1968*). Dabei war die Stärke der Reaktion mit schwachen bis sehr starken granulären Reaktionen in ein- und demselben Blutausrich unterschiedlich. In der Literatur wird die Aktivität den sekundären Granula zugeordnet (*Wetzel et al., 1967b; Osbaldiston und Sullivan, 1978b*), was ich in meinen lichtmikroskopischen Untersuchungen nicht näher differenzieren konnte.

Eine Aktivität der Naphthol-AS-Acetat-Esterase war in meiner Arbeit in den Erythrozytenvorläufern ohne Zellkern, den Thrombozyten, den Lymphozyten, den Monozyten, den neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten zu sehen. In den Erythrozytenvorläufern waren fokale Reaktionsprodukte sichtbar. Fey und Kuntze (1970) beschreiben zudem eine Aktivität des Enzyms in der Zellmembran von Erythrozyten der höheren Wirbeltiere, unter anderem auch dem Kaninchen (*Fey und Kuntze, 1970*), was in meinen Untersuchungen nicht der Fall war. Granuläre Reaktionsprodukte in den Thrombozyten, die sich zumeist im Hyalomer unterhalb der Zellmembran befanden, waren gut zu erkennen. Auch Fey und Kuntze (1970) stellten eine stark positive Reaktion bei Untersuchungen auf die Naphthol-AS-Acetat-Esterase in den Thrombozyten des Kaninchens fest (*Fey und Kuntze, 1970*). In den Lymphozyten waren in meinen Untersuchungen zum einen große, stark positive

Reaktionsprodukte, zum anderen fein verteilte granuläre Reaktionsprodukte vorhanden. Eine Aktivität der Naphthol-AS-Acetat-Esterase wiesen überdies Fey und Kuntze (1970) mit enzymhistochemischen Methoden nach (Fey und Kuntze, 1970). In den Monozyten und Granulozyten konnte ich ebenfalls im gesamten Zytoplasma fein verteilte granuläre Reaktionsprodukte erfassen. Auch Fey und Kuntze (1970) beobachteten eine positive Reaktion in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, wohingegen sie keine Monozyten und basophilen Granulozyten in ihrem Untersuchungsmaterial sicher identifizieren und somit auch nicht beurteilen konnten (Fey und Kuntze, 1970). Meine Ergebnisse beim Kaninchen decken sich weitgehend mit den Untersuchungen von Schmalzl und Braunsteiner (1968) an Blutzellen des Menschen (Schmalzl und Braunsteiner, 1968).

Die α -Naphthyl-Acetat-Esterase konnte in meinen Untersuchungen in Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten dargestellt werden. Die Erythrozyten und basophilen Granulozyten waren negativ. Nach Fey und Kuntze (1970) soll jedoch auch in Erythrozyten des Kaninchens eine Aktivität der α -Naphthyl-Acetat-Esterase vorhanden sein (Fey und Kuntze, 1970). Die Ausprägung der positiven Reaktion in den Blutzellen der von mir untersuchten Kaninchen war sehr unterschiedlich. Teilweise kam es zu einer sehr starken Reaktion, sodass die Zelle völlig von braunroten Reaktionsprodukten ausgefüllt war. Die Thrombozyten zeigten, wie bei Özcan (2005) beschrieben (Özcan, 2005), auch in meiner Arbeit granuläre Reaktionsprodukte, die im Hyalomer lokalisiert waren. Die Lymphozyten wiesen drei verschiedene Reaktionsgrade auf, die über negativ und granulär bis hin zu stark präzipitierend reichten. Eine Aktivität der α -Naphthyl-Acetat-Esterase in den Lymphozyten wurde bereits in früheren Arbeiten von verschiedenen Autoren nachgewiesen (Fey und Kuntze, 1970; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Osbaldiston und Sullivan, 1978a; Özcan, 2005), wobei Özcan (2005) ein bis zwei Granula pro Lymphozyt und Osbaldiston et al. (1978a) granuläre Ablagerungen im Zytoplasma beobachten konnten (Osbaldiston und Sullivan, 1978a; Özcan, 2005). Bei humanen Lymphozyten dient die α -Naphthyl-Acetat-Esterase als Marker für T-Lymphozyten. Horwitz et al. (1977) fanden heraus, dass Lymphozyten, die nicht zur T-Lymphozyten-Population gehören, α -Naphthyl-Acetat-Esterase-negativ sind (Horwitz et al., 1977). Dies könnte auch die unterschiedliche Reaktivität der Lymphozyten beim Kaninchen in meiner Arbeit erklären. Hierfür wären jedoch genauere Untersuchungen in Kombination mit verschiedenen CD-Antigennachweisen nötig. In den Monozyten lagerte sich das Reaktionsprodukt zum einen granulär im gesamten Zytoplasma, zum anderen im Bereich der Einbuchtung des Zellkerns ab. Im Gegensatz dazu beobachtete Özcan (2005) bei seinen Untersuchungen eine eher diffuse Reaktion im Zytoplasma der Monozyten (Özcan, 2005). Eine sowohl diffuse als auch granuläre zytoplasmatische Enzymlokalisation war bei Osbaldiston und Sullivan (1978a) in den Monozyten zu sehen (Osbaldiston und Sullivan, 1978a). Neutrophile Granulozyten waren durch teilweise starke Ablagerungen des Reaktionsprodukts in meinen Untersuchungen gekennzeichnet. Es befanden sich jedoch auch einige Zellen mit weniger

Reaktionsprodukt im Blutaussstrich, die zur genaueren Beurteilung der Lokalisation herangezogen werden konnten. In diesen war vor allem eine granuläre Reaktion zu sehen. Bei keinem der Autoren, die die α -Naphthyl-Acetat-Esterase in den neutrophilen Granulozyten nachweisen konnten, erfolgte eine exakte Lokalisation in einer bestimmten Granulapopulation (*Fey und Kuntze, 1970; Osbaldiston und Sullivan, 1978a; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Özcan, 2005*). Die eosinophilen Granulozyten wiesen nicht in allen Fällen Reaktionsprodukte auf. Wenn sie vorhanden waren, konnten sie den spezifischen Granula zugeordnet werden. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen von Osbaldiston und Sullivan (1978a) sowie Özcan (2005) überein, die die Reaktion als granulär bzw. granuläre Ablagerungen im Zytoplasma beschrieben (*Osbaldiston und Sullivan, 1978a; Özcan, 2005*).

Für die Untersuchungen zum Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase wurden verschiedene Färbemethoden ausprobiert. Dabei kam es mit dem Michaelis-Barbital-Natrium-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 zur Ausfällung des Farbstoffes, sodass keine der Blutzellen eine positive Reaktion zeigte. Der PBS-Puffer war für den enzymhistochemischen Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase in den Blutzellen besser geeignet. Hier wurden zusätzlich mit zwei verschiedenen Kernfärbungen (Kernechtrot und Hämalaun) und Fast Blue als Marker die Blutzellen bei verschiedenen pH-Werten angefärbt.

Bei einem pH-Wert von 7,4 und Verwendung von PBS als Puffer, Kernechtrot sowie Fast Blue konnte, im Gegensatz zu Fey und Kuntze (1970) (*Fey und Kuntze, 1970*), eine positive Reaktion in den Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Bei einem pH-Wert von 6,5 kam es nur noch zu einer sehr schwachen Reaktion in den neutrophilen Granulozyten und bei einem pH-Wert von 5,5 zu keiner positiven Reaktion mehr. Wurden hingegen PBS-Puffer mit einem pH von 6,5, Hämalaun und Fast Blue verwendet, kam es zu Reaktionsprodukten in Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und einigen Lymphozyten. In den Untersuchungen von Osbaldiston und Sullivan (1978) war eine positive Reaktion bei Monozyten und Lymphozyten, hingegen nicht bei den Thrombozyten, zu sehen (*Osbaldiston und Sullivan, 1978a; Osbaldiston und Sullivan, 1978b*). Dies konnte ich bei meinen Untersuchungen so nicht beobachten. Eine deutliche, granuläre Reaktion war bei der Verwendung von Fast Blue und Kernechtrot bei einem pH von 7,4 in den neutrophilen Granulozyten vorhanden. Positive, granuläre Reaktionsprodukte konnten auch andere Autoren bei neutrophilen Granulozyten des Kaninchens im Zytoplasma nachweisen (*Fey und Kuntze, 1970; Osbaldiston und Sullivan, 1978a; Osbaldiston und Sullivan, 1978b; Özcan, 2005*). Allgemein befindet sich die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase in den primären und sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten von Säugetieren (*Raskin und Valenciano, 2000*). Fey und Kuntze (1970) verzeichneten außerdem eine Aktivität in den eosinophilen Granulozyten (*Fey und Kuntze, 1970*), wohingegen Osbaldiston und Sullivan (1978b) keine Chloracetat-Esterase in den eosinophilen Granulozyten finden konnten (*Osbaldiston und Sullivan, 1978b*), was mit den Ergebnissen meiner Untersuchungen

übereinstimmt. Die in früheren Studien gemachte Beobachtung, dass das Kaninchen im Unterschied zum Menschen keine Chloracetat-Esterase in den basophilen Granulozyten aufweist (*Hermansky et al., 1970; Osbaldiston und Sullivan, 1978b*), konnte in meinen Versuchen bestätigt werden.

Die β -Glucuronidase wurde in meinen Untersuchungen in allen Leukozyten und den Thrombozyten nachgewiesen. Erythrozyten hingegen zeigten keine Aktivität. Retikulozyten wiesen jedoch rotes, fokales Reaktionsprodukt im Zytoplasma auf. Die einzige spezielle Untersuchung über die Aktivität der β -Glucuronidase in Blutzellen des Kaninchens fand 1975 von Rausch und Moore mit der Spektrophotometrie statt, die das Vorkommen von β -Glucuronidase in den primären Granula der neutrophilen Granulozyten feststellten (*Rausch und Moore, 1975*). In meiner Arbeit konnte lediglich eine schwache, diffuse Aktivität der β -Glucuronidase im Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Diese wird auch von Raskin und Valenciano (2000) in den neutrophilen Granulozyten beschrieben (*Raskin und Valenciano, 2000*). Teilweise waren die neutrophilen Granulozyten in den Blutausstrichen der Kaninchen auch negativ. In eosinophilen Granulozyten war die Reaktion in den spezifischen Granula lokalisiert, was bei Säugetieren als physiologisch gilt (*Young, 2000*). Die basophilen Granulozyten waren teilweise schwach positiv, mit einer diffusen Verteilung des Reaktionsproduktes in der Zelle. Eine fokale teilweise auch granuläre Reaktion war in den Lymphozyten zu beobachten. Einige Lymphozyten waren jedoch auch negativ. In Untersuchungen von Orye et al. (1984) an humanen T- und B-Lymphozyten wurde festgestellt, dass die β -Glucuronidase als Marker für T-Lymphozyten angesehen werden kann, da B-Lymphozyten keine Reaktivität zeigen (*Orye et al., 1984*). Ob dies auch beim Kaninchen der Fall ist bedarf weiterer Versuche.

Eine diffuse, positive Reaktion im Zytoplasma der Monozyten wie sie für Säugetiere postuliert wird (*Raskin und Valenciano, 2000*), konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Hier färbte sich das gesamte Zytoplasma der Monozyten kräftig orangerot an mit teilweise dunkelroten, deutlichen Granula. Auch in den Thrombozyten befanden sich schwach-positive Granula im Hyalomere, was mit der Aussage von Jain (1993), dass β -Glucuronidase in den Thrombozyten von Säugetieren vorkommt, übereinstimmt (*Jain, 1993*).

Im Allgemeinen entsprechen die Ergebnisse dieser Arbeit den früheren Befunden. Da die lichtmikroskopische Untersuchung oft keine genaue Lokalisation der Reaktionsprodukte zulässt, müssten für ganz exakte Angaben elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Zudem kann durch die Anfertigung der Blutausstriche, die Art der Probenahme oder die Umgebungstemperatur ein negativer Einfluss auf die Aktivität der Enzyme ausgeübt werden.

5.5 Glykohistochemie

Die Bindung von Lektinen an die Blutzellen des Kaninchens wurde in meiner Arbeit mit verschiedenen Methoden nachgewiesen. Zum einen wurden an Fluorescein-Isocyanat (FITC) gekoppelte Lektine (Con A, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-1, DBA, SBA, SJA, UEA-1, PHA-L, PHA-E), zum anderen biotinylierte Lektine (VAA, MAA-1, SNA, Gal-1, Gal-3 truncated, Gal-3 full length, Gal-8, Gal-9) verwendet. Bei letzteren erfolgte die Sichtbarmachung der Bindung durch Streptavidin, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) markiert war. Gleichzeitig wurde eine DAPI-Kernfärbung vorgenommen. Zusätzlich zu Blutaussstrichen, die mit Methanol fixiert wurden, wurden luftgetrocknete Blutaussstriche ohne weitere Vorbehandlung für meine Untersuchungen herangezogen.

Um die Spezifität der Lektine zu überprüfen, wurde ein Hemmzuckernachweis für die insgesamt stark positiven Lektine Con A, LCA, PSA, WGA und WGAs durchgeführt. Dabei kam es stets zu einer vollständigen Hemmung der Lektinbindung.

Weiterhin wurden Blutaussstriche auch mit Neuraminidase vorbehandelt, die Sialinsäure von Glykoproteinen abspaltet. Die Sialinsäuren sind eine Familie von N- bzw. O-substituierten Derivaten der Neuraminsäure, deren Reaktionsspezifität abhängig von ihrem biologischen Ursprung ist. Mit dem von Julia Scholz und mir entwickelten Protokoll konnte die Bindung von Lektinen, die vorher keine oder eine nur sehr schwache Bindung an die Blutzellen des Kaninchens zeigten, demonstriert werden. Dazu gehörten PNA, SBA, SJA, GSL-1, RCA und DBA. Auffällig war hierbei, dass es bei allen Lektinen zu einer Bindung an die Thrombozyten kam, seltener an andere Blutzellen. Monozyten und eosinophile Granulozyten waren, abgesehen von einer Ausnahme, stets negativ. Die Galaktosebindenden Lektine, RCA und PNA, hatten sehr ähnliche Bindungsaffinitäten zu Thrombozyten, Lymphozyten sowie neutrophilen und basophilen Granulozyten. In der Gruppe der N-Acetyl-Galaktosamin-bindenden Lektine waren die Unterschiede größer. SBA und DBA wiesen lediglich eine Bindung an die Thrombozyten auf, wohingegen bei GSL-1 und SJA die Thrombozyten, die Lymphozyten sowie die neutrophilen und basophilen Granulozyten positiv waren.

Die Bindung von Lektinen an verschiedene Glykane ist von mehreren Faktoren, wie der Spezifität für Mono- und Oligosaccharide mit ihren Anomeren, abhängig. Weiterhin spielen auch die Verzweigungen und Anhänge der Oligosaccharide eine Rolle (*André et al., 2004; André et al., 2006*). Zudem sind räumliche Parameter, wie z.B. die Form der Glykankette, entscheidend. Clustereffekte mit benachbarten Kohlenhydratketten im gleichen Glykoprotein sowie mit verschiedenen Glykokonjugaten als auch mit N-Glykanen oder verzweigten O-Glykanen auf der Zelloberfläche beeinflussen zusätzlich die Bindung von Lektinen (*Gabius, 2008*). Diese Vielfältigkeit der Bindungsparameter kann auch die unterschiedliche Bindung von Lektinen innerhalb einer LektinGruppe, beispielsweise die

unterschiedliche Bindung von N-Acetylgalaktosamin-spezifischen Lektinen, in meinen Untersuchungen erklären.

Wichtig für die Bindungsspezifität der Lektine ist außerdem die Art und Weise ihrer Isolierung und Aufreinigung. Durch Fehler in diesem Prozess kann es Chargen-abhängig zu einer verminderten Bindung des Lektins an die Blutzellen kommen. Der Grund dafür ist, dass Lektine bereits an den Zucker gebunden haben und bei der Aufreinigung nicht ausreichend aus dieser Bindung herausgelöst wurden.

Im Folgenden soll die Bindung der Lektine an die verschiedenen Blutzelltypen diskutiert werden. Dabei waren bei verschiedenen Lektinen auch zwischen den einzelnen Blutaussstrichen, die mit demselben Lektin inkubiert wurden, Unterschiede zu beobachten.

Die Erythrozyten der Kaninchen wiesen eine positive Reaktion mit den Lektinen Con A, LCA, PSA, WGA, WGAs, GSL-1, SNA und PHA-L auf. Abgesehen von Con A war diese fast ausschließlich bei unfixierten Blutaussstrichen zu beobachten. Hier war die Zellmembran bei den Glukose-spezifischen Lektinen Con A, LCA und PSA sowie bei SNA und PHA-L stets positiv, das Zytoplasma jedoch negativ. Bei WGA und WGAs konnte in unfixierten Blutaussstrichen zusätzlich zu der Fluoreszenz der Zellmembran auch eine starke, fokale Fluoreszenz im Zytoplasma der Erythrozyten beobachtet werden, die auch bei GSL-1 in unfixierten Blutaussstrichen auftrat. Die vor allem bei unfixierten Blutaussstrichen auftretende Bindung der Lektine an die Erythrozyten kann durch die Glykolipide auf ihrer Zelloberfläche (*Eto et al., 1968*) erklärt werden. Beim Kaninchen handelt es sich dabei um Galaktosyl-Galaktosyl-N-Acetylglukosaminyl-Galaktosyl-Glukosyl-Ceramid, Galaktosyl-Galaktosyl-Glukosyl-Ceramid und Dihexosyl-Ceramid (*Eto et al., 1968*). Durch die Fixierung der Blutaussstriche mit Methanol kommt es zum Herauslösen der Glykolipide auf der Zellmembran. Diese werden jedoch bei luftgetrockneten Blutaussstrichen nicht zerstört, sodass eine Bindung des Lektins erfolgen kann. Nach Untersuchungen von Ogawa und Galli (2006) sollen die Erythrozyten des Kaninchens 2×10^6 α -Galaktose-Reste pro Zelle besitzen (*Ogawa und Galli, 2006*). Dies konnte ich nur im Fall von SNA teilweise bestätigen. In meinen Untersuchungen kam es bei keinem der Lektine, die für N-Acetylgalaktosamin spezifisch sind, zu einer Bindung an die Zellmembran der Erythrozyten. Nur bei GSL-1 war eine fokale Fluoreszenz im Zytoplasma, bei SNA teilweise eine Fluoreszenz der Zellmembran vorhanden.

In der Literatur wurde bislang nur die Bindung von Con A (*Parmley et al., 1973; Verloes und Kanarek, 1976*), PHA (*Verloes und Kanarek, 1976*), des Lektins von *Croton tiglium* (*Banerjee und Sen, 1981*) und SBA (*Reisner et al., 1976; Medina, 1990*) an die Erythrozyten nachgewiesen. Dies stimmt nur teilweise mit den Ergebnissen meiner Untersuchungen überein.

Dies könnte, vor allem bei den Erythrozyten, auf Unterschieden in der Ausstrichtechnik beruhen. Bei den konventionellen Färbungen konnte ich oft Sphärozyten beobachten. Da bei diesen ein Verlust der

Antikörper- oder Komplement-tragenden Membranen durch Makrophagen vorhanden ist (*Jain, 1993; Thrall, 2004; Reagan, 2008*), könnte dies auch zu einer verminderten Bindung von Lektinen an die Erythrozytenmembran geführt haben.

Die Thrombozyten zeigten sich positiv bei den Lektinen Con A, LCA, PSA und MAA-1, bei letzterem ausschließlich in unfixierten Blutaussstrichen. Eine unspezifische Bindung erfolgte möglicherweise bei den Lektinen SNA und PHA-L. Eine Abhängigkeit von der Fixationsart konnte auch hier nachgewiesen werden. In unfixierten Blutaussstrichen war die Bindung an die Zellstrukturen sehr viel ausgeprägter und eindeutig spezifisch, wohingegen es in wenigen fixierten Blutaussstrichen zu einer positiven Reaktion kam. Nach *Nurden et al. (1977)* befinden sich drei verschiedene Glykoproteine (Glykoprotein-I, -II, -III) in der Zellmembran der Thrombozyten des Kaninchens (*Nurden et al., 1977*). Diese besitzen als endständige Zuckerreste Galaktose und N-Acetylgalaktosamin (*Toor et al., 1982*). In meinen Blutaussstrichen kam es zu keiner Bindung der für Galaktose oder N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektine. Erst nach Vorbehandlung mit Neuraminidase konnte eine positive Reaktion bei den Thrombozyten im Fall von PNA, RCA, SBA, SJA, GSL-1 und DBA beobachtet werden. Dies stimmt mit Untersuchungen von *Toor et al. (1982)* im Hinblick auf PNA und SBA überein. Eine Bindung von RCA an die Thrombozyten erfolgte in meinen Versuchen im Gegensatz zu *Toor et al. (Toor et al., 1982)* nur nach Vorbehandlung mit Neuraminidase. Die Bindung von Con A an die Thrombozyten wurde bereits in der Literatur beschrieben (*Parmley et al., 1973*) und konnte von mir bestätigt werden. Im Unterschied zu *Dhar und Ganguly (1988) (Dhar und Ganguly, 1988)* konnte ich keine Bindung von WGA an die Thrombozyten nachweisen. Somit scheinen die Thrombozyten vor allem Glukosereste endständig an den Kohlenhydraten der einzelnen Zellstrukturen zu besitzen sowie Galaktose- und N-Acetylgalaktosaminreste, an die terminal Sialinsäure gebunden ist. Von den ausschließlich an Oligosaccharide bindenden Lektinen war nur MAA-1 (*Rüdiger und Gabius, 2009a*) bei den Thrombozyten des Kaninchens positiv.

An die Lymphozyten des Kaninchens banden die Lektine Con A, LCA, PSA, WGA, WGAs, GSL-1, MAA-1, SNA und PHA-L. Bei PSA, GSL-1, MAA-1, SNA und PHA-L betraf dies fast ausschließlich unfixierte Blutaussstriche. Auffällig war insgesamt die stärkere Bindung der Lektine an unfixierte Blutzellen. Zudem war der prozentuale Anteil der positiven Blutzellen in diesen stets höher als bei fixierten Blutaussstrichen. Bei PSA zeigte sich dies durch die Anfärbung der Lymphozytenmembran bei allen unfixierten Blutaussstrichen, wohingegen in fixierten Blutaussstrichen kein Lymphozyt eine positive Reaktion aufwies. Untersuchungen auf die Bindung von Lektinen beim Kaninchen wurden für T- und B-Lymphozyten durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass Thymozyten (*Schmidt-Ullrich et al., 1976*) und T-Lymphozyten Con A und PHA binden (*Parmley et al., 1973; Raffel und Sell, 1982; McNicholas et al., 1981*), B-Lymphozyten zusätzlich auch PWM (*McNicholas et al., 1981*). Bei den für N-Acetylglukosamin spezifischen Lektinen WGA und succinyliertes WGA (*Rüdiger und Gabius, 2009b*)

wiesen die Lymphozyten eine inhomogene Reaktion auf. Diese reichte von komplett negativ bis hin zu einer stark positiven Reaktion der Zellmembran mit einer deutlich positiven Reaktion des Zytoplasmas und mit einer stark positiven, fokalen Fluoreszenz im Zytoplasma. Derartige Unterschiede in ein- und demselben Blutaussstrich waren bei anderen Lektinen in dieser Form nicht zu sehen. Die unterschiedliche Bindung der beiden Lektine kann mit den verschiedenen Funktionszuständen der Lymphozyten und Lymphozytentypen erklärt werden. Inwiefern diese jedoch auf die bestimmte, definierte Lymphozytenpopulationen zurückzuführen sind, lässt sich nur mit Hilfe weitergehender immunhistochemischer Methoden bestimmen. Eine Kombination glyko- und immunhistochemischer Untersuchungen wurde bereits bei den Lymphozyten des Rindes durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass WGA ein Marker für T-Lymphozyten beim Rind ist (*Djilali et al., 1987*). Ob dies auch beim Kaninchen der Fall ist, wurde bislang nicht untersucht. Nach Vorbehandlung der Blutaussstriche mit Neuraminidase war vor allem das Zytoplasma der Lymphozyten bei PNA, SJA und RCA schwach positiv. Nach Ogawa und Galili (1977) befinden sich auf den Lymphozyten des Kaninchens $0,8 \times 10^6$ Acetyllactosamin-Reste sowie mit Sialinsäure maskierte Acetyllactosamin-Reste und α -Galaktose-Reste (*Ogawa und Galili, 2006*). Dies deckt sich mit meinen Untersuchungen, die darauf schließen lassen, dass auch die Lymphozyten des Kaninchens mit Sialinsäure bedeckte Glykoproteine besitzen. Beim Menschen wurde diese Eigenschaft im Hinblick auf die T-Lymphozyten genauer untersucht. Humane T-Lymphozyten binden PNA nicht ohne vorherige Behandlung mit Neuraminidase. Im Gegensatz dazu kommt es zu einer Bindung von PNA an unreife T-Lymphozyten ohne Neuraminidase-Vorbehandlung, so dass PNA als Marker humaner, unreifer T-Lymphozyten angesehen werden kann. Aus ihren Ergebnissen schlossen Reisner et al. (1979), dass bei zunehmender Reifung der T-Lymphozyten-Vorläufer eine Maskierung des PNA-Rezeptors mit Sialinsäure erfolgt (*Reisner et al., 1979*). Auch beim Pferd ist eine verstärkte Bindung von PNA an Lymphozyten des peripheren Blutes erst nach Vorbehandlung mit Neuraminidase zu beobachten (*Mérant et al., 2005*).

Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass in den Lymphozyten sehr viele Kohlenhydrate mit endständiger Glukose bzw. Mannose sowie N-Acetylglukosamin und wenig N-Acetylgalaktosaminreste und komplexe Kohlenhydrate vorhanden sind. Galaktose- und N-Acetylgalaktosaminreste sind beim Kaninchen mit Sialinsäure maskiert.

Die Monozyten des Kaninchens wiesen eine stark positive Reaktion der vakuolären Strukturen im Zytoplasma bei der Bindung von Con A, LCA, WGA und WGAs, sowohl bei unfixierten als auch bei fixierten Blutaussstrichen, auf. Im Fall von PSA war eine stark positive Fluoreszenz vor allem in unfixierten Blutaussstrichen zu sehen. Bei SNA, PHA-L und PHA-E war dies nur bei wenigen Monozyten der Fall. Die Zellmembran zeigte nur in unfixierten Blutaussstrichen bei der Inkubation mit LCA, PSA, WGA, WGAs und PHA-L eine Fluoreszenz. Das Zytoplasma hingegen war fast immer mit

WGA, WGAs und MAA-1, selten auch mit SNA, positiv. Dabei trat nur bei den beiden biotinylierten Lektinen eine Fluoreszenz der Monozyten bei unfixierten Blutaussstrichen auf. Nach Vorbehandlung mit Neuraminidase konnte in lediglich einem Blutaussstrich mit dem Lektin RCA eine schwach positive Reaktion des Zytoplasmas beobachtet werden. Somit ist auch die Bindung der Lektine an die Monozyten abhängig von der Fixationsart. Aus meinen Befunden lässt sich schließen, dass in den Monozyten vor allem Glukose- bzw. Mannosereste, N-Acetylglukosamin und komplexe Kohlenhydrate vorkommen.

Bei den neutrophilen Granulozyten des Kaninchens war die Bindung an die neutrophilen Granula bei Con A, LCA, PSA, WGA und WGAs sehr stark und betraf Blutaussstriche beider Fixationsarten. Im Gegensatz dazu waren in unfixierten Blutaussstrichen, die mit GSL-1, MAA-1, SNA, PHA-L, PHA-E, Galektin-1 und Galektin-8 inkubiert waren, ausschließlich die Granula der neutrophilen Granulozyten positiv. Eine Bindung an die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten erfolgte vorzugsweise bei unfixierten Blutaussstrichen mit Con A, LCA, WGA, GSL-1, SNA und Galektin-8. Auffällig hierbei war, dass bei WGAs weder in fixierten noch in unfixierten Blutaussstrichen eine Bindung an die Zellmembran vorhanden war. WGA und WGAs binden an N-Acetylglukosamin. Der Unterschied zwischen diesen beiden Lektinen ist jedoch, dass WGA auch mit Glykokonjugaten interagiert, die N-Acetylneuraminsäure enthalten, wohingegen WGAs ausschließlich an N-Acetylglukosamin bindet (*Monsigny et al., 1979; Monsigny et al., 1980*). Für die Bindung von Galektin-8 an neutrophile Granulozyten gibt es bereits Untersuchungen beim Menschen. Galektin-8 fördert bei diesen die Zelladhäsion. Nach Isolierung von Integrin α M kann die Bindung der C-terminalen CRD von Galektin-8 beobachtet werden. Eine Adhäsion eosinophiler Granulozyten wird jedoch durch Galektin-8 nicht vermittelt (*Nishi et al., 2003*). Auch in meinen Untersuchungen kam es zu einer starken Bindung von Galektin-8 an die Zellmembran der neutrophilen, aber nicht der eosinophilen Granulozyten. Nach Vorbehandlung mit Neuraminidase wiesen die Granula eine positive Reaktion nach der Inkubation mit PNA, GSL-1, RCA und SJA auf. Eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma war hingegen bei GSL-1 und PNA zu sehen. Angaben in der Literatur zur Bindung von Lektinen an die neutrophilen Granulozyten sind nur im Fall von Con A vorhanden (*Parmley et al., 1973*).

Bei den eosinophilen Granulozyten kam es vor allem zu einer Bindung an die eosinophilen Granula, seltener an die Zellmembran oder an Organellen des Zytoplasmas. Auch hier waren Unterschiede in Abhängigkeit von der Fixation zu sehen. Eine stark positive Fluoreszenz der eosinophilen Granula war sowohl in unfixierten als auch in fixierten Blutaussstrichen nach Inkubation mit Con A, LCA, WGA, WGAs und PHA-L nachzuweisen. Bei den Lektinen PSA und MAA-1 zeigten nur die Granula unfixierter eosinophiler Granulozyten eine positive Reaktion. Mit SNA war nur ca. ein Viertel der untersuchten Zellen positiv. Eine lediglich schwach positive Reaktion der eosinophilen Granula war nach Inkubation mit GSL-1 zu erkennen. Eine Fluoreszenz der Zellmembran war nach Zugabe von

Con A in fixierten Blutaussstrichen, nach Zugabe von LCA, SNA, WGA und WGAs in unfixierten Blutaussstrichen vorhanden. Das Zytoplasma war in fixierten Blutaussstrichen mit WGA und WGAs positiv, in unfixierten Ausstrichen mit WGAs und MAA-1. Eine starke, fokale Fluoreszenz im Zytoplasma konnte durch die Inkubation mit biotinyliertem Galektin-8 beobachtet werden. Nach Vorbehandlung der Blutaussstriche mit Neuraminidase kam es zu keiner spezifischen Bindung der Lektine. Im Unterschied zum Menschen (*Lee et al., 1987*) sind beim Kaninchen die Lektine GSL-1 und SBA nicht spezifisch für eosinophile Granulozyten.

Das Lektinbindungsverhalten der basophilen Granulozyten ähnelt dem der neutrophilen Granulozyten. Stark positive Reaktionen der Granula gab es in fixierten und unfixierten Blutaussstrichen bei allen Glukose-spezifischen Lektinen (Con A, LCA, PSA), bei den N-Acetylglukosamin-spezifischen Lektinen (WGA, WGAs) und bei GSL-1. Nach Inkubation mit Galektin-8 sowie in ausschließlich unfixierten Blutaussstrichen nach Inkubation mit MAA-1, SNA, PHA-L, PHA-E und Galektin-1 waren sowohl stark positive als auch schwach positive Reaktionen zu beobachten. Die Zellmembran färbte sich auch in den basophilen Granulozyten, vor allem in unfixierten Blutaussstrichen, an. Dies betraf die Lektine Con A, WGA, WGAs, GSL-1, SNA und Galektin-8. Das Zytoplasma zeigte selten Fluoreszenz nach der Inkubation mit den genannten Lektinen. Lediglich bei Con A, WGA und WGAs war in fixierten Ausstrichen eine Fluoreszenz vorhanden, in unfixierten Blutaussstrichen bei Con A, GSL-1, MAA-1, SNA und PHA-L. Somit scheint auch hier die Fixationsmethode ausschlaggebend für das Bindungsverhalten der Lektine zu sein. Nachdem die Blutaussstriche mit Neuraminidase vorbehandelt wurden, war eine schwache Fluoreszenz der Granula bei Inkubation mit PNA, GSL-1 und RCA sowie eine schwache Fluoreszenz des Zytoplasmas bei SJA und GSL-1 zu sehen. Somit scheinen auch die basophilen Granulozyten mit Sialinsäure maskierte Galaktose- und N-Acetylgalaktosaminmoleküle zu besitzen. Untersuchungen der basophilen Granulozyten des Menschen haben gezeigt, dass verschiedene Lektine, darunter Con A, LCA, PHA-E, PSA, SNA, SBA, in der Lage sind, die Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus den basophilen Granulozyten zu induzieren (*Haas et al., 1999*). Untersuchungen im Hinblick auf die Bindung oder Funktion der Lektine bei basophilen Granulozyten des Kaninchens gibt es jedoch nicht.

Bei den Ergebnissen meiner Lektinuntersuchungen muss weiter berücksichtigt werden, dass es sich um eine subjektive Bewertung der Fluoreszenzstärke handelt. Dies diente vor allem dazu, eine generelle Tendenz feststellen zu können.

Auf weitere Aspekte, die einen Einfluss auf die Bindung der Lektine an Kohlenhydratstrukturen haben, werde ich im Folgenden noch kurz eingehen.

Die Ergebnisse meiner glykohistochemischen Untersuchungen zeigen deutlich, dass die Bindung der Lektine an die Blutzellen des Kaninchens sehr stark von der Art der Fixierung der Blutaussstriche

abhängig ist. Die verschiedenen Blutzellen von luftgetrockneten, nicht mit Methanol vorbehandelten Blutausstrichen binden die Lektine deutlich stärker als bei methanolfixierten Ausstrichen.

Die Bindungsaffinität der Lektine an die Blutzellen ist aber auch von der Ausstrichtechnik bei der Anfertigung der Blutausstriche abhängig, da es dabei zu mechanisch bedingten Veränderungen an den Blutzellen kommt. Eine Alternative wäre die direkte Inkubation frisch entnommenen Blutes mit den FITC-markierten Lektinen und die anschließende Anfertigung der Ausstriche. Dabei würde auch eine Fixierung der Blutzellen vor der Inkubation mit den Lektinen entfallen.

Eine weitere Rolle spielt auch die Entnahmemethode des Blutes. Wie bereits in Kapitel 5.1 erläutert, besitzen Kaninchen ein ausgeprägtes intrinsisches Gerinnungssystem (*Dodds, 2000*). Dies führt bei dieser Spezies zu einer raschen Agglutination der Blutzellen schon während der Probenahme. Hier kommt es zur Veränderung des Funktionszustands der Zellen und möglicherweise der Kohlenhydratzusammensetzung ihrer Zellmembran, sodass auch daraus unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den Lektinen resultieren könnten.

5.6 Immunhistochemie und Histochemie

5.6.1 Immunhistochemischer Nachweis von spezifischen Antigenen der Lymphozyten und basophilen Granulozyten

Für den immunhistochemischen Nachweis von Antigenen, die spezifisch für die Lymphozyten und die basophilen Granulozyten des Kaninchens sind, eigneten sich die von Davis und Hamilton (2008) (*Davis und Hamilton, 2008*) entwickelten und charakterisierten Antikörper (VMRD Inc. Pullman). Zum Nachweis der verschiedenen Lymphozytenpopulationen dienen die Antikörper ISC29E (gegen CD8⁺-T-Lymphozyten), RTH1A (gegen CD4⁺-T-Lymphozyten) und RACT30A (gegen B-Lymphozyten). Zusätzlich wurden mit Hilfe des Antikörpers MRB61A basophile Granulozyten und T-Lymphozyten sowie mit dem Antikörper RACT20A basophile Granulozyten, CD4⁺-T-Lymphozyten und T-Lymphozytensubpopulationen bestimmt.

Bei der Differenzierung der Lymphozyten konnte in jedem Blutausstrich eine selektive Anfärbung von Lymphozyten beobachtet werden. Die Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes besteht beim gesunden Kaninchen aus 39 % B-Lymphozyten, 44 % T-Lymphozyten und 8 % Null-Zellen (*Jenkins, 2008*) bzw. 38 % B-Lymphozyten, 45 % T-Lymphozyten und 15 % Null-Zellen (*Bast et al., 1979*). Auffällig ist, dass die Prozentangaben in der Addition nicht 100 % ergeben. Dies wird jedoch von den Autoren nicht näher erläutert. In Untersuchungen von Jacksons et al. (1983) wurden fünf

verschiedene Lymphozytenpopulationen anhand ihrer Oberflächenantigene mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierten Antikörpern in der Milz des Kaninchens charakterisiert. Dabei handelte es sich um zwei Subpopulationen an T-Lymphozyten, zwei Subpopulationen an B-Lymphozyten und Null-Zellen (*Jackson et al., 1983*).

Die eigenen stichprobenartigen Zählungen von positiven Lymphozyten in den Antikörperfärbungen mit ISC29E, RTH1A und RACT30A ließen keinen Schluss auf die prozentuale Verteilung der Lymphozytenpopulationen im Blut zu. Hierfür wären Färbungen mit Doppelimmunfluoreszenz notwendig gewesen. Davis und Hamilton (2008) stellten mit einer zweifarbigen Durchflusszytometrie fest, dass im Blut des Kaninchens keine T-Lymphozyten vorkommen, die für CD4- und CD8-Antikörper negativ sind (*Davis und Hamilton, 2008*).

Die CD8-Antigene, die ein Korezeptor des TCR zytotoxischer T-Lymphozyten für MHC-Klasse-I-Moleküle sind (*Moore und Vernau, 2000*), konnten mit Hilfe des Antikörpers ISC29E differenziert werden. Dieser zeigte eine selektive Bindung an Lymphozyten im Blutaussstrich, jedoch keine Bindung an andere Blutzellen. Diese Befunde beweisen, dass die CD8-Moleküle nur auf einer bestimmten Lymphozytenpopulation, den T-Lymphozyten, exprimiert werden. Ob dieser Antikörper Epitope auf CD8 α - oder CD8 β -Lymphozyten erkennt, ist jedoch unklar. Die $\alpha\beta$ -T-Zellen machen beim Kaninchen den Hauptanteil aus. Ob auch $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut des Kaninchens vorhanden sind, bedarf weiterer Untersuchungen (*Davis und Hamilton, 2008*).

Das mit 67 kDa beim Kaninchen vorkommende CD4-Antigen (*Kotani et al., 1993*) dient allgemein auf T-Helferzellen als TCR-assoziiertes Korezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle und IL-16 (*Moore und Vernau, 2000*). In den eigenen Untersuchungen zeigte der Antikörper RTH1A eine selektive Bindung an Lymphozyten im Blutaussstrich und keine Bindung an andere Blutzellen.

Die Bindung des Antikörpers RACT30A verlief bei den Lymphozyten stets stark positiv. Dabei erfolgte wiederum eine selektive Bindung ausschließlich an Lymphozyten.

Beim Nachweis der basophilen Granulozyten kam es beim Antikörper MRB61A (basophile Granulozyten und T-Lymphozyten) trotz starker Konzentrationserhöhung zu einer sehr schwachen Bindung an Lymphozyten und basophile Granulozyten. Somit wurde dieser Antikörper zur Beurteilung nicht herangezogen. RACT20A (basophile Granulozyten, CD4⁺-T-Lymphozyten und T-Lymphozytensubpopulationen) hingegen zeigte eine deutliche Bindung an basophile Granulozyten und selektiv an Lymphozyten. Eine Bindung an andere Blutzellen erfolgte nicht. Die Funktion der Moleküle, an die für basophile Granulozyten spezifische Antikörper binden, ist bislang unklar. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch basophile Granulozyten Immunglobulin-Isotypen auf ihrer Zelloberfläche besitzen (*Davis und Hamilton, 2008*).

Insgesamt eignen sich die oben genannten Antikörper, außer MRB61A, die bisher nur in der Durchflusszytometrie eingesetzt wurden, sehr gut für die Detektion einzelner Lymphozytenpopulationen und basophiler Granulozyten mit immunhistochemischen Methoden.

5.6.2 Immunhistochemischer und histochemischer Nachweis zytoskelettaler Elemente

Das Zytoskelett von tierischen Zellen besteht im Allgemeinen aus drei Komponenten, den Mikro- oder Aktinfilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli (*Sinowatz und Hees, 2000*). Dies trifft bei Leukozyten und eingeschränkt bei Thrombozyten zu. Im Gegensatz dazu wird in den Erythrozyten über submembranöse Proteine wie Ankyrin, Spektrin α (-Spektrin und β -Spektrin) und Band 4.1 ein Netzwerk mit Aktinfilamenten und anderen Proteinen wie Adducin (α -Adducin und β -Adducin), Tropomyosin (*Geiger, 1983; Harvey, 2008; Pasini et al., 2010*) und Tropomodulin gebildet (*Pasini et al., 2010*). Vimentin oder Mikrotubuli kommen in reifen Erythrozyten nicht vor. In Erythrozyten-Vorläufern von Säugetieren ist hingegen Tubulin nachweisbar (*Cohen, 1991*). Mit immunhistochemischen und histochemischen Methoden wurden in dieser Arbeit F-Aktin, Vimentin und Tubulin nachgewiesen. Die Immunfluoreszenz erlaubt dabei eine hochspezifische Lokalisation der zytoskelettalen Elemente (*Geiger, 1983*). F-Aktin wurde mittels Phalloidin von *Amanita phalloides*, das mit TRITC gekoppelt war, dargestellt.

In eukaryotischen Zellen bilden Aktinfilamente ein zytoskelettales und mobiles System (*Pollard und Earnshaw, 2008*). Sie verleihen in muskulären und nicht-muskulären Zellen der Zelloberfläche ihre Form und sind unentbehrlich für die Fortbewegung der ganzen Zelle (*Geiger, 1983*). Im kortikalen Zytoplasma (*Geiger, 1983*) ist Aktin maßgeblich für die Festigkeit und Form der Zellmembran verantwortlich. In vielen Zelltypen bildet es zudem die Grundlage für Projektionen an der Zelloberfläche wie z.B. Mikrovilli (*Alberts et al., 2008*) oder Pseudopodien (*Pollard et al., 2000*). Biochemisch sehr ähnliche Isoformen des Aktins sind in Zellen verschiedener Spezies bekannt, wobei die Sequenzen auch bei völlig unterschiedlichen Spezies bis zu 90 % identisch sind. In nicht-muskulären Zellen des Menschen, in denen der Anteil von Aktin am zytoplasmatischen Protein 10 % beträgt, können die β - und die γ -Isoform unterschieden werden (*Pollard und Earnshaw, 2008*). Mit einem Molekulargewicht von 43 kDa in neutrophilen Granulozyten des Kaninchens (*Huang und Devanney, 1986*) liegt Aktin als globuläres Monomer (G-Aktin) oder als polymerisiertes Filament (F-Aktin) vor (*Richelme et al., 1996*). G-Aktin bildet dabei die Untereinheiten der Aktin-Filamente, die sich zu einer Doppelhelix zusammenlagern (*Korn, 1982*). In nicht-muskulären Zellen liegt zu 50 % unpolymerisiertes Aktin vor (*Korn, 1982; Richelme et al., 1996*), da sie, im Gegensatz zu Muskelzellen, Interaktionen mit zellulären Komponenten eingehen (*Korn, 1982*).

In meiner Arbeit konnte Aktin unter Verwendung von Phalloidin-TRITC mit unterschiedlicher Fluoreszenz in allen Blutzellen nachgewiesen werden.

Allgemein besitzen Erythrozyten die β -Isoform von Aktin (*Yao et al., 1996*). Dieses ist eng mit dem Spektrinnetzwerk unterhalb der Zellmembran verknüpft (*Pasini et al., 2010*), sodass es sich als Ring unterhalb der Zellmembran darstellen lässt.

In Thrombozyten ist ca. die Hälfte der Aktinmoleküle zu Filamenten zusammengefügt, die sowohl ein submembranöses, als auch ein zytoplasmatisches Netzwerk bilden (*White, 2006*). Es verbindet zum einen die Spektrinmoleküle des Membranskeletts durch seine langen Aktinfilamente, zum anderen zieht es vom Zytoplasma zur Zellmembran und bildet somit eine weitere kontinuierliche Ultrastruktur (*Hartwig, 2006*). In den untersuchten Blutausstrichen konnten die Aktinfilamente in den Pseudopodien als auch im Hyalomer lokalisiert werden. Bei den aktivierten Thrombozyten, die den größten Anteil an Thrombozyten in den Blutausstrichen ausmachten, waren die fluoreszierenden Aktinfilamente kurz. Dies ist auf die Umbildungsphase von ruhenden zu aktivierten Thrombozyten zurückzuführen, bei der lange Aktinfilamente in kürzere umgewandelt werden (*Hartwig, 2006*). In letzteren spielt das zytoplasmatische Actomyosin-Skelett eine einzigartige Rolle, da es den Ring an Mikrotubuli zusammenzieht, was bei starker Stimulation zur Freigabe der Inhaltsstoffe von α -Granula und „dense bodies“ ins OCS führt. In ruhenden Thrombozyten schirmt Aktin die Zellorganellen im Zytoplasma voneinander ab (*White, 2006*).

In aktiven und passiven Leukozyten ist das Aktin des kortikalen Zytoskeletts maßgeblich für die Stabilität der Zelle verantwortlich, als auch für die Ausbildung der Mikrovilli. Seine wichtigste Funktion hat es in den migrierenden Leukozyten. Hier kommt es durch die Aktinpolymerisation und -depolymerisation zur aktiven Umgestaltung der Zellform. In Leukozyten geht die Aktivierung mit einer Polymerisation der Aktinfilamente einher, die ein 3D-Netzwerk aus kurzen Aktinfilamenten in der Region der Anheftung ans Endothel bilden. Zudem führt die Aktinpolymerisation zu einer Änderung der Zellform (*Khismatullin, 2009*).

Auch in den Lymphozyten ist ein gut ausgeprägtes Aktinnetzwerk vorhanden. Unterschiede in der Art der Ausprägung des Aktin-Zytoskeletts in B- und T-Lymphozyten wie bei Zauli et al. (1988), mit Aktinfilamenten im Zytoplasma und Mikrovilli der B-Lymphozyten und wenig Aktinfilamenten in T-Lymphozyten (*Zauli et al., 1988*), konnte ich nicht feststellen. Mikrovilli auf der Zelloberfläche der Lymphozyten, in die sich die Aktinfilamente erstrecken (*Khismatullin, 2009*), waren aufgrund der zu geringen Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop (100x Ölimmersionsobjektiv) nicht zu differenzieren. Durch Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop in verschiedenen Ebenen, konnte jedoch die dreidimensionale Struktur des Aktinnetzwerkes verdeutlicht werden.

In den Monozyten des Menschen ist das Aktinnetzwerk eng mit Myosin und α -Actinin verknüpft. In meinen Untersuchungen wurde eine eher granuläre bzw. diffuse Fluoreszenz in der gesamten Zelle

nachgewiesen (Takubo *et al.*, 1999). Dass die Aktinfilamente, wie bei Takubo *et al.* (Takubo *et al.*, 1999) beschrieben, vor allem perinukleär und in den Lamellipodien der Monozyten vorkommen, konnte ich nicht bestätigen.

In neutrophilen und basophilen Granulozyten des Kaninchens ist die Fluoreszenz vor allem an den Zellkern-freien Stellen im Zytoplasma stark ausgeprägt. In eosinophilen Granulozyten hingegen umgeben Aktinfilamente die großen, eosinophilen Granula im Zytoplasma. Hier wird deutlich, dass das Aktinnetzwerk in den Zellen auch für die Anordnung und Position der einzelnen Zellorganellen verantwortlich ist (Lenormand und Fredberg, 2006). Die teilweise in den Leukozyten vorhandene Verteilung von kurzen Aktinfilamenten im Zytoplasma bzw. eine diffuse oder granuläre Anfärbung sind wahrscheinlich auf eine Reorganisation bzw. Umbau des Aktin-Netzwerkes, wie oben bereits erwähnt, durch die Aktivierung der Zelle (Khismatullin, 2009), zurückzuführen.

Vimentin gehört zu den Intermediärfilamenten in mesenchymalen Zellen. Es dient als Regler zahlreicher Proteine, die in die Haftung, Migration und Signalwege zwischen Zellen involviert sind (Ivaska *et al.*, 2007). Es steuert beispielsweise durch Phosphorylierung die Abgabe von Integrinvesikeln an die Plasmamembran im Zuge ihres Recyclings (Eriksson *et al.*, 2004). Vimentinfilamente sind außerdem essentiell für den Transport endolysosomaler Vesikel und die Positionierung von Endosomen und Lysosomen in der Zelle (Styers *et al.*, 2004). Vimentinfilamente bestehen in Leukozyten aus langen, fadenförmigen Molekülen. Die meisten dieser Intermediärfilamente liegen vollständig polymerisiert vor, wodurch das Vimentin-Netzwerk stabiler ist als das der Aktinfilamente und Mikrotubuli. Die polymerisierten Filamente dienen zur Aufrechterhaltung der Zellform bei mechanischem Stress und bilden eine stabile 3D-Struktur in der Zelle. Sie sind typisch für den inaktiven Zustand von Leukozyten (Khismatullin, 2009). Durch Interaktionen mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten (Yoon *et al.*, 1998; Martys *et al.*, 1999) kommt es zu dynamischen Veränderungen des Vimentin-Netzwerkes, das bei Polymerisation der Mikrotubuli zum Zellkern hin zerfallen kann. Dies zeigt sich durch kurze Vimentinfilamente im Zytoplasma (Gyoeva und Gelfand, 1991; Soltys und Gupta, 1992). Obwohl in einigen Studien (Nieminen *et al.*, 2006) die Bedeutung des Vimentins für Lymphozyten diskutiert wurde, ist seine Relevanz für biomechanische Zusammenhänge in Granulozyten und Monozyten noch nicht untersucht worden (Khismatullin, 2009). In der Literatur gibt es keine Angaben zum Vorkommen von Vimentin in Erythrozyten. Untersuchungen an murinen Erythrozyten und seinen Vorläufern zeigten keine Existenz von Vimentin in den Zellen (Koury *et al.*, 1989). Dies entspricht auch den Ergebnissen meiner Arbeit, bei der in keinem Blutausschuss eine Immunfluoreszenz bei Erythrozyten nachgewiesen werden konnte.

In neueren Arbeiten findet man keinen Hinweis auf das Vorkommen von Vimentin in Thrombozyten von Säugetieren. In meiner Arbeit konnte ich jedoch vereinzelt Immunfluoreszenz-positive, filamentöse Strukturen in den Thrombozyten des Kaninchens beobachten. Aus welchem Grund sich

nur in wenigen Thrombozyten eine Immunfluoreszenz zeigte, konnte nicht geklärt werden. In Untersuchungen von Muszbek et al. (1987) (*Muszbek et al., 1987*) wurde Vimentin mit immunhistochemischen Methoden in den Thrombozyten von Rind und Mensch festgestellt. Andere Autoren sprechen hingegen von einem Vimentin-ähnlichen Molekül, das mit Anti-Vimentin-Antikörpern kreuzreagiert (*Tablin und Taube, 1987*). In ruhenden Thrombozyten soll Vimentin einen Ring unterhalb der Zellmembran bilden, wohingegen bei aktivierten Thrombozyten eine starke Anfärbung in der Zelle und in den Pseudopodien vorhanden sein soll (*Muszbek et al., 1987*). Dies konnte in den von mir untersuchten positiven Thrombozyten nur bedingt bestätigt werden. Die Intermediärfilamente stellten sich entweder ringförmig unterhalb der Zellmembran oder polymorph in der Zelle dar. Wenn man anhand der Ergebnisse von Muszbek et al. (1987) davon ausgeht, dass es sich bei den in dieser Arbeit positiven Thrombozyten um ruhende Thrombozyten handelt (*Muszbek et al., 1987*), hätten sich die aktivierten Thrombozyten nicht anfärben lassen. Ob tatsächlich Vimentin in den Thrombozyten vorhanden ist oder ob die Immunfluoreszenz auf eine immunologische Kreuzreaktion zurückzuführen ist, muss durch weitergehende Untersuchungen geklärt werden.

Das 3D-Netzwerk der Vimentinfilamente konnte in Blutausstrichen des Kaninchens an den Leukozyten am besten dargestellt werden. Durch Fokussieren der Intermediärfilamente in verschiedenen optischen Ebenen im Fluoreszenzmikroskop konnte die dreidimensionale Struktur in der Zelle nachvollzogen werden. Doch auch in zweidimensionalen Aufnahmen kann man die Ausprägung des Netzwerkes gut erkennen. In den Lymphozyten des Kaninchens zeigen sich die Vimentinfilamente meist als lange, fädige Strukturen, die sich spiralförmig durch die Zelle ziehen. Bei einigen Lymphozyten konnte jedoch eine mehr diffuse, eher granuläre Anfärbung beobachtet werden. Bei diesen scheint es sich um kurze Vimentinfibrillen zu handeln, die aufgrund dynamischer Veränderungen in der Zelle entstehen (*Gyoeva und Gelfand, 1991; Soltys und Gupta, 1992*).

Auch in den neutrophilen und basophilen Granulozyten des Kaninchens konnte dies öfter beobachtet werden. Monozyten hingegen zeigten meist eine umfassende dreidimensionale Verteilung der Intermediärfilamente in der Zelle. In eosinophilen Granulozyten umgab das Vimentin-Netzwerk die eosinophilen Granula und den Zellkern, sodass diese beiden Strukturen gut differenziert werden konnten.

Mikrotubuli sind hohle Röhren, die aus einem Heterodimer, dem Tubulin, aufgebaut sind. Sie bilden ein 3D-Netzwerk, das an den Zentrosomen beginnt und sich von ihnen aus zur Zellmembran hin ausbreitet (*Khismatullin, 2009*). Es ist verantwortlich für die Positionierung von Zellorganellen und die Beförderung von intrazellulären Molekülen (*Vaughan, 2005*). Aufgrund ihrer dynamischen Instabilität können Mikrotubuli die Zelle gegen Deformation nicht schützen (*Khismatullin, 2009*). Diese Eigenschaft erlaubt ihnen jedoch, schnell zu zerfallen (*Mitchison und Kirschner, 1984; Cassimeris et al., 1988; Hunyadi et al., 2005*) und die Bewegung von Organellen in migrierenden Zellen zu

ermöglichen (Rothwell et al., 1989; Blocker et al., 1998; Stinchcombe et al., 2006; Sanchez-Madrid und Serrador, 2007).

In meiner Arbeit kam es bei ca. 40 % der Blutausstriche zu einer Bindung des Antikörpers gegen Tubulin. Dabei waren die Thrombozyten und Lymphozyten stets positiv, andere Blutzellen in nur zwei bis drei Blutausstrichen. Ein Grund für die Abwesenheit von Mikrotubuli in den Blutzellen einiger Blutausstriche könnte eine Abkühlung dieser sein, die in einem Abbau der Mikrotubuli, einem Aufbau von Aktinfilamenten und einer Ausdehnung der Pseudopodien resultiert. Durch Aufwärmen können diese Prozesse rückgängig gemacht werden (White, 2006). Da alle Blutausstriche jedoch zeitgleich angefertigt wurden und somit den gleichen Temperaturen und Methoden unterlagen, ist eine Zerstörung oder ein Zerfallen der Mikrotubuli während der Probenahme wahrscheinlicher.

In reifen Erythrozyten konnten von mir keine Mikrotubuli nachgewiesen werden. In Erythrozytenvorläufern befindet sich jedoch eine Isoform des β -Tubulin (Cohen, 1991). In einem der für die Doppelfärbungen verwendeten Blutausstriche vom Kaninchen wurden in einer kernlosen Erythrozytenvorstufe fluoreszierende Areale festgestellt. Dies deckt sich mit Untersuchungen an murinen Retikulozyten, die meist eine diffuse Verteilung von Tubulin im Zytoplasma zeigten (Koury et al., 1989). In murinen Erythrozytenvorläufern mit Zellkern bilden die Mikrotubuli eine Art Korbgeflecht um den Zellkern und ordnen sich radial unterhalb der Plasmamembran an. Kurz vor der Eukleation kommt es zu einer Auflösung der Anordnung der Mikrotubuli um den Zellkern. Im Retikulozyten sind weiterhin Mikrotubuli vorhanden, in denen jedoch auch das gesamte Zytoplasma Immunfluoreszenz zeigt (Koury et al., 1989).

Das Tubulin in Thrombozyten liegt zu 50-60 % in polymerisierter Form vor. Dabei wird der unter der Zellmembran liegende Mikrotubulus aus vier verschiedenen β -Tubulinen (β 1, β 2, β 4, β 5) aufgebaut. Der Mikrotubulus ist ca. 100 μ m lang und windet sich acht bis zwölfmal um sich selbst (Hartwig, 2006). Beim Kaninchen beträgt die Wanddicke des Mikrotubulus ca. 7 nm und ist aus 12-13 Untereinheiten mit einem Durchmesser von 3,5-4 nm aufgebaut (Silver und McKinstry, 1967). Der Mikrotubulus dient der Aufrechterhaltung der diskoiden Zellform in ruhenden Thrombozyten (Tablin, 2000; White, 2006). Durch Abkühlungsversuche und Knockout-Experimente konnte diese Abhängigkeit nachgewiesen werden. In der immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung konnte immunreaktives Tubulin in einem ringförmigen Bereich unterhalb der Zellmembran und bei einigen aktivierten Thrombozyten auch in den Pseudopodien nachgewiesen werden. In aktivierten Thrombozyten können nach Hartwig (2006) in einigen Zellen Reste des Mikrotubulusringes verbleiben, in anderen wiederum kommt es zur Fragmentierung und/oder Generierung von neuen Mikrotubuli. Zusätzlich dehnen sich die Mikrotubuli bis in die Pseudopodien aus (Hartwig, 2006).

Auch zum Zytoskelett der Lymphozyten gehört Tubulin (Billadeau et al., 2007), das bei den Lymphozyten des Kaninchens mehr granulär als filamentös ausgeprägt ist. In Monozyten des

Kaninchens umspannen zum einen weitläufige, dreidimensionale Netze von Mikrotubuli den Zellkern, zum anderen zeigen sich die Mikrotubuli granulär im Zytoplasma. In neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wurde eine Immunfluoreszenz vor allem in den Zellkern-nahen Bereichen nachgewiesen. In einigen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten kann man auch die Ausbreitung der Mikrotubuli von den Zentrosomen zur Plasmamembran nachzuvollziehen. In basophilen Granulozyten sind die Mikrotubuli in der ganzen Zelle verteilt. Diese Unterschiede in der Darstellung beruhen auf der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli in den Leukozyten (*Khismatullin, 2009*). In humanen neutrophilen Granulozyten interagieren die Mikrotubuli mit den primären und sekundären Granula in ruhenden und aktivierten neutrophilen Granulozyten. Die Granula bilden dabei Komplexe mit polymerisiertem Tubulin, sodass eine aktive Translokation zur Zellmembran hin stattfinden kann (*Rothwell et al., 1989*).

Die Doppelfärbungen mit Aktin und Vimentin sowie Aktin und Tubulin wurden angefertigt, um die unterschiedliche Lokalisation der zytoskelettalen Elemente zu verdeutlichen. Die Doppelfärbung war jedoch nicht bei allen Blutzellen erfolgreich. Dies wird vermutlich eine Folge der räumlichen Anordnung der zytoskelettalen Elemente und der daran bindenden Antikörper sein.

Trotzdem konnte eine unterschiedliche Lokalisation von Aktin und Vimentin bei einem basophilen Granulozyten beobachtet werden. Dieser zeigte Aktinfilamente diffus über die ganze Zelle verteilt, den Zellkern bedeckend, und besonders stark in Bereichen, in denen keine Vimentin-Immunfluoreszenz vorhanden war. Vimentin hingegen war vor allem im Zellkern-freien Bereich und in der Nähe der Zellmembran zu sehen. Im neutrophilen Granulozyten war kein Lokalisationsunterschied erkennbar. Bei der Doppelfärbung von Aktin und Tubulin wurden die Ergebnisse der Einzelfärbungen bestätigt.

Kapitel 6

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Doktorarbeit war eine umfassende Charakterisierung der Blutzellen gesunder Kaninchen mit Hilfe konventioneller histologischer Färbungen und ultrastruktureller, enzymhistochemischer, glykohistochemischer und immunhistochemischer Methoden. Dazu wurden Blutproben von insgesamt 44 Kaninchen entnommen und zunächst der Gesundheitsstatus der Tiere erfasst. Bei der Erhebung der normalen, labordiagnostischen Parameter waren Unterschiede bei männlichen und weiblichen Kaninchen zu beobachten, die aber nicht signifikant waren. Erst im Anschluss an die Labordiagnostik erfolgte die morphologische Untersuchung der Blutzellen.

In den fünf Übersichtsfärbungen (Diff-Quick, Giemsa 1:11, Giemsa 1:20, May-Grünwald, Pappenheim) sind häufig Erythrozytenvorläufer und auch Riesenthrombozyten mit einem Durchmesser von bis zu 9 µm zu sehen. Die Granula der neutrophilen Granulozyten zeichnen sich durch ihre Eosinophilie in diesen Färbungen aus, die auch die Ursache für eine Anfärbung der neutrophilen Granula in der Sirius-Red-Färbung ist. Somit ist diese zur Differenzierung eosinophiler und neutrophiler Granulozyten, im Gegensatz zu der H.E.-Färbung, bei der die neutrophilen Granulozyten degranulieren, ungeeignet. Basophile Granulozyten des Kaninchens sind häufig in den Blutausstrichen vertreten. Sie besitzen einen oft dreifach gelappten Zellkern, der randständig im Zytoplasma liegt. Gegenüber Schnellfärbungen, wie Diff-Quick, die zu einer Degranulation der basophilen Granulozyten führt, zeigen sie sich sehr empfindlich. Eine gute Darstellung der basophilen Granula ist nur mit der May-Grünwald-, der Pappenheim- und der Toluidinblau-Färbung möglich.

Das Vorkommen von Kohlenhydraten und anderen Glykokojugaten ist mit der PAS-Reaktion und der Alcianblaufärbung dargestellt worden. Bei der PAS-Reaktion sind alle Blutzellen des Kaninchens, mit Ausnahme der Erythrozyten, positiv. Saure Mukosubstanzen in der Alcianblaufärbung mit einem pH-Wert von 2,5 sind in Thrombozyten sowie neutrophilen und basophilen Granulozyten nachweisbar. Sulfatierte Mukosubstanzen sind in der Alcianblaufärbung mit einem pH-Wert von 1 in neutrophilen und basophilen Granulozyten zu sehen.

Um Zuckerstrukturen auf den Blutzellen des Kaninchens zu charakterisieren, wurden sowohl FITC-markierte Lektine, darunter Concanavalin Agglutinin (Con A), Lens culinaris Agglutinin (LCA), Pisum sativum Agglutinin (PSA), Peanut Agglutinin (PNA), Ricinus communis Agglutinin (RCA), Wheat germ Agglutinin (WGA), succinyliertes Wheat germ Agglutinin (WGAs), Griffonia simplicifolia I Agglutinin (GSL-1), Dolichos biflorus Agglutinin (DBA), Soybean Agglutinin (SBA), Saphora japonica Agglutinin (SJA), Ulex europaeus I Agglutinin (UEA-1), Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuko (PHA-L) sowie Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro (PHA-E), und biotinylierte Lektine, darunter Viscum album Agglutinin (VAA), Maackia amurensis I Agglutinin (MAA-1), Sambucus nigra Agglutinin (SNA), Galektin-1, Galektin-3 full length, Galektin-3 truncated, Galektin-8, Galektin-9, verwendet. Bei letzteren erfolgte die Visualisierung der Bindung durch Streptavidin. In den glykohistochemischen Untersuchungen ist die Reaktion der einzelnen Lektine sowie ihre Bindungsaffinität bei den verschiedenen Blutzellen teilweise deutlich unterschiedlich. Dies kann zum Teil auf die Art der Fixation zurückgeführt werden. Generell weisen Blutausrichungen ohne vorherige Fixierung mit Methanol eine verstärkte Bindung der Lektine auf. Aus den Untersuchungen auf Bindung der Lektine kann geschlossen werden, dass die Blutzellen des Kaninchens vor allem Glukose- und Glukosaminreste endständig an den Zuckerstrukturen auf und in der Zelle besitzen, da die Lektine Con A, LCA, PSA, WGA und WGAs gut an diese binden. Von den Galektinen ist vor allem die Bindung von Galektin-8 an die Granulozyten des Kaninchens auffällig. Bei diesen besteht besonders in unfixierten Blutausrichungen eine starke Affinität zur Zellmembran, seltener an die Granula.

Weiter wurde die Auswirkung einer vorangehenden Neuraminidase-Inkubation mit einer Neuraminidase von *Vibrio cholerae*, durch die terminale α -(2 \rightarrow 3)-Verbindungen der Sialinsäure, aber auch α -(2 \rightarrow 6)- und α -(2 \rightarrow 8)-Verbindungen abgespalten werden, getestet. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchung lässt sich ableiten, dass beim Kaninchen Sialinsäure vorzugsweise an Galaktose- und N-Acetylgalaktosmin-Reste gebunden vorliegt.

Zur Differenzierung der Lymphozytenpopulationen und der basophilen Granulozyten wurden speziell für die Blutzellen des Kaninchens entwickelte Antikörper des Departments of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman erstmals für den immunhistochemischen Nachweis herangezogen. Die Antikörper ISC29, RTH1A, RACT30A und RACT20A zeigen eine deutlich positive Reaktion bei einer Konzentration von 1:68. MRB61A hingegen ist ungeeignet für immunhistochemische Färbungen.

Von den zytoskelettalen Elementen wurden Aktin, Vimentin und Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens nachgewiesen. Hierfür wurde im Fall von Aktin mit TRITC gekoppeltes Phalloidin verwendet. Eine starke Fluoreszenz ist in allen Blutzellen zu sehen. In den Thrombozyten erstreckt sich diese bis in die Pseudopodien. Das mit Anti-Vimentin und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemachte Vimentin zeigt eine charakteristische Verteilung im Zytoplasma

der Blutzellen. Die Vimentinfilamente bilden ein ausgeprägtes 3D-Netzwerk in den Blutzellen, das besonders in den Leukozyten demonstriert werden kann. In eosinophilen Granulozyten wird überdies deutlich, wie eng das Vimentinnetz die eosinophilen Granula im Zytoplasma umschließt. Erythrozyten sind stets negativ, Thrombozyten nur in seltenen Fällen positiv mit filamentösen Strukturen in der Zelle. Zur Darstellung von Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens wurden Anti-Tubulin und ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. In den Thrombozyten des Kaninchens ist ein stark Fluoreszenz-positiver Ring unterhalb der Zellmembran zu sehen. Die Leukozyten zeigen sowohl filamentöse als auch granuläre, fluoreszierende Strukturen im Zytoplasma. Mit Hilfe von Doppelfärbungen mit Aktin und Tubulin bzw. Aktin und Vimentin kann zudem die Verteilung der zytoskelettalen Elemente in den Blutzellen demonstriert werden.

In den enzymhistochemischen Analysen der Blutzellen wurde das Vorkommen der Peroxidase, der sauren Phosphatase, der alkalischen Phosphatase, der Naphthol-AS-Acetat-Esterase, der α -Naphthyl-Acetat-Esterase, der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase und der β -Glucuronidase untersucht. Hierbei erfolgte eine umfassende Auswertung der Reaktivität aller Blutzellen. Im Gegensatz zu ihren Vorläuferzellen enthalten Erythrozyten keine der untersuchten Enzyme. In Retikulozyten und Normoblasten sind jedoch regelmäßig Reaktionsprodukte bei dem Nachweis der sauren Phosphatase, der unspezifischen Esterasen und der β -Glucuronidase zu beobachten. Charakteristisch ist daneben die starke Reaktivität der Monozyten bei der Untersuchung auf β -Glucuronidase. Eine Differenzierung der Granulozyten ist zudem durch die fehlende Reaktion der basophilen Granulozyten auf den Nachweis von Peroxidase, von saurer Phosphatase und von alkalischer Phosphatase gegeben. Eosinophile Granulozyten sind Peroxidase-positiv, wohingegen neutrophile Granulozyten sowohl für Peroxidase, als auch für saure Phosphatase und alkalische Phosphatase positiv sind.

In den ultrastrukturellen Untersuchungen können die einzelnen Granulapopulationen (primäre, sekundäre und tertiäre Granula) in den neutrophilen Granulozyten sehr gut differenziert werden. Eosinophile Granulozyten zeichnen sich durch ihre homogenen, eckigen, eosinophilen Granula aus. Monozyten besitzen große Mitochondrien und zahlreiche Ribosomen im Zytoplasma. Bei den Lymphozyten kann man kleine und große Lymphozyten unterscheiden. Vor allem in den großen Lymphozyten, die einen Nukleolus besitzen, sind primäre und sekundäre Lysosomen gut zu erkennen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in meiner Doktorarbeit eine ausführliche Charakterisierung der Blutzellen des Kaninchens erfolgte, bei der frühere Erkenntnisse kritisch analysiert und weitere zytologische und histochemische Eigenschaften der Blutzellen des Kaninchens durch verschiedene Untersuchungsmethoden ermittelt wurden.

7 Summary

Ultrastructural, enzyme histochemical, immunohistochemical and glycohistochemical investigation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) blood cells

The aim of my thesis was the characterization of rabbit blood cells using cytologic, enzyme histochemical, immunohistochemical und glycohistochemical techniques.

Blood from 44 clinically healthy rabbits of different breeds was used for this study. Using conventional blood stains such as Diff-Quick, Giemsa 1:11, Giemsa 1:20, May-Grünwald, Pappenheim and H.E., besides the normal cell types expected, also precursors of red blood cells and giant platelets with a diameter of 9 µm could be distinguished. Different to most domestic species, blood smears of rabbits exhibit a large number of basophilic granulocytes. Using toluidine blue, May-Grünwald and Pappenheim, an excellent visualization of basophils is possible.

To determine carbohydrates and glycoconjugates, blood smears were stained with periodic-acid-Schiff-reaction and Alcian blue. All blood cells, besides red blood cells, are PAS-positive. Acid mucosubstances can be demonstrated at a pH of 2.5 in platelets, neutrophils and basophils, whereas sulfated mucosubstances are only present in neutrophils and basophils with Alcian blue staining at a pH of 1.

For the characterization of glycoconjugates of rabbit blood cells, FITC-marked lectins, as concanavalin A (Con A), lens culinaris agglutinin (LCA), pisum sativum agglutinin (PSA), peanut agglutinin (PNA), ricinus communis agglutinin (RCA), wheat germ agglutinin (WGA), wheat germ agglutinin succinylated (WGAs), griffonia simplicifolia I agglutinin (GSL-1), dolichos biflorus agglutinin (DBA), soybean agglutinin (SBA), sophora japonica agglutinin (SJA), ulex europaeus I agglutinin (UEA-1), phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L), phaseolus vulgaris erythroagglutinin (PHA-E) and biotinylated lectins, as viscum album agglutinin (VAA), maackia amurensis I agglutinin (MAA-1), sambucus nigra agglutinin (SNA), galectin-1, galectin-3 full length, galectin-3 truncated, galectin-8 and galectin-9, were used. The lectin-staining pattern of the blood cells showed distinct variations that were probably influenced by the fixation method. Generally a more reliable and stronger lectin binding occurred in unfixed, air-dried smears. From the galectins tested, galcectin-8 exhibits a strong binding to the cell membrane of granulocytes of unfixed blood smears.

Removing of sialic acid by pretreatment with neuraminidase from *Vibrio cholerae* indicates that sialic acid masks the epitopes of α-galactose and N-acetyl-galactosamine residues of rabbit blood cells.

To characterize different lymphocyte populations and basophils antibodies were used, which were specifically developed for rabbit blood cells from the Department of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, for the first time for immunohistochemical staining. Using unfixed blood smears, antibodies ISC29, RTH1A, RACT30A and RACT20A revealed a strong positive reaction on the cell membrane of lymphocytes with a concentration of 1:68. MRB61A appeared to be unsuitable for immunohistochemical studies.

Cytoskeletal elements of the blood cells (actin, vimentin and tubulin) were studied using histochemical and immunohistochemical techniques. With TRITC-labeled phalloidin actin could be demonstrated in all rabbit blood cells. In activated platelets, actin staining was also observed in the pseudopods. Immunohistochemical localization of vimentin showed an interesting staining pattern within the different blood cells, which was best seen in eosinophils, where a vimentin network encloses the eosinophilic granules of the cytoplasm. Red blood cells are always vimentin-negative. Using FITC-labeled tubulin, platelets showed a strong circular staining under their cell membrane, corresponding to the ultrastructurally shown localization of microtubuli. Leukocytes revealed filamentous and granular tubulin-positive structures in their cytoplasm. Double stainings with actin and Tubulin antibody and actin and vimentin antibody, the interactions of cytoskeletal elements could be demonstrated.

Using enzyme-histochemical techniques, the activity of peroxidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, naphthol-AS-acetate-esterase, α -naphthyl-acetate-esterase, naphthol-AS-D-chloracetate-esterase and β -glucuronidase could be demonstrated in several types of leukocytes. In contrast to reticulocytes and normoblasts, which were positive for acid phosphatase, naphthol-AS-acetate-esterase and β -glucuronidase, red blood cells did not show any activity for the enzymes studied. β -glucuronidase also showed a strong, characteristic reaction in monocytes. Enzyme histochemistry also allows a differentiation of granulocytes: basophils are always negative for peroxidase, acid phosphatase and alkaline phosphatase, whereas, eosinophiles possess granules, which are positive for peroxidase, and neutrophils are positive for peroxidase, acid phosphatase and alkaline phosphatase.

With the transmission electron microscope, the different populations of granules (primary, secondary and tertiary granules) of neutrophilic granulocytes can be well discerned. Eosinophilic granulocytes are characterized by their moderately electron dense, angular granules. Monocytes contain large mitochondria and numerous ribosomes in their cytoplasm. Large lymphocytes always show a nucleolus, and a number of primary and secondary lysosomes.

A. Verzeichnis der Gebrauchslösungen

Lichtmikroskopie

Saures Hämalaun nach Mayer:

Hämatoxilin krist.	2 g	MERCK (Darmstadt)
Natriumjodat NaJO ₃	0,4 g	MERCK (Darmstadt)
Aluminiumkaliumsulfat Dodecahydrat	100 g	MERCK (Darmstadt)
Chloralhydrat	100 g	MERCK (Darmstadt)
Zitronensäure krist.	2 g	MERCK (Darmstadt)

Eosin-Stammlösung:

Eosin gelblich	2 g	MERCK (Darmstadt)
Aqua dest.	198 ml	
Zur Haltbarkeit einige Tropfen Formol zugeben.		

Eosin-Gebrauchslösung:

Eosin-Stammlösung	1 Teil	
Aqua dest.	10 Teile	
Eisessig	1 Tropfen pro 100 ml fertige Färbelösung	MERCK (Darmstadt)

Sirius Red – Färbelösung:

Sirius Red	500 mg	(REACTIFS RAL, Martillac)
Aqua bidest	45 ml	
Ethanol absol.	50 ml	(MERCK, Darmstadt)
NaOH 1 %	1 ml	
NaCl 20 %	4 ml	

500 mg Sirius Red werden in 45 ml Aqua bidest und 50 ml Ethanol absolut gelöst. Anschließend werden 1 ml NaOH 1 % und 4 ml NaCl 20 % hinzugegeben und filtriert. Die Lösung ist ca. 2 Monate bei Raumtemperatur haltbar.

Toluidinblau-Färbelösung:

Toluidinblau O	1 g	(ROTH, Karlsruhe)
Methanol	100 ml	(MERCK, Darmstadt)

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

Lösungen für die PAS-Färbung:10 %ige Natriumdisulfatlösung = SO₂-Wasser:

Natriumdisulfat	10 g	(MERCK, Darmstadt)
Aqua dest.	100 ml	
Das SO ₂ -Wasser sollte immer frisch hergestellt werden.		

0,5 %ige wässrige Perjodsäurelösung:

Perjodsäure	1 g	(MERCK, Darmstadt)
Aqua dest.	200 ml	
Die Perjodsäurelösung sollte immer frisch angesetzt werden.		

Lösungen für die Alcianblau-Färbung:Alcianblau-Färbelösung pH 2,5:

Essigsäure 100 %	15 ml	(MERCK, Darmstadt)
Aqua dest.	485 ml	
Alcianblau 8 GX Certistain®	5 g	(MERCK, Darmstadt)

Alcianblau-Färbelösung pH 1:

0,1 N HCl	500 ml	(MERCK, Darmstadt)
Alcianblau 8 GX Certistain®	5 g	(MERCK, Darmstadt)

Kernechtrotlösung:

Aluminiumkaliumsulfatdodecahydrat	47,4 g	(MERCK, Darmstadt)
Aqua dest.	100 ml	
Kernechtrot Certistain®	0,1 g	(MERCK, Darmstadt)

Elektronenmikroskopie

Fixierlösung nach Karnovsky:

10 %ige Paraformaldehyd-Lösung:

Paraformaldehyd	10 g	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
Aqua dest.	100 ml	
Paraformaldehyd in Aqua dest. bei max. 60-70°C im Magnetrührer lösen.		
1 N NaOH	1-2 Tropfen	(MERCK, Darmstadt)

Karnovsky-Stammlösung:

10 %ige Paraformaldehyd-Lösung	20 ml	
0,2 M Cacodylatpuffer	50 ml	
Calciumchlorid, wasserfrei	0,05 g	(SERVA, Heidelberg)

Karnovsky-Gebrauchslösung:

Karnovsky-Stammlösung	10 ml	
Glutaraldehyd 5 %		(POLYSCIENCES, Warrington)

Natriumcacodylat-Puffer:

Lösung A:

Natriumcacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	8,56 g	(POLYSCIENCES, Warrington)
Aqua dest.	200 ml	

Lösung B:

0,2 M HCl		(MERCK, Darmstadt)
-----------	--	--------------------

0,2 M Natriumcacodylat-Puffer pH 7,2:

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

0,1 M Natriumcacodylat-Puffer pH 7,2:

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

Kontrastierungslösung:*2 %ige Osmiumtetroxid-Stammlösung:*

4 %iges Osmiumtetroxid	2 ml	(POLYSCIENCES, Warrington)
0,1 M Natriumcacodylatpuffer	2 ml	

3 %ige Kaliumferrocyanid-Stammlösung:

Kaliumferrocyanid	0,3g	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
0,1 M Natriumcacodylatpuffer	10 ml	

1 %ige Osmiumtetroxid + 1,5 %iges Kaliumferrocyanid in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer:

3 %ige Kaliumferrocyanid-Stammlösung	4 ml	
2 %ige Osmiumtetroxid-Stammlösung	4 ml	

Nachkontrastierung mit Bleicitratlösung nach Reynolds:

Endvolumen ca. 10 ml:

Bleinitrat	0,266 g	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
Natriumcitrat	0,352 g	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
Aqua dest.	6 ml	
1 N NaOH	1,6 ml	(MERCK, Darmstadt)

Polyembed:

Poly/bed 812	16 ml	(POLYSCIENCES, Warrington)
DDSA	10 ml	(POLYSCIENCES, Warrington)
NMA	9 ml	(POLYSCIENCES, Warrington)
DMP-30	0,3-0,5 ml	(POLYSCIENCES, Warrington)

Enzymhistochemie

0,1 M Phosphatpuffer:

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	4,45 g	(MERCK, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat z.A.	3,45 g	(MERCK, Darmstadt)
Beide Substanzen in je 250 ml Aqua dest. lösen. di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat mit Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat titrieren bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist.		

10 %iges Methanol-Formol:

Methanol	9 Teile	(MERCK; Darmstadt)
Formaldehyd 37 %	1 Teil	(ROTH, Karlsruhe)

Michaelis-Barbital-Natrium-Puffer pH 7,4:

Sodium barbiturate	3,75 g	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
Aqua dest.	250 ml	
HCl 0,1 N		(MERCK, Darmstadt)
3,75g Sodium barbiturate werden im Magnetrührer bei einer Temperatur von mindestens 70°C in 250 ml Aq. dem. gelöst. Anschließend wird mit 0,1 N HCl bis zu einem pH-Wert von 7,4 gepuffert. Danach werden 50 ml Aqua Milli Q zu 50 ml des Michaelis-Natrium-Barbital-Puffers hinzugegeben und erneut der pH-Wert eingestellt.		

0,2 M Natriumacetatlösung:

Natriumacetat wasserfrei	1,312 g	(MERCK, Darmstadt)
Aqua dest.	80 ml	

Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung:Lösung A:

Pararosanilin (Chlorid) Certistain®	200 mg	(MERCK, Darmstadt)
Aqua dest.	4 ml	
konz. HCl	1 ml	
Pararosanilin (Chlorid) wird in Aqua dest. gelöst. Anschließend wird konzentriertes HCl hinzugesetzt.		

Lösung B: 4 %ige wässrige Natriumnitritlösung

Natriumnitrit	400 mg	(MERCK, Darmstadt)
Aqua dest.	10 ml	

Gebrauchslösung:

Die Lösungen A und B werden zu gleichen Teilen unmittelbar vor der Verwendung vermischt, wobei sich rasch eine gelbe Färbung einstellen sollte.

Glykohistochemie

Phosphate-buffered-saline (pH 7,4):

NaCl	42,5 g	(MERCK, Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat)	6,35 g	(MERCK, Darmstadt)
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat)	1,95 g	(MERCK, Darmstadt)
In 5 Liter Aq. dem. lösen		

100 mM Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,0):

Natrium-Acetat wasserfrei	8,2 g	(MERCK, Darmstadt)
Aq. dem.	1 l	
1 M HCl		(MERCK, Darmstadt)

Es wurden 8,2 g Natrium-Acetat wasserfrei in 1 l Aqua dest. gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M HCl eingestellt.

Natrium-Acetatpuffer (pH 5,5):

Natrium-Acetat wasserfrei	13,6 g	(MERCK, Darmstadt)
Aq. dem.	1 l	
Essigsäure 10 %		(ROTH, Karlsruhe)

13,6 g Natrium-Acetat wasserfrei wurden in 1 l Aq. dem. gelöst. Der pH-Wert von 5,5 wurde anschließend mit 10 %iger Essigsäure eingestellt (*Mulisch und Welsch, 2010*).

Gebrauchslösung für die Vorbehandlung mit Neuraminidase:Pufferlösung:

100 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 5,0		
Calciumchlorid	0,294 g	(MERCK, Darmstadt)
1 M HCl		(MERCK, Darmstadt)

Gebrauchslösung:

Pufferlösung	1 ml	
Neuraminidase von <i>Vibrio cholerae</i>	3 µl	(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Es wurde zunächst ein 100 mM Natrium-Acetat-Puffer, dem 0,294 g CaCl₂ zugesetzt wurde, hergestellt. Der pH-Wert des Puffers wurde anschließend mit 1 M HCl auf 5,0 eingestellt. Zudem musste die Temperatur des Puffers 37°C betragen, bevor das Enzym hinzugesetzt werden konnte. Zu 1 ml der Pufferlösung wurden 3 µl der Neuraminidase-Lösung gegeben. Dies entspricht 0,02 Einheiten der Neuraminidase-Lösung.

B. Übersicht der Laborwerte von Kaninchen in der Literatur

Rotes Blutbild:

Quelle	Rasse	Geschlecht	Anzahl Erythrozyten (10 ⁶ /μl)	Anteil Retikulozyten (%)	Hämatokrit (%)	Hämoglobin (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)
(Sanderson und Phillips, 1981)	NZW	m	5,32	2,5	34,5	11,2	65	21,3	32,8 g/dl
		w	5,35	2,2	35,7	11,7	67	22,1	33,0 g/dl
(Jain, 1993)	NZW	Beide	5,98 ± 0,39	3,7 ± 1,3	42,0 ± 2,7	13,3 ± 0,9	70,4 ± 2,9	22,3 ± 1,1	31,7 ± 1,1
(Jain, 1993)	WJR	Beide	7,73 ± 0,78	0,3 ± 0,74	49,08 ± 3,98	15,97 ± 1,30	63,62 ± 2,47	20,70 ± 1,07	32,52 ± 1,04
(Mitruka und Rawnsley, 1981)	NZW	m	5,46 – 7,94		33,0 – 50,0	10,4 – 17,4	58,6 – 66,5	18,7 – 22,7	30,0 – 37,0
		w	5,11 – 6,51		31,0 – 48,6	9,80 – 15,8	57,8–65,4	17,1- 23,5	28,7 – 35,
(Harkness und Wagner, 1995)	-	Beide	4 – 7,2	-	36 - 48	10,0 – 15,5 mg/dl	-	-	-
(Jenkins, 2008)	Domestic rabbit	Beide	5,4 – 7,6	-	33-50	10,0 – 17,4	60-69	19-22	30-35
(Quesenberry, 2004)	-	Beide	5,1-7,9	-	33-50	10,0-17,4	57,8-66,5	17,1-23,5	29-37
(Aleman et al., 2000)	NZW	m	-	-	44,20	12,92	-	-	-
		w			42,40	13,28			
(Wolford et al., 1986)	NZW	m	6,75	1,9	40,4	13,7	59,9	20,4	34,0
		w	6,22	2,7	37,8	12,8	60,9	20,8	34,1
(Bortolotti et al., 1989)	NZW	w	5,7 ± 0,4	-	36 ± 3	12,1 ± 1,0	62 ± 1	21,2 ± 0,4	33,7 ± 0,1 g/dl
(Kabata et al., 1991)	NZW								
(Hewitt et al., 1989)	NZW	Beide	3,7-7,5	-	26,7-47,2	8,9-15,5	58,0-79,6	19,2-29,5	31,1-37,0
(Hein und Hartmann, 2003)	verschiedene	Beide	5,36-8,13	-	36-55	11,3-17,1	59,3-69,6	18-22	30-32 g/dl
(Pearce und Casey, 1930)	-	m	5,2 ± 0,01	-	-	63 ± 2 %			
(Fudge, 2000)	-	Beide	4,9-7,8	-	33,5-47	11,1-13,9	59,4-69,6	18,1-23,9	28,2-36,4 mg/dl
(Banks, 1986)	-	Beide	5,6	-	48	12 g/100ml	61	-	32 g/dl
(Schermer, 1958)									
(Ewringmann, 2005)	-	Beide	4,5-7,8	-	30-48	8,5-16	-	-	-
(Parmley, 1988)	-								

Weißes Blutbild:

Quellen	Rasse	Geschlecht	Leukozyten zahl		Neutrophile Granulozyten		Eosinophile Granulozyten		Basophile Granulozyten		Lymphozyten		Monozyten		Thrombozyten
			%	x10 ³ /µl	%	x10 ³ /µl	%	x10 ³ /µl	%	x10 ³ /µl	%	x10 ³ /µl	%	x10 ³ /µl	x10 ³ /µl
(Sanderson und Phillips, 1981)		m		9,7		2,9		0,1		0,2		5,8		0,3	528
		w		7,7		1,9		0,0		0,3		4,9		0,4	342
(Jain, 1993)	NZW	Beide		8,2	29,2 ± 9,1		1,1 ± 1,0		2,7 ± 2,2		62,5 ± 13,9		3,2 ± 2,6		428 ± 178
(Jain, 1993)	WJR	Beide		5	34,6 ± 11,4		4,5 ± 3,6		0,4 ± 0,6		54,2 ± 11,6		6,3 ± 3,5		447 ± 215
(Mitruka und Rawnsley, 1981)	NZW	m		5,5-12,5	38-54	2,53-5,75	0,5-3,5	0,11-0,25	2,5-7,5	0,28-0,62	28-50	2,14-4,88	4-12	0,44-1,0	304-656
		w		5,2-10,6	36,4-50,4	2,26-4,6	0,8-3,2	0,1-0,21	2,4-6,2	0,22-0,46	31,5-52,1	2,17-4,43	6,6-13,4	0,47-0,95	270-630
(Harkness und Wagner, 1995)	-	Beide	20-35		20-35		0-4		2-10		55-80		1-4		200-1000
(Jenkins, 2008)	Domestic rabbits	Beide		5,2-12,5	20-75		1-4		1-7		30-85		1-4		250-600
(Quesenberry, 2004)	-	Beide		5,2-12,5	20-75		1-4		1-7		30-85		1-4		250-650
(Aleman et al., 2000)	NZW	m	-	-	38	-	2	-	-	-	69	-	3	-	-
		w	-	-	35	-	1	-	-	-	71	-	2	-	-
(Wolford et al., 1986)	NZW	m	-	9,5	32	-	1	-	2	-	62	-	1	-	499
		w	-	8,4	34	-	1	-	3	-	61	-	1	-	470
(Bortolotti et al., 1989)	NZW	Beide	-	8,1 ± 2,7	32 ± 15	-	-	-	-	-	68 ± 15	-	-	-	-
(Kabata et al., 1991)	NZW														
(Hewitt et al., 1989)	NZW	Beide	-	5,2-16,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	112-795
(Hein und Hartmann, 2003)	Verschiedene	Beide	-	6,7	33	2,1	0	0	1	0,067	62	4	3	0,212	397
(Pearce und Casey, 1930)	-	m	-	9,56-9,61	-	4,34-4,38	-	0,21-0,22	-	0,95-0,96	-	3,04-3,07	-	1,0-1,1	-
(Sabin et al., 1936)	-														
(Fudge, 2000)	-	Beide	-	-	40-75		0-2		0-2		40-75		2-6		260-600
(Banks, 1986)	-	Beide	-	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500
(Schermer, 1958)	-														
(Ewringmann, 2005)	-	Beide		2,6-9,9	20-75		0-4		0-2		25-85		2-10		130-900

C. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Zusammensetzung des Blutes.....	3
Abbildung 2.2: Ablauf der Hämatopoese.....	6
Abbildung 3.4: Herstellung der Färbelösung zum Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase.....	93
Abbildung 3.5: Herstellung der Färbelösung zum Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase.....	94
Abbildung 4.1: Übersichtsfärbungen der Erythrozyten.....	117
Abbildung 4.2: Übersichtsfärbungen der Thrombozyten.....	118
Abbildung 4.3: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten I.....	119
Abbildung 4.4: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten II.....	120
Abbildung 4.5: Übersichtsfärbungen der Monozyten.....	121
Abbildung 4.6: Übersichtsfärbungen der neutrophilen Granulozyten I.....	122
Abbildung 4.7: Übersichtsfärbungen der neutrophilen Granulozyten II.....	123
Abbildung 4.8: Übersichtsfärbungen der eosinophilen Granulozyten.....	125
Abbildung 4.9: Übersichtsfärbungen der basophilen Granulozyten.....	127
Abbildung 4.10: Sirius-Red-Färbung der Blutzellen des Kaninchens.....	128
Abbildung 4.11: Toluidinblau-Färbung der basophilen Granulozyten.....	129
Abbildung 4.12: PAS-Färbung der Blutzellen des Kaninchens.....	130
Abbildung 4.13: Alcianblaufärbung pH 2,5.....	131
Abbildung 4.14: Alcianblaufärbung pH 1.....	132
Abbildung 4.15: Erythrozytenvorläufer.....	134
Abbildung 4.16: Thrombozyt I.....	136
Abbildung 4.17: Zwei Thrombozyten.....	137
Abbildung 4.18: Zwei Lymphozyten.....	138
Abbildung 4.19: Lymphozyten und Granulozyt.....	139
Abbildung 4.20: Monozyt I.....	141
Abbildung 4.21: Monozyt II.....	142
Abbildung 4.22: Neutrophiler Granulozyt I.....	144
Abbildung 4.23: Neutrophiler Granulozyt II.....	145
Abbildung 4.24: Eosinophiler Granulozyt.....	147
Abbildung 4.25: Aktivität der Peroxidase in den Blutzellen des Kaninchens.....	149
Abbildung 4.26: Saure Phosphatase – Normoblast, Thrombozyten, Lymphozyt, Monozyt.....	150
Abbildung 4.27: Saure Phosphatase – Granulozyten.....	151
Abbildung 4.28: Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Blutzellen des Kaninchens.....	152
Abbildung 4.29: Aktivität der Naphthol-AS-Acetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens.....	154
Abbildung 4.30: Aktivität der α -Naphthyl-Acetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens.....	156
Abbildung 4.31: Aktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase bei einem pH-Wert von 7,4.....	157
Abbildung 4.32: Aktivität der Chloracetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens bei pH 6,5.....	158
Abbildung 4.33: Aktivität der β -Glucuronidase in den Blutzellen des Kaninchens.....	160
Abbildung 4.34: Bindung von Con A-FITC an die Blutzellen des Kaninchens I.....	163
Abbildung 4.35: Bindung von Con A-FITC an die Blutzellen des Kaninchens II.....	164
Abbildung 4.36: Bindung von LCA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens I.....	167
Abbildung 4.37: Bindung von LCA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens II.....	168
Abbildung 4.38: Bindung von PSA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens I.....	171
Abbildung 4.39: Bindung von PSA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens II.....	172
Abbildung 4.40: Bindung von SNA an die Blutzellen des Kaninchens.....	175
Abbildung 4.41: Bindung von VAA an neutrophile Granulozyten des Kaninchens.....	176
Abbildung 4.42: Bindung von WGA-FITC an die Granulozyten des Kaninchens.....	180

Abbildung 4.43: Bindung von WGA-FITC an die Monozyten des Kaninchens	181
Abbildung 4.44: Bindung von WGA-FITC an die Lymphozyten.....	182
Abbildung 4.45: Bindung von WGAs-FITC an die Blutzellen des Kaninchens.....	185
Abbildung 4.46: Bindung von WGAs-FITC an die eosinophilen und basophilen Granulozyten	186
Abbildung 4.47: Bindung von GSL-1-FITC an die Blutzellen des Kaninchens.....	189
Abbildung 4.48: Bindung von MAA-1 an die Blutzellen des Kaninchens	192
Abbildung 4.49: Bindung von PHA-L-FITC an die Granulozyten des Kaninchen.....	195
Abbildung 4.50: Bindung von PHA-L-FITC an die Blutzellen des Kaninchens	196
Abbildung 4.51: Bindung von PHA-E-FITC an die Blutzellen des Kaninchens	198
Abbildung 4.52: Bindung von Galektin-1 an die Blutzellen des Kaninchens.....	200
Abbildung 4.53: Bindung von Galektin-8 an die Blutzellen des Kaninchens.....	202
Abbildung 4.54: Bindung verschiedener Lektine an die Blutzellen des Kaninchens nach Vorbehandlung mit Neuraminidase ..	205
Abbildung 4.55: Bindung der Antikörper ISC29E, RTH1A und RACT20A an die Lymphozyten	207
Abbildung 4.56: Bindung von RACT20A an basophile Granulozyten und Lymphozyten	208
Abbildung 4.57: Nachweis von F-Aktin in den Blutzellen I	210
Abbildung 4.58: Nachweis von F-Aktin in den Blutzellen II	211
Abbildung 4.59: Nachweis von Vimentin in den Blutzellen des Kaninchens.....	213
Abbildung 4.60: Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens.....	215
Abbildung 4.61: Doppelfärbung von Aktin – Vimentin an Blutzellen bei Kaninchens	217
Abbildung 4.62. : Doppelfärbung von Aktin und Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens I.....	219
Abbildung 4.63: Doppelfärbung von Aktin und Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens II.....	220
Abbildung 4.64: Doppelfärbung von Aktin und Tubulin bei einem eosinophilen Granulozyten	221

D. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Physiologische Blutwerte des Kaninchens	9
Tabelle 2.2: Morphometrische Parameter der Erythrozyten beim Kaninchen (<i>Poljičak-Milas et al., 2009</i>).....	13
Tabelle 2.3: Prozentualer Anteil von T- und B-Lymphozyten in lymphatischen Organen (nach Bast et al., 1979)	25
Tabelle 2.4: Einteilung ausgewählter Pflanzenlektine.....	65
Tabelle 2.8: Lektinbindung der Blutzellen des Kaninchens.....	68
Tabelle 2.9: Lymphozytenpopulationen anhand ihrer Oberflächenantigene nach Jackson et al. 1983.....	73
Tabelle 2.10: Blutgruppensysteme beim Kaninchen (<i>Cohen und Tissot, 1974</i>).....	75
Tabelle 3.1: Aufstellung aller untersuchten Kaninchen	79
Tabelle 3.2: Methoden der Giemsa-Färbung.....	80
Tabelle 3.3: Übersicht über die Methoden zum Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase	95
Tabelle 3.4: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten direkt FITC-markierten Pflanzenlektine (modifiziert nach Rüdiger, Gabius und Habermann (<i>Rüdiger und Gabius, 2009b</i>) (<i>Gabius et al., 2011</i>) (<i>Habermann et al., 2011</i>))	98
Tabelle 3.5: In der Arbeit verwendete Hemmzucker.....	100
Tabelle 3.6: In der Arbeit verwendete biotinylierte Lektine. Modifiziert nach Gabius und Habermann (<i>Gabius et al., 2011</i>) (<i>Gabius, 2011</i>) (<i>Habermann et al., 2011</i>)	102
Tabelle 3.7: In der Arbeit verwendete Galektine modifiziert nach Habermann (<i>Habermann et al., 2011</i>).....	103
Tabelle 3.8: In der Arbeit verwendete Antikörper.....	104
Tabelle 3.9: In der Arbeit verwendete Antikörper zum Nachweis von Intermediärfilamenten	105
Tabelle 3.10: In der Arbeit verwendeter Antikörper zum Nachweis von Tubulin.....	106
Tabelle 3.11: Für die Doppelfärbung verwendete Antikörper und Phalloidin	107
Tabelle 4.1: Rotes Blutbild der Kaninchen.....	110
Tabelle 4.2: Weißes Blutbild der Kaninchen.....	111
Tabelle 4.3: Serumparameter der Kaninchen.....	113
Tabelle 4.4: Differentialblutbild der männlichen und weiblichen Tiere im Vergleich.....	114
Tabelle 4.5: Abweichungen der Erythrozyten von der physiologischen Form	117
Tabelle 4.6: Übersichtsfärbungen der Erythrozyten.....	117
Tabelle 4.7: Übersichtsfärbungen der Thrombozyten	118
Tabelle 4.8: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten.....	119
Tabelle 4.9: Übersichtsfärbungen der Monozyten	120
Tabelle 4.10: Übersichtsfärbungen der neutrophilen Granulozyten	122
Tabelle 4.11: Übersichtsfärbungen der eosinophilen Granulozyten.....	124
Tabelle 4.12: Übersichtsfärbungen der basophilen Granulozyten.....	126
Tabelle 4.13: Ergebnisse der PAS-Färbung	129
Tabelle 4.14: Ergebnisse der Alcianblaufärbung	131
Tabelle 4.15: Aktivität der Peroxidase in den Blutzellen des Kaninchens	148
Tabelle 4.16: Aktivität der sauren Phosphatase in den Blutzellen des Kaninchens.....	149
Tabelle 4.17: Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Blutzellen des Kaninchens	152
Tabelle 4.18: Aktivität der Naphthol-AS-Acetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens	153
Tabelle 4.19: Aktivität der α -Naphthyl-Acetat-Esterase in den Blutzellen des Kaninchens.....	155
Tabelle 4.20: Aktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase bei einem pH-Wert von 7,4 in den Blutzellen des Kaninchens	157
Tabelle 4.21: Aktivität der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase bei einem pH-Wert von 6,5 in den Blutzellen des Kaninchens	158
Tabelle 4.22: Aktivität der β -Glucuronidase in den Blutzellen des Kaninchens.....	159
Tabelle 4.23: Auswertung der Bindung von Con A-FITC an die Blutzellen des Kaninchens.....	162
Tabelle 4.24: Auswertung der Bindung von LCA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens	166

Tabelle 4.25: Auswertung der Bindung von PSA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens	170
Tabelle 4.26: Auswertung der Bindung von SNA an die Blutzellen des Kaninchens	174
Tabelle 4.27: Auswertung der Bindung von VAA an die Blutzellen des Kaninchens	177
Tabelle 4.28: Auswertung der Bindung von WGA-FITC an die Blutzellen des Kaninchens	179
Tabelle 4.29: Auswertung der Bindung von WGA-FITC an die Lymphozyten des Kaninchens	181
Tabelle 4.30: Auswertung der Bindung von WGAs-FITC an die Blutzellen des Kaninchens	184
Tabelle 4.31: Auswertung der Bindung von GSL-1-FITC an die Blutzellen des Kaninchens	188
Tabelle 4.32: Auswertung der Bindung von MAA-1 an die Blutzellen des Kaninchens.....	191
Tabelle 4.33: Auswertung der Bindung von PHA-L-FITC an die Blutzellen des Kaninchens	194
Tabelle 4.34: Auswertung der Bindung von PHA-E-FITC an die Blutzellen des Kaninchens.....	197
Tabelle 4.35: Auswertung der Bindung von Galektin-1 an die Blutzellen des Kaninchens	199
Tabelle 4.36: Auswertung der Bindung von Galektin-8 an die Blutzellen des Kaninchens	201
Tabelle 4.37: Auswertung der Bindung der Lektine GSL-1, PNA, RCA ₁₂₀ , DBA, SJA und SBA an die Blutzellen des Kaninchens nach Neuraminidase-Vorbehandlung	204
Tabelle 4.38: Bindung der Antikörper ISC29E, RTH1A und RACT30A an die Lymphozyten.....	206
Tabelle 4.39: Histochemischer Nachweis von F-Aktin in den Blutzellen des Kaninchens	209
Tabelle 4.40: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin in den Blutzellen des Kaninchens.....	212
Tabelle 4.41: Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin in den Blutzellen des Kaninchens.....	214
Tabelle 4.42: Bindung von Phalloidin-TRITC und Anti-Vimentin an die Blutzellen des Kaninchens	216
Tabelle 4.43: Bindung von Phalloidin-TRITC und Anti-Tubulin an die Blutzellen des Kaninchens.....	218

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGRAWAL, B. B. L., und GOLDSTEIN, I. J., 1965: Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. *Biochem. J.*, **96**, C23-15C.
2. ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., und WALTER, P., 2008: *Molecular Biology of the Cell*. 5. Aufl. New York, Abingdon: Garland Science.
3. ALEMAN, C. L., NOA, M., MAS, R., RODEIRO, I., MESA, R., MENENDEZ, R., GAMEZ, R., und HERNANDEZ, C., 2000: Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratory animals. *Lab. Anim.*, **34**, 379-385.
4. ANDRÉ, S., KOJIMA, S., GUNDEL, G., RUSSWURM, R., SCHRATT, X., UNVERZAGT, C., und GABIUS, H. J., 2006: Branching mode in complex-type triantennary N-glycans as regulatory element of their ligand properties. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.*, **1760**, 768-782.
5. ANDRÉ, S., UNVERZAGT, C., KOJIMA, S., FRANK, M., SEIFERT, J., FINK, C., KAYSER, K., VON DER LIETH, C. W., und GABIUS, H. J., 2004: Determination of modulation of ligand properties of synthetic complex-type biantennary N-glycans by introduction of bisecting GlcNAc in silico, in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 118-134.
6. ARFORS, K. E., LUNDBERG, C., LINDBOM, L., LUNDBERG, K., BEATTY, P. G., und HARLAN, J. M., 1987: A monoclonal-antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphnuclear leukocyte accumulation and plasma leakage invivo. *Blood*, **69**, 338-340.
7. ARNOLD, M., 1968: *Histochemie - Einführung in Grundlagen und Prinzipien der Methoden*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
8. BAGGIOLINI, M., HIRSCH, J. G., und DE DUVE, C., 1970: Further biochemical studies and morphological studies of granula fractions from rabbit heterophil leukocytes. *J. Cell Biol.*, **45**, 586-597.
9. BÄHLER, M., CESURA, A. M., FISCHER, G., KUHN, H., KLEIN, R. L., und DA PRADA, M., 1990: Serotonin organelles of rabbit platelets contain synaptophysin. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 825-829.
10. BAINTON, D. F., und FARQUHAR, G., 1968: Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphnuclear leukocytes. 2. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells. *J. Cell Biol.*, **39**, 299-317.
11. BAINTON, D. F., und FARQUHAR, M. G., 1970: Segregation and packaging of granule enzymes in eosinophilic leukocytes. *J. Cell Biol.*, **45**, 54-73.
12. BAK, I. J., MAY, B., und HASSLER, R., 1969: Electron microscopical demonstration of acid phosphatase in blood platelets. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.*, **96**, 641-648.
13. BANERJEE, K. K., und SEN, A., 1981: Purification and properties of a lectin from the seeds of croton-tiglium with hemolytic-activity toward rabbit red-cells *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 740-753.
14. BANKS, W. J., 1986: *Applied Veterinary Histology*. 2. Aufl. Baltimore: Williams & Wilkins.
15. BARTON, J. C., PARMLEY, R. T., BUTLER, T. W., WILLIAMSON, S., MACKENZIE, S., CHANDLER, D. B., BLACKBURN, W., und HECK, L. W., 1988: Neutrophil lactoferrin content - variation among mammals. *Anat. Rec.*, **221**, 567-575.
16. BAST, B., CATTY, D., MANTENSLINGERLAND, R., JANSEN, J. T. G., VELDHUIS, D. H., ROHOLL, P., und BALLIEUX, R. E., 1979: Surface Ig on rabbit lymphocytes - rabbit B-cells and T-cells are distinct populations *Eur. J. Immunol.*, **9**, 997-1003.
17. BENES, P., MACECKOVA, V., ZDRAHAL, Z., KONECNA, H., ZAHRADNICKOVA, E., MUZIK, J., und SMARDA, J., 2006: Role of vimentin in regulation of monocyte/macrophage differentiation. *Differentiation*, **74**, 265-276.

18. BENSON, K. G., und PAUL-MURPHY, J., 1999: Clinical pathology of the domestic rabbit. Acquisition and interpretation of samples. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, **2**, 539-551.
19. BENTFELD, M. E., und BAINTON, D. F., 1975a: CYTOCHEMICAL-LOCALIZATION OF LYSOSOMAL ENZYMES IN RAT MEGAKARYOCYTES AND PLATELETS. *Journal of Clinical Investigation*, **56**, 1635-1649.
20. BENTFELD, M. E., und BAINTON, D. F., 1975b: Cytochemical localization of lysosomal enzymes in rat megakaryocytes and platelets. *J. Clin. Invest.*, **56**, 1635-1649.
21. BENVENISTE, J., EGIDO, J., GUTIERREZMILLET, V., und CAMUSSI, G., 1977: Detection of immediate hypersensitivity in rabbits by direct basophil degranulation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **59**, 271-279.
22. BIENZLE, D., 2000: Monocytes and Makrophages. In: *Schalm's veterinary hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 318-325.
23. BILLADEAU, D. D., NOLZ, J. C., und GOMEZ, T. S., 2007: Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 131-143.
24. BLACK, D. M., GILARDI, K. V. K., HAMILTON, L. P., WILLIAMS, E., WILLIAMS, D. F., KELLY, P. A., und GARDNER, I., 2009: Hematologic and biochemistry reference values for the endangered riparian brush rabbit (*sylvilagus bachmani riparius*). *J. Wildl. Dis.*, **45**, 491-496.
25. BLOCKER, A., GRIFFITHS, G., OLIVO, J. C., HYMAN, A. A., und SEVERIN, F. F., 1998: A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *J. Cell Sci.*, **111**, 303-312.
26. BØG-HANSEN, T. C., 1973: Crossed immuno-affinoelectrophoresis - analytical method to predict result of affinity chromatography. *Anal. Biochem.*, **56**, 480-488.
27. BORGERS, M., und VERHEYEN, A., 1985: Enzyme cytochemistry. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, **95**, 163-227.
28. BORTOLOTTI, A., CASTELLI, D., und BONATI, M., 1989: Hematology and serum chemistry values of adult, pregnant and newborn New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab. Anim. Sci.*, **39**, 437-439.
29. BOSEILA, A. W. A., 1959: Normal count and physiological variability of rabbit blood basophils. *Experientia*, **15**, 149-150.
30. BOYD, W. C., und SHAPLEIGH, E., 1954: Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, **119**, 419-419.
31. BRODERSEN, R., BIJLSMA, F., GORI, K., JENSEN, K. T., CHEN, W., DOMINGUEZ, J., HAVERSON, K., MOORE, P. F., SAALMULLER, A., SACHS, D., SLIERENDRECHT, W. J., STOKES, C., VAINIO, O., ZUCKERMANN, F., und AASTED, B., 1998: Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **64**, 1-13.
32. CAMPBELL, T. W., und ELLIS, C. K., 2007: *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3. Aufl. Ames, Iowa: Blackwell.
33. CASSIMERIS, L., PRYER, N. K., und SALMON, E. D., 1988: Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.*, **107**, 2223-2231.
34. CASTLE, W. E., und KEELER, C. E., 1933: Blood group inheritance in the rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **19**, 92-98.
35. CHENOWETH, D. E., LANE, T. A., ROWE, J. G., und HUGLI, T. E., 1980: Quantitative comparisons of neutrophil chemotaxis in 4 animal species. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **15**, 525-535.
36. CHOI, E., 1997: Regulation of Proplatelet and Platelet Formation In Vitro. In: *Thrombopoiesis and Thrombopoietins: Molecular, Cellular, Preclinical and Clinical Biology*, (D. J. KUTER, P. HUNT, W. SHERIDAN, und D. ZUCKER-FRANKLIN, Hrsg.). New Jersey, Humana Press. S. 271-284.

37. CLARK, J. M., ALTMAN, G., und FROMOWITZ, F. B., 1977: Basophil hypersensitivity response in rabbits. *Infect. Immun.*, **15**, 305-312.
38. COHEN, C., und TISSOT, R. G., 1974: Specialized Research Applications: II. Serological Genetics. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*, (S. H. WEISBROTH, R. E. FLATT, und A. L. KRAUS, Hrsg.). New York, San Francisco, London, Academic Press. S. 167-178.
39. COHEN, W. D., 1991: The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. *Int. Rev. Cytol.*, **130**, 37-84.
40. COONEY, D. P., und SMITH, B. A., 1965: Maturation time of rabbit megakaryocytes. *Br. J. Haematol.*, **11**, 484-487.
41. COONS, A. H., CREECH, H. J., und JONES, R. N., 1941: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*, 200-202.
42. COOPER, H. S., 1984: Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry - the peanut (arachis-hypogaea) lectin. *Hum. Pathol.*, **15**, 904-906.
43. CUMMINGS, R. D., 1997: Lectins as Tools for Glycoconjugate Purification and Characterization. In: *Glycosciences: Status and Perspectives*, (H.-J. GABIUS, und S. GABIUS, Hrsg.). Weinheim, Chapman & Hall S. 191-200.
44. DA PRADA, M., RICHARDS, J. G., und KETTLER, R., 1981: Amine Storage Organelles in Platelets. In: *Platelets in Biology and Pathology - 2*, (GORDON, Hrsg.). Elsevier. S. 107-145.
45. DAM, T., GABIUS, H. J., ANDRÉ, S., KALTNER, H., LENSCH, M., und BREWER, C., 2005: Galectins bind to the multivalent glycoprotein asialofetuin with enhanced affinities and a gradient of decreasing binding constants. *Biochemistry*, **44**, 12564-12571.
46. DAVIS, R. B., und WHITE, J. G., 1968: Localization of 5-Hydroxytryptamine in Blood Platelets: An Autoradiographic and Ultrastructural Study. *Br. J. Haematol.*, **15**, 93-99.
47. DAVIS, W. C., und HAMILTON, M. J., 2008: Use of flow cytometry to develop and characterize a set of monoclonal antibodies specific for rabbit leukocyte differentiation molecules. *J. Vet. Sci.*, **9**, 51-66.
48. DAY, M. J., 2000: Biology of Lymphocytes and Plasma Cells. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 240-246.
49. DE SMET, W., VAECK, M., SMET, E., BRYSS, L., und HAMERS, R., 1983: Rabbit leukocyte surface-antigens defined by monoclonal antibodies *Eur. J. Immunol.*, **13**, 919-928.
50. DEANE, H. W., BARRNETT, R. J., und SELIGMAN, A. M., 1960: *Handbuch der Histochemie VIII/1 - Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität*. Stuttgart: Gustav-Fischer-Verlag.
51. DENK, H., 1989: Immunhistochemische Färbemethoden. In: *Romeis, Mikroskopische Technik*, 17., neubearbeitete Aufl. (P. BÖCK, Hrsg.). München, Wien, Baltimore, Urban & Schwarzenberg. S. 251-262.
52. DHAR, A., und GANGULY, P., 1988: Lectin fractionation of rabbit blood platelets isolation of subpopulations of different ages. In: *Jamieson, G. A. S.* 77-82.
53. DJILALI, S., PARODI, A. L., und LEVY, D., 1987: Wheat-germ-agglutinin (WGA) - a bovine T-lymphocyte marker. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **16**, 151-154.
54. DODDS, J. W., 2000: Rabbit and Ferret Hemostasis. In: *Laboratory Medicine - Avian and Exotic Pets*, (A. M. FUDGE, Hrsg.). Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokio, W.B. Saunders Company. S. 285-290.
55. DUNN, W. B., HARDIN, J. H., und SPICER, S. S., 1968: Ultrastructural localization of myeloperoxidase in human neutrophil and rabbit heterophil and eosinophil leukocytes. *Blood*, **32**, 935-944.
56. EGUCHI, M., 1991: Comparative electron-microscopy of basophils and mast cells, in vivo and in vitro. *Electron Microsc. Rev.*, **4**, 293-318.
57. EHRLICH, P., 1879: Über die spezifischen Granulationen des Blutes. *Arch. Anat. Physiol. Physiol.*, 571-579.

58. ELSBACH, P., WEISS, J., FRANSON, R. C., BECKERDITEQUAGLIATA, S., SCHNEIDER, A., und HARRIS, L., 1979: Separation and purification of a potent bactericidal-permeability-increasing protein and a closely associated Phospholipase-A₂ from rabbit polymorphnuclear leukocytes - observations on their relationship. *J. Biol. Chem.*, **254**, 1000-1009.
59. ERIKSSON, J. E., HE, T., TREJO-SKALLI, A. V., HARMALA-BRASKEN, A. S., HELLMAN, J., CHOU, Y. H., und GOLDMAN, R. D., 2004: Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J. Cell Sci.*, **117**, 919-932.
60. ETO, T., ICHIKAWA, Y., NISHIMUR.K, ANDO, S., und YAMAKAWA, T., 1968: Chemistry of lipid of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. 16. Occurrence of ceramide pentasaccharide in membrane of erythrocytes and reticulocytes of rabbit. *J. Biochem.*, **64**, 205-213.
61. EWRINGMANN, A., 2005: *Leitsymptome beim Kaninchen: Diagnostischer Leitfaden und Therapie*. Stuttgart: Enke Verlag.
62. FELTNER, D. E., SMITH, R. H., und MARASCO, W. A., 1986: Characterization of the plasma-membrane bound GTPase from rabbit neutrophils. 1. Evidence for an NI-like protein coupled to the formyl-peptide, C5A, and leukotriene-B₄ chemotaxis receptors. *J. Immunol.*, **137**, 1961-1970.
63. FERENCIK, M., STEFANOVIC, J., und KOTULOVA, D., 1982: The activities of elastase and other lysosomal enzymes in professional phagocytes and mechanism of their release. *Acta biol. med. germ.*, **41**, 31-34.
64. FETTERS, M. D., 1972: Hematology of the black-tailed jack rabbit (*Iepus californicus californicus*). *Lab. Anim. Sci.*, **22**, 546-548.
65. FEY, F., und KUNTZE, A., 1970: Zytochemische Untersuchungen an Blutzellen in der vergleichenden Hämatologie. *Folia Haematol (Leipz)*, **93**, 241-248.
66. FOWLER, V. M., DAVIS, J. Q., und BENNETT, V., 1985: Human-erythrocyte myosin - identification and purification. *J. Cell Biol.*, **100**, 47-55.
67. FOX, R. R., und LAIRD, C. W., 1970: Diurnal variations in rabbits - hematological parameters. *Am. J. Physiol.*, **218**, 1609-1612.
68. FRANZ, H., 1990: 100 years of lectin research. *Naturwissenschaften*, **77**, 103-109.
69. FREUND, M., 2008: *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*. 11. Aufl. München: Urban & Fischer.
70. FUDGE, A. M., 2000: *Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets*. Philadelphia: Saunders.
71. GABIUS, H.-J., UHLENBRUCK, G., und RÜDIGER, H., 1988: Lektine. *Spektrum der Wissenschaft*, 50-80.
72. GABIUS, H. J., 2008: Glycans: bioactive signals decoded by lectins. *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 1491-1496.
73. GABIUS, H. J., 2011: Glycobiomarkers by glycoproteomics and glycan profiling (glycomics): emerge of functionality. *Biochem. Soc. Trans.*, **39**, 399-405.
74. GABIUS, H. J., ANDRÉ, S., JIMÉNEZ-BARBERO, J., ROMERO, A., und SOLIS, D., 2011: From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences*, **36**, 298-313.
75. GABIUS, H. J., SIEBERT, H. C., ANDRE, S., JIMENEZ-BARBERO, J., und RUDIGER, H., 2004: Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem*, **5**, 740-764.
76. GARDNER, K., und VANN BENNETT, G., 1989: Recently Identified Erythrocyte Membran-Skeletal Proteins and Interactions: Implications for Structure and Function. In: *Red Blood Cell Membranes: Structure, Function, Clinical Implications*, (P. AGRE, und J. C. PARKER, Hrsg.). New York, Marcel Dekker Inc. S. 1-30.
77. GASPER, P. W., 2000: The Hemopoietic System. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 63-73.

78. GASSMANN, M., und LUTZ, A. M., 2005a: Zelluläre Bestandteile. In: *Physiologie der Haustiere*, 2., völlig neu bearbeitete Aufl. (W. VON ENGELHARDT, und G. BREVES, Hrsg.). Stuttgart, Enke Verlag. S. 198-206.
79. GASSMANN, M., und LUTZ, T. A., 2005b: Funktionen des Blutes. In: *Physiologie der Haustiere*, 2. Aufl. (W. VON ENGELHARDT, und G. BREVES, Hrsg.). Stuttgart, Enke Verlag. S. 193.
80. GATTERMANN, R., 1978a: Biorythmic in rabbit (*Oryctolagus cuniculus* (L) F domestica). 3. Influence of 2 Zeitgeber on circadian-rhythms of behavior and hematological parameters. *Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere*, **82**, 354-360.
81. GATTERMANN, R., 1978b: Biorythmic of rabbit (*O-cuniculus* (L) F domestica). 2. Circadian-rhythms of hematocrit, hemoglobin, leukocytes and blood-glucose. *Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere*, **82**, 234-243.
82. GEIGER, B., 1983: Membrane-cytoskeleton interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 305-341.
83. GERSHWIN, L. J., 2008: Clinical Veterinary Immunology. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*, 6. Aufl. (J. J. KANEKO, Hrsg.). Amsterdam, Elsevier. S. 157-172.
84. GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., und SHARON, N., 1980: What should be called a lectin? *Nature*, **285**, 66-66.
85. GOLDSTEIN, I. J., und PORETZ, R. D., 1986: Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins. In: *The Lectins - Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*, (I. E. LIENER, N. SHARON, und I. J. GOLDSTEIN, Hrsg.). Orlando, Academic Press. S. 35-250.
86. GOTO, Y., HOGG, J. C., SUWA, T., QUINLAN, K. B., und VAN EEDEN, S. F., 2003: A novel method to quantify the turnover and release of monocytes from the bone marrow using the thymidine analog 5'-bromo-2'-deoxyuridine. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, **285**, C253-C259.
87. GYOEVA, F. K., und GELFAND, V. I., 1991: Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature*, **353**, 445-448.
88. HAAS, H., FALCONE, F. H., SCHRAMM, G., HAISCH, K., GIBBS, B. F., KLAUCKE, J., POPPELMANN, M., BECKER, W. M., GABIUS, H. J., und SCHLAACK, M., 1999: Dietary lectins can induce in vitro release of IL-4 and IL-13 from human basophils. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 918-927.
89. HABERMANN, F., ANDRÉ, S., KALTNER, H., KÜBLER, D., SINOWATZ, F., und GABIUS, H. J., 2011: Galectins as tools for glycan mapping in histology: comparison of their binding profiles to the bovine zona pellucida by confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cell Biol*, **135**, 539-552.
90. HARCOURT-BROWN, F., 2008: *Textbook of Rabbit Medicine*. Edinburgh: Butterworth-Heinemann.
91. HARDIN, J. H., und SPICER, S. S., 1971: Ultrastructural localization of dialyzed iron-reactive mucosubstance in rabbit heterophils, basophils, and eosinophils. *J. Cell Biol.*, **48**, 368-386.
92. HARKNESS, J. E., und WAGNER, J. E., 1995: *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. 4. Aufl. Baltimore: Williams & Wilkins.
93. HARTWIG, J. H., 2006: The Platelet Cytoskeleton. In: *Platelets*, 2. Aufl. (A. D. MICHELSON, Hrsg.). Burlington, San Diego, London, Academic Press. S. 75-97.
94. HARVEY, J. W., 2008: The Erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical Disorders. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*, 6. Aufl. (J. J. KANEKO, J. W. HARVEY, und M. L. BRUSS, Hrsg.). Amsterdam, Elsevier. S. 173.
95. HASHIZUME, T., TANIGUCHI, M., SATO, T., und FUJII, T., 1994: Arachidonic acid liberation induced by phosphatidic acid endogenously generated from membrane phospholipids in rabbit platelets. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, **1221**, 179-184.

96. HASKOVEC, C., und KINKOR, M., 1976: Interactions of lectins with surface-membrane receptors of animal-cells. 1. Factors responsible for agglutinability of human, rabbit and sheep erythrocytes with concanavalin-a. *Folia Biol.-Prague*, **22**, 225-234.
97. HAWKEY, C. M., und DENNETT, T. B., 1990: *Farbatlas der Hämatologie*. Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei.
98. HEIN, J., und HARTMANN, K., 2003: Labordiagnostische Referenzbereiche bei Kaninchen. *Tierärztliche Praxis*, **31**, 321-328.
99. HEIN, J., und HARTMANN, K., 2005: Labordiagnostik bei Kaninchen und Meerschweinchen. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 6. Aufl. (W. KRAFT, und U. M. DÜRR, Hrsg.). Stuttgart, Schattauer. S. 479-488.
100. HENNEMANN, H. H., HASTKA, J., und WEISS, A., 1991: *Hämatologie und internistische Zytologie*. Stuttgart, New York: Schattauer.
101. HERMANSKY, F., LODROVA, V., und POSSNEROVA, V., 1970: Zytochemische Untersuchungen an Leukozyten bei einigen Laboratoriums- und Haustieren. *Folia Haematol (Leipz)*, **93**, 249-258.
102. HEWITT, C. D., INNES, D. J., SAVORY, J., und WILLS, M. R., 1989: Normal biochemical and hematological values in new zealand white rabbits. *Clin. Chem.*, **35**, 1777-1779.
103. HINTON, M., JONES, D. R. E., und FESTING, M. F. W., 1982: Hematological findings in healthy and diseased rabbits, a multivariate-analysis. *Lab. Anim.*, **16**, 123-129.
104. HIRATA, M., SHIMOMURA, Y., YOSHIDA, M., MORGAN, J. G., PALINGS, I., WILSON, D., YEN, M. H., WRIGHT, S. C., und LARRICK, J. W., 1994: Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. *Infect. Immun.*, **62**, 1421-1426.
105. HORN, R. G., und SPICER, S. S., 1964: Sulfated mucopolysaccharide + basic protein in certain granules of circulating heterophils of rabbits during endotoxin-induced leukocytosis. *Am. J. Pathol.*, **44**, 905-919.
106. HORWITZ, D. A., ALLISON, A. C., WARD, P., und KIGHT, N., 1977: Identification of human mononuclear leukocyte populations by esterase staining. *Clin. Exp. Immunol.*, **30**, 289-298.
107. HUANG, C. K., und DEVANNEY, J. F., 1986: GTP-gamma-S-induced solubilization of actin and myosin from rabbit peritoneal neutrophil membrane. *FEBS Lett.*, **202**, 41-44.
108. HULOT, J., und RAMOND, E., 1901: Anémie post-hémorragique. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **53**, 813-815.
109. HUNYADI, V., CHRETIEN, D., und JANOSI, I. M., 2005: Mechanical stress induced mechanism of microtubule catastrophes. *J. Mol. Biol.*, **348**, 927-938.
110. IVASKA, J., PALLARI, H. M., NEVO, J., und ERIKSSON, J. E., 2007: Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.*, **313**, 2050-2062.
111. JACKSON, S., CHUSED, T. M., WILKINSON, J. M., LEISERSON, W. M., und KINDT, T. J., 1983: Differentiation antigens identify subpopulations of rabbit lymphocyte-T and lymphocyte-B-definition by flow-cytometry. *J. Exp. Med.*, **157**, 34-46.
112. JAIN, N. C., 1968: Alkaline phosphatase activity in leukocytes of some animal species. *Acta Haematol.*, **39**, 51-59.
113. JAIN, N. C., 1969: Glycogen content of leukocytes of some animal species. *Acta Haematol.*, **41**, 249-253.
114. JAIN, N. C., 1993: *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febinger.
115. JEGATHEESAN, G., SIVAKUMAR, T., und MURUGAN, M., 2006: Hematological study of new zealand white rabbits under different feeding systems. *Indian Vet. J.*, **83**, 1116-1117.
116. JEKLOVA, E., LEVA, L., KNOTIGOVA, P., und FALDYNA, M., 2009: Age-related changes in selected haematology parameters in rabbits. *Res. Vet. Sci.*, **86**, 525-528.
117. JENKINS, J. R., 2000: Rabbit and Ferret Liver and Gastrointestinal Testing. In: *Laboratory Medicine - Avian and Exotic Pets*, (A. M. FUDGE, Hrsg.). Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokio, W.B. Saunders Company. S. 291-304.

118. JENKINS, J. R., 2008: Rabbit diagnostic testing. *J. Exot. Pet Med.*, **17**, 4-15.
119. JI, T. H., KIEHM, D. J., und MIDDAUGH, G. R., 1980: Presence of spectrin tetramer on the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2990-2993.
120. KABATA, J., GRATWOHL, A., TICHELLI, A., JOHN, L., und SPECK, B., 1991: Hematological values of new zealand white rabbits by automated flow cytometry. *Lab. Anim. Sci.*, **41**, 613-619.
121. KARLSON, P., DOENECKE, D., KOOLMANN, J., FUCHS, G., und GEROK, W., 2005: *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 5. überarb. u. neugestaltete Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag.
122. KASPERS, B., und GÖBEL, T., 2005a: Hämostase. In: *Physiologie der Haustiere*, 2. Aufl. (W. VON ENGELHARDT, und G. BREVES, Hrsg.). Stuttgart, Enke Verlag S. 207-212.
123. KASPERS, B., und GÖBEL, T., 2005b: Immunabwehr und Blutgruppen. In: *Physiologie der Haustiere*, 2., völlig neu bearbeitete Aufl. (W. VON ENGELHARDT, und G. BREVES, Hrsg.). Stuttgart, Enke Verlag. S. 213-229.
124. KELLNER, A., und HEDAL, E. F., 1952: Experimental erythroblastosis fetalis. *Am. J. Pathol.*, **28**, 539-540.
125. KERMODE, J. C., MUTHUKUMARASWAMY, N., und FREER, R. J., 1988: Characteristics of binding of a potent chemotactic formyl tetrapeptide, formylmethionyl-leucyl-phenylalanyl-phenylalanine, to the receptors on rabbit neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, **43**, 420-428.
126. KHISMATULLIN, D. B., 2009: The Cytoskeleton and Deformability of White Blood Cells. In: *Leukocyte Adhesion*, Vol. 64. San Diego, Elsevier Academic Press Inc. S. 47-111.
127. KIM, J. C., YUN, H. I., CHA, S. W., KIM, K. H., KOH, W. S., und CHUNG, M. K., 2002: Haematological changes during normal pregnancy in New Zealand White rabbits: a longitudinal study. *Comp. Clin. Path.*, **11**, 98-106.
128. KLUT, M. E., WHALEN, B. A., und HOGG, J. C., 2000: Flow cytometric analysis of defensins in blood and marrow neutrophils. *Eur. J. Haematol.*, **64**, 114-120.
129. KOMIYAMA, A., und SPICER, S. S., 1974: Ultrastructural localization of a characteristic acid phosphatase in granules of rabbit basophils. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1092-1104.
130. KORN, E. D., 1982: Actin polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells. *Physiol. Rev.*, **62**, 672-737.
131. KORN, E. D., und HAMMER, J. A., 1988: Myosins of nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **17**, 23-45.
132. KOTANI, M., YAMAMURA, Y., TAMATANI, T., KITAMURA, F., und MIYASAKA, M., 1993: Generation and characterization of monoclonal-antibodies against rabbit CD4-antigen CD5-antigen and CD11a-antigen. *J. Immunol. Methods*, **157**, 241-252.
133. KOURY, S. T., KOURY, M. J., und BONDURANT, M. C., 1989: Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J. Cell Biol.*, **109**, 3005-3013.
134. KOZMA, C., MACKLIN, W., CUMMINS, L. M., und MAUER, R., 1974: Anatomy, Physiology, and Biochemistry of the Rabbit. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*, (S. H. WEISBROTH, R. E. FLATT, und A. L. KRAUS, Hrsg.). New York, Academic Press. S. 49-72.
135. KRAFT, W., DÜRR, U. M., FÜRLL, M., BORSTEDT, H., und HEINRITZI, K., 2005: Hämatologie. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 6. Aufl. (W. KRAFT, und U. M. DÜRR, Hrsg.). Stuttgart, Schattauer. S. 49-114.
136. KRIESTEN, K., MURAWSKI, U., und SCHMIDTMANN, W., 1987: Haematological values during normal reproduction of the maternal and the fetal rabbit. *Comp. Biochem. Physiol.*, **87**, 479-485.

137. KRZEMINSKI, M., SINGH, T., ANDRÉ, S., LENSCH, M., WU, A., BONVIN, A., und GABIUS, H. J., 2011: Human galectin-3 (Mac-2 antigen): defining molecular switches of affinity to natural glycoproteins, structural and dynamic aspects of glycan binding by flexible ligand docking and putative regulatory sequences in the proximal promoter region. *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 150-161.
138. LAIRD, C. W., FOX, R. R., MITCHELL, B. P., BLAU, E. M., und SCHULTZ, H. S., 1970: Effect of strain and age on some hematological parameters in rabbit. *Am. J. Physiol.*, **218**, 1613-1617.
139. LEBIEN, T. W., 2001: Lymphopoiesis. In: *William's Hematology*, 7. Aufl. (E. BEUTLER, M. LICHTMAN, B. COLLER, T. KIPPS, und U. SELIGSOHN, Hrsg.). McGraw-Hill. S. 1041-1046.
140. LEE, M. C., TURCINOV, D., und DAMJANOV, I., 1987: Lectins as markers for eosinophilic leukocytes. *Histochemistry*, **86**, 269-273.
141. LENORMAND, G., und FREDBERG, J. J., 2006: Deformability, dynamics, and remodeling of cytoskeleton of the adherent living cell. *Biorheology*, **43**, 1-30.
142. LEPITZKI, D. A. W., und WOOLF, A., 1991: Hematology and serum chemistry of cottontail rabbits of southern illinois. *J. Wildl. Dis.*, **27**, 643-649.
143. LESTER, V. K., TARPLEY, H. L., und LATIMER, K. S., 2005: Small mammal hematology - leukocyte identification in rabbits and guinea pigs. Athens.
144. LEVEN, R. M., 2000: Megakaryocytes. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 443-447.
145. LEVINE, P., und LANDSTEINER, K., 1929: On immune isoagglutinins in rabbits. *J. Immunol.*, **17**, 559-565.
146. LEVINE, P., und LANDSTEINER, K., 1931: On immune isoagglutinins in rabbits - second paper. *J. Immunol.*, **21**, 513-515.
147. LEVITZ, S. M., SELSTED, M. E., GANZ, T., LEHRER, R. I., und DIAMOND, R. D., 1986: Invitro killing of spores and hyphae of aspergillus-fumigatus and rhizopus-oryzae by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *J. Infect. Dis.*, **154**, 483-489.
148. LICHTENBERGER, M., 2004: Transfusion medicine in exotic pets. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, **19**, 88-95.
149. LIU, L. P., SHAN, C. W., LIU, X. H., XIAO, H. C., und YANG, S. Q., 1998: Effect of procainamide on ultrastructure of blood platelet in rabbits. *Acta Pharmacol. Sin.*, **19**, 376-379.
150. LOHR, M., KALTNER, H., SCHWARTZ-ALBIEZ, R., SINOWATZ, F., und GABIUS, H. J., 2010: Towards Functional Glycomics by Lectin Histochemistry: Strategic Probe Selection to Monitor Core and Branch-end Substitutions and Detection of Cell-type and Regional Selectivity in Adult Mouse Testis and Epididymis. *Anat. Histol. Embryol.*, **39**, 481-493.
151. LOJDA, Z., GOSSRAU, R., und SCHIEBLER, T. H., 1979: *Enzyme Histochemistry: A Laboratory Manual*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
152. LUPPA, H., 1986: Prinzipien immunhistochemischer Methoden. In: *Handbuch der Histochemie IV Teil 2 - Immunreaktionen in der Histochemie*, (W. GRAUMANN, und K. NEUMANN, Hrsg.). Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag. S. 83-188.
153. MAHLBERG, R., GILLES, A., und LÄSCH, A., 2004: *Hämatologie: Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe*. 2., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
154. MARSHALL, K. L., 2008: Rabbit hematology. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, **11**, 551-567.
155. MARTYS, J. L., HO, C. L., LIEM, R. K. H., und GUNDERSEN, G. G., 1999: Intermediate filaments in motion: Observations of intermediate filaments in cells using green fluorescent protein-vimentin. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1289-1295.

156. MCLAUGHLIN, R. M., und FISH, R. E., 1994: Clinical Biochemistry and Hematology. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*, 2. Aufl. (P. MANNING, Hrsg.). San Diego, Academic Press. S. 111-124.
157. MCNICHOLAS, J. M., WATKINS, J. R., JOHNSON, A. D., und KNIGHT, K. L., 1981: Functional-studies of rabbit lymphocyte-T. *Immunology*, **43**, 635-641.
158. MEDINA, M. B., 1990: Selective inhibition of lectin induced rabbit erythrocyte agglutination by hydrolysates of skeletal beef protein. *J. Food Sci.*, **55**, 867.
159. MELILLO, A., 2007: Rabbit clinical pathology. *J. Exot. Pet Med.*, **16**, 135-145.
160. MÉRANT, C., MESSOUAK, A., CADORÉ, J. L., und 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. *Glycoconjugate J.*, **22**, 27-34.
161. MEYERS, K. M., HOLMSEN, H., und SEACHORD, C. L., 1982: Comparative study of platelet dense granule constituents.
162. MICHEEV, A., und SUCHANOV, A., 1972: Cytochemical studies of leukocyte acid phosphatase part 2 leukocyte acid phosphatase in man and laboratory animals. *Folia Haematol (Leipz)*, **98**, 163-174.
163. MISCHKE, R., 2005: *Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.
164. MITCHISON, T., und KIRSCHNER, M., 1984: Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, **312**, 237-242.
165. MITRUKA, B. M., und RAWNSLEY, H. M., 1981: *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans*. 2. Aufl. New York: Masson.
166. MOISE, K. J., RODKEY, L. S., SAADE, G. R., DURE, M., DORMAN, K., MAYES, M., und GRAHAM, A., 1995: An animal-model for hemolytic-disease of the fetus and newborn. 2. Fetal effects in New-Zealand rabbits. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **173**, 747-753.
167. MONSIGNY, M., ROCHE, A. C., SENE, C., MAGETDANA, R., und DELMOTTE, F., 1980: Sugar-lectin interactions - how does wheat-germ-agglutinin bind sialoglycoconjugates. *Eur. J. Biochem.*, **104**, 147-153.
168. MONSIGNY, M., SENE, C., OBRENOVITCH, A., ROCHE, A. C., DELMOTTE, F., und BOSCHETTI, E., 1979: Properties of succinylated wheat-germ-agglutinin. *Eur. J. Biochem.*, **98**, 39-45.
169. MOORE, D. M., 2000: Hematology of Rabbits. In: *Schalm's veterinary hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 1100-1106.
170. MOORE, P. F., und VERNAU, W., 2000: Lymphocytes: Differentiation Molecules in Diagnosis and Prognosis. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 247-255.
171. MOSIMANN, W., und KOHLER, T. (Hrsg.) (1990) *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*, Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey.
172. MULISCH, M., und WELSCH, U. (Hrsg.) (2010) *Romeis - Mikroskopische Technik*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
173. MURATA, F., NAGATA, T., und SPICER, S. S., 1975: Fine structural localization of arylsulfatase b activity in the rabbit blood platelets. *Histochemistry*, **44**, 307-312.
174. MURATA, F., YOSHIDA, K., OHNO, S., und NAGATA, T., 1978: Ultrastructural localization of glycogen in the granulocytes of normal rabbit bone marrow. *Histochemistry*, **58**, 103-111.
175. MUSZBEK, L., ADANY, R., GLUKHOVA, M. A., FRID, M. G., KABAKOV, A. E., und KOTELIANSKY, V. E., 1987: The identification of vimentin in human blood platelets. *Eur. J. Cell Biol.*, **43**, 501-504.
176. NACHTSHEIM, H., 1950: The Pelger-anomaly in man and rabbit - a mendelian character of the nuclei of the leukocytes. *J. Hered.*, **41**, 131-137.

177. NAGATA, T., 2001: Special cytochemistry in cell biology. In: *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol. 211. San Diego, Academic Press Inc. S. 33-151.
178. NEPPERT, J., VON WITZLEBEN-SCHURHOLZ, E., ZUPANSKA, B., BARTZ, L., GREVE, O., EICHLER, H., KEROWGAN, M., WICHMANN, M. G., und STUDY PROTECTIVE MATERNAL, H. L. A. A., 1999: High incidence of maternal HLA A, B and C antibodies associated with a mild course of haemolytic disease of the newborn. *Eur. J. Haematol.*, **63**, 120-125.
179. NICHOLS, B. A., BAINTON, D. F., und FARQUHAR, M. G., 1971: Differentiation of monocytes - origin, nature, and fate of their azurophilic granules. *J. Cell Biol.*, **50**, 498-515.
180. NICOLSON, G. L., 1974: Interactions of lectins with animal-cell surfaces. *Int. Rev. Cyt.*, **39**, 89-190.
181. NIEMINEN, M., HENTTINEN, T., MERINEN, M., MARTTILA-ICHIHARA, F., ERIKSSON, J. E., und JALKANEN, S., 2006: Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 156-162.
182. NISHI, N., SHOJI, H., SEKI, M., ITOH, A., MIYANAKA, H., YUUBE, K., HIRASHIMA, M., und NAKAMURA, T., 2003: Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alpha M. *Glycobiology*, **13**, 755-763.
183. NURDEN, A. T., BUTCHER, P. D., und HAWKEY, C. M., 1977: Comparative studies on glycoprotein composition of mammalian platelets. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, **56**, 407-413.
184. OGAWA, H., und GALILI, U., 2006: Profiling terminal N-acetyllactosamines of glycans on mammalian cells by an immuno-enzymatic assay. *Glycoconjugate J.*, **23**, 663-674.
185. OKA, K., MIYAZAKI, M., und KOJIMA, M., 1982: An electronmicroscopical study on peroxidase activity of rabbit monocytes, resident and exudate macrophages. *Acta Pathol Jpn*, **32**, 445-460.
186. ORYE, E., PLUM, J., und DESMEDT, M., 1984: β -Glucuronidase activity in human lymphocytes-T and lymphocytes-B and the T-mu-subpopulations and T-gamma-subpopulations. *Histochemistry*, **81**, 287-290.
187. OSBALDISTON, G. W., und SULLIVAN, R. J., 1978a: Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **39**, 683-685.
188. OSBALDISTON, G. W., und SULLIVAN, R. J., 1978b: The cytochemistry of rabbit peripheral blood leukocytes. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*, **105**, 646-655.
189. ÖZCAN, Z., 2005: Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in the peripheral blood leukocytes in Angora rabbits. *Turk J Vet Anim Sci*, **29**, 881-884.
190. PACKHAM, M. A., RAND, M. L., und KINLOUGHRATHBONE, R. L., 1992: Similarities and differences between rabbit and human platelet characteristics and functions. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103A**, 35-54.
191. PARMLEY, R. T., 1988: Mammals. In: *Vertebrate Blood Cells*, (A. F. ROWLEY, und N. A. RATCLIFFE, Hrsg.). Cambridge, Cambridge University Press. S. 337-424.
192. PARMLEY, R. T., EGUCHI, M., und SPICER, S. S., 1979: Ultrastructural cytochemistry of complex carbohydrates in leukocyte granules. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1167-1170.
193. PARMLEY, R. T., MARTIN, B. J., und SPICER, S. S., 1973: Staining of blood-cell surfaces with a lectin-horseradish peroxidase method. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 912-922.
194. PARMLEY, R. T., TAKAGI, M., SPICER, S. S., THRASHER, A., und DENYS, F. R., 1982: Ultrastructural visualization of complex carbohydrates in eosinophilic leukocytes. *American Journal of Anatomy*, **165**, 53-67.
195. PASINI, E. M., LUTZ, H. U., MANN, M., und THOMAS, A. W., 2010: Red blood cell (RBC) membrane proteomics - Part I: Proteomics and RBC physiology. *J. Proteomics*, **73**, 403-420.

196. PEARCE, L., und CASEY, A. E., 1930: Studies in the blood cytology of the rabbit I. Blood counts in normal rabbits. *J. Exp. Med.*, **51**, 83-97.
197. PEARSE, A. G. E., 1980: *Histochemistry, Volume one: Preparative and Optical Technology*. 4. Aufl. New York, Edinburgh, London: Churchill Livingstone.
198. PERCY, D. H., und BARTHOLD, S. W., 2007: *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. 3. Aufl. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional.
199. PINDER, J. C., und GRATZER, W. B., 1983: Structural and dynamic states of actin in the erythrocyte. *J. Cell Biol.*, **96**, 768-775.
200. POLJIČAK-MILAS, N., KARDUM-SKELIN, I., VUDAN, M., MARENJAK, T. S., BALLARIN-PERHARIC, A., und MILAS, Z., 2009: Blood cell count analyses and erythrocyte morphometry in New Zealand white rabbits. *Vet. Arh.*, **79**, 561-571.
201. POLLARD, T. D., BLANCHOIN, L., und MULLINS, R. D., 2000: Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.*, **29**, 545-576.
202. POLLARD, T. D., und EARNSHAW, W. C., 2008: *Cell Biology*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
203. POSPISIL, R., KABAT, J., und MAGE, R. G., 2009: Characterization of rabbit CD5 isoforms. *Mol. Immunol.*, **46**, 2456-2464.
204. PSCHYREMBEL, W., 2007: Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. 261. Aufl., Walter de Gruyter.
205. PURVIS, G. M., und SEWELL, M. M. H., 1973: Leukocyte counts in normal young rabbits. *Br. Vet. J.*, **129**, 47-51.
206. QUESENBERRY, K. E. (Hrsg.) (2004) *Ferrets, Rabbits, and Rodents, Clinical Medicine and Surgery; Includes Sugar Gliders and Hedgehogs*, St. Louis, Saunders.
207. RAFFEL, C., und SELL, S., 1982: Heterogeneity of rabbit lymphocyte populations as determined by ultrastructural localization and modulation of lymphocyte surface-receptors for mitogenic lectins (Con A and PHA) and anti-Ig. *Immunobiology*, **163**, 208-208.
208. RAMAN, C., und KNIGHT, K. L., 1992: CD5 + B-cells predominate in peripheral tissues of rabbit. *J. Immunol.*, **149**, 3858-3864.
209. RASKIN, R. E., und VALENCIANO, A., 2000: Cytochemistry of normal leukocytes. In: *Schalm's veterinary hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 337-346.
210. RAUSCH, P. G., und MOORE, T. G., 1975: Granule enzymes of polymorphnuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. *Blood*, **46**, 913-919.
211. REAGAN, W. J. I. R., ARMANDO R.; DENICOLA, D. B. (Hrsg.) (2008) *Veterinary hematology: Atlas of common domestic species and non-domestic species*, Ames Iowa, Blackwell.
212. REED, G. L., HOUNG, A. K., und BIANCHI, C., 1998: Comparative biochemical and ultrastructural studies of P-selectin in rabbit platelets. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, **119**, 729-738.
213. REISNER, Y., BINIAMINOV, M., ROSENTHAL, E., SHARON, N., und RAMOT, B., 1979: Interaction of peanut agglutinin with normal human lymphocytes and with leukemic-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 447-451.
214. REISNER, Y., LIS, H., und SHARON, N., 1976: Importance of binding of lectins to cell-surface receptors at low lectin concentrations. *Exp. Cell Res.*, **97**, 445-448.
215. REYNOLDS, E. S., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 208-212.
216. RICHARDSON, R. L., HINTON, D. M., und CAMPION, D. R., 1983: An improved method for storing and using stains in electron-microscopy. *J. Electron Microsc.*, **32**, 216-218.
217. RICHELME, F., BENOLIEL, A. M., und BONGRAND, P., 1996: The leukocyte actin cytoskeleton. *Bull. Inst. Pasteur*, **94**, 257-284.
218. ROMEIS, B., 1989: *Mikroskopische Technik*. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg.

219. ROTHWELL, S. W., NATH, J., und WRIGHT, D. G., 1989: Interactions of cytoplasmic granules with microtubules in human-neutrophils. *J. Cell Biol.*, **108**, 2313-2326.
220. RÜDIGER, H., 1981: Lectins - behaviour, use and function. *Chem. Unserer Zeit*, **15**, 155-162.
221. RÜDIGER, H., 1982: Phythemagglutinins. *Planta Med.*, **46**, 3-9.
222. RÜDIGER, H., 1998: Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.*, **161**, 130-152.
223. RÜDIGER, H., BURKHARD, B., und GABIUS, H. J., 2010: Pflanzliche Lektine: Vorkommen, Eigenschaften, Analytik und Bewertung ihrer immunmodulatorischen Aktivität. In: *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, 9., überarbeitete und aktualisierte Aufl. (R. HÄNSEL, und O. STICHER, Hrsg.). Heidelberg, Springer Verlag. S. 640-666.
224. RÜDIGER, H., und GABIUS, H.-J., 2001: Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate J.*, **18**, 589-613.
225. RÜDIGER, H., und GABIUS, H. J., 2009a: The History of Lectinology. In: *The Sugar Code - Fundamentals of Glycosciences*, (H. J. GABIUS, Hrsg.). Weinheim, Wiley-Blackwell. S. 261-268.
226. RÜDIGER, H., und GABIUS, H. J., 2009b: Plant Lectins. In: *The Sugar Code - Fundamentals of Glycosciences*, (H. J. GABIUS, Hrsg.). Weinheim, Wiley-Blackwell. S. 301-315.
227. SABIN, F. R., MILLER, F. R., SMITHBURN, K. C., THOMAS, R. M., und HUMMEL, L. E., 1936: Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits. *J. Exp. Med.*, **64**, 97-120.
228. SAITO, H., SALMON, J. A., und MONCADA, S., 1986: Biosynthesis of PDG₂ and TXB₂ by rabbit blood monocytes. *Prostaglandins*, **31**, 477-487.
229. SAKAKIBARA, H., und EGUCHI, M., 1985a: Ultrastructural and ultrazytochemical identification of the small granules in basophils from human and animals. *Blut*, **51**, 385-392.
230. SAKAKIBARA, H., und EGUCHI, M., 1985b: Ultrastructural cytochemistry of glycoconjugates in basophils from human and animals. *Histochemistry*, **83**, 307-313.
231. SANCHEZ-MADRID, F., und SERRADOR, J. M., 2007: Mitochondrial redistribution: adding new players to the chemotaxis game. *Trends Immunol.*, **28**, 193-196.
232. SANDERSON, J. H., und PHILLIPS, C. E., 1981: *An Atlas of Laboratory Animal Haematology*. 4. Aufl. Oxford: Clarendon Pr.
233. SCHÄFER, H. E., HÜBNER, G., und FISCHER, R., 1973: Spezifische Mikrogranula in Eosinophilen. *Acta Haematol.*, **50**, 92-104.
234. SCHERMER, S., 1958: *Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere*. Leipzig: Barth.
235. SCHMALZL, F., und BRAUNSTEINER, H., 1968: Cytochemical presentation of esterase activity in blood and bone marrow cells. *Klin Wochenschr*, **46**, 642.
236. SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W., 1990: Leukocyte biophysics - an invited review. *Cell Biophys.*, **17**, 107-135.
237. SCHMIDT-ULLRICH, R., WALLACH, D. F. H., und HENDRICKS, J., 1976: Interaction of concanavalin A with rabbit thymocyte plasma-membranes distinction between low affinity association and positively cooperative binding mediated by a specific glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **443**, 587-600.
238. SCHMIDT, R. F., LANG, F., und THEWS, G. (Hrsg.) (2005) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Heidelberg, Springer Verlag.
239. SCHRÖDER, B., und DIENER, M., 2005: Grundlagen der Zellphysiologie. In: *Physiologie der Haustiere*, 2., völlig neu bearbeitete Aufl. (W. VON ENGELHARDT, und G. BREVES, Hrsg.). Stuttgart, Enke Verlag. S. 5-21.
240. SCOTT, M. A., und STOCKHAM, S. L., 2000: Basophils and Mast Cells. In: *Schalm's veterinary hematology*, 5th Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 308-317.
241. SEEMAN, P. M., und PALADE, G. E., 1967: Acid phosphatase localization in rabbit eosinophils. *J. Cell Biol.*, **34**, 745-756.

242. SELL, S., 1979: Rabbit immune system - characterization of cell-surface markers and functional properties of rabbit lymphocytes. *Mol. Immunol.*, **16**, 1045-1058.
243. SELSTED, M. E., BROWN, D. M., DELANGE, R. J., HARWIG, S. S. L., und LEHRER, R. I., 1985: Primary structures of 6 antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4579-4584.
244. SHANKLIN, W. M., SHEPPARD, L. B., und BURKE, G. W., 1977: Staining of rabbit eosinophil and pseudo-eosinophil leukocytes. *Acta Anat.*, **97**, 147-150.
245. SHARON, N., und LIS, H., 2004: History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **14**, 53R-62R.
246. SHIMOKAWA, Y., TAKEYA, M., MIYAUCHI, Y., und TAKAHASHI, K., 1990: A monoclonal antibody, RbM2, specific for a lysosomal membrane antigen of rabbit monocyte/macrophages. *Immunology*, **70**, 513-519.
247. SHOTTON, D. M., und BURKE, B. E., 1979: The molecular structure of human erythrocyte spectrin: Biophysical and electron microscopic studies. *J. Mol. Biol.*, **131**, 303-329.
248. SILBERNAGL, S., und DESPOPOULOS, A., 2001: *Taschenatlas der Physiologie*. 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
249. SILVER, M. D., und MCKINSTRY, J., 1967: Morphology of mikrotubules in rabbit platelets. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, **81**, 12-17.
250. SILVER, M. D., und SILVER, M. M., 1971: Observations on morphology of rabbit blood platelets. *Pathology*, **3**, 203-207.
251. SINOWATZ, F., und HEES, H. (Hrsg.) (2000) *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, Köln, Dt. Ärzte-Verl.
252. SMETANA, K. J., DVORANKOVA, M., BOUCEK, J., KLIMA, J., MOTLIK, J., LENSCH, M., KALTNER, H., ANDRÉ, S., und GABIUS, H. J., 2006: Nuclear presence of adhesion/growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. *Histochem Cell Biol*, **125**, 171-182.
253. SMITH, G. S., 2000: Neutrophils. In: *Schalm's Veterinray Hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 281-296.
254. SOBOTTA, J., und WELSCH, U., 2006: *Lehrbuch Histologie*. 2. Aufl. München: Elsevier.
255. SOLTYS, B. J., und GUPTA, R. S., 1992: Interrelationships of endoplasmic-reticulum, mitochondria, intermediate filaments, and microtubules - a quadruple fluorescence labeling study. *Biochem. Cell Biol.*, **70**, 1174-1186.
256. SPICER, S. S., GREENE, W. B., und HARDIN, J. H., 1969: Ultrastructural localization of acid mucosubstance and antimonate-precipitable cation in human and rabbit platelets and megakaryocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 781-792.
257. SPICER, S. S., HORN, R. G., und WETZEL, B. K., 1968: Ultrastructural and cytochemical characteristics of leukocytes in various stages of development. *Biochem. Pharmacol.*, 143-156.
258. SPRECA, A., RAMBOTTI, M. G., und DONATO, R., 1991: Particulate guanylate cyclase and adenylate cyclase activities after activation with various agents in rabbit platelets. An ultracytochemical study. *Histochem.J.*, **23**, 143-148.
259. SRINIVASAN, R., NATARAJAN, N., und SHANMUGAM, A. M., 1979: A study on the normal hematology of rabbits. *Indian Vet. J.*, **56**, 550-553.
260. STEFFENS, W. L., 2000: Ultrastructural features of leukocytes. In: *Schalm's veterinary hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 326-336.
261. STINCHCOMBE, J. C., MAJOROVITS, E., BOSSI, G., FULLER, S., und GRIFFITHS, G. M., 2006: Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*, **443**, 462-465.
262. STOBBE, H., 1970: *Hämatologischer Atlas*. 3., völlig neu bearbeitete Aufl. Berlin: Akademie-Verlag.

263. STORCH, W., 1986: Immunfluoreszenz. In: *Handbuch der Histochemie IV Teil 2 - Immunreaktionen in der Histochemie*, (W. GRAUMANN, und K. NEUMANN, Hrsg.). Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag. S. 189-298.
264. STYERS, M. L., SALAZAR, G., LOVE, R., PEDEN, A. A., KOWALCZYK, A. P., und FAUNDEZ, V., 2004: The endo-lysosomal sorting machinery interacts with the intermediate filament cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5369-5382.
265. STYRT, B., 1989: Species variation in neutrophil biochemistry and function. *J. Leukoc. Biol.*, **46**, 63-74.
266. SUGAWARA, T., MIYAMOTO, M., TAKAYAMA, S., und KATO, M., 1995: Separation of neutrophils from blood in human and laboratory animals and comparison of the chemotaxis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **33**, 91-100.
267. SZABO, P., DAM, T., SMETANA, K. J., DVORANKOVA, M., KÜBLER, D., BREWER, C., und GABIUS, H. J., 2009: Phosphorylated human lectin galectin-3: analysis of ligand binding by histochemical monitoring of normal/malignant squamous epithelia and by isothermal titration calorimetry. *Anat. Histol. Embryol.*, **38**, 68-75.
268. TABLIN, F., 2000: Platelet Structure and Function. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 448-452.
269. TABLIN, F., und TAUBE, D., 1987: Platelet intermediate filaments - detection of a vimentinlike protein in human and bovine platelets. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **8**, 61-67.
270. TAKUBO, T., HINO, M., SUZUKI, K., und TATSUMI, N., 1999: Relative distribution of myosin, actin, and alpha-actinin in adherent monocytes. *Eur. J. Histochem.*, **43**, 71-77.
271. THOMAS, D. P., NIEWIARO, S., und REAM, V. J., 1970: Release of adenine nucleotides and platelet factor 4 from platelets of man and four other species. *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 607-618.
272. THRALL, M. A., 2004: *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins.
273. TOOR, B., MCGREGOR, J. L., MCGREGOR, L., und CLEMETSON, K. J., 1982: Comparison of the major membrane-glycoproteins and properties of human, rabbit and rat-blood platelets. *Thromb. Res.*, **26**, 317-328.
274. TRANZER, J. P., DA PRADA, M., und PLETSCHER, A., 1966: Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Nature*, **212**, 1574-1575.
275. TYLER, J., HARGREAVES, W., und BRANTON, D., 1979: Purification of two spectrin-binding proteins: Biochemical and electron microscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and band 2.1 and 4.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 5192-5196.
276. USTON, P. I., und LEE, C. M., 2003: Characterization and function of the multifaceted peripheral blood basophil. 1125-1135.
277. VACHA, J., 1983: Red Cell Life Span. In: *Red Blood Cells of Domestic Mammals*, (N. S. AGAR, und P. G. BOARD, Hrsg.). Amsterdam, Elsevier. S. 67.
278. VAUGHAN, K. T., 2005: Microtubule plus ends, motors, and traffic of Golgi membranes. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, **1744**, 316-324.
279. VERLOES, R., und KANAREK, L., 1976: Interactions of lectins PHA, Con A and anti-micrococcus with blood-cells of different species and ehrlich carcinoma cells. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.*, **84**, 418-420.
280. VOLPI, M., NACCACHE, P. H., und SHAAFI, R. I., 1983: Calcium-transport in inside-out membrane-vesicles prepared from rabbit neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4153-4158.
281. WEHREND, A., HETZEL, U., HUCHZERMEYER, S., KLEIN, C., und BOSTEDT, H., 2004: Sirius Red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. *Anat. Histol. Embryol.*, **33**, 180-182.
282. WELLS, M. Y., DECOBECQ, C. P. M., DECOUVELAERE, D. M., JUSTICE, C., und GUITTIN, P., 1999: Changes in clinical pathology parameters during gestation in the New Zealand White rabbit. *Toxicol. Pathol.*, **27**, 370-379.

283. WESSELS, J. M. C., und VEERKAMP, J. H., 1973: Some aspects of osmotic lysis of erythrocytes. 3. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood-cell membranes from 8 mammalian species. *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 190-196.
284. WETZEL, B. K., HORN, R. G., und SPICER, S. S., 1967a: Fine structural studies on the development of heterophil, eosinophil and basophil granulocytes in rabbits. *Lab. Invest.*, **16**, 349-382.
285. WETZEL, B. K., SPICER, S. S., und HORN, R. G., 1967b: Fine structural localization of acid and alkaline phosphatases in cells of rabbit blood and bone marrow. *J. Histochem. Cytochem.*, **15**, 311-334.
286. WHITE, J. G., 1987: Platelet Membrane Ultrastructure and its Changes during Platelet Activation. In: *Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology*, (G. A. JAMIESON, Hrsg.). New York, Alan R. Liss, Inc. S. 1-32.
287. WHITE, J. G., 2006: Platelet Structure. In: *Platelets*, 2. Aufl. (A. D. MICHELSON, Hrsg.). Burlington, San Diego, London, Academic Press. S. 45-73.
288. WHITE, J. R., NACCACHE, P. H., MOLSKI, T. F. P., BORGEAT, P., und SHAAFI, R. I., 1983: Direct demonstration of increased intracellular concentration of free calcium in rabbit and human neutrophils following stimulation by chemotactic factor *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113**, 44-50.
289. WHITECAR, P. W., FARB, R., SUBRAMANYAM, L., DORMAN, K., BALU, R. B., und MOISE, K. J., 2002: Paternal leukocyte alloimmunization as a treatment for hemolytic disease of the newborn in a rabbit model. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **187**, 977-980.
290. WIESNER, E., und RIBBECK, R. (Hrsg.) (2000) *Lexikon der Veterinärmedizin*, Stuttgart, Enke Verlag.
291. WILKINSON, J. M., GALEALARI, J., SELLARS, R. A., und BONIFACE, C., 1992: Identification and tissue distribution of rabbit leukocyte antigens recognized by monoclonal-antibodies. *Immunology*, **76**, 625-630.
292. WOLFORD, S. T., SCHROER, R. A., GOHS, F. X., GALLO, P. P., BRODECK, M., FALK, H. B., und RUHREN, R., 1986: Reference range database for serum chemistry and hematology values in laboratory-animals. *J. Toxicol. Environ. Health*, **18**, 161-188.
293. WONG, A. J., KIEHART, D. P., und POLLARD, T. D., 1985: Myosin from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **260**, 46-49.
294. YANG, Z. W., LI, J. A., YANG, M. H., FENG, Y. S., TANG, Z., DAI, X. S., WANG, H. Y., YIN, Q. Q., GAO, Y., LI, J., HE, X. L., ZHANG, Y., und AN, Q., 2005: Comparison of blood counts in splenic, renal and mesenteric arterial and venous blood in post-pubertal rabbits. *Res. Vet. Sci.*, **79**, 149-154.
295. YAO, X. B., CHENG, L., und FORTE, J. G., 1996: Biochemical characterization of ezrin-actin interaction. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7224-7229.
296. YOON, M., MOIR, R. D., PRAHLAD, V., und GOLDMAN, R. D., 1998: Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J. Cell Biol.*, **143**, 147-157.
297. YOUNG, K. M., 2000: Eosinophils. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5. Aufl. (B. F. FELDMAN, Hrsg.). Philadelphia, Williams & Wilkins. S. 297-307.
298. ZAULI, D., GOBBI, M., CRESPI, C., TAZZARI, P. L., MISEROCCHI, F., und TASSINARI, A., 1988: Cytoskeleton organization of normal and neoplastic lymphocytes and lymphoid-cell lines of T-origin and B-origin. *Br. J. Haematol.*, **68**, 405-409.
299. ZELLMER, D. M., und SHANNON, W. A., 1983: Morphometric cyto-chemistry of catalase and myeloperoxidase-containing granules in the rabbit polymorphnuclear leukocyte. *Histochem. J.*, **15**, 211-230.

F. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil F. Sinowatz möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes als auch der Materialien, die Unterstützung bei neuen Ideen und das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Auch bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bei Fragen zur Umsetzung einiger Versuche und Materialien bedanken. Besonders hervorheben möchte ich das Engagement von Wiebke Scholz, die bei der Beschaffung von neuem Untersuchungsmaterial einen entscheidenden Beitrag geleistet hat.

Zudem möchte ich mich auch bei Frau Dr. Jutta Hein bedanken, die eine Kooperation mit der Medizinischen Kleintierklinik im Hinblick auf die Auswertung der Laborwerte möglich machte und mir Kaninchen aus dem Bestand der Medizinischen Kleintierklinik zur Probenahme zur Verfügung stellte.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken, die Stunden dafür geopfert haben meine Arbeit Korrektur zu lesen oder ein großes Engagement bei der Beschaffung von Literatur für diese Arbeit zeigten, darunter: Barbara Merten, Johannes Merten, Dr. Alfons Merten und Raphael Merten.

Mein Dank gilt außerdem denjenigen, die mich bei der Probenahme tatkräftig unterstützt und dadurch zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben, darunter: René Martschei, Wiebke Scholz, Ursula Teichgräber, Caroline Zauter und Julia Scholz.

Anschließend bedanke ich mich bei allen, die durch jegliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.