

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

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

Ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen am Blut des Schafes (*Ovis aries*)

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

von
Stephanie Riegler
aus München

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

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

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Deeg

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
I EINLEITUNG	1
II LITERATURÜBERSICHT.....	3
1. ALLGEMEINES ZUM BLUT DES SCHAFES.....	3
1.1 <i>Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes</i>	3
1.2 <i>Hämatopoese</i>	4
1.3 <i>Spezielle Hämatologie des Schafes</i>	5
2. CHARAKTERISIERUNG DER EINZELNEN BLUTZELLEN.....	10
2.1 <i>Erythrozyten</i>	10
2.1.1 Allgemeines	10
2.1.2 Bildung	10
2.1.3 Morphologie	11
2.1.4 Aufgaben	13
2.1.5 Zytchemische Eigenschaften	14
2.2 <i>Thrombozyten</i>	15
2.2.1 Allgemeines	15
2.2.2 Bildung	15
2.2.3 Morphologie	17
2.2.4 Aufgaben	18
2.2.5 Zytchemische Eigenschaften	19
2.3 <i>Lymphozyten</i>	20
2.3.1 Allgemeines	20
2.3.2 Bildung	20
2.3.3 Morphologie	21
2.3.4 Aufgaben	24
2.3.5 Zytchemische Eigenschaften	25
2.4 <i>Monozyten</i>	26
2.4.1 Allgemeines	26
2.4.2 Bildung	26
2.4.3 Morphologie	27
2.4.4 Aufgaben	28
2.4.5 Zytchemische Eigenschaften	29
2.5 <i>Neutrophile Granulozyten</i>	30
2.5.1 Allgemeines	30
2.5.2 Bildung	30
2.5.3 Morphologie	32
2.5.4 Aufgaben	33
2.5.5 Zytchemische Eigenschaften	34
2.6 <i>Eosinophile Granulozyten</i>	35

2.6.1	Allgemeines	35
2.6.2	Bildung	36
2.6.3	Morphologie	36
2.6.4	Aufgaben	38
2.6.5	Zytochemische Eigenschaften	39
2.7	<i>Basophile Granulozyten</i>	40
2.7.1	Allgemeines	40
2.7.2	Bildung	40
2.7.3	Morphologie	41
2.7.4	Aufgaben	42
2.7.5	Zytochemische Eigenschaften	43
3.	ENZYMHISTOCHEMIE	43
3.1	<i>Definition und Anwendung</i>	43
3.2	<i>Technik</i>	43
3.2.1	Phosphatasen	44
3.2.2	Peroxidasen	45
3.2.3	β -Glucuronidase	45
3.2.4	Esterasen	46
3.3	<i>Enzymausstattung der ovinen Blutzellen</i>	47
4.	IMMUNHISTOCHEMIE	47
4.1	<i>Definition und Anwendung</i>	47
4.2	<i>Technik</i>	48
4.3	<i>Immunhämatologische Differenzierung von Lymphozyten</i>	49
5.	ZYTOSKELETT	51
5.1	<i>Aufbau des Zytoskeletts</i>	51
5.2	<i>Funktionen des Zytoskeletts</i>	54
5.3	<i>Zytoskelett der Blutzellen</i>	55
5.3.1	Erythrozyten	55
5.3.2	Thrombozyten	56
5.3.3	Leukozyten.....	58
6.	GLYKOHISTOCHEMIE	60
6.1	<i>Definition des Begriffes „Lektin“</i>	60
6.2	<i>Einteilung, Struktur und Bindungseigenschaften der Pflanzen-Lektine</i>	61
6.3	<i>Lektinhistochemie: Definition, Technik und Anwendung</i>	63
6.4	<i>Anwendung der Pflanzen-Lektine in der Forschung</i>	63
6.5	<i>Zuckerstrukturen auf ovinen Blutzellen</i>	64
6.6	<i>Lektinbindungsstellen auf ovinen Blutzellen</i>	65
7.	BLUTGRUPPEN BEIM SCHAF	66
7.1	<i>Allgemeines zu den Blutgruppen</i>	66
7.2	<i>Technik</i>	67
7.3	<i>Blutgruppensysteme der Schafe</i>	68

7.4	<i>Bedeutung der Blutgruppenbestimmung beim Schaf</i>	70
III	MATERIAL UND METHODEN	72
1.	UNTERSUCHUNGSMATERIAL.....	72
2.	LICHTMIKROSKOPIE	74
2.1	<i>Übersichtsfärbungen</i>	74
2.1.1	Diff-Quick-Färbung	74
2.1.2	Giemsa-Färbung.....	74
2.1.3	Färbung nach May-Grünwald	75
2.1.4	Panoptische Färbung nach Pappenheim	76
2.1.5	Sirius Red-Färbung.....	77
2.1.6	Toluidinblau-Färbung nach Undritz	78
2.2	<i>Substrathistochemische Färbungen</i>	79
2.2.1	Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)	79
2.2.2	Alcianblau-Färbung.....	80
2.3	<i>Enzymhistochemische Färbungen</i>	81
2.3.1	Nachweis der sauren Phosphatase	81
2.3.2	Nachweis der alkalischen Phosphatase	82
2.3.3	Nachweis der Peroxidase.....	83
2.3.4	Nachweis der β -Glucuronidase	84
2.3.5	Nachweis der α -Naphthyl-Azetat-Esterase nach Löffler	85
2.3.6	Nachweis der Naphthol-AS-Azetat-Esterase nach Löffler	85
2.3.7	Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase	86
3.	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	87
4.	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	88
4.1	<i>Untersuchungen des Zytoskeletts oviner Blutzellen</i>	88
4.1.1	Nachweis von Aktin durch Phalloidin-TRITC	89
4.1.2	Immunhistochemischer Nachweis von Myosin, Vimentin, Zytokeratin und Tubulin.....	90
4.2	<i>Glykohistochemie</i>	91
4.2.1	FITC-markierte Pflanzen-Lektine.....	91
4.2.2	Inhibition mit Hemmzuckern	93
4.2.3	Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	94
4.2.4	Biotinylierte Pflanzen-Lektine.....	95
5.	AUSWERTUNG.....	96
IV	ERGEBNISSE	97
1.	BLUTBILD DER VERWENDETEN SCHAFE	97
2.	LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	101
2.1	<i>Übersichtsfärbungen</i>	101
2.1.1	Erythrozyten	101
2.1.2	Thrombozyten	102
2.1.3	Lymphozyten	103

2.1.4	Monozyten.....	105
2.1.5	Neutrophile Granulozyten	107
2.1.6	Eosinophile Granulozyten.....	110
2.1.7	Basophile Granulozyten.....	111
2.2	<i>Substrathistochemische Färbungen</i>	113
2.2.1	Periodic-Acid-Schiff-Reaktion	113
2.2.2	Alcianblau-Färbung.....	115
2.3	<i>Enzymhistochemische Färbungen</i>	117
2.3.1	Nachweis der sauren Phosphatase	117
2.3.2	Nachweis der alkalischen Phosphatase	119
2.3.3	Nachweis der Peroxidase.....	121
2.3.4	Nachweis der β -Glucuronidase	123
2.3.5	Nachweis der α -Naphthyl-Azetat-Esterase.....	126
2.3.6	Nachweis der Naphthol-AS-Azetat-Esterase.....	128
2.3.7	Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase.....	131
3.	<i>ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN</i>	132
3.1	<i>Erythrozyten</i>	132
3.2	<i>Thrombozyten</i>	132
3.3	<i>Lymphozyten</i>	135
3.4	<i>Monozyten</i>	138
3.5	<i>Neutrophile Granulozyten</i>	141
3.6	<i>Eosinophile Granulozyten</i>	144
3.7	<i>Basophile Granulozyten</i>	147
4.	<i>FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN</i>	147
4.1	<i>Untersuchungen des Zytoskeletts oviner Blutzellen</i>	147
4.1.1	Nachweis von Aktin	147
4.1.2	Nachweis von Myosin	150
4.1.3	Nachweis von Vimentin	152
4.1.4	Nachweis von Zytokeratin	155
4.1.5	Nachweis von Tubulin.....	155
4.2	<i>Glykohistochemische Untersuchungen</i>	155
4.2.1	Glukose/Mannose-spezifische Lektine	155
4.2.1.1	Bindung von Concanavalia ensiformis Agglutinin (ConA-FITC).....	155
4.2.1.2	Bindung von Lens culinaris Agglutinin (LCA-FITC)	159
4.2.1.3	Bindung von Pisum sativum Agglutinin (PSA-FITC)	162
4.2.2	Galaktose-spezifische Lektine.....	165
4.2.2.1	Bindung von Peanut Agglutinin (PNA-FITC).....	165
4.2.2.2	Bindung von Ricinus communis Agglutinin (RCA-FITC).....	165
4.2.2.3	Bindung von Viscum album Agglutinin (VAA-Biotin)	165
4.2.3	N-Acetyl-Glukosamin-spezifische Lektine	166
4.2.3.1	Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA-FITC).....	166
4.2.3.2	Bindung von succinyliertem Wheat germ Agglutinin (WGAs-FITC)	169

4.2.4	N-Acetyl-Galaktosamin-spezifische Lektine	172
4.2.4.1	Bindung von Griffonia simplicifolia I Agglutinin (GSL-I-FITC)	172
4.2.4.2	Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA-FITC)	175
4.2.4.3	Bindung von Sophora japonica Agglutinin (SJA-FITC)	175
4.2.5	Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosamin- spezifische Lektine	175
4.2.5.1	Bindung von Soybean Agglutinin (SBA-FITC)	175
4.2.5.2	Bindung von Sambucus nigra Agglutinin (SNA-Biotin)	175
4.2.6	L-Fukose-spezifische Lektine	176
4.2.6.1	Bindung von Ulex europaeus I Agglutinin (UEA-I-FITC)	176
4.2.7	Für komplexe Kohlenhydratstrukturen spezifische Lektine	176
4.2.7.1	Bindung von Phaseolus vulgaris E Agglutinin (PHA-E-FITC)	176
4.2.7.2	Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin (PHA-L-FITC)	177
4.2.7.3	Bindung von Maackia amurensis I Agglutinin (MAA-I-Biotin)	179
4.2.8	Ergebnisse der Zuckerhemmung	182
4.2.9	Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase	182
V	DISKUSSION	184
1.	BLUTPROBEN	184
2.	LICHTMIKROSKOPIE	185
2.1	Übersichtsfärbungen	185
2.2	Substrathistochemische Färbungen	192
2.3	Enzymhistochemische Färbungen	195
3.	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	202
4.	FLUORESENZMIKROSKOPIE	207
4.1	Untersuchungen des Zytoskeletts oviner Blutzellen	207
4.2	Glykohistochemische Untersuchungen	211
VI	ZUSAMMENFASSUNG	218
VII	SUMMARY	221
VIII	VERZEICHNIS DER GEBRAUCHSLÖSUNGEN	223
1.	LICHTMIKROSKOPIE	223
1.1	Übersichtsfärbungen	223
1.2	Substrathistochemische Färbungen	224
1.3	Enzymhistochemische Färbungen	225
2.	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	227
3.	FLUORESENZMIKROSKOPIE	230
3.1	Immunhistochemie	230
3.2	Glykohistochemie	230
IX	TABELLENVERZEICHNIS	231
X	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	233

XI	LITERATURVERZEICHNIS.....	238
XII	ANHANG	252
	DANKSAGUNG	252

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2,3-BPG	2,3-Biphosphoglycerat
Abb	Abbildung
ABC	Avidin-biotin-complex
Abk	Abkürzung
ABP	Aktin bindendes Protein
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen presenting cell
Aqua dest	Aqua destillata
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua demin	Aqua demineralisata
Arp	Actin-related protein
BALT	Bronchus associated lymphoid tissue
Bas	Basophiler Granulozyt
BCR	B cell receptor
βG	β-Glucuronidase
Ca²⁺	Kalzium
CAE	Chlorazetat-Esterase
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
CFU-Bas	CFU-Basophils
CFU-E	CFU-Erythroid
CFU-Eos	CFU-Eosinophils
CFU-GM	CFU-Granulocytes/Monocytes
CFU-Meg	CFU-Megacaryocytes
Co²⁺	Kobalt
ConA	Concanavalia Agglutinin
CSF	Colony stimulating factor
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
DMS	Demarcation membrane system
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Deoxyribonucleic acid
DTS	Dense tubular system
ECP	Eosinophil cationic protein
EDN	Eosinophil-derived neurotoxin
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EO-CSF	Eosinophil colony stimulating factor
EO-GSF	Eosinophil growth stimulating factor
Eos	Eosinophiler Granulozyt
EPO	Eosinophile Peroxidase
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
Ery	Erythrozyt
Ethanol abs	Ethanol absolut
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fuc	Fucose
G-Aktin	Globuläres Aktin
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamine
GALT	Gut associated lymphoid tissue
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamine
GM-CSF	Granulocyte- monocyte/macrophage colony stimulating factor
GSL	Griffonia simplicifolia Agglutinin
Hb	Hämoglobin
HbA	Adultes Hämoglobin
HbE	Embryonales Hämoglobin
HbF	Fetales Hämoglobin
HCl	Salzsäure
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HK	High Kalium
Hkt	Hämatokrit
IFAP	Intermediärfilament assoziiertes Protein
Ig	Immunglobulin

IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
Kan	Kaninchen
Konz	Konzentration
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LCA	Leukocyte common antigen
Leu	Leukozyt
LK	Low Kalium
LT	Leukotrien
LTB	Leukotrien B
LTC	Leukotrien C
LTD	Leukotrien D
Ly	Lymphozyt
m	männlich
MAA	Maackia amurensis Agglutinin
Man	Mannose
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MBP	Major basic protein
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
M-CSF	Monocyte colony stimulating factor
MCV	Mean corpuscular volume
Meg-CSF	Megakaryocyte colony stimulating factor
Mg²⁺	Magnesium
Mn²⁺	Mangan
Mo	Monozyt
MOC	Microtubule-organising center
MPO	Myeloperoxidase
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
Ms	Maus

NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaH₂PO₄H₂O	Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat
Na₂HPO₄2H₂O	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
Neu	Neutrophiler Granulozyt
NeuNAc	N-Acetyl-Neuraminsäure
NSE	Non-specific esterase
O₂⁻	Oxid-Anion
OCl⁻	Hypochlorit
OCS	Open canalicular system
OvWC1	Ovine workshop cluster 1
PAF	Platelet activating factor
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PG	Prostaglandin
PGE	Prostaglandin E
PGI	Prostaglandin I
Pgp-1	Phagocyte glycoprotein-1
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
PMN	Polymorph nuclear leukocyte
PNA	Peanut Agglutinin
POX	Peroxidase
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RCA	Ricinus communis Agglutinin
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SBA	Soybean Agglutinin
Sf	Schaf
SJA	Sophora japonica Agglutinin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
SO₂-Wasser	Sulfit-Wasser
SP	Saure Phosphatase

St	Stabkerniger Leukozyt
T11TS	T11 target structure
Tab	Tabelle
TCR	T cell receptor
Thr	Thrombozyt
Thy-1	Theta-Antigen
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UEA	Ulex europaeus Agglutinin
U/m	Umdrehungen pro Minute
UTALT	Urinary tract associated lymphoid tissue
VAA	Viscum album Agglutinin
VFA	Vicia faba Agglutinin
vgl	vergleiche
w	weiblich
WC	Workshop cluster
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
Zg	Ziege
Zn²⁺	Zink

I Einleitung

Die Hämatologie ist ein wichtiger Bereich der Tiermedizin, da die Untersuchung des Blutes eine große Rolle bei der Beurteilung des aktuellen Gesundheitszustandes einzelner Tiere spielt. Sie dient dem Erkennen von Krankheiten, da diese in einigen Fällen zu Veränderungen im Blutbild führen. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Laborwerte des Blutes gesunder Tiere zu kennen und die jeweiligen Blutzellen morphologisch differenzieren zu können. Die Anzahl der Leukozyten gibt wichtige Hinweise auf die Immunantwort des Körpers. Bakterielle Infektionen beispielsweise führen zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten, eine Erhöhung der eosinophilen Granulozyten hingegen ist bei Allergien oder Parasitenbefall zu beobachten. Weiterhin lassen sich bei einigen inneren Erkrankungen Veränderungen der Werte bestimmter Serumkomponenten nachweisen. Die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Analyse des Blutes dient der Identifizierung und Charakterisierung einzelner Blutzellen und liefert weiterhin Informationen über die regenerative Kapazität des Knochenmarks. Das Elektronenmikroskop erlaubt aufgrund des hohen Auflösungsvermögens eine genaue Untersuchung der Ultrastruktur der Blutzellen.

Jede Blutzelle ist mit einem gewissen Enzymspektrum ausgestattet. Durch den Nachweis der verschiedenen Enzyme können Stoffwechselvorgänge in der Zelle dargestellt und bestimmte Zellen sowie Zellstrukturen (z.B. Granula oder Lysosomen) aufgrund ihrer charakteristischen Enzymausstattung identifiziert werden.

Das Zytoskelett stellt ein dreidimensionales Geflecht aus Filamenten und Mikrotubuli in den Blutzellen dar. Es organisiert das Zellinnere und ist für eine Reihe wichtiger Funktionen der Zelle von Bedeutung. Jede einzelne Zelle ist mit bestimmten Strukturproteinen ausgestattet, die durch markierte Substanzen sichtbar gemacht werden können. Das genaue Verständnis aktiver, kortikaler Zytoskelettsysteme könnte einen Beitrag zum Fortschritt der Bekämpfung verschiedener Krankheiten, wie Malaria im Fall der Erythrozyten, leisten. Aktive Netzwerke könnten zudem als technische Mittel bei der Konstruktion biomimetischer Apparaturen, Sensoren oder biomimetischer Strukturen für die Medikamentenverabreichungen dienen.

Die Blutzellen tragen verschiedene Kohlenhydratstrukturen auf ihrer Oberfläche, die eine Vielzahl von Funktionen erfüllen. Im Allgemeinen dienen sie der Kommunikation der Zellen untereinander, vermitteln die spezifische Erkennung verschiedenster Strukturen und gewährleisten die Regulierung biologischer Prozesse. Darüber hinaus fungieren sie aber auch als Anheftungsstrukturen für Mikroorganismen. Die Kohlenhydratreste auf den Zellen können mit Hilfe der Lektinhistochemie charakterisiert werden, da diese Zucker bindenden Proteine spezifisch an bestimmte Zuckerstrukturen der Zelle binden.

Meine Arbeit hat die morphologische Charakterisierung der Blutzellen des Schafes mit modernen licht- und elektronenmikroskopischen Methoden zum Ziel. Dabei wird zuerst die allgemeine Morphologie der jeweiligen Zellen nach Durchführung verschiedener konventioneller Übersichtsfärbungen beschrieben. Als Nächstes erfolgt die Charakterisierung der Zellen anhand von substrathistochemischen und verschiedenen enzymhistochemischen Techniken. Unter dem Elektronenmikroskop wird die Ultrastruktur der einzelnen Blutzellen analysiert. Weiterhin werden die zytoskelettalen Proteine in den Blutzellen der Schafe mit verschiedenen Methoden dargestellt. Schließlich wird mit glykohistochemischen Techniken das Bindungsverhalten verschiedner Pflanzen-Lektine an bestimmte Kohlenhydratstrukturen der Zellen untersucht.

II Literaturübersicht

1. Allgemeines zum Blut des Schafes

1.1 Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes

Das Blutvolumen der meisten Haussäugetiere beträgt ca. 6 - 8 % des Körpergewichts (Hees und Tschudi, 1990). Hodgetts (1961) beschreibt bei adulten Merinoschafen ein totales Blutvolumen von $66,4 \pm 5,4$ ml/kg Körpergewicht, bei fetalen und neugeborenen Schafen hingegen liegt es laut Pipkin und Kirkpatrick (1973) bei $80,8 \pm 2,8$ ml/kg Körpergewicht. Ein Siebtel des Blutvolumens befindet sich beim adulten Schaf in der Milz, in Stresssituationen kann davon ein Teil oder die gesamte Menge in die Zirkulation abgegeben werden (Greenwood, 1977). Die Zusammensetzung des Blutes weist bei den verschiedenen Haussäugetieren deutliche Unterschiede auf und kann sich in den einzelnen Lebensphasen auch ändern. Im Allgemeinen lässt sich das Blut in einen festen Anteil, die Blutzellen, und einen flüssigen Anteil, das Blutplasma, unterteilen (Kraft et al., 2005), wobei die zellulären Elemente in der elektrolythaltigen Eiweißlösung, dem Plasma, suspendiert vorliegen (Hees und Tschudi, 1990). Die zellulären Komponenten betreffend können die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) von den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und den Blutplättchen (Thrombozyten) unterschieden werden (Sinowatz, 2006a). Die weißen Blutzellen lassen sich wiederum in die Lymphozyten, die Monozyten und die Granulozyten unterteilen (Liebich, 2004). Beim adulten Schaf liegt der Anteil der zellulären Bestandteile am Blutvolumen, der Hämatokrit, durchschnittlich bei 35 % (27 - 45 %) (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Dieser ist in erster Linie von der Konzentration der Erythrozyten abhängig, da jene den Großteil der zellulären Blutbestandteile ausmachen (Lösch et al., 2000). Das Blutplasma stellt eine größtenteils aus Wasser bestehende Lösung dar (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a) und enthält neben den organischen Bestandteilen wie Albumin, Fibrinogen, Globuline, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fette, Cholesterin, Harnstoff, Kreatinin, Kreatin und Indikan auch anorganische Stoffe wie Natrium, Chloride, Kalium, Kalzium, Magnesium, Bikarbonat, Phosphate, Sulfate, Eisen und Jodid und weitere Bestandteile wie Hormone, Enzyme, Antikörper, Gerinnungsfaktoren und Komplement (Kraft et al., 2005). Das Plasma von Schafen und Ziegen ist, im Gegensatz zu dem von Rindern, aufgrund der Unabhängigkeit von Futterchromogenen farblos (Kramer, 2000). Als Serum wird die Blutflüssigkeit nach Entzug der Gerinnungsproteine bezeichnet (Hees und Tschudi, 1990).

Das Blut übernimmt eine Reihe sehr wichtiger Aufgaben im Körper. Es stellt den wichtigsten Funktionsträger des Kreislaufsystems dar (Liebich, 2004). Als erstes zu nennen ist die Funktion des Blutes als Transportmedium für Wärme, Nahrungsstoffe, Gase (Sauerstoff, Kohlensäure),

Stoffwechselprodukte, Wasser, Proteine, Fette, Hormone, Enzyme, Vitamine und Blutzellen. Weiterhin ist es für die Aufrechterhaltung des physikochemischen Gleichgewichts (Homöostase), also dem Stoffaustausch zwischen den Organen und den Geweben zuständig, wodurch sowohl die Regulation des Wasserhaushalts in den Geweben als auch die Aufrechterhaltung der pH-Wertes (Isohydrie) und des osmotischen Druckes (Isotonie) gewährleistet wird (Kraft et al., 2005). An der Aufrechthaltung einer konstanten Körpertemperatur (Isothermie) ist das Blut ebenfalls maßgeblich beteiligt (Sinowatz, 2006a). Neben diesen lebenswichtigen Funktionen übernimmt das Blut auch unspezifische und spezifische Abwehrfunktionen, nämlich die Phagozytose durch Granulozyten und Monozyten und die Antikörperbildung durch Lymphozyten bzw. Plasmazellen (Kraft et al., 2005). Von großer Wichtigkeit ist weiterhin die Gerinnungsfähigkeit des Blutes bei kleineren Gefäßverletzungen (Hees und Tschudi, 1990).

1.2 Hämatopoese

Die Hämatopoese, die Bildung der Blutzellen, stellt einen komplexen und stark regulierten Prozess dar. Sie erfolgt in erster Linie im Knochenmark, bei erhöhtem Bedarf können aber auch Milz, Leber und Lymphknoten zur Blutbildung beitragen (Reagan et al., 2008). Das hämatopoetische System ist ein äußerst komplex strukturiertes Gewebe, dessen Zellen sich anhand ihrer funktionellen und antigenen Eigenschaften grobschematisch in drei Kompartimente unterteilen lassen. An der Spitze steht das Stammzellkompartiment mit seinen pluripotenten Stammzellen, den Hämozytoblasten (Sinowatz, 2006a). Diese machen lediglich 0,01 % sämtlicher Knochenmarkszellen aus (Liebich, 2004), weisen aber eine hohe Regenerationsfähigkeit auf (Lösch et al., 2000). Diese mesenchymalen Zellen sind imstande, sämtliche Zelltypen des lymphohämatopoetischen Systems hervorzubringen (Jain, 1993), sie werden deshalb auch als „colony forming units“ (CFU) bezeichnet (Lösch et al., 2000). Das zweite Kompartiment besteht aus den Progenitoren, die aus den pluripotenten Stammzellen hervorgehen. Diese Vorläuferzellen sind nur in sehr begrenztem Maße zur Selbsterneuerung fähig und können nur noch bestimmte Zellen hervorbringen (Sinowatz, 2006a). Die Progenitoren können in myeloische Vorläuferzellen, aus welchen die Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten entstehen, und lymphatische Vorläuferzellen, welche die B- und T-Lymphozyten und somit auch die Plasmazellen hervorbringen, unterteilt werden. Die Vorläuferzellen mit einer determinierten Entwicklungslinie werden als CFU-E (CFU-Erythroid), CFU-Meg (CFU-Megacaryocytes), CFU-GM (CFU-Granulocytes/Monocytes) (Lösch et al., 2000), CFU-Eos (CFU-Eosinophils), CFU-Bas (CFU-Basophils) oder als T- und B-Vorläuferzellen bezeichnet (Jain, 1993). Aus den Progenitoren gehen also Zellen hervor, die morphologisch bestimmten Zellreihen zugeordnet werden können und deren Differenzierung letztendlich zu reifen Zellen führt. Diese Effektorzellen stellen das

dritte Kompartiment dar. Sie besitzen nur noch eine begrenzte Lebenszeit und haben die Fähigkeit zur Proliferation verloren (Sinowatz, 2006a). Im Blut sind normalerweise nur die Effektorzellen vorzufinden (Kraft et al., 2005).

Die Blutbildung kann im Allgemeinen in eine pränatale und in eine postnatale Phase eingeteilt werden (Sinowatz, 2006a). In der pränatalen Phase lassen sich die megaloblastische Periode, die sich bereits zwei Wochen nach der Befruchtung extraembryonal im Mesenchym des Dottersacks beobachten lässt, die hepatolienale Periode, die sich in der Leber, in der Milz und später auch in den Lymphknoten und im Thymus abspielt, und die medulläre Periode, die im roten Knochenmark in den späteren Abschnitten der intrauterinen Entwicklung stattfindet, unterscheiden. Während der megaloblastischen Periode werden kernhaltige Erythrozyten, die Megaloblasten, gebildet (Sinowatz, 2006a). Die in der hepatolienalen und medullären Periode gebildeten Erythrozyten sind hingegen immer kernlos (Rüsse, 2008). Die postnatale Blutbildung erfolgt vorrangig im hämatoretikulären Gewebe des roten Knochenmarks der Wirbelkörper, der Rippen, des Brustbeins, des Darmbeins und der proximalen Enden langer Röhrenknochen, wobei die Blutzellbildung in Leber und Milz bei Knochenmarkserkrankungen zeitlebens wieder aktiviert werden kann (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a). Postnatal entstehen Erythrozyten und Granulozyten nur noch im roten Knochenmark, wohingegen die Lymphozyten sich hauptsächlich in den lymphatischen Organen wie Thymus, Milz und Lymphknoten vermehren (Sinowatz, 2006a).

Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoiese, da diese als interzelluläre Mediatoren die Teilung, Proliferation, Differenzierung, Mobilität und Aktivität der hämatopoetischen Zellen regulieren. Für die Blutzellbildung sind vor allem die Chemokine, Wachstumsfaktoren (Hämopoietine), Interleukine (IL) und koloniestimulierende Faktoren (colony stimulating factors, CSF), von Bedeutung (Liebich, 2004).

1.3 Spezielle Hämatologie des Schafes

Die Blutzusammensetzung unterliegt bei den Haussäugetieren einem ständigen Wechsel, der vielseitig bedingt sein kann. Neben speziesspezifischen Ursachen kommen auch rassespezifische und geschlechtsspezifische Gründe in Frage (Jain, 1993); (Kraft et al., 2005). Einzelne Individuen zeigen häufig ausgeprägte Unterschiede der absoluten Leukozytenzahlen (Greenwood, 1977). Bei den verschiedenen Schafrassen existieren teilweise unterschiedliche Hämoglobin-Arten (Kramer, 2000) sowie unterschiedliche Enzymaktivitäten in den roten Blutkörperchen (Agar et al., 1975b). In einer Studie von Egbe-Nwiyi et al. (2000) in Nigeria wurde herausgefunden, dass Böcke im Allgemeinen höhere Werte des roten Blutbildes und der Gesamtleukozyten aufweisen als Zibben

(Egbe-Nwiyi et al., 2000).

Auch das Alter der Tiere hat einen entscheidenden Einfluss auf die Blutparameter (Jain, 1993). Im Allgemeinen steigen die Erythrozytenzahl, die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokrit im Laufe der intrauterinen Entwicklung stetig an (Jain, 1993). Diese Werte sind zum Zeitpunkt der Geburt sehr hoch (Ullrey et al., 1965a); (Jain, 1993), fallen dann bei Schafen bis zum 14. Tag post partum auf ein Minimum ab, um dann wieder zu steigen. Die Erythrozytenzahl erreicht ihr Maximum im 3. Monat nach der Geburt. Das mittlere Zellvolumen der Erythrozyten (mean corpuscular volume, MCV) und deren mittlerer Hämoglobingehalt (mean corpuscular hemoglobin, MCH) sind zum Zeitpunkt der Geburt am höchsten und sinken innerhalb der ersten Lebensmonate ab. Die zum Zeitpunkt der Geburt niedrige mittlere Hämoglobinkonzentration aller zellulären Bestandteile im Blut (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) hingegen steigt im Laufe des ersten Lebensjahres an (Ullrey et al., 1965a). Fetales Erythrozyten sind größer als jene von adulten Tieren (Greenwood, 1977); (Jain, 1993). Ab dem 60. Tag der Trächtigkeit erscheinen neben den großen auch kleinere Erythrozyten, die denen von adulten Schafen ähneln (Greenwood, 1977) und nach der Geburt nimmt die Größe der Erythrozyten stetig ab (Jain, 1993). In der frühen fetalen Phase sind kernhaltige Erythrozyten vorherrschend, wobei deren Anzahl bis zur Geburt hin stark absinkt. Die Retikulozytenzahl ist sowohl in der fetalen Phase als auch im Zeitraum um die Geburt erhöht (Jain, 1993) und erreicht beim Schaf in der zweiten Woche post partum ein Maximum, was auf die für diesen Zeitraum niedrige Erythrozytenzahl zurückgeführt werden kann (Ullrey et al., 1965a). Im Blut gesunder, adulter Schafe sind gewöhnlich keine Retikulozyten vorzufinden (Greenwood, 1977). In der frühen fetalen Phase sind entweder keine Leukozyten oder nur in sehr geringer Zahl vorhanden. Diese steigt jedoch allgemein im Laufe der Trächtigkeit an und erreicht zum Zeitpunkt der Geburt höhere Werte als die von adulten Tieren (Jain, 1993). Die absolute Leukozytenzahl verdoppelt sich bei Lämmern in den ersten 12 Stunden nach der Geburt (Ullrey et al., 1965b) (Greenwood, 1977); (Taylor, 2000) und fällt in den nächsten 12 - 48 Stunden wieder etwas ab. Darauf folgend kann wieder ein Anstieg beobachtet werden, der seinen Höhepunkt im 3. Monat post partum erreicht (Ullrey et al., 1965b). Der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten beträgt zum Zeitpunkt der Geburt ca. 37 % und steigt in den folgenden 12 Stunden auf 52 % an (Ullrey et al., 1965b). Bei Schafen übersteigt in diesem Zeitraum die Anzahl der neutrophilen Granulozyten die der Lymphozyten (Ullrey et al., 1965b); (Jain, 1993), was auf einen Abfall der Lymphozytenzahlen bei stressinduzierter Kortikosteroidausschüttung zum Zeitpunkt der Geburt zurückgeführt werden kann (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Bis zu einem Alter von 12 Monaten nimmt die Zahl der neutrophilen Granulozyten tendenziell ab. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten verhält sich in diesem Zeitraum genau umgekehrt zu dem der neutrophilen Granulozyten (Ullrey et al., 1965b). Zwei Wochen nach der Geburt überwiegen bereits die

Lymphozyten (Kramer, 2000) und nach ungefähr drei Monaten kann die Lymphozytenzahl bis zu 70 - 80 % der Gesamtleukozytenzahl ausmachen. Innerhalb weniger Jahre erfolgt dann ein langsamer Abfall der Lymphozytenzahl (Kramer, 2000); (Byers und Kramer, 2010). Die Zahl der eosinophilen Granulozyten ist bei adulten Tieren im Allgemeinen höher als bei Lämmern (Greenwood, 1977); (Jain, 1993), gleiches gilt für basophile Granulozyten (Jain, 1993). Die Monozyten hingegen scheinen in ihrer Anzahl durch das Alter nicht wesentlich beeinflusst zu werden (Jain, 1993); (Egbe-Nwiyi et al., 2000), ihr Anteil an den Gesamtleukozyten zeigt jedoch tendenziell einen ähnlichen Verlauf wie die Lymphozyten (Ullrey et al., 1965b).

Die Blutwerte von Schafen sind aber auch umweltbedingten Einflüssen unterworfen. So hat eine Höhenveränderung beispielsweise Auswirkungen auf die Sauerstoffspannung im Blut, die umso niedriger ist, je höher die Lage ist, in der sich das Tier befindet. Auch die Werte des roten Blutbildes steigen in höheren Lagen (Jain, 1993); (Kramer, 2000), wobei in diesem Fall eine Zunahme der Erythrozytenzahl, des Hämatokrits (Jain, 1993) und der Hämoglobinkonzentration zu beobachten ist (Jain, 1993); (Moraga et al., 1996). Zudem sind Schafe in der Lage, Hämoglobin mit einer höheren Sauerstoffaffinität zu exprimieren, wenn sie höheren Lagen ausgesetzt sind (Moraga et al., 1996). Weiterhin kann mit abfallender Temperatur eine Abnahme der Gesamtleukozytenwerte mit einer Neutropenie beobachtet werden (Taylor, 2000).

Auch saisonale Faktoren haben Auswirkungen auf die Blutparameter (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Vor allem bei Schafen werden hier signifikante Schwankungen in den Werten des roten Blutbildes beobachtet. Diese Abweichungen sind wahrscheinlich auf jahreszeitlich bedingte Parasiteninfektionen und auf den sich ändernden Ernährungszustand der Tiere zurückzuführen. Im späten Winter und im Anfang des Frühlings kann beispielsweise mit steigender Wurmbürde der Schafe eine niedrigere Erythrozytenzahl beobachtet werden, wohingegen die Werte der Erythrozyten in den futterreichen Sommermonaten wieder deutlich ansteigen (Jain, 1993). Die Temperatur beeinflusst insofern die Blutwerte (da Silva et al., 1992); (McManus et al., 2009), indem sich bei einem Wert von über 25 °C ein Abfall der Erythrozyten, der Leukozyten, der Hämoglobinkonzentration sowie des Hämatokrits zeigt. Diese Veränderungen sind bei geschorenen Schafen besonders deutlich zu erkennen. Bei ungeschorenen Schafen hingegen überwiegen Veränderungen der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, der Lymphozyten, der Monozyten und der Blutglukose (da Silva et al., 1992).

Weiterhin kann sowohl der Gesundheitszustand, die Fütterung, individuelle Faktoren wie Stress und Trächtigkeit als auch die Technik der Blutentnahme und der Bestimmung der Blutparameter Einfluss auf die Blutwerte nehmen (Jain, 1993). Bei Aufregung oder Stress ist die noradrenalininduzierte, physiologische Leukozytose durch eine Neutrophilie in Verbindung mit einer Lymphozytose, einer Monozytose und einer milden Eosinopenie gekennzeichnet. Endogene

oder exogene Kortikosteroideinwirkungen haben hingegen eine Neutrophilie, eine Lymphopenie, eine Eosinopenie und eine Monozytose zur Folge (Taylor, 2000). Während der Trächtigkeit nimmt die Zahl der Leukozyten beim Mutterschaf tendenziell zu, um zum Zeitpunkt des Gebärens den Höhepunkt zu erreichen (Ullrey et al., 1965b). Im Zeitraum um die Geburt zeigt sich beim Mutterschaf eine deutliche Neutrophilie, eine Lymphopenie und eine milde Eosinopenie, wobei sich die Werte in den ersten zwei Wochen post partum wieder normalisieren (Ullrey et al., 1965b); (Taylor, 2000). Schafe besitzen ebenso wie andere Wiederkäuer, Schweine, Hühner, Ratten und Mäuse ein lymphozytäres Blutbild. Dies bedeutet, dass im Blut mehr als 50 % der Leukozyten Lymphozyten darstellen (Lösch et al., 2000).

Die in der Literatur angegebenen Referenzwerte für das Blut des Schafes unterscheiden sich je nach Autor. Die Tabelle II.1 führt die von Kramer (Kramer, 2000) beschriebenen Referenzwerte des adulten Schafes auf.

Tabelle II.1: Physiologische Blutwerte des adulten Schafes

	Einheit	Spannbreite	Mittel
Rotes Blutbild			
Erythrozyten	$\times 10^6/\mu\text{l}$	9 - 15	12
Hämoglobin	g/l	90 - 150	115
Hämatokrit	%	27 - 45	35
MCV	fL	28 - 40	34
MCH	pg	8 - 12	10
MCHC	%	31 - 34	32,5
Weißes Blutbild			
Leukozyten gesamt	$\times 10^3/\mu\text{l}$	4 - 12	8
Lymphozyten			
Gesamtzahl	$\times 10^3/\mu\text{l}$	2 - 9	5
Prozentualer Anteil	%	40 - 75	62
Neutrophile Granulozyten			
<i>Stabkernige</i>			
Gesamtzahl	$\times 10^3/\mu\text{l}$	selten	
Prozentualer Anteil	%	selten	
<i>Segmentkernige</i>			
Gesamtzahl	$\times 10^3/\mu\text{l}$	0,7 - 6	2,4
Prozentualer Anteil	%	10 - 50	30
Eosinophile Granulozyten			
Gesamtzahl	$\times 10^3/\mu\text{l}$	0 - 1	0,4
Prozentualer Anteil	%	0 - 10	5
Basophile Granulozyten			
Gesamtzahl	$\times 10^3/\mu\text{l}$	0 - 0,3	0,05
Prozentualer Anteil	%	0 - 3	0,5
Monozyten			
Gesamtzahl	$\times 10^3/\mu\text{l}$	0 - 0,75	0,2
Prozentualer Anteil	%	0 - 6	2,5
Thrombozyten			
Gesamtzahl	$\times 10^3/\mu\text{l}$	250 - 750	400
Fibrinogen			
Gesamtzahl	mg/dl	100 - 500	
Plasmaproteine			
Gesamtzahl	g/dl	6,0 - 7,5	

MCV = mean corpuscular volume, MCH = mean corpuscular hemoglobin, MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration

2. Charakterisierung der einzelnen Blutzellen

2.1 Erythrozyten

2.1.1 Allgemeines

Wie bereits in der Tabelle II.1 ersichtlich, beträgt die Anzahl der Erythrozyten im Blut des Schafes ca. $12 \times 10^6/\mu\text{l}$ ($9 - 15 \times 10^6/\mu\text{l}$) (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Innerhalb einer Tierart existieren jedoch, bedingt durch Rasse-, Alters- und Geschlechtsunterschiede, erhebliche Schwankungen der Erythrozytenzahlen (Hees und Tschudi, 1990), auf die in Kapitel 1.3 bereits ausführlich eingegangen wurde. Die Lebensdauer der roten Blutkörperchen beträgt bei adulten Schafen im Schnitt 140 - 150 Tage (Kramer, 2000), bei Lämmern mit einem Alter von 3 Monaten ca. 46 Tage (Jain, 1993) und steht im direkten Verhältnis zum Stoffwechsel und somit zum Körpergewicht der Tiere (Hawkey und Dennet, 1990). Der Hämatokrit gibt den prozentualen Anteil der zellulären Bestandteile am Gesamtblutvolumen an. Da die Erythrozyten den Großteil der Zellen im Blut ausmachen, wird der Hämatokrit im Wesentlichen von der Erythrozytenzahl und -größe bestimmt. Das Verhältnis von Erythrozyten zu Leukozyten beträgt 1000:1 (Lösch et al., 2000).

2.1.2 Bildung

Die roten Blutkörperchen haben, wie alle Blutzellen, eine mesodermale Herkunft (Lösch et al., 2000). Die Erythropoese dauert ungefähr 7 - 8 Tage (Jain, 1993) und beginnt mit den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (Liebich, 2004), aus welchen durch mitotische Teilungen die erythropoetischen Vorläuferzellen (Proerythroblasten) entstehen. Diese frühe Phase der Erythropoese wird durch das Hormon Erythropoietin gesteuert, das bei Sauerstoffmangel in der Niere gebildet wird (Liebich, 2004). Die Rate der Neubildung entspricht ungefähr der Abbaurate gealterter Erythrozyten (Hawkey und Dennet, 1990); (Lösch et al., 2000). Nach der Phase des Proerythroblasten durchlaufen die Zellen die Stadien des Makroblasten, des basophilen, des polychromatischen, des orthochromatischen bzw. azidophilen Erythroblasten (Normoblasten) und des Retikulozyten (Proerythrozyt), um letztendlich zum reifen Erythrozyten zu werden (Liebich, 2004). Eine einzige Vorläuferzelle bringt 16 Erythrozyten hervor (Sinowatz, 2006a), da vier Mitosen erfolgen (Jain, 1993). Während der Entwicklung zum reifen Erythrozyten werden die Zellen immer kleiner und verlieren schließlich Nukleolen und Nukleus. Die einzelnen Entwicklungsstadien lassen sich aufgrund der Größe, des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses, der Kernstruktur und der Anfärbarkeit des Zytosplasmas differenzieren (Lösch et al., 2000).

Der Proerythroblast, im Englischen auch als Rubriblast bezeichnet (Jain, 1993), stellt eine junge,

runde, basophile Zelle dar. Er hat einen Kern mit scharf begrenzten Nukleolen (Lösch et al., 2000) und ist ca. 20 - 25 μm groß. Sehr schnell teilt sich dieser unter Verkleinerung des Zellkernes zum Makroblasten. Bereits in dieser Phase der Erythropoese beginnt die Einlagerung von Hämoglobin in das Zytoplasma. Der Markroblast differenziert sich nach nochmaliger Teilung zum basophilen Erythroblasten (Liebich, 2004), welcher auch als Prorubrizyt bezeichnet wird (Banks, 1981); (Jain, 1993) und einen deutlich kleineren, dichteren und basophilen Kern besitzt (Liebich, 2004). Die basophilen Erythroblasten ordnen sich in Gruppen um Retikulumzellen an, die als „Ammenzellen“ fungieren und das für die Hämoglobinsynthese notwendige Eisen in Form eines Transferrin-Eisen-Komplexes liefern (Sinowatz, 2006a). Aus dem basophilen Erythroblasten entwickelt sich der polychromatische Erythroblast (Liebich, 2004), welcher auch Rubrizyt genannt wird (Banks, 1981); (Jain, 1993). Dieser ist durch einen bereits hohen Anteil an azidophilem Hämoglobin bei einer geringen zytoplasmatischen Basophilie gekennzeichnet. Im Verlauf kommt es durch weitere Zunahme der Hämoglobinkonzentration und dem Verlust basophiler Organellen (Ribosomen oder raues endoplasmatisches Retikulum) zur Entstehung des orthochromatischen bzw. azidophilen Erythroblasten (Liebich, 2004), der im Englischen auch Metarubrizyt bezeichnet wird (Banks, 1981); (Jain, 1993). Im weiteren Verlauf entwickelt sich der Retikulozyt. Nach einer Verdichtung und Schrumpfung des Chromatins folgt eine Kernpyknose, der sich die für Säugetiere charakteristische Kernausschleusung (Enukleation) anschließt. Die in der Zelle verbliebenen Reste von Organellen, wie Golgi-Vesikel, Polyribosomen, Membranen des endoplasmatischen Retikulums oder Mitochondrien, verklumpen (Liebich, 2004) und durch die Reste von RNA im Zytoplasma bildet sich ein feines netzartiges Gerüst, das dem Retikulozyt seinen Namen gibt (Sinowatz, 2006a). Dieser ist nicht mehr teilungsfähig (Lösch et al., 2000) und wandelt sich innerhalb von 24 Stunden nach Verlust der verbleibenden Innenstrukturen in den reifen, organellenlosen Erythrozyten um (Liebich, 2004). Im Blut adulter Schafe sind gewöhnlich keine oder nur äußerst wenige Retikulozyten zu finden. Jeglicher Anstieg der Retikulozyten deutet daher auf eine Stimulation des erythropoetischen Systems hin. Bei Lämmern können zum Zeitpunkt der Geburt nur sehr wenige (unter 1 %) Retikulozyten im Blut gefunden werden, wogegen eine höhere Zahl (bis zu 9 %) bei einem Alter von 2 - 7 Tagen auftreten kann (Jain, 1993). Die Bildung der roten Blutkörperchen wird von sehr vielen Faktoren beeinflusst. Neben Erythropoietin spielen Interleukine (IL3, IL9), Prostaglandine (PGE₁, PGE₂, PGI₂), GM-CSF, Androgene, Kortikosteroide, Wachstumshormone und Thyroxine eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Erythropoese (Jain, 1993).

2.1.3 Morphologie

Bei den Wirbeltieren bestehen bezüglich der Erythrozytenmorphologie beträchtliche

Unterschiede. Diejenigen der Säugetiere sind kernlos und im Allgemeinen kleiner als die der Vögel und der Reptilien. Neben Ziegen und Hirschen weisen die Schafe die kleinsten Erythrozyten auf (Hawkey und Dennet, 1990). Ihr Durchmesser beträgt sowohl bei Lämmern als auch bei adulten Tieren im Durchschnitt 4 - 5 μm , wobei auch Zellen mit einer Größe von 3 μm bis zu 8 μm vorkommen können (Greenwood, 1977). Die Größe der roten Blutkörperchen steht innerhalb einer Familiengruppe im Verhältnis zur Körpergröße (Hawkey und Dennet, 1990); (Lösch et al., 2000), sie kann jedoch durch Umweltfaktoren beeinflusst werden. So besitzen Schafe in höheren Lagen, bedingt durch den niedrigeren Sauerstoffgehalt der Luft, in der Regel kleinere Erythrozyten, wodurch eine größere Oberfläche zur Sauerstoffaufnahme erreicht wird (Hawkey und Dennet, 1990). Bei den Haussäugetieren besteht weiterhin eine negative Korrelation zwischen Größe und Anzahl der Erythrozyten (Lösch et al., 2000). Eine Anisozytose beschreibt eine ungleichmäßige Größenverteilung gewöhnlich gleich großer Zellen (Hees und Tschudi, 1990); (Reagan et al., 2008) und ist beim Schaf nicht selten zu beobachten (Greenwood, 1977). Erythrozyten, deren Größe sich im Normalbereich bewegt, werden als Normozyten bezeichnet, kleinere als Mikrozyten und größere als Makrozyten (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990). Die rote Blutzelle stellt bei den meisten Haussäugetieren eine kernlose, bikonkav, runde Scheibe dar (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004). Im gefärbten Blutausstrich lässt sich eine zentrale Aufhellung erkennen, an deren Stelle sich der zuvor ausgestoßene Kern befand (Hees und Tschudi, 1990). Dies trifft in der Regel auch für ovine Erythrozyten zu, doch können beim Schaf teilweise auch unikonkav Zellen auftreten (Jain, 1993). Aufgrund des fehlenden Kernes weisen die Erythrozyten der Säuger eine hohe Formflexibilität auf und unterliegen dadurch ständigen reversiblen Strukturveränderungen (Liebich, 2004). Für diese Vorgänge ist das Membranskelett bedeutend, das sich parallel zur Erythrozytenmembran auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle befindet (Hees und Tschudi, 1990). Bestimmte Strukturproteine ermöglichen die für die Verformung notwendige Flexibilität der Membran (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991). Dies ermöglicht den Zellen, selbst kleinste Kapillaren zu passieren (Liebich, 2004), wobei sie in solch einer Situation häufig eine so genannte Napfform annehmen (Kramer, 2000). Der halbflüssige, fein granulierte und homogene Zellinhalt besteht hauptsächlich aus Wasser. Weiterhin sind vor allem der rote Blutfarbstoff Hämoglobin und Enzyme enthalten (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a). Zellorganellen sind nicht vorhanden (Sinowatz, 2006a). Die Erythrozyten vom Schaf neigen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur in geringem Ausmaß zur Geldrollenbildung (Kramer, 2000), die durch Ladungsänderungen an der Zelloberfläche bedingt und durch eine lineare, aufeinander gestapelte Anordnung der Zellen gekennzeichnet ist (Reagan et al., 2008). Bei Wiederkäuern kann gelegentlich eine basophile Tüpfelung der Erythrozyten, die durch verbleibende RNA-Aggregate in der Zelle zustande kommt, beobachtet werden (Reagan et al., 2008). Diese kann sowohl physiologisch bei jungen Erythrozyten (Jain, 1993) als auch in

Verbindung mit einer regenerativen Anämie vorkommen. So genannte Howell-Jolly-Körperchen stellen ganze Kernreste dar und können ebenfalls im Zuge einer Anämie auftreten (Reagan et al., 2008). Eine Variation der sonst runden Zellform wird als Poikilocytose bezeichnet und kann beim Schaf gelegentlich beobachtet werden (Reagan et al., 2008). Echinozyten sind Erythrozyten mit vielen kleinen, gleichmäßigen, stacheligen Fortsätzen auf der Zelloberfläche und stellen in den meisten Fällen in vitro-Artefakte dar (Jain, 1993); (Reagan et al., 2008). Diese Stechpfeiform entsteht entweder durch zu langsames Trocknen dicker Ausstriche (Kraft et al., 2005) oder durch Schrumpfung der Erythrozyten in Folge von Flüssigkeitsaustritt in hypertonen Lösungen (Hees und Tschudi, 1990). Bei Schafen können, wenn auch selten, einzelne Drepanozyten, also sichelförmige Erythrozyten, gefunden werden (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993). Die Membran der Erythrozyten besitzt eine glatte Oberfläche. Sie besteht aus zwei elektronendichten Schichten, welche durch eine elektronendurchlässige Schicht voneinander getrennt sind. Aus biochemischer Sicht setzt sich die Zellmembran aus Proteinen, Lipiden und zu einem geringeren Anteil aus Kohlenhydraten zusammen (Jain, 1993). Die Zellmembran sämtlicher Körperzellen, also auch die der Erythrozyten, trägt die antigenen Determinanten der jeweiligen Zelle (Hudson et al., 1975). Anhand der Struktur und der Eigenschaften der Erythrozytenglykocalix können außerdem die Blutgruppen bestimmt werden (Kolb, 1991).

2.1.4 Aufgaben

Die Hauptfunktion der roten Blutkörperchen besteht im Transport von Sauerstoff mittels Oxyhämoglobin von der Lunge zu den Körpergeweben und im Abtransport von Kohlendioxid durch Carboxyhämoglobin von den Geweben zur Lunge (Banks, 1981). Die bikonkav Form der Erythrozyten gewährleistet ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, wodurch ein rascher und effizienter Gasaustausch ermöglicht wird. Für die Transportfunktion ist der rote Blutfarbstoff, das Hämoglobin, verantwortlich. Dieses besteht aus der sauerstofftragenden, prosthetischen Gruppe (Häm) und dem tierartspezifischen Proteinanteil (Globin). Insgesamt können vier Sauerstoffmoleküle reversibel gebunden und transportiert werden, weil das komplexe Hämoglobinprotein aus vier Untereinheiten und demzufolge auch aus vier sauerstofftragenden Häm molekülen mit je zwei α - bzw. β -Polypeptidketten aufgebaut ist (Lösch et al., 2000). Hämoglobin ist mit einem Anteil von 95 % an der Trockenmasse des Erythrozyten in sehr hoher Konzentration in den roten Blutkörperchen verpackt (Jain, 1993), die Hämoglobinkonzentration im Gesamtblut beläuft sich beim Schaf auf 90 - 150 g/l (Kramer, 2000). Die Sauerstoffkonzentration im Blut hängt von der Hämoglobinkonzentration und dem Ausmaß der Sättigung des Hämoglobins mit Sauerstoff ab. Die Oxyhämoglobinsättigung hingegen wird durch die Sauerstoffspannung und die Sauerstoffaffinität des Blutes bestimmt (Moraga et al., 1996). Bei

Wiederkäuern existieren allgemein drei Hämoglobin-Arten, nämlich embryonales (HbE), fetales (HbF) und adultes (HbA) Hämoglobin (Kramer, 2000), wobei beim Schaf zwei HbE-Typen, ein HbF-Typ und bis zu vier HbA-Typen vorkommen (Jain, 1993). Das Schaf besitzt neben der Ziege als Besonderheit zudem ein vierter Hämoglobin, das HbC. HbF ersetzt bereits im Uterus HbE (Kramer, 2000). Laut Barker et al. (1980) wird HbF beim Schaf nur vom Tag 30 - 125 der Trächtigkeit synthetisiert (Barker et al., 1980). Jain (1993) gibt jedoch an, dass die HbF-Konzentration zum Zeitpunkt der Geburt mit einem Anteil von 90 - 95 % am höchsten ist und dass diese beim Schaf in den ersten 40 - 50 Tagen durch den Ersatz durch HbA sinkt (Jain, 1993). Die Erythrozyten des Schafes mit fetalem Hämoglobin sind osmotischen Einflüssen gegenüber weniger empfindlich als solche mit adultem Hämoglobin (Jain, 1993). HbC erscheint um den Zeitpunkt der Geburt, steigt etwas an, und wird innerhalb der ersten postnatalen Monate durch HbA ersetzt (Kramer, 2000). Eine Besonderheit beim Schaf ist die Fähigkeit zur reversiblen Umwandlung von HbA zu HbC, die durch Erythropoietin stimuliert wird (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Ein Wandel von HbA zu HbC findet beispielsweise als Antwort auf eine Anämie statt, bei der es durch Sauerstoffmangel zur Erythropoietinausschüttung kommt. HbC hat eine höhere Affinität zu Sauerstoff und erleichtert zugleich dessen Freisetzung, wodurch die Anwesenheit dieses Hämoglobin-Typs bei Gewebshypoxien große Vorteile bietet (Jain, 1993). Nur Schafe mit den HbA-Phänotypen A oder AB können HbC exprimieren, das dann etwa 15 - 20 % des Gesamthämoglobins ausmacht. Schafe mit dem HbA-Phänotyp B hingegen besitzen kein HbC (Kramer, 2000).

2.1.5 Zytchemische Eigenschaften

Essentiell für das Überleben der Erythrozyten ist Glutathion, das einen wichtigen Oxidationsschutz in der Zelle darstellt (Suzuki und Agar, 1983); (Lösch et al., 2000). Die roten Blutkörperchen der Schafe können anhand ihrer Kaliumkonzentration in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Agar et al., 1975a). Eine Gruppe weist einen hohen Kalium-, aber einen niedrigen Natriumgehalt (HK), die andere dagegen einen niedrigen Kalium- und einen hohen Natriumgehalt (LK) auf. Die Erythrozyten der Lämmer haben, unabhängig von denen im Erwachsenenalter, stets eine hohe Kaliumkonzentration (Greenwood, 1977). Die beiden Gruppen zeigen deutliche Unterschiede in manchen Enzymaktivitäten (Agar et al., 1975a). Zudem variieren die Aktivitäten der einzelnen Enzyme der Erythrozyten bei den verschiedenen Schafrassen (Agar et al., 1975b). Die Erythrozyten der Schafe haben keine Peroxidase-Aktivität, lassen sich nicht mit Sudan-Schwarz anfärben und reagieren negativ bei der Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (Al Izzi et al., 2007). Fey und Kuntze (1970) konnten die α -Naphthyl-Azetat-Esterase und die Naphthol-AS-Azetat-Esterase auf der Oberfläche von ovinen Erythrozyten nachweisen, nicht jedoch die

Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase, die saure Phosphatase und die alkalische Phosphatase (Fey und Kuntze, 1970). Diallo et al. (1975) hingegen berichten über eine Aktivität der sauren Phosphatase in den Erythrozyten der Schafe (Diallo et al., 1975). In den roten Blutkörperchen wird, bei Wiederkäuern jedoch in eingeschränktem Maße, 2,3-Biphosphoglycerat (2,3-BPG) gebildet (Gattinoni und Samaja, 1979); (Jain, 1993), das die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins mindert und somit die Sauerstoffabgabe aus der Zelle erhöht (Jain, 1993). Die niedrigere 2,3-BPG Konzentration hat demnach Auswirkungen auf die Sauerstoffaffinität der Erythrozyten und auf den Säure-Basen-Haushalt im Blut des Schafes (Gattinoni und Samaja, 1979).

2.2 Thrombozyten

2.2.1 Allgemeines

Thrombozyten sind die kleinsten Blutelemente und spielen eine wichtige Rolle bei der Hämostase (Hawkey und Dennet, 1990); (White, 2007). Die Zahl der Thrombozyten im Blut des Schafes beläuft sich auf $250 - 750 \times 10^3/\mu\text{l}$, wobei der Durchschnitt bei $400 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut liegt (Kramer, 2000). Sie unterliegt positiven und negativen Feedbackmechanismen (Jain, 1993) und wird nachhaltig von der Milz beeinflusst (Hees und Tschudi, 1990), da diese möglicherweise einen Inhibitor der Thrombopoiese produziert und alternde oder zerstörte Thrombozyten neben dem Knochenmark und der Leber eben auch in der Milz abgebaut werden. Zusätzlich stellt die Milz als „splenic pool“ neben dem „non-splenic pool“, der vermutlich von den Lungen, der Leber, dem Herz und dem Knochenmark gebildet wird, einen Speicher für Blutplättchen dar. Aus diesen Pools können äußerst schnell Thrombozyten mobilisiert werden, wodurch sich die Zahl der zirkulierenden Thrombozyten rasch vervielfachen kann. Im Allgemeinen gilt, dass Anzahl und Größe der Thrombozyten in umgekehrter Beziehung zueinander stehen. Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt bei Schafen ungefähr 9 - 11 Tage (Jain, 1993). Während des Alterungsvorgangs werden sie durch Änderungen des Kohlenhydratmusters der Zellmembran von Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (MPS) in Milz und Leber erkannt, phagozytiert und abgebaut (Lösch et al., 2000); (Sinowatz, 2006a).

2.2.2 Bildung

Die Thrombozyten gehen aus den myeloiden Stammzellen im Knochenmark hervor (Lösch et al., 2000) und entstehen wahrscheinlich durch Zytoplasmafragmentierung der Megakaryozyten (Jain, 1993). Der genaue Ablauf der Blutplättchenformation ist jedoch nicht völlig geklärt (Jain, 1993); (Leven, 2000). Aus den Stammzellen entstehen zunächst die Megakaryoblasten, die sich über das

Stadium der Promegakaryozyten schließlich zu den Megakaryozyten entwickeln (Liebich, 2004). Charakteristisch für den Verlauf der Thrombopoese ist eine Zunahme der Zellgröße und der Zahl der Nuklei pro Zelle (Banks, 1981). Durch Endomitose (Endoreduplikation), also Karyokinese (Kernteilung) ohne nachfolgende Zytokinese (Teilung des Zytoplasmas), besitzen die Vorläuferzellen einen polyploiden Kern (Banks, 1981); (Jain, 1993).

Die Megakaryoblasten sind ungefähr 15 - 50 μm groß (Leven, 2000) und weisen einen runden (Banks, 1981), oft gekerbten Kern mit vielen Nukleoli auf (Liebich, 2004), der fast die gesamte Zelle einnimmt (Jain, 1993). Das Zytoplasma erscheint aufgrund zahlreicher freier Ribosomen basophil und in der peripheren Zone schaumig (Banks, 1981). In diesem frühen Stadium findet bereits eine mehrfache Vermehrung des Chromosomensatzes ohne nachfolgende Kernteilung statt. Durch eine anschließende Karyokinese entstehen die Promegakaryozyten, die sich durch einen stark gelappten, polyploiden Kern auszeichnen (Liebich, 2004). Sie sind mit 50 - 75 μm größer als deren Vorläuferzellen. Das Zytoplasma ist reichlicher vorhanden als beim Megakaryoblasten (Leven, 2000), enthält zahlreiche Granula und kann auch hier in der Peripherie schaumig erscheinen. Durch nochmaliges Teilen der Chromosomen entstehen schließlich die Megakaryozyten (Banks, 1981), die auch als Knochenmarkriesenzellen bezeichnet werden (Sinowatz, 2006a). Die erst unreifen Reservezellen haben einen stark gekerbten Kern und deren Zytoplasma schließt zahlreiche Ribosomen und Granula ein (Banks, 1981). Reife Megakaryozyten stellen mit einem Durchmesser von bis zu 100 - 150 μm (Leven, 2000); (Liebich, 2004) die größten hämatopoetischen Zellen im Knochenmark dar (Jain, 1993) und sind in unmittelbarer Nähe von Gefäßen zu finden (Leven, 2000); (Sinowatz, 2006a). Sie zeichnen sich durch einen gelappten Kern mit groben Heterochromatinbereichen (Hees und Tschudi, 1990) und ein extrem verbreiteretes, eosinophiles Zytoplasma mit zahlreichen azuropilen Granula aus. Das Zytoplasma der reifen Megakaryozyten kann in drei Zonen unterteilt werden. In der peripheren Zone sind wenige membranbegrenzte Organellen vorhanden, sie enthält jedoch viele Mikrofilamente und Glykogenpartikel. Die den größten Zytoplasmaanteil beherbergende, intermediäre Zone (Leven, 2000) wird von dem so genannten „demarcation membrane system“ (DMS) dominiert (Jain, 1993); (Leven, 2000). Diese auch als „Demarkationsmembranen“ bezeichneten, zisternenartigen Einstülpungen der Megakaryozytenoberfläche (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a) sind aufgrund struktureller und immunologischer Ähnlichkeiten vermutlich für die Entwicklung der späteren Plasmamembran der Thrombozyten verantwortlich. In dieser Zone sind zudem Lysosomen, Mitochondrien, Ribosomen, Mikrotubuli, Mikrofilamente und sich entwickelnde Granula vorzufinden (Leven, 2000). Die perinukleäre Zone enthält neben dem Golgi-Apparat freie Ribosomen, raues endoplasmatisches Retikulum (Jain, 1993); (Leven, 2000) und heranreifende Granula (Jain, 1993). Die reifen Megakaryozyten verlassen das Knochenmark und zerfallen beim Übertritt ins Blut und auch in den Pulmonalarterien in die

Thrombozyten (Lösch et al., 2000). Die Entstehung der Thrombozyten erfolgt vermutlich dadurch, dass sich die Demarkationsmembranen im Zytoplasma mit einem Netz aus Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums verbinden, wodurch ein dreidimensionales intrazelluläres Raumsystem entsteht. Dieses schließt Zytoplasmaanteile mit azuophilen Granula, Vesikeln, Mikrotubuli und Mikrofilamenten ein (Liebich, 2004). Durch die Abschnürung dieser Zytoplasmaanteile entstehen schließlich die Blutplättchen (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004). Der Kern des Megakaryozyten geht zugrunde und wird von Retikulumzellen und Makrophagen phagozytiert (Sinowatz, 2006a). Die Thrombopoese dauert ca. 10 - 12 Tage (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a), wobei aus einem Megakaryozyten in ca. 3 - 12 Stunden 2000 - 8000 Thrombozyten hervorgehen können (Hees und Tschudi, 1990). Sie läuft unter Einfluss verschiedener hämatopoetischer Wachstumsfaktoren ab (Lösch et al., 2000) und wird zudem durch die Anzahl zirkulierender Blutplättchen im Blut gesteuert (Jain, 1993). Thrombopoietin reguliert die Bildung der Megakaryozyten auf drei verschiedene Weisen. Erstens kommt es zu einer Stimulation der Stammzellen im Knochenmark, zweitens induziert es zusätzliche Endomitosen in unreifen Megakaryozyten und drittens verkürzt es deren Reifungszeit (Jain, 1993). Neben Thrombopoietin wird die Bildung der Thrombozyten aber auch durch Meg-CSF, GM-CSF, G-CSF, IL1, IL3, IL4, IL6 und IL11 stimuliert (Jain, 1993).

2.2.3 Morphologie

Thrombozyten stellen flache, kernlose Zytoplasmascheibchen mit einer meist unregelmäßigen Form dar (Liebich, 2004), weshalb sie von manchen Autoren oft auch als „Blutplättchen“ bezeichnet werden (Hawkey und Dennet, 1990); (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004). Seitlich betrachtet besitzen ruhende Thrombozyten eine scheibenförmige oder linsenförmige Gestalt (Jain, 1993). Ihr Durchmesser beläuft sich auf ca. 2 - 4 μm (Banks, 1981); (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004) und die Dicke auf ca. 0,5 μm (Hees und Tschudi, 1990), wobei die Schafe unter den Haussäugetieren neben Rindern und Pferden die kleinsten Thrombozyten aufweisen (Hees und Tschudi, 1990). Bei den Blutplättchen können zwei Zonen unterschieden werden (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a). Das Granulomer, auch als Chromomer bezeichnet (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990), stellt die innere, dichte Zentralzone dar und wird ringartig vom Hyalomer, der durchsichtigen Randzone, umgeben (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a). Das Granulomer erscheint basophil und enthält Granula, Mitochondrien (Banks, 1981), wenige Golgi-Zisternen (Hees und Tschudi, 1990), Lysosomen, Peroxisomen, Glykogen und bei jungen Thrombozyten wenige Ribosomen (Sinowatz, 2006a). Morphologisch können α -Granula von elektronendichten Granula („dense bodies“) und Lysosomen unterschieden werden (Lösch et al., 2000); (Reed, 2007); (White, 2007); (Cerecedo et

al., 2010). Die zahlreich vorkommenden α -Granula haben eine runde bis ovale Form (White, 2007), sind etwa 0,2 - 0,3 μm groß und erscheinen azurophil (Liebich, 2004). Die „dense bodies“ sind kleiner und in geringerer Zahl als die α -Granula vorhanden (Hartwig, 2007). Sie zeichnen sich durch einen intensiv elektronendichten, kugelförmigen Innenkörper aus, der von der umgebenden Membran durch einen scheinbar leeren Zwischenraum getrennt wird, weshalb die Bezeichnung „bulls eye“ Verwendung findet (White, 2007). Die schnelle Freisetzung endogener Thrombozytenstoffe wird durch eine bestimmte Anordnung intrazellulärer Kapillaren, die das „open canalicular system“ (OCS) bilden, gewährleistet. Die verzweigten Kanalikuli erstrecken sich ausgehend vom Granulomer durch das Hyalomer hindurch bis an die Zelloberfläche (Hees und Tschudi, 1990). Die Kanälchen selbst tragen eine Glykokalix, da diese Invaginationen der Zellmembran darstellen (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993). Bei einer Aktivierung der Thrombozyten verschmelzen die Granula im Zellzentrum mit dem OCS und setzen ihre Stoffe frei, die daraufhin in den extrazellulären Raum gelangen können (Cerecedo et al., 2010). Zwischen Granulomer und Hyalomer befindet sich das „dense tubular system“ (DTS) (Hees und Tschudi, 1990), das aus residualen Kanälchen des endoplasmatischen Retikulums besteht (White, 2007) und nicht mit dem OCS oder der Zelloberfläche in Verbindung steht (Hees und Tschudi, 1990). Das Hyalomer stellt eine homogen strukturierte Zytoplasmazone dar, in der Vesikel, Glykogenpartikel (Banks, 1981), Mikrofilamente, Mikrotubuli (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004) und Myosinfilamente enthalten sind (Liebich, 2004). Die Zellmembran der Thrombozyten ist in der Regel glatt und kann bei aktivierten Zellen fadenförmige Oberflächenprojektionen besitzen. Kleine Eindellungen mit einem Durchmesser von etwa 25 nm an der Zelloberfläche entsprechen den Mündungen der bereits erwähnten Kanalikuli (Jain, 1993) zur Freisetzung endogener Thrombozytenprodukte (Hees und Tschudi, 1990).

2.2.4 Aufgaben

Die Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Blutstillung (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990). An der Hämostase sind vier verschiedene Mechanismen beteiligt, nämlich die Vasokonstriktion, die Bildung eines Thrombozytenaggregats (primäre Blutstillung), die Blutgerinnung (sekundäre Blutstillung) und die Bildung von Bindegewebe zum endgültigen Wundverschluss. Nach einer Verletzung kommt es durch eine initiale Vasokonstriktion zur Verringerung des Blutflusses (Lösch et al., 2000), wobei die Blutplättchen aufgrund ihres Serotoningehalts wichtige Mediatoren hierfür darstellen (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993); (Sinowatz, 2006a). Sehr rasch folgt eine durch den von-Willebrand-Faktor vermittelte Adhäsion der Thrombozyten im Bereich der verletzten Gefäßwand (Lösch et al., 2000). Auf die Anheftung folgt eine Aktivierung, die eine Formänderung mit

Pseudopodienbildung und die Freisetzung von Inhaltsstoffen aus den Granula bewirkt (Banks, 1981); (Liebich, 2004). Daraufhin kommt es zur Agglutination der Blutplättchen (Sinowatz, 2006a), wobei die Ausbildung von Fibrinogenbrücken zwischen den Thrombozyten zur Entstehung eines Thrombozytenaggregats führt. Eine sich anschließende Bildung von Fibrin (Gerinnung) führt zur Vernetzung des Thrombozytenaggregats und zu einer Stabilisierung des Thrombozytenprofes. Durch Kontraktionen bestimmter Zytoskelettfilamente (siehe Kapitel 5.3.2) kommt es zur Retraktion des Gerinnsels und somit zur weiteren Stabilisierung, zur Annäherung der Gefäßwände und schließlich zum Stillstand der Blutung (Lösch et al., 2000). Die Thrombozyten setzten ferner bestimmte Wachstumsfaktoren frei, die durch Anregung einer Endothelzellproliferation die Reparatur eines Gefäßschadens positiv beeinflussen (Sinowatz, 2006a). Obwohl die Hämostase die Hauptaufgabe der Thrombozyten darstellt, übernehmen sie weitere wichtige Funktionen (Banks, 1981). Sehr wahrscheinlich spielen sie eine Rolle im Entzündungsgeschehen. Außerdem binden Thrombozyten Endotoxin, um dieses möglicherweise zu entgiften (Jain, 1993).

2.2.5 Zytchemische Eigenschaften

Die α -Granula weisen einen heterogenen Inhalt (Hees und Tschudi, 1990) mit zahlreichen wichtigen Proteinen für die Thrombozytenfunktion auf, darunter von-Willebrand-Faktor, Plättchenfaktor 4 und 1, Wachstumsfaktoren, β -Thromboglobulin, Thrombospondin, Fibrinogen und Fibronektin. Zudem sind kationische Proteine, ein Thrombozyten-spezifisches basisches Protein, Albumin und Katalase vorhanden (Jain, 1993). Die elektronendichten Granula enthalten Adenin-Nukleotide (Kolb, 1991); (Jain, 1993), Histamin, Serotonin und Kalzium. In den Lysosomen befinden sich saure Hydrolasen wie die saure Phosphatase oder die β -Glucuronidase. Das DTS enthält zudem Kalzium, Enzyme für die Prostaglandinsynthese und ein Isoenzym der Peroxidase (Jain, 1993). Das Vorkommen dieser Thrombozyten-spezifischen Peroxidase variiert jedoch von Spezies zu Spezies. Daimon et al. (1985) konnten diese in ovinen Thrombozyten nicht nachweisen (Daimon et al., 1985). Fey und Kuntze (1970) berichten über eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase und der Naphthol-AS-Azetat-Esterase in den Thrombozyten von Schafen (Fey und Kuntze, 1970). Lanillo und Cabezas (1981) bestimmten verschiedene Markerenzyme der ovinen Thrombozyten. So ist das Vorkommen der β -N-Acetylglucosaminidase charakteristisch für die Granula, wogegen die Glucose-6-Phosphatase in den Mikrosomen und die Succinat-Dehydrogenase in den Mitochondrien vorkommt (Lanillo und Cabezas, 1981). Die Thrombozyten zeigen weiterhin eine positive Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (Romeis, 1989).

2.3 Lymphozyten

2.3.1 Allgemeines

Die Lymphozyten gehören bei den Leukozyten neben den Monozyten zur Untergruppe der Agranulozyten (Liebich, 2004). Sie können anhand ihrer Funktion und ihrer Größe in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, worauf in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen wird. Aber auch im Bezug auf die Lebenserwartung kann man zwei Gruppen unterscheiden, nämlich die langlebigen (T-Zellen und Gedächtniszellen) und kurzlebigen (meist B-Zellen) Lymphozyten (Jain, 1993). Die Spanne der Lebensdauer reicht somit von wenigen Stunden bis zu Jahren (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990). Die Gesamtzahl der Leukozyten im Blut des adulten Schafes beträgt $4 - 12 \times 10^3/\mu\text{l}$, im Mittel $8 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Greenwood, 1977); (Hees und Tschudi, 1990); (Kramer, 2000). Davon sind, charakteristisch für ein lymphozytäres Blutbild, über 50 % der Leukozyten Lymphozyten (Lösch et al., 2000), bei Schafen nämlich im Schnitt 62 % (40 - 75 %). Der genaue Anteil der Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl unterliegt jedoch individuellen und altersbedingten Schwankungen (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993); (Kramer, 2000), auf die in Kapitel 1.3 bereits eingegangen wurde. Die absolute Zahl der Lymphozyten beträgt beim Schaf im Mittel $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($2 - 9 \times 10^3/\mu\text{l}$) (Kramer, 2000), wobei die Zahl der beiden Lymphozyten-Subpopulationen, der T- und B-Zellen, im Körper der Säuger etwa gleich ist (Lösch et al., 2000). Bei den Schafen stellen knapp über 70 % der Blutlymphozyten T-Zellen dar. Der Anteil an B-Zellen im Blut liegt bei knapp unter 30 % (Ristau et al., 1985). Der Großteil der Lymphozyten befindet sich in Lymphknoten, Thymus, Knochenmark und anderen lymphatischen Geweben (Kraft et al., 2005), wogegen nur etwa 2 % im Blut kreisen (Liebich, 2004). Die Lymphozyten unterliegen einer ständigen Zirkulation zwischen Blut, Lymphbahn, Geweben und Organen (Kolb, 1991); (Lösch et al., 2000), die Granulozyten und Monozyten hingegen verlassen ihr Zielgewebe nicht mehr (Lösch et al., 2000).

2.3.2 Bildung

Der Großteil der Lymphozyten wird in lymphatischen Geweben und Organen gebildet (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a). Die Neubildung beginnt jedoch, wie bei allen anderen Blutzellen, mit der pluripotenten Stammzelle im Knochenmark, dem Hämozytoblasten (Kolb, 1991); (Liebich, 2004); (Kraft et al., 2005). Aus diesem gehen die pluripotenten lymphatischen Vorläuferzellen (Progenitorzellen) hervor (Liebich, 2004); (Kraft et al., 2005), die auf ihrer Zelloberfläche bereits eine Determination zur späteren T- oder B-Zelle tragen (Liebich, 2004), jedoch noch keine Antigenrezeptoren besitzen (Silbernagl und Despopoulos, 2001). Sie werden auch als Immunoblasten (Liebich, 2004), Lymphoblasten (Hees und Tschudi, 1990) oder „große

„Lymphozyten“ bezeichnet, da diese Progenitorzellen die größten Zellen in der Entwicklung der Lymphozyten darstellen (Banks, 1981). Man erkennt den Lymphoblasten mitunter an seinem großen, runden Kern mit einem Nukleolus oder mehreren Nukleoli und dem stark basophilen Zytoplasma (Banks, 1981); (Hawkey und Dennet, 1990). Die Lymphoblasten differenzieren sich unter Größenabnahme zu den lymphozytären Zellen, den B- oder T-Lymphozyten (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Kraft et al., 2005). Die noch unreifen Lymphozyten verlassen das Knochenmark, treten ins Blut über und wandern zu den lymphatischen Organen (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004), die in primäre (zentrale) und sekundäre (peripherie) lymphatische Organe unterteilt werden können (Sinowatz, 2006a). Sowohl der Thymus als auch das Bursa-Äquivalent der Säuger, nämlich das lymphatische Gewebe des Knochenmarks (Jain, 1993) und die Payerschen Platten des Darms (Lösch et al., 2000), zählen zu den primären lymphatischen Organen (Jain, 1993). Die Lymphknoten, die Milz, die Tonsillen und das lymphatische Gewebe in den Schleimhäuten des Verdauungstraktes (gut associated lymphoid tissue, GALT), des Respirationstraktes (bronchus associated lymphoid tissue, BALT) und des Urogenitaltraktes (urinary tract associated lymphoid tissue, UTALT) gehören hingegen zu den sekundären lymphatischen Organen (Sinowatz, 2006a). Im Thymus findet die Prägung der T-Lymphozyten statt. Die Stammzellen der T-Zellen haben ihren Ursprung zwar, wie bereits erwähnt, im Knochenmark, wandern aber schon während der embryonalen Entwicklung in den Thymus und reifen dort bis zur Geschlechtsreife der Tiere. Hier werden sie einer positiven Selektion zur Antigenerkennung und einer negativen Selektion zur Eliminierung autoreaktiver T-Zellen unterzogen. Die Prägung der B-Zellen hingegen findet im Bursa-Äquivalent statt (Lösch et al., 2000). In der Prägungsphase hat noch kein Antigenkontakt stattgefunden (Sinowatz, 2006a). In den sekundären lymphatischen Organen erfolgt schließlich die Entwicklung zu immunkompetenten Zellen (Jain, 1993). Im Gegensatz zu anderen Leukozyten sind die kleinen Lymphozyten keine Endzellen und können sich bei entsprechender Stimulation wieder zu Lymphoblasten dedifferenzieren (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990). Sie stehen somit dem Immunsystem als langlebige Gedächtniszellen zur Verfügung (Liebich, 2004) wodurch deren Anzahl je nach Bedarf schnell erhöht werden kann (Banks, 1981). Das Wissen über jene Faktoren, die Produktion, Differenzierung und Vermehrung der Vorläuferzellen der Lymphozyten regulieren, ist noch relativ begrenzt. Einen wichtigen Einfluss auf die Lymphopoese nehmen jedoch sehr wahrscheinlich Thymushormone, Antigene, Interleukine, Tumornekrosefaktor α , T-Zell-Wachstumsfaktor β und Interferon α (Jain, 1993).

2.3.3 Morphologie

Die Lymphozyten der Schafe stellen meist runde bis ovale Zellen mit einem runden bis ovalen

Kern (Yamada und Sonoda, 1972b) und einem basophilen Zytoplasmasaum dar (Norris und Cham-Berlin, 1929). Charakteristisch für die Lymphozyten ist ein relativ hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis (Banks, 1981); (Lösch et al., 2000), da der große Zellkern in den meisten Fällen fast die gesamte Zelle ausfüllt (Yamada und Sonoda, 1972b). Er liegt zentral (Hawkey und Dennet, 1990) oder leicht exzentrisch in der Zelle (Norris und Cham-Berlin, 1929) und weist nicht selten eine Kerninvagination auf (Yamada und Sonoda, 1972b); (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993). Bei einzelnen ovinen Lymphozyten besteht der Kern sogar aus zwei Lappen, die durch einen dünnen Faden verbunden sind (Greenwood, 1977). Aufgrund der hohen Chromatinkondensation zeigt er ein fleckenförmiges Muster (Yamada und Sonoda, 1972b), wobei im Kernzentrum helleres und in der Kernperipherie dunkleres Chromatin zu sehen ist. Bis zu zwei Nukleoli können im Kern der ovinen Lymphozyten vorkommen (Rudolph und Schnabl, 1981). Im meist schmalen Zytoplasma befinden sich einige Mitochondrien, wogegen der Golgi-Apparat nur schlecht entwickelt ist und Zentriolen selten vorkommen (Yamada und Sonoda, 1972b). Die Basophilie des Zytoplasmas lässt sich jedoch durch eine hohe Dichte an Ribosomen, Polyribosomen und rauem endoplasmatischen Retikulum erklären (Jain, 1993); (Liebich, 2004) und variiert mit der Aktivität des Lymphozyten (Jain, 1993). Zellen mit einem dunkelblauen Zytoplasma stellen reaktive Lymphozyten (Immunozyten) dar. Sie kommen in geringen Zahlen im Blut gesunder Tiere vor, treten aber hauptsächlich nach antigener Stimulation auf. Die einer Transformation zur Plasmazelle unterliegenden Lymphozyten zeichnen sich durch mehr Zytoplasma, das sich stark dunkelblau darstellt und eine perinukleäre klare Zone erkennen lässt, aus. Der runde Kern liegt exzentrisch in der Zelle und zeigt sowohl klare Bereiche als auch solche mit Chromatinkondensation. Im peripheren Blut werden diese plasmazytoiden Lymphozyten jedoch nur selten gefunden (Reagan et al., 2008). Entgegen ihrer Zuordnung zu den Agranulozyten sind bei manchen Lymphozyten der Schafe azurophile Granula im Zytoplasma zu beobachten (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Yamada und Sonoda, 1972b); (Greenwood, 1977); (Banks, 1981); (Kramer, 2000). Diese sind ca. 0,2 - 0,5 μm groß (Yamada und Sonoda, 1972b) und befinden sich häufig im Bereich der Kerninvagination (Hees und Tschudi, 1990). Die Oberfläche der Lymphozyten ist glatt oder mit kurzen Fortsätzen besetzt (Yamada und Sonoda, 1972b); (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993); (Tizard, 2000). Zirkulierende Lymphozyten tragen auf der Zelloberfläche kurze Mikrovilli, die Aktinbündel enthalten (Burkhardt et al., 2008).

Die Lymphozyten lassen sich anhand ihrer Größe in verschiedene Gruppen einteilen (Jain, 1993). Im Allgemeinen können kleine, mittlere und große Lymphozyten unterschieden werden (Banks, 1981); (Jain, 1993); (Kramer, 2000); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004), manche Autoren hingegen differenzieren nur kleine ($\leq 10\mu\text{m}$) von großen Lymphozyten ($> 10\mu\text{m}$) (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991); (Lösch et al., 2000); (Kraft et al., 2005); (Sinowitz, 2006a). Der Hauptunterschied liegt dabei im Kern-Zytoplasma-Verhältnis, das bei steigender Zellgröße aufgrund des

zunehmenden Zytoplasmaanteils kleiner wird (Steffens, 2000). Kleine Lymphozyten haben einen Durchmesser von 5 - 10 μm (Banks, 1981); (Liebich, 2004) und weisen ein sehr hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf. Das geklumpte Chromatin färbt sich dunkel an (Jain, 1993) und Nukleoli kommen gewöhnlich nicht vor (Steffens, 2000). Die kleinen Lymphozyten stellen den größten Anteil der zirkulierenden Lymphozyten im Blut dar (Banks, 1981); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a), da zu ihnen sowohl die immunkompetenten T- und B-Zellen als auch die noch nicht immunkompetenten Lymphozyten aus dem Knochenmark zählen (Sinowatz, 2006a). Mittelgroße Lymphozyten sind ca. 10 - 18 μm groß (Banks, 1981); (Liebich, 2004). Von einigen jener Autoren, die die Lymphozyten ihrer Größe nach nur in zwei Gruppen einteilen, werden sie auch als „große Lymphozyten“ bezeichnet (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991); (Sinowatz, 2006a). Bei den mittelgroßen Lymphozyten erscheint die Kernstruktur weniger dicht und kompakt (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a) und ein bis zwei Nukleoli können vorkommen (Steffens, 2000). Wie bereits in Kapitel 2.3.2 erwähnt, stellen die Immunoblasten die größten Zellen in der Entwicklung der Lymphozyten dar und werden deshalb oft als „große Lymphozyten“ bezeichnet (Banks, 1981). Sie haben einen Durchmesser von bis zu 25 μm (Liebich, 2004) und zeichnen sich durch einen großen, meist runden Kern mit ein bis zwei Nukleoli und ein basophiles Zytoplasma aus (Banks, 1981); (Hawkey und Dennet, 1990). Das Chromatin erscheint aufgelockert und leicht getüpfelt (Reagan et al., 2008). Typischerweise treten sie im extravaskulären (lymphatischen) Gewebe auf (Banks, 1981); (Steffens, 2000), im Blut sind sie normalerweise nicht zu finden (Steffens, 2000). Beim Schaf kommen vor allem kleine und mittelgroße Lymphozyten vor, und die Verwechslungsgefahr mit den Monozyten ist weniger gegeben als beim Rind (Kramer, 2000). Banks weist zudem darauf hin, dass beim Schaf die Einteilung der Lymphozyten anhand ihrer Größe nicht immer leicht ist (Banks, 1981).

B-Lymphozyten können morphologisch nicht von T-Lymphozyten unterschieden werden (Kolb, 1991); (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004); (Kraft et al., 2005); (Sinowatz, 2006a), erst immunhistochemische Techniken (siehe Kapitel 4) erlauben eine genaue Identifizierung beider Zellpopulationen (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a). So können auf der Zellmembran der Lymphozyten verschiedene CD-Antigene („cluster of differentiation antigens“) bestimmt werden (Sinowatz, 2006a). Außerdem stellen die Immunglobuline auf der Oberfläche der B-Lymphozyten einen Marker für diese Zellen dar (Djilali und Parodi, 1987). Aber auch Enzyme können zur Differenzierung eingesetzt werden (Lösch et al., 2000). So ist eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase beispielsweise nur in den T-Zellen nachzuweisen (Ristau et al., 1985). Weiterhin können T-Lymphozyten mit autologen Erythrozyten spontan Rosetten bilden (Outeridge, 1985); (Djilali und Parodi, 1987), was durch die Interaktion des Glykoproteins CD2 der T-Zellen und der CD2-Liganden der ovinen Erythrozyten zustande kommt (Kusui und Takasaki, 1998). Bei den Schafen stellt außerdem das Lektin Peanut Agglutinin (PNA) einen

Marker für die T-Lymphozyten dar (Fahey, 1980); (Outeridge, 1985); (Djilali et al., 1987); (Djilali und Parodi, 1987).

2.3.4 Aufgaben

Das Immunsystem setzt sich aus zwei vernetzten Funktionseinheiten, dem angeborenen (unspezifischen) und dem erworbenen (spezifischem) Immunsystem, zusammen. Zum angeborenen Abwehrsystem zählen neben Zellen (Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) auch lösliche Faktoren (Akute-Phase-Proteine, Komplement- und Interferonsystem). Die zum erworbenen Abwehrsystem zählenden Lymphozyten bekämpfen jene Erreger, welche die Mechanismen der unspezifischen Abwehr durchbrochen haben (Lösch et al., 2000). Die Lymphozyten können bezüglich ihrer immunologischen Funktion in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden. Die T-Zellen sind für die zellgebundene Immunantwort verantwortlich (Kolb, 1991); (Jain, 1993); (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004); (Kraft et al., 2005) und zerstören vor allem intrazelluläre Agenzien („endogene Antigene“) (Tizard, 2000). Die B-Lymphozyten hingegen sind für die humorale Immunreaktion zuständig (Kolb, 1991); (Jain, 1993); (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004); (Kraft et al., 2005) und machen mit Hilfe der von ihnen produzierten Antikörper vorrangig im Extrazellulärraum vorkommende Eindringlinge („exogene Antigene“) unschädlich (Tizard, 2000).

T-Lymphozyten erkennen anhand ihres spezifischen T-Zell-Rezeptors bestimmte Antigene, die durch Antigen präsentierende Zellen (APC) dargeboten werden (Vicente-Manzanares et al., 2002). Als Reaktion auf die antigene Stimulation erhalten die T-Zellen ihre Immunkompetenz und wandeln sich zu Effektorzellen um (Liebich, 2004). Es können hier verschiedene funktionelle Untergruppen unterschieden werden (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a), nämlich die T-Helferzellen, die zytotoxischen T-Zellen und die T-Suppressorzellen (Banks, 1981); (Sinowatz, 2006a). Die T-Helferzellen regulieren und fördern im Allgemeinen die Immunantwort (Tizard, 2000). Sie stimulieren unter anderem die Proliferation der B-Zellen und deren Differenzierung zu Antikörper produzierenden Plasmazellen (Sinowatz, 2006a), unterstützen die Antwort der zytotoxischen T-Zellen (Lösch et al., 2000); (Tizard, 2000) und sind an der Aktivierung von Makrophagen maßgeblich beteiligt (Lösch et al., 2000). Die zytotoxischen T-Zellen hingegen sind in der Lage, bestimmte Zielzellen, für die sie spezifische Antigene besitzen, abzutöten (Sinowatz, 2006a). Der genaue Mechanismus ist weitgehend unbekannt, könnte aber durchaus die Degranulation der für diese T-Zellpopulation charakteristischen lysosomalen Granula einschließen (Jain, 1993). Eine äußerst wichtige Aufgabe ist die Beseitigung virusinfizierter Zellen. Dabei wird die infizierte Zelle nach Bindung an die T-Zelle durch gebildetes Perforin

abgetötet (Lösch et al., 2000). T-Suppressorzellen haben die Aufgabe, überschießende Immunreaktionen zu unterdrücken (Sinowatz, 2006a).

Reife B-Zellen tragen an ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren für Antigene, die Immunglobuline (Naessens, 1997); (Tizard, 2000); (Silbernagl und Despopoulos, 2001); (Liebich, 2004). Nach Kontamination mit Fremdproteinen, Viren oder Toxinen bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, der in die B-Zelle eingeschleust wird (Liebich, 2004). Die humorale Immunantwort mit Aktivierung der B-Zellen setzt jedoch noch die Interaktion mit den bereits erwähnten T-Helferzellen voraus (Tizard, 2000); (Sinowatz, 2006a). Die B-Zellen präsentieren nach Internalisierung und Aufarbeitung des Antigen-Antikörper-Komplexes den T-Helferzellen das Antigen (Silbernagl und Despopoulos, 2001). Die aktivierte T-Helferzellen beeinflussen daraufhin in peripher-lymphatischen Organen die Transformation von B-Zellen zu Lymphoblasten, die sich wiederum zu Immunglobulin produzierenden Plasmazellen differenzieren (Liebich, 2004). Diese stellen die eigentlichen Effektorzellen dar (Lösch et al., 2000). Die gebildeten Antikörper gelangen ins Gewebe und Blut und machen dort die Antigene durch Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen unschädlich, die daraufhin von phagozytierenden Zellen abgebaut werden (Sinowatz, 2006a). Plasmazellen produzieren pro Sekunde bis zu 10000 Antikörpermoleküle mit identischer Antigenspezifität (Tizard, 2000). Bei höher entwickelten Tieren gibt es strukturell und funktionell verschiedene Immunglobuline (Ig). IgM stellt den Antikörper der Erstantwort dar, wogegen IgG meist nach wiederholten Antigenkontakten gebildet wird. IgA kommt nur lokal auf Schleimhäuten vor und IgE spielt eine Rolle bei allergischen Prozessen (Lösch et al., 2000) und parasitären Infektionen (Shaw et al., 2009).

Neben den Effektorzellen werden nach antigener Stimulation zusätzlich hochspezifische und langlebige T- und B-Gedächtniszellen gebildet, die das immunologische Gedächtnis bilden (Lösch et al., 2000) und somit für eine beschleunigte und effektivere Immunantwort nach einem erneuten Antigenkontakt sorgen (Tizard, 2000). Bei den B-Gedächtniszellen handelt es sich sehr wahrscheinlich um teilungsfähige Vorstufen der Plasmazellen (Lösch et al., 2000).

2.3.5 Zytchemische Eigenschaften

Reife T-Lymphozyten zeigen im Gegensatz zu den B-Lymphozyten eine Aktivität der sauren Phosphatase und der β -Glucuronidase (Jain, 1993). In den T-Zellen kommt zudem die α -Naphthyl-Azetat-Esterase vor, die sich im Gegensatz zu denjenigen der Monozyten nicht durch Natrium-Fluorid hemmen lässt (Jain, 1993); (Benzle, 2000); (Raskin und Valenciano, 2000). Diese Tatsache ist durch eine unterschiedliche Lokalisation der Enzyme zu erklären. Die α -

Naphthyl-Azetat-Esterase der Lymphozyten ist meist in intrazellulären Organellen lokalisiert, wogegen sich diejenige der Monozyten vorwiegend an der Plasmamembran befindet (Raskin und Valenciano, 2000). Fey und Kuntze (1970) berichten weiterhin über eine schwache Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase in ovinen Lymphozyten (Fey und Kuntze, 1970). Eine Periodic-Acid-Schiff-Reaktion verläuft bei Lymphozyten der Schafe nur teilweise positiv (Jain, 1970); (Raskin und Valenciano, 2000); (Al Izzi et al., 2007), da nicht immer Glykogen in den Zellen enthalten ist (Stobbe, 1970). Laut Hermansky et al. (1970) lässt sie sich bei weniger als 10 % der ovinen Lymphozyten beobachten (Hermansky et al., 1970). Die Lymphozyten weisen weder eine Peroxidase- (Jain, 1967); (Schnabl, 1976); (Jain, 1993); (Raskin und Valenciano, 2000); (Al Izzi et al., 2007) noch eine Chlorazetat-Esterase- oder eine alkalische Phosphatase-Aktivität auf (Schnabl, 1976); (Jain, 1993). Auch eine Anfärbung mit Sudan-Schwarz ist nicht möglich (Schnabl, 1976); (Jain, 1993); (Al Izzi et al., 2007).

2.4 Monozyten

2.4.1 Allgemeines

Die Monozyten zählen neben den Lymphozyten zu den Agranulozyten (Kolb, 1991); (Liebich, 2004). Mit einer Zahl von $0,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($0 - 0,75 \times 10^3/\mu\text{l}$) machen sie beim Schaf im Schnitt nur 2,5 % (0 - 6 %) der zirkulierenden Leukozyten im Blut aus (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Generell häufen sich Monozyten bei Entzündungen oder Gewebsschädigungen an. Als chemotaktische Faktoren dienen hier unter anderem bakterielle Substanzen, Komplementfaktoren, lösliche Substanzen der T-Lymphozyten (Lymphokine), neutrophile Granulozyten und Tumorzellen (Jain, 1993). Die intravaskuläre Aufenthaltszeit der Monozyten beträgt im Allgemeinen ca. 6 - 12 Stunden (Kraft et al., 2005). Nach dem Austritt aus der Blutbahn verlassen sie ihr Zielgewebe nicht mehr (Lösch et al., 2000), wobei ihre Lebensdauer im interstitiellen Bindegewebe etwa 60 - 90 Tage beträgt (Liebich, 2004).

2.4.2 Bildung

Die Entwicklung der Monozyten beginnt, wie bei allen Blutzellen, mit dem Hämozytoblasten (Liebich, 2004) und den daraus entstehenden, unipotenten Vorläuferzellen (Kolb, 1991). Über die Stadien des Monoblasten und des Promonozyten entwickelt sich schließlich der Monozyt. Es erscheint möglich, dass frühe Entwicklungsstadien der Monozyten gemeinsame Differenzierungsstufen mit den neutrophilen Granulozyten durchlaufen (Liebich, 2004). Die Zellen der Monozytose nehmen mit zunehmender Reifung an Größe ab, das Zytoplasma färbt

sich basophil und der Kern bildet eine Einbuchtung (Hees und Tschudi, 1990). Zudem treten im Laufe der Entwicklung kleine azuophile Granula auf und das Chromatin lockert sich allmählich auf (Liebich, 2004).

Der Monoblast stellt die erste, morphologisch identifizierbare Vorstufe der Monozyten dar. Dieser zeigt einen leicht gewundenen, runden Kern mit mehreren Nukleoli sowie einem wellenförmigen oder eingebuchten Umriss. Das Zytoplasma stellt sich mäßig basophil dar (Jain, 1993). Der Promonozyt ist 15 - 20 μm groß (Hees und Tschudi, 1990) und besitzt einen deutlicher gewundenen Kern mit einer leichten Einbuchtung (Jain, 1993). Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist in diesem Stadium größer als beim Monozyten (Bienzle, 2000), wobei das Zytoplasma einige Vakuolen (Jain, 1993) und kleine azuophile Granula enthalten kann (Liebich, 2004). Bei dem Übertritt vom Knochenmark in den Blutkreislauf sind die Monozyten noch relativ unreife Zellen. Erst nach der Auswanderung in das Bindegewebe erreichen sie ihre volle Reife (Hees und Tschudi, 1990) und wandeln sich zu Makrophagen um (Jain, 1993); (Steffens, 2000); (Thrall und Weiser, 2004); (Sinowatz, 2006a). Die Monozyten sind folglich keine Endstufen ihrer Differenzierungsreihe (Sinowatz, 2006a). Aus Monozyten können sich zudem Mastzellen und teilweise auch Fibroblasten, Fettzellen, glatte Muskelzellen und Osteoblasten entwickeln. Auch eine Entwicklung von Megakaryozyten aus Monozyten wird vermutet (Kolb, 1991). Aus der Fusion mehrerer Monozyten entstehen Osteoklasten (Hees und Tschudi, 1990). Die Bildung der Monozyten wird hauptsächlich durch IL3, IL11 GM-CSF und M-CSF stimuliert. Das von den Makrophagen gebildete PGE₂ hingegen hemmt die Monozytopoese (Jain, 1993).

2.4.3 Morphologie

Die Monozyten stellen meist unregelmäßig geformte Zellen dar (Yamada und Sonoda, 1972b) und sind bei Schafen ca. 12 - 18 μm groß (Greenwood, 1977). Sie sind somit die größten reifen Leukozyten im Blut (Jain, 1993); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a). Der große Zellkern liegt meist exzentrisch in der Zelle (Norris und Cham-Berlin, 1929) und zeichnet sich durch eine ausgeprägte Pleomorphie aus (Jain, 1993). Seine Gestalt kann rund, oval, nieren-, bohnen-, linsen- (Hees und Tschudi, 1990) oder hufeisenförmig sein (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Yamada und Sonoda, 1972b); (Greenwood, 1977); (Steffens, 2000). Bei den Schafen kann teilweise auch eine deutliche Lobulierung auftreten (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Yamada und Sonoda, 1972b); (Banks, 1981). Das Chromatin weist typischerweise ein diffuses, gestreiftes, geflecht- (Jain, 1993) oder netzartiges Muster auf (Bienzle, 2000) und ist in der Regel heller als das der Lymphozyten (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Banks, 1981). Kleine Nukleoli können vorkommen (Bienzle, 2000). Der Kern des Monozyten kann zeitweise dem des frühen

stabkernigen neutrophilen Granulozyten oder dem des späten Metamyelozyten ähnlich sehen. Durch die ungleiche Anfärbung des Zytoplasmas (Jain, 1993), den unterschiedlichen Durchmesser (Thrall und Weiser, 2004) und das verschiedenartige Chromatinmuster (Bienzle, 2000) können die Zellen aber leicht voneinander unterschieden werden (Jain, 1993); (Bienzle, 2000); (Thrall und Weiser, 2004). Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis der Monozyten ist in der Regel relativ klein (Lösch et al., 2000). Das breite Zytoplasma färbt sich typischerweise basophil-milchglasartig und enthält häufig unterschiedlich große Vakuolen. Nicht selten scheint auch im Zellkern eine Vakuole enthalten zu sein (Jain, 1993). Im Zytoplasma der Monozyten können gelegentlich azuophile Granula (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Ullrey et al., 1965b); (Jain, 1993); (Bienzle, 2000), die primäre Lysosomen darstellen, vorkommen (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004). Diese sind 0,2 - 0,6 μm groß (Kolb, 1991), haben eine runde bis ovale Gestalt und sind von einer Membran umgeben (Yamada und Sonoda, 1972b). Beim Schaf sind die Granula nur selten zu finden (Greenwood, 1977); (Banks, 1981). Norris und Cham-Berlin (1929) konnten diese jedoch mit der Giemsa-Färbung nach verlängerter Färbezeit identifizieren (Norris und Cham-Berlin, 1929). Auch Yamada und Sonoda (1972) gelang ein Nachweis dieser Granula beim Schaf mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen (Yamada und Sonoda, 1972b). Das Zytoplasma enthält weiterhin Ribosomen, Polysomen, Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum und einen Golgi-Apparat, der sich oftmals im Bereich einer Kerneinbuchtung befindet (Yamada und Sonoda, 1972b). Nicht selten enthalten die Monozyten phagozytiertes Material (Kolb, 1991). Die Oberfläche der Monozyten trägt viele pseudopodienartige Projektionen von unterschiedlicher Größe (Yamada und Sonoda, 1972b). Aufgrund der hohen Bewegungs- und Phagozytosefähigkeit (Bienzle, 2000) ist die Oberfläche der Zelle ausgiebig gerafft (Jain, 1993); (Bienzle, 2000), weshalb unter dem Elektronenmikroskop deutliche Falten und Furchen zu sehen sind (Jain, 1993).

2.4.4 Aufgaben

Wie bereits in Kapitel 2.4.2 erwähnt, erlangen die Monozyten erst nach Auswanderung ins Bindegewebe ihre volle Reife (Hees und Tschudi, 1990). Sie nehmen an Größe zu und wandeln sich zu Makrophagen um (Kolb, 1991), die zusammen mit den Vorläuferzellen im Knochenmark, den Promonozyten und den Monozyten das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) bilden. Die Makrophagen halten sich als ortsfeste oder freie Zellen (Jain, 1993) in Lebersinusoiden als Kupffer-Sternzellen, in Lungenalveolen als Alveolarmakrophagen, in Körperhöhlen als Peritonealmakrophagen, im Bindegewebe als Histiozyten oder in lymphatischen Organen als Sinusendothelzellen auf und erfüllen dort organspezifische Aufgaben (Liebich, 2004). Die Monozyten nehmen im Allgemeinen wichtige Funktionen in der unspezifischen Abwehr wahr und beteiligen sich am Entzündungsgeschehen (Thrall und Weiser, 2004). So weist eine Monozytose

in der Regel auf eine subakute oder chronische Entzündung hin (Jain, 1993). Als mononukleäre Fresszellen sind sie in der Lage, Bakterien, Hefen, Protozoen, beschädigte Zellen und Zelltrümmer zu phagozytieren (Thrall und Weiser, 2004). Die Bakterien werden wahrscheinlich, ähnlich dem Mechanismus der neutrophilen Granulozyten (siehe Kapitel 2.5.4), durch Sauerstoffmetaboliten, Peroxidase, Lysozym, ein spezifisches basisches Protein (Monocytin) und proteolytische Enzyme abgetötet. Die von aktivierten Makrophagen freigesetzten Sauerstoffmetaboliten weisen zudem zytotoxische Effekte auf Tumorzellen und virusinfizierte Zellen auf. Weiterhin trägt sezerniertes Interferon zur Abwehr viraler Infektionen bei. Die kationischen Proteine der Monozyten hingegen besitzen eine fungizide Wirkung (Jain, 1993). Die Monozyten übernehmen darüber hinaus immunregulatorische Funktionen, indem sie den T-Lymphozyten die verarbeiteten Antigene präsentieren (Thrall und Weiser, 2004) und somit als Zellen der unspezifischen Abwehr auf das spezifische Abwehrsystem einwirken (Lösch et al., 2000). Außerdem sind sie sowohl an dem Abbau alternder Erythrozyten in der Milz (Liebich, 2004) und der damit verbundenen Eisenwiederverwertung als auch an der pathologischen Zerstörung der roten Blutkörperchen beteiligt (Thrall und Weiser, 2004). Durch verschiedene Gerinnungsfaktoren beeinflussen sie die Koagulation und durch den Plasminogenaktivator die Fibrinolyse (Jain, 1993).

2.4.5 Zytchemische Eigenschaften

Charakteristisch für die Monozyten ist das Vorkommen von unspezifischen Esterasen (Jain, 1993); (Benzle, 2000); (Olivier et al., 2001), die diffus im Zytoplasma verteilt sind (Jain, 1993); (Benzle, 2000). Eine Enzymaktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase lässt sich jedoch besonders gut an der Plasmamembran beobachten (Raskin und Valenciano, 2000). Die unspezifischen Esterasen der Monozyten können aufgrund dieser Lokalisation, wie bereits in Kapitel 2.3.5 erwähnt, durch Natrium-Fluorid gehemmt werden (Jain, 1993); (Benzle, 2000); (Raskin und Valenciano, 2000). In den Granula sind unter anderem die saure Phosphatase und Lysozym vorhanden (Jain, 1993). Die Peroxidase kann bei den Monozyten der Schafe sowohl leicht positiv als auch negativ sein (Schnabl, 1976); (Al Izzi et al., 2007), wogegen Makrophagen generell Peroxidase-negativ sind (Jain, 1993). Die β -Glucuronidase ist laut Benzle (2000) bei den Monozyten meist negativ oder nur schwach positiv (Benzle, 2000) und die alkalische Phosphatase fehlt (Schnabl, 1976); (Jain, 1993); (Benzle, 2000). Auch die Chlorazetat-Esterase ist üblicherweise nicht vorhanden, wobei bei Schafen teilweise von einer leichten Enzymaktivität berichtet wird (Benzle, 2000); (Raskin und Valenciano, 2000). Die Färbung mit Sudan-Schwarz und die Periodic-Acid-Schiff-Reaktion gelingen bei den Monozyten des Schafes nur teilweise (Al Izzi et al., 2007).

2.5 Neutrophile Granulozyten

2.5.1 Allgemeines

Die neutrophilen Granulozyten gehören in der Gruppe der Leukozyten neben den basophilen und eosinophilen Granulozyten zur Untergruppe der Granulozyten (Liebich, 2004). Die Unterteilung der Granulozyten erfolgt anhand der unterschiedlichen Anfärbbarkeit ihrer Granula (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991); (Sinowatz, 2006a). Bei den neutrophilen Granulozyten sind die Granula sowohl mit basischen als auch mit sauren Farbstoffen nur sehr schwach färbbar. Die Granula der eosinophilen Granulozyten hingegen lassen sich mit sauren Farbstoffen und die der basophilen Granulozyten mit basischen Farbstoffen anfärben (Kolb, 1991).

Der neutrophile Granulozyt kommt unter den Granulozyten sowohl im Knochenmark als auch im Blut am häufigsten vor (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990). Bei adulten Schafen beträgt die Anzahl an reifen Zellen im Blut $0,7 - 6 \times 10^3/\mu\text{l}$, im Schnitt $2,4 \times 10^3/\mu\text{l}$. (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Die neutrophilen Granulozyten machen bei den Schafen im Schnitt 30 % (10 - 50 %) der Gesamtleukozyten aus (Greenwood, 1977); (Kramer, 2000). In den ersten Lebenswochen sind sie die vorherrschende Leukozytenart (siehe Kapitel 1.3), nach ca. zwei Wochen werden jedoch die Lymphozyten zur dominierenden Gruppe (Kramer, 2000). Die neutrophilen Granulozyten verlassen relativ rasch die Zirkulation und treten in verschiedene Gewebe oder Körperhöhlen über. Im Blut überleben sie ca. 7 - 14 Stunden, in den Geweben hingegen 2 - 3 Tage. Nach dem Verlassen des Blutgefäßsystems kehren sie nicht wieder in die Zirkulation zurück (Jain, 1993).

2.5.2 Bildung

Die Granulozyten haben eine gemeinsame Stammform im Knochenmark, den Myeloblasten (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a), aus dem 16 Granulozyten hervorgehen können (Kolb, 1991). Der Myeloblast entsteht nach mehrfachen mitotischen Teilungen aus den bereits aufgeführten, pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks (Liebich, 2004) und entwickelt sich über die Stadien des Promyelozyten, des Myelozyten, des Metamyelozyten und des stabkernigen Granulozyten zum reifen Granulozyten (Sinowatz, 2006a).

Myeloblasten sind mit einem Durchmesser von $15 - 20 \mu\text{m}$ relativ große Zellen (Banks, 1981). Sie besitzen einen großen, runden Kern mit wenig Heterochromatin (Liebich, 2004) und zwei oder mehreren Nukleoli (Banks, 1981); (Reagan et al., 2008). Das Zytoplasma erscheint durch das Vorkommen von Ribosomen, Polyribosomen und endoplasmatischem Retikulum stark basophil. Bei der Weiterentwicklung zum Promyelozyten kommt es zur Ausbildung azurophtiler Granula. Promyelozyten sind mit $18 - 25 \mu\text{m}$ die größten Zellen im Verlauf der Granulopoese. Der Kern

enthält viel Euchromatin und im Zytoplasma sind viele Mitochondrien, Golgi-Felder, Ribosomen, Polyribosomen und endoplasmatisches Retikulum vorzufinden (Liebich, 2004). Trotz der azuropilen Regionen ist das Zytoplasma auch hier größtenteils basophil (Banks, 1981). Die 0,25 - 0,5 μm großen Granula entwickeln sich innerhalb einer Woche zu spezifischen Granula (Liebich, 2004). Der Promyelozyt wird zum Myelozyt, sobald die Identifizierung der spezifischen Granula anhand der Färbungseigenschaften, der Form und der Größe möglich ist (Banks, 1981). Folglich kann zwischen neutrophilen, basophilen und eosinophilen Myelozyten unterschieden werden (Liebich, 2004). Der Myelozyt ist 12 - 16 μm groß (Kraft et al., 2005). Der eher ovale als runde Kern (Banks, 1981) weist eine leichte Einbuchtung und zunehmend größeres Chromatin auf (Kraft et al., 2005). Nukleoli sind nicht vorhanden (Jain, 1993). Das anfangs basophile Zytoplasma wird durch den Verlust von Ribosomen zunehmend azidophil (Sinowitz, 2006a). Die Metamyelozyten, oft auch als jugendliche Granulozyten bezeichnet (Kraft et al., 2005), entstehen durch letzte mitotische Teilungen aus dem Myelozyten (Liebich, 2004). Die Entwicklung zeichnet sich durch eine Verkleinerung des Zellkernes aus (Sinowitz, 2006a), wobei dieser eine Nierengestalt annimmt (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993); (Sinowitz, 2006a) und das Chromatin nochmals größer wird. Die Metamyelozyten sind 10 - 15 μm groß (Kraft et al., 2005). Das Zytoplasma ist leicht azidophil und enthält zahlreiche spezifische Granula (Banks, 1981). Aus ihnen gehen nach einer Reifedauer von etwa einer Woche die neutrophilen, basophilen oder eosinophilen Granulozyten hervor (Liebich, 2004). Der Kern des stabkernigen Granulozyten ist hufeisenförmig gekrümmmt (Hees und Tschudi, 1990); (Thrall und Weiser, 2004); (Sinowitz, 2006a). Die Segmentform erhält der Kern durch mehrere Einschnürungen, wodurch getrennte Kernbruchstücke entstehen (Kolb, 1991). Die neutrophilen Granulozyten verbleiben in der Regel bis zu ihrer vollkommenen Ausreifung zur segmentkernigen Form im Knochenmark (Sinowitz, 2006a). Der stabkernige Granulozyt kann jedoch in geringer Zahl im Blut vorkommen, die Metamyelozyten sind im Blut normalerweise nicht zu finden (Thrall und Weiser, 2004). Im Knochenmark existieren drei verschiedene Granulozytenkompartimente. Der Proliferationspool enthält Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten. Metamyelozyten und unreife Granulozyten bilden den Reifungspool. Im Speicherungspool hingegen befinden sich hauptsächlich reife neutrophile Granulozyten (Jain, 1993), wobei eine von der Anzahl differenzierter Granulozyten abhängige, negative Rückkopplung deren Abgabe aus dem Knochenmark ins Blut steuert (Liebich, 2004). Das Schaf weist neben Rind und Ziege eine kleinere Knochenmarksreserve als andere Säuger auf. Dort kommen nur halb so viele Granulozyten vor wie im Blut, was sich in der frühen Phase einer Antwort auf Entzündungen an einer Neutropenie im Blut zeigt (Kramer, 2000). Die Bildung der neutrophilen Granulozyten wird vor allem durch IL3, GM-CSF und G-CSF reguliert (Jain, 1993).

2.5.3 Morphologie

Der neutrophile Granulozyt hat bei den Schafen eine runde bis ovale Form (Yamada und Sonoda, 1970b); (Rudolph und Schnabl, 1981) und ist ca. 12 - 14 μm groß (Norris und Cham-Berlin, 1929). Je nach Morphologie des Zellkernes lassen sich, wie bereits in Kapitel 2.5.2 erwähnt, verschiedene Reifungsstufen unterscheiden. Unreife (stabkernige) neutrophile Granulozyten besitzen einen unsegmentierten Kern, der oft hufeisenförmigen gebogen ist. Das Chromatin ist weniger geklumpt als beim reifen Granulozyten (Jain, 1993). Reife Granulozyten sind an ihrem segmentierten Kern erkennbar (Smith, 2000); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004), dessen einzelne Segmente oft durch schmale Chromatinbrücken miteinander verbunden sind (Yamada und Sonoda, 1970b); (Sinowitz, 2006a). Aufgrund dieser Kernmorphologie werden sie oft auch als polymorphkernige Leukozyten (polymorph nuclear leukocyte, PMN) (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991) oder segmentkernige Granulozyten bezeichnet. Anhand der Ausprägung der Kernsegmentierung kann auf das Alter der Zelle geschlossen werden. Das Vorhandensein von mehr als fünf Segmenten wird als Hypersegmentierung bezeichnet und stellt ein Zeichen für eine Überalterung der Zelle dar (Hees und Tschudi, 1990). Innerhalb des Kernes sind, je nach Chromatinkondensation, zwei unterschiedlich elektronendichte Bereiche zu sehen. Die hellere Region befindet sich im Kernzentrum und wird von der dunkleren Region, die an die Kernmembran grenzt, umgeben (Yamada und Sonoda, 1970b). Die stark basophile Anfärbung der Kernsegmente entsteht durch die dichten Heterochromatinbereiche (Hees und Tschudi, 1990). Nukleoli sind meist nicht vorhanden (Yamada und Sonoda, 1970b); (Smith, 2000); (Steffens, 2000). Bei verschiedenen Spezies kann an den Kernen der neutrophilen Granulozyten weiblicher Tiere ein ca. 1,5 μm dicker, trommelschlegelartiger Anhang („drum-stick“), der den verklumpten Teil des zweiten X-Chromosoms darstellt, gefunden werden (Hees und Tschudi, 1990); (Smith, 2000). Im Zytoplasma kommen typischerweise zahlreiche neutrophile Granula vor (Yamada und Sonoda, 1970b); (Banks, 1981); (Smith, 2000); (Sinowitz, 2006a), die, wie bereits in Kapitel 2.5.1 erwähnt, eine gewisse farberische Neutralität zeigen (Hees und Tschudi, 1990). Die Granula stellen Lysosomen dar (Banks, 1981) und werden vom Golgi-Apparat gebildet (Jain, 1993). Je nach Inhalt können primäre (azurophile) und sekundäre (spezifische) Granula unterschieden werden (Hees und Tschudi, 1990), deren Namensgebung in Bezug zu deren zeitlicher Erscheinung im Verlauf der Granulopoese steht (siehe Kapitel 2.5.2) (Jain, 1993). Primäre Granula bilden sich im Stadium des Promyelozyten, sekundäre Granula erst im Stadium des Myelozyten aus (Rausch und Moore, 1975); (Jain, 1993). Bei Wiederkäuern kommen als Besonderheit auch die so genannten „großen Granula“ vor (Baggiolini et al., 1985); (Styrt, 1989); (Kramer, 2000), die zeitlich gesehen zwischen den primären und den sekundären Granula auftreten (Baggiolini et al., 1985). Die primären Granula sind bei den Haussäugern ungefähr 0,5 μm groß, haben eine runde bis längliche Gestalt (Steffens, 2000) und können weniger stark

angefärbt werden als die sekundären Granula (Steffens, 2000). Laut Jain (1993) lassen sie sich aufgrund ihres reduzierten Gehalts an Glykosaminoglykanen (Mukopolysacchariden) mit routinemäßigen Blut-Färbemethoden gar nicht darstellen (Jain, 1993). Die sekundären Granula sind kleiner und elektronendichter als die primären Granula, kommen aber häufiger vor (Steffens, 2000). In reifen Zellen ist das Verhältnis von primären zu sekundären Granula ungefähr 1:2 (Jain, 1993). In fortgeschrittenen Reifungsstadien weisen die sekundären Granula eine scharf konturierte Membran auf, ihr Inhalt ist grob und dunkel (Baggiolini et al., 1985). Die „großen Granula“ stellen die größten Granula dar, haben eine runde Gestalt und einen blassen und einheitlichen Inhalt. Bei den Wiederkäuern scheinen sie im Allgemeinen die vorherrschende Granula-Art zu sein (Baggiolini et al., 1985), beim Schaf sind sie jedoch nur selten zu finden (Buchta, 1990); (Kramer, 2000). Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten enthält weiterhin Glykogenpartikel (Rudolph und Schnabl, 1981); (Steffens, 2000), freie Ribosomen, Polysomen, phagozytische Vakuolen, wenige Mitochondrien, einen Golgi-Apparat und vereinzelte Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (Yamada und Sonoda, 1970b). Ein schmaler, organellfreier Zytoplasmaraum in der Zellperipherie beherbergt außerdem zytoskelettale Elemente wie Mikrofilamente und Mikrotubuli (Smith, 2000). Die Oberfläche der neutrophilen Granulozyten ist gewöhnlich glatt (Yamada und Sonoda, 1970b). Sie trägt jedoch einige kurze Mikrovilli, die höchstwahrscheinlich für die Adhäsion am Gefäßendothel von Bedeutung sind. Bei der Migration von der Zirkulation in den extravasalen Raum nehmen die neutrophilen Granulozyten eine länglichere Form an und bilden lange Pseudopodien aus, um ihrer Funktion als bewegliche Phagozyten nachzugehen (Steffens, 2000).

2.5.4 Aufgaben

Die neutrophilen Granulozyten stellen eine der zellulären Hauptkomponenten des angeborenen Immunsystems dar (Tung et al., 2009) und bilden die erste Abwehr gegen eindringende Organismen (Jain, 1993); (Thelen et al., 1993); (Smith, 2000). Die Aufgaben dabei sind unspezifisch (Liebich, 2004). Ihre Hauptfunktion stellt die Phagozytose von verschiedenen Partikeln, Bakterien oder anderen Mikroorganismen (Banks, 1981) mit deren anschließendem Abbau durch lysosomale Enzyme (Sinowatz, 2006a) oder deren Tötung mittels reaktiver Sauerstoffspezies dar (Buchta, 1990). Diese Aktivität zeigt sich vor allem bei einer akuten lokalen Entzündung (Banks, 1981), wobei Schafe in diesem Falle generell eine beachtliche Reaktion der neutrophilen Granulozyten aufweisen (Greenwood, 1977). Die neutrophilen Granulozyten sind amöboid beweglich (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a) und können auf bestimmte Reize hin, z.B. Bakterien und deren Zerfallsprodukte, kleine Blutgefäße durchwandern und ins umliegende Gewebe austreten (Sinowatz, 2006a). Sie werden im Falle einer Infektion schnell

rekrutiert und reagieren mit der eben erwähnten Phagozytose des schädlichen Agens, Freisetzung von Enzymen und Proteinen und dem Respiratory Burst (Woldehiwet et al., 2003); (Farinacci et al., 2008); (Johnson et al., 2009); (Tung et al., 2009). Für eine effiziente Phagozytose ist jedoch eine vorherige Bindung von Immunglobulinen oder Komplementfaktoren an die zu entfernenden Partikel (Opsonisierung) bedeutend (Lösch et al., 2000). Der Respiratory Burst spielt eine Hauptrolle bei der Bekämpfung mikrobieller Infektionen (Whist et al., 2002). Dabei führt die Aktivierung der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase (Thelen et al., 1993); (Lösch et al., 2000); (Tung et al., 2009), der Superoxid-Dismutase oder der Myeloperoxidase (Lösch et al., 2000) zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) (Tung et al., 2009) aus molekularem Sauerstoff (Lösch et al., 2000). In unstimulierten Zellen sind diese Enzyme inaktiv (Farinacci et al., 2008). Gebildete Oxid-Anionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorit (OCl^-) töten die Mikroorganismen durch Oxidation ab (Lösch et al., 2000). Die phagozytische und oxidative Funktion kann durch Chemolumineszenz nachgewiesen werden (Woldehiwet et al., 2003); (Johnson et al., 2009), da aktive Zellen Licht abgeben. Der Respiratory Burst ist bei Lämmern weniger ausgeprägt als bei adulten Schafen. Erst im Alter von ca. drei Monaten erreicht das Lamm nahezu gleiche Werte wie das Muttertier. Daraus lässt sich schließen, dass die neutrophilen Granulozyten von Lämmern in den ersten zwei Monaten wahrscheinlich weniger zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen befähigt sind (Johnson et al., 2009). Im Vergleich zu Mensch und Rind ist die oxidative Reaktion der neutrophilen Granulozyten des Schafes jedoch viel geringer, was darauf hinweisen könnte, dass die Hauptantwort der neutrophilen Granulozyten bei dieser Spezies Sauerstoff-unabhängig ist (Buchta, 1990). Die neutrophilen Granulozyten fungieren weiterhin auch als sekretorische Zellen, da sie bei Kontakt mit phagozytosefähigem Material auch in der Lage sind, ihre Granula nach außen abzugeben, um dieses extrazellulär zu verdauen (Sinowatz, 2006a). Oft werden auch zelluläre Bestandteile in die Auflösungsprozesse miteinbezogen, was dann zur Eiterbildung führt (Liebich, 2004).

2.5.5 Zytchemische Eigenschaften

Die neutrophilen Granulozyten zeichnen sich durch eine äußerst umfangreiche Enzymausstattung aus (Rausch und Moore, 1975). Die primären Granula enthalten Peroxidase (Myeloperoxidase) (Rausch und Moore, 1975); (Buchta, 1990); (Jain, 1993); (Raskin und Valenciano, 2000); (Smith, 2000), β -Glucuronidase (Rausch und Moore, 1975); (Buchta, 1990); (Jain, 1993) und saure Phosphatase (Jain, 1993); (Raskin und Valenciano, 2000). Die Myeloperoxidase (MPO) stellt den einzigen zuverlässigen Marker für die primären Granula dar (Jain, 1993), wobei ihre Aktivität im Stadium des Promyelozyten beginnt (Raskin und Valenciano, 2000); (Al Izzi et al., 2007). Die

primären Granula enthalten weiterhin Polypeptide, die gegenüber Bakterien, Pilzen und manchen behüllten Viren eine starke antimikrobielle Aktivität aufweisen (Liebich, 2004). Die sekundären Granula sind im Gegensatz zu den primären Granula Peroxidase-negativ (Styrt, 1989); (Buchta, 1990); (Smith, 2000), enthalten jedoch unter anderem die alkalische Phosphatase (Jain, 1993); (Raskin und Valenciano, 2000); (Smith, 2000); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004) und die NADPH-Oxidase (Smith, 2000); (Liebich, 2004). Für die sekundären Granula stellt Laktoferrin einen geeigneten Marker dar. Dieses wirkt generell bakteriostatisch, indem es das für das Bakterienwachstum notwendige Eisen bindet. Teilweise wirkt es jedoch auch bakterizid (Jain, 1993). Weiterhin kommt in den sekundären Granula Cobalophilin vor, welches das für die DNA-Replikation der Bakterien benötigte Vitamin-B 12 bindet (Sinowatz, 2006a). Die primären und sekundären Granula zeichnen sich weiterhin durch eine Aktivität der Chlorazetat-Esterase aus. (Raskin und Valenciano, 2000). Laut Bienzle (2000) besitzen die neutrophilen Granulozyten der Schafe im Gegensatz zu den Monozyten keine unspezifischen Esterasen (Bienzle, 2000). Eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase in ovinen neutrophilen Granulozyten wird jedoch in der Literatur mehrfach beschrieben (Schnabl, 1976); (Osbaldiston und Sullivan, 1978); (Ristau et al., 1985). Fey und Kunze (1970) berichten außerdem über eine Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase beim Schaf (Fey und Kuntze, 1970). Den neutrophilen Granulozyten der Schafe fehlt laut Rausch und Moore (1975) sowie Kramer (2000), Lysozym (Rausch und Moore, 1975); (Kramer, 2000). Buchta (1990) hingegen konnte geringe Lysozymkonzentrationen in den primären und sekundären Granula des Schafes nachweisen (Buchta, 1990). Weiterhin zeigen die neutrophilen Granulozyten der Schafe eine positive Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (Schnabl, 1976); (Al Izzi et al., 2007) und lassen sich mit Sudan-Schwarz anfärben (Raskin und Valenciano, 2000).

Zusammengefasst enthalten die Granula der neutrophilen Granulozyten trotz speziesbedingter Unterschiede viele hydrolytische Enzyme und antibakterielle Substanzen, die für das Abtöten phagozytierter Mikroorganismen nötig sind (Jain, 1993). Die neutrophilen Granulozyten der Schafe weisen insgesamt weniger Granulakomponenten auf als die der Rinder und der Menschen, was darauf hinweisen könnte, dass deren neutrophile Granulozyten eine etwas andere Rolle bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen spielen (Buchta, 1990).

2.6 Eosinophile Granulozyten

2.6.1 Allgemeines

Die eosinophilen Granulozyten gehören, wie bereits erwähnt, in der Gruppe der Leukozyten zur Untergruppe der Granulozyten (Liebich, 2004). Im Blut der Schafe sind im Schnitt 5 % (0 - 10 %) der weißen Blutkörperchen eosinophile Granulozyten, wobei deren absolute Zahl durchschnittlich

$0,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($0 - 1 \times 10^3/\mu\text{l}$) beträgt (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Die Anzahl der zirkulierenden eosinophilen Granulozyten wird durch das adrenokortikotrope Hormon (Liebich, 2004) und durch Kortikosteroide vermindert (Banks, 1981); (Liebich, 2004). Nach Verlassen des Knochenmarks wandern sie nach einer sehr kurzen intravasalen Verweildauer von ca. 30 Minuten in das Gewebe aus und überleben dort ungefähr 12 Tage. Normalerweise kehren sie nicht wieder in die Zirkulation zurück (Lösch et al., 2000).

2.6.2 Bildung

Die eosinophilen Granulozyten gehen, wie alle Granulozyten, aus dem Myeloblasten im Knochenmark hervor. Über die Stadien des Promyelozyten, des eosinophilen Myelozyten des eosinophilen Metamyelozyten und des stabkernigen eosinophilen Granulozyten entwickelt sich der reife eosinophile Granulozyt (Liebich, 2004). Die gemeinsamen Charakteristika der granulozytären Vorläuferzellen wurden bereits in Kapitel 2.5.2 beschrieben.

Die erste morphologisch identifizierbare Vorläuferzelle des eosinophilen Granulozyten ist der Promyelozyt. Dieser enthält bereits viele große azurophile Granula, wodurch er sich leicht von dem neutrophilen Promyelozyten mit seinen feinen Granula unterscheiden lässt (Jain, 1993). Azurophile Granula sind als unreif, eosinophile Granula als reif zu betrachten. Ab dem Stadium des Myelozyten werden azurophile Granula sehr wahrscheinlich nicht mehr gebildet und demnach durch die folgenden Zellteilungen eliminiert (Kolb, 1991). Bei dem eosinophilen Myelozyten ist die Peroxidase sowohl in den Granula als auch im rauen endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Apparat nachweisbar. Ab dem Stadium des Metamyelozyten befindet sich diese nur noch in den Granula (Kolb, 1991); (Young, 2000). Im Knochenmark kommt bei den meisten Haussäugetieren nur eine geringe Reserve an eosinophilen Granulozyten vor (Jain, 1993). Die Bildung der eosinophilen Granulozyten dauert ca. 2 - 6 Tage (Jain, 1993); (Young, 2000), 2 Tage später treten sie in die Zirkulation über (Jain, 1993). Sie wird von verschiedenen Faktoren aktiverter T-Lymphozyten und Makrophagen reguliert. Im Wesentlichen sind dies IL3, IL5, GM-CSF, EO-CSF und EO-GSF (Jain, 1993).

2.6.3 Morphologie

Die eosinophilen Granulozyten der Schafe haben eine runde bis ovale Form (Yamada und Sonoda, 1970a) und sind meist etwas größer als die neutrophilen Granulozyten (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Rudolph und Schnabl, 1981). Bei den Haussäugetieren sind sie im Allgemeinen ca. 12 - 14 μm (Banks, 1981); (Liebich, 2004), teilweise sogar bis zu 20 μm groß

(Hees und Tschudi, 1990). Der Kern besteht beim Schaf oft aus zwei bis vier Lappen (Yamada und Sonoda, 1970a). Er weist regelmäßig eine Brillen- oder Hantelform auf (Hees und Tschudi, 1990), nicht selten ist er beim Schaf aber auch segmentiert (Norris und Cham-Berlin, 1929). Innerhalb des Kernes sind, je nach Chromatinkondensation, zwei unterschiedlich elektronendichte Bereiche zu sehen. Die hellere Region befindet sich im Kernzentrum und wird von der dunkleren Region, die an die Kermembran grenzt, umgeben (Yamada und Sonoda, 1970a). Heterochromatin kommt reichlich vor und in der Regel sind ein bis zwei Nukleoli vorhanden (Hees und Tschudi, 1990). Das Zytoplasma färbt sich basophil (Norris und Cham-Berlin, 1929) und enthält zahlreiche eosinophile (azidophile) Granula (Liebich, 2004), die das Zytoplasma meist gänzlich ausfüllen und teilweise sogar den Kern bedecken (Banks, 1981). Die Granula stellen primäre Lysosomen dar (Liebich, 2004) und werden vom Golgi-Apparat gebildet (Steffens, 2000). Mit sauren Farbstoffen wie Eosin stellen sie sich orangerot bis rot dar (Hees und Tschudi, 1990), wobei sich diese charakteristische Färbung aus ihrem Gehalt an argininreichen, stark basischen Proteinen wie dem „major basic protein“ (MBP) oder dem „eosinophil cationic protein“ (ECP) ergibt (Jain, 1993). Bei den Schafen zeichnen sich die eosinophilen Granula teilweise durch eine außergewöhnlich starke Elektronendichte aus, variieren in Form und Größe und sind von einer Membran umgeben. Anhand von Abweichungen bezüglich der Innenstruktur unterscheiden Yamada und Sonoda (1970) beim Schaf sechs verschiedene Granula-Typen. Typ 1 ist rund, ca. 0,6 µm groß und enthält homogenes, elektronendiches Material. Typ 2 ist oval bis spindelförmig und durchschnittlich 1,1 µm lang und 0,3 µm breit. Er besteht aus ein bis mehreren, äußerst elektronendichten „Mittelplatten“ und einer diese umgebende Grundsubstanz (Yamada und Sonoda, 1970a). Diese kristalline Ultrastruktur, die teilweise schon unter dem Lichtmikroskop als dunkler Einschluss erkennbar wird, stellt eine Besonderheit bei den eosinophilen Granula des Schafes dar (Kramer, 2000). Typ 3 ist in der Regel rund, im Schnitt 0,7 µm groß und enthält lamellenartige, konzentrisch angeordnete Strukturen, die diesem Granula-Typ das Aussehen eines Haarballes verleiht. Typ 4 ist rund oder oval und besteht aus feinen netzartigen Strukturen innerhalb einer homogenen Grundsubstanz. Typ 5 ist rund und beinhaltet runde, elektronendichte, homogene Gebilde. Typ 6 ist ebenfalls rund oder oval und besteht gleichzeitig aus allen inneren Strukturen, die bei Typ 2 - 5 beschrieben wurden. Typ 2 kommt am häufigsten vor, gefolgt von Typ 3 und 6. (Yamada und Sonoda, 1970a). Das spärlich ausgebildete Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten (Kramer, 2000) enthält weiterhin glattes und raues endoplasmatisches Retikulum, wenige Mitochondrien, freie Ribosomen, Polysomen, einen Golgi-Apparat (Yamada und Sonoda, 1970a); (Rudolph und Schnabl, 1981) und Glykogenpartikel (Rudolph und Schnabl, 1981). Die dünne Zellmembran der eosinophilen Granulozyten ist generell glatt und bildet bei manchen Zellen Pseudopodien aus (Yamada und Sonoda, 1970a). Spärlich ausgebildete Mikrovilli werden erst unter dem Elektronenmikroskop erkennbar (Young, 2000).

2.6.4 Aufgaben

Die genaue Funktion der eosinophilen Granulozyten ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt (Banks, 1981); (Jain, 1993); (Thrall und Weiser, 2004), sie erfüllen aber wichtige Aufgaben in der Parasitenabwehr und der Regulierung allergischer und entzündlicher Vorgänge (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993); (Sansome et al., 2007). Dabei kann ihre Wirkung für den Wirt sowohl nützlich als auch schädigend sein (Costa et al., 1997). Ihre Hauptfunktion besteht wahrscheinlich in der Beseitigung von Antigen-Antikörper-Komplexen (Banks, 1981); (Liebich, 2004); (Sinowatz, 2006a).

Die eosinophilen Granulozyten werden durch die Freisetzung bestimmter Mediatoren aus Gewebs-Mastzellen (Liebich, 2004), basophilen Granulozyten (Jain, 1993), T-Lymphozyten und Monozyten aktiviert (Gleich et al., 1993); (Young, 2000). Nach einer kurz andauernden Bluteosinophilie wandern sie in die betroffenen Gewebe oder Organe aus (Kraft et al., 2005). Die regulierende Funktion der eosinophilen Granulozyten im Allergiegeschehen ergibt sich aus mehreren Tatsachen. Neben der Phagozytose von Immunkomplexen und Mastzell-Granula üben sie durch Abgabe von Prostaglandinen (PGE₁, PGE₂) und Zink einen hemmenden Einfluss auf die Freisetzung von Histamin, Serotonin und dem Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) aus den Mastzellen aus. Die Histaminase und die Phospholipase C inaktivieren freies Histamin bzw. PAF. Weiterhin wird durch bestimmte Faktoren die Neubildung von Histamin in den Mastzellen unterbunden. Durch diese antihistaminischen und antiinflammatorischen Eigenschaften der eosinophilen Granulozyten kann auch auf die Regulation eines akuten Entzündungsgeschehens geschlossen werden. Darüber hinaus beherbergen die eosinophilen Granula Substanzen, welche die ödeminduzierenden Eigenschaften von Serotonin und Bradykinin hemmen (Jain, 1993). Obwohl die eosinophilen Granulozyten zur Phagozytose befähigt sind, müssen sie ihre bevorzugten Ziele (z.B. Parasiten) wegen deren Größe auf eine andere Weise unschädlich machen (Young, 2000). So sezernieren sie ihre Inhaltsstoffe nach außen ins Gewebe (Lösch et al., 2000), meist direkt auf das angegriffene Objekt (Young, 2000). Das MBP scheint gegen Parasiten, darunter vor allem gegen Würmer, wirksam zu sein (Gleich et al., 1993); (Jain, 1993); (Young, 2000); (Sinowatz, 2006a), indem es erst an die Parasitenmembran bindet und diese anschließend beschädigt (Thrall und Weiser, 2004). Zudem weist es auch eine zytotoxische Wirkung gegenüber Protozoen und Bakterien auf (Gleich et al., 1993); (Young, 2000). Ein Peroxidase-H₂O₂-Halogenid-Komplex bildet toxische Sauerstoffmetaboliten, die an der Bekämpfung von Parasiten, Bakterien, Mykoplasmien, Pilzen, Protozoen, Viren und Tumorzellen beteiligt sind (Young, 2000). Das ECP ist ebenfalls giftig für Würmer, Protozoen und Bakterien (Gleich et al., 1993); (Young, 2000). Sowohl das MBP als auch das ECP sowie die eosinophile Peroxidase weisen jedoch auch eine Toxizität gegenüber manchen Säugerzellen auf, wobei sie vor allem bei den Zellen des

respiratorischen Epithels bemerkenswerten Schaden hervorrufen können. Zudem ist das MBP in der Lage, eine bronchiale Hyperreagibilität zu induzieren (Gleich et al., 1993). Weiterhin produzieren eosinophile Granulozyten Leukotriene (LTC₄ und LTD₄), die einen Bronchospasmus auslösen können (Jain, 1993). Diese Eigenschaften lassen vermuten, dass die eosinophilen Granulozyten die wichtigsten Mediatoren bei bronchialem Asthma sind (Gleich et al., 1993). Vermutlich sind die eosinophilen Granulozyten zudem an der Koagulation und der Fibrinolyse durch Aktivierung von Faktor XII bzw. Plasminogen beteiligt (Jain, 1993). Schließlich können sie andere Immunreaktionen einschließlich der Antwort der T-Lymphozyten beeinflussen und als Antigen präsentierende Zellen fungieren (Costa et al., 1997).

2.6.5 Zytotochemische Eigenschaften

Die eosinophilen Granula enthalten eine Reihe verschiedener Substanzen (Jain, 1993). Im Internum der Granula befindet sich das „major basic protein“ (MBP) (Gleich et al., 1993); (Jain, 1993); (Costa et al., 1997); (Young, 2000); (Sinowatz, 2006a), Zink und die Phospholipase C (Jain, 1993). Das Externum der Granula beinhaltet die eosinophile Peroxidase (EPO) (Gleich et al., 1993); (Jain, 1993); (Costa et al., 1997); (Raskin und Valenciano, 2000); (Steffens, 2000); (Young, 2000); (Sinowatz, 2006a), die beim Schaf eine stärkere Aktivität als die Myeloperoxidase der neutrophilen Granulozyten aufweist (Jain, 1967) und sich sowohl strukturell als auch biochemisch von dieser unterscheidet (Raskin und Valenciano, 2000). Die Granulamatrix schließt zusätzlich die saure Phosphatase (Jain, 1993); (Young, 2000), hydrolytische lysosomale Enzyme (Jain, 1993), das „eosinophil cationic protein“ (ECP) und das „eosinophil-derived neurotoxin“ (EDN) ein (Gleich et al., 1993); (Costa et al., 1997); (Young, 2000). Darüber hinaus enthalten die Granula unter anderem Cathepsin D und die β -Glucuronidase (Young, 2000). Die alkalische Phosphatase kann bei den eosinophilen Granulozyten der Schafe sowohl positiv (Fey und Kuntze, 1970) als auch negativ sein (Atwal und McFarland, 1967); (Jain, 1968); (Jain, 1970); (Schnabl, 1976). Bei Wiederkäuern können teilweise unspezifische Esterasen in den eosinophilen Granulozyten vorkommen (Raskin und Valenciano, 2000). So wird beim Schaf sowohl von einer Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase (Fey und Kuntze, 1970); (Schnabl, 1976) als auch der Naphthol-AS-Azetat-Esterase berichtet (Fey und Kuntze, 1970). Andere Autoren hingegen konnten unspezifische Esterasen bei den eosinophilen Granulozyten der Schafe nicht nachweisen (Jain, 1970); (Osbaldiston und Sullivan, 1978). Die eosinophilen Granulozyten weisen generell keine Aktivität der Chlorazetat-Esterase auf (Stobbe, 1970); (Raskin und Valenciano, 2000). Beim Schaf lassen sie sich mit Sudan-Schwarz anfärben und zeigen eine positive Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (Schnabl, 1976); (Al Izzi et al., 2007). Außerdem produzieren sie weitere Enzyme, darunter auch die Kollagenase, die Histaminase und die NADPH-Oxidase. Den eosinophilen

Granulozyten fehlen im Übrigen Lysozym, Laktoferrin und Phagozytin, die eine bakterizide Wirkung aufweisen (Young, 2000).

2.7 Basophile Granulozyten

2.7.1 Allgemeines

Auch die basophilen Granulozyten gehören in der Gruppe der Leukozyten zur Untergruppe der Granulozyten (Liebich, 2004). Aufgrund ähnlicher morphologischer und funktioneller Eigenschaften werden sie oft mit den Gewebsmastzellen gleichgestellt (Jain, 1993). Im Blut der Säugetiere kommen sie nur sehr selten vor (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004) und werden im Differentialblutbild häufig nicht gefunden (Thrall und Weiser, 2004). Beim Schaf machen sie mit einer Anzahl von $0,05 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($0 - 0,3 \times 10^3/\mu\text{l}$) durchschnittlich nur 0,5 % (0 - 3 %) der gesamten Leukozyten aus (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Eine Basophilie ist häufig im Zusammenhang mit einer Eosinophilie zu sehen, da bestimmte Substanzen der basophilen Granulozyten, wie beispielsweise Histamin, chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten wirken und ein funktionelles Zusammenspiel beider Granulozyten-Arten angenommen wird (Jain, 1993). Die genaue Identifizierung der basophilen Granulozyten kann sich als schwierig erweisen, wenn die Probennahme und die Fixierung der Blutausstriche nicht optimal sind (Steffens, 2000). Um sie gezielt im Blut nachzuweisen, ist beispielsweise die Färbung mit Toluidinblau sinnvoll (Jain, 1993). Die Lebensdauer der basophilen Granulozyten beträgt im Blut in der Regel 6 - 12 Stunden, nach Auswanderung ins Gewebe überleben sie dort ungefähr 12 - 14 Tage (Kraft et al., 2005).

2.7.2 Bildung

Die basophilen Granulozyten werden wahrscheinlich in ähnlicher Weise wie die neutrophilen und die eosinophilen Granulozyten über mehrere Zwischenstufen im Knochenmark gebildet (Jain, 1993). Aus der pluripotenten Stammzelle, die allen Blutzellen gemeinsam ist, geht die myeloische Vorläuferzelle hervor (Kraft et al., 2005). Diese entwickelt sich über die Stadien des Myeloblasten, des Promyelozyten, des basophilen Myelozyten, des basophilen Metamyelozyten und des stabkernigen basophilen Granulozyten letztendlich zum reifen basophilen Granulozyten (Liebich, 2004). Die Entwicklung im Knochenmark dauert in der Regel mindestens 2,5 Tage und ist meist vollständig abgeschlossen, bevor die Zellen ins Blut abgegeben werden (Scott und Stockham, 2000). Die Produktion, die Differenzierung und das Wachstum der basophilen Granulozyten werden vor allem durch IL3, IL5 und GM-CSF gesteuert. Diese „Basophilopoietine“ werden von aktivierten T-Lymphozyten gebildet (Jain, 1993).

2.7.3 Morphologie

Die basophilen Granulozyten erscheinen im Blutausstrich oft polyedrisch (Greenwood, 1977) und stellen bei den Haussäugern mit einem Durchmesser von 8 - 10 μm die kleinsten Granulozyten dar (Steffens, 2000). Der Zellkern besteht meist aus zwei oder drei (Yamada und Sonoda, 1972a); (Greenwood, 1977); (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993), manchmal aber auch aus bis zu fünf Segmenten (Rudolph und Schnabl, 1981); (Rothwell et al., 1994), die beim Schaf eine eckige Form aufweisen (Greenwood, 1977). Der Kern zeichnet sich durch eine beträchtliche Menge an Heterochromatin aus und Nukleoli können vorkommen (Steffens, 2000). Das Zytoplasma enthält zahlreiche basophile Granula (Yamada und Sonoda, 1972a), die eine runde bis ovale Gestalt aufweisen und von einer deutlichen Membran umgeben werden. Beim Schaf sind sie laut Yamada und Sonoda (1972) durchschnittlich 0,67 μm groß (Yamada und Sonoda, 1972a), Rudolph und Schnabl (1981) hingegen beschreiben beim Schaf eine Größe von bis zu 1,5 μm (Rudolph und Schnabl, 1981). Anhand ihrer Elektronendichte und ihrer inneren Struktur unterscheiden Yamada und Sonoda (1972) drei verschiedene Granula-Typen. Typ A zeichnet sich durch eine dichte, homogene Struktur aus. Typ B hingegen weist einen dichten, grob granulären Inhalt und Typ C einen weniger dichten, fein granulären Inhalt mit einer netzartigen Innenstruktur auf. Typ A kommt seltener vor als Typ B oder Typ C (Yamada und Sonoda, 1972a). Die basophilen Granula färben sich im Blutausstrich in der Regel dunkler an als der Kern (Banks, 1981) und überlagern diesen häufig (Banks, 1981); (Kramer, 2000). Sie sind wasserlöslich (Yamada und Sonoda, 1972a); (Jain, 1993); (Steffens, 2000) und verschwinden daher oft in unfixierten Blutausstrichen. In schwach fixierten Ausstrichen können sie schmutzig (Jain, 1993) oder teilweise vakuolisiert erscheinen (Jain, 1993); (Steffens, 2000), manchmal aber auch in der Anzahl vermindert sein (Jain, 1993); (Rothwell et al., 1994). Die für basophile Granulozyten und Mastzellen charakteristische Metachromasie (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993); (Costa et al., 1997) beschreibt die Fähigkeit, durch basische Farbstoffe in einen anderen Farbton angefärbt zu werden, als dem der angebotenen Färbelösung (Pschyrembel, 2002) und resultiert aus einem hohen Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen (Jain, 1993); (Scott und Stockham, 2000). Das Zytoplasma enthält weiterhin Ribosomen, Polyribosomen, Glykogenpartikel, Mikrotubuli, Aktinfilamente, Intermediärfilamente (Steffens, 2000), Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum (Yamada und Sonoda, 1972a); (Steffens, 2000) und einen dürlig entwickelten Golgi-Apparat, in dessen Nähe ein oder zwei Zentriolen vorkommen können (Yamada und Sonoda, 1972a). Die dünne Zytoplasmamembran (Yamada und Sonoda, 1972a) ist scharf umrissen und trägt zahlreiche Falten und Mikrovilli (Jain, 1993); (Steffens, 2000).

2.7.4 Aufgaben

Über die funktionelle Bedeutung der basophilen Granulozyten ist bis jetzt noch wenig bekannt (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Thrall und Weiser, 2004). Sie zeigen nur eine sehr geringe Beweglichkeit und Phagozytosefähigkeit (Hees und Tschudi, 1990). Es ist jedoch bewiesen, dass sie für allergische und entzündliche Prozesse bestimmte Mediatoren wie Histamin, Heparin oder Leukotriene freisetzen (Hees und Tschudi, 1990), wenn spezifische Antigene und Immunglobulin E (IgE) an bestimmte Rezeptoren auf der Plasmamembran der basophilen Granulozyten binden. Eine Aktivierung der Zelle mit Freisetzung des Granulainhalts kann aber auch durch verschiedene biologische Stimuli (z. B. Produkte der Komplement-Aktivierung, Zytokine) oder chemische Substanzen (z. B. Insektengifte, Kalzium-Ionophore) hervorgerufen werden (Costa et al., 1997). Eine der wichtigsten Aufgaben der basophilen Granulozyten ist das Auslösen einer sofortigen Hypersensitivitätsreaktion bei allergischen Prozessen (Jain, 1993). Diese Reaktion wird durch die Interaktion von gebundenem, antigenspezifischem IgE auf der Oberfläche der basophilen Granulozyten und/oder Mastzellen mit bestimmten multivalennten Antigenen ausgelöst. Die physiologischen Effekte sind auf die mediatorbedingten Reaktionen der Zielzellen, beispielsweise des Gefäßendothels, der glatten Muskulatur, der Drüsen oder der Leukozyten zurückzuführen (Costa et al., 1997). Das aus den Granula freigesetzte Histamin wirkt gefäßweiternd (Kraft et al., 2005) und führt durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Jain, 1993); (Scott und Stockham, 2000) zu einem Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen (Kraft et al., 2005). Die basophilen Granulozyten beeinflussen zudem Koagulation und Fibrinolyse (Jain, 1993). So hemmt Heparin die Blutgerinnung (Kolb, 1991); (Scott und Stockham, 2000); (Liebich, 2004) und hat demzufolge eine gewisse Schutzwirkung gegen die disseminierte intravasale Gerinnung (Kraft et al., 2005). Aber auch die Bereitstellung von Leukotrienen stellt eine wichtige Aufgabe der basophilen Granulozyten dar. Diese fungieren bereits in sehr geringen Konzentrationen als Mediatoren bei Entzündungsprozessen (Sinowatz, 2006a). Da die basophilen Granulozyten weiterhin das „major basic protein“ (MBP) enthalten (Scott und Stockham, 2000), wird ihnen auch eine Wirkung gegen Ektoparasiten (z.B. Zecken) zugeschrieben (Costa et al., 1997). Den basophilen Granulozyten und den Mastzellen ist der Gehalt an Heparin und Histamin (Liebich, 2004) sowie die IgE-Rezeptoren auf der Plasmamembran gemeinsam (Jain, 1993); (Costa et al., 1997); (Marone et al., 1997). Eine weitere Besonderheit beider Zellarten ist die Fähigkeit, ihre Granula nach der Degranulation zu resynthetisieren (Jain, 1993). Nicht umsonst werden die basophilen Granulozyten deshalb auch oft als „Blutmastzellen“ bezeichnet (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a). Es gibt aber keinen Beweis dafür, dass basophile Granulozyten ins Gewebe auswandern und sich dort zu Gewebsmastzellen transformieren (Thrall und Weiser, 2004). Außerdem sind die basophilen Granulozyten im Gegensatz zu den Mastzellen Peroxidase-negativ (Jain, 1993).

2.7.5 Zytotochemische Eigenschaften

Der Inhalt der basophilen Granula variiert ja nach Spezies (Jain, 1993). In der Regel enthalten sie Histamin, Heparin (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991); (Jain, 1993); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004); (Thrall und Weiser, 2004); (Kraft et al., 2005); (Sinowatz, 2006a), Proteoglykane (Costa et al., 1997) und das MBP (Gleich et al., 1993); (Costa et al., 1997); (Scott und Stockham, 2000). Außerdem weisen sie β -Glucuronidase, Elastase (Costa et al., 1997); (Scott und Stockham, 2000) und Cathepsin auf (Scott und Stockham, 2000). Die alkalische Phosphatase ist in den Granula nur teilweise vorhanden (Jain, 1993). Aktivierte Zellen produzieren neben den inflammatorischen Metaboliten der Arachidonsäure (Costa et al., 1997), wie Thromboxan A₂ oder Leukotriene, auch PAF (Jain, 1993). Die basophilen Granulozyten der Schafe besitzen keine Peroxidase (Jain, 1993); (Raskin und Valenciano, 2000); (Al Izzi et al., 2007). Auch die saure Phosphatase, saure Hydrolasen (Jain, 1993) und die bei den Mastzellen vorkommende Tryptase fehlt ihnen. Eine Aktivität der Chlorazetat-Esterase ist in der Regel ebenso nicht nachweisbar (Jain, 1993); (Scott und Stockham, 2000). Die basophilen Granulozyten der Schafe lassen sich mit Sudan-Schwarz anfärben und zeigen eine positive Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (Al Izzi et al., 2007), die jedoch nicht glykogenbedingt ist (Stobbe, 1970).

3. Enzymhistochemie

3.1 Definition und Anwendung

Die Enzymhistochemie dient der exakten Lokalisation von Enzymen in Zellen und Geweben (Sinowatz, 2006b). Enzyme stellen ubiquitär verbreitete, katalytisch wirksame Proteine dar, welche die chemische Reaktionen im Stoffwechselgeschehen der Zellen und Gewebe ermöglichen (Romeis, 2010). Enzymhistochemische Methoden haben demnach das Ziel, Stoffwechselvorgänge in der Zelle darzustellen und bestimmte Zellstrukturen aufgrund ihrer charakteristischen Enzymausstattung zu identifizieren (Sinowatz, 2006b).

3.2 Technik

Enzyme können durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden, wobei die häufigste Technik der Nachweis der enzymatischen Aktivität darstellt. Bei dieser Methode wird im Allgemeinen ein wasserlösliches Substrat angeboten, aus dem durch die Enzymreaktion ein oder mehrere wasserunlösliche Produkte entstehen. Diese werden anschließend sichtbar gemacht (Romeis, 2010), indem eines der Spaltprodukte durch Zufügen eines weiteren Reagens in einen

unlöslichen Komplex übergeführt wird. Dieser zeigt sich als Niederschlag am Ort der Enzymaktivität und kann unter dem Licht- oder Elektronenmikroskop betrachtet werden (Sinowatz, 2006b). Die simultane Azokupplungsreaktion stellt eine wichtige Präzipitationsmethode zum Nachweis der enzymatischen Aktivität dar. Sie umfasst zwei Schritte: auf die Umsetzung eines Substrats (Naphthol-, Naphtylamin-, Indoxyl- oder Indolylamin-Derivate) durch das entsprechende Enzym (primäre Reaktion) folgt die Präzipitationsreaktion durch Zugabe eines Diazoniumsalzes oder hexazotierten Pararosanilins. Diese reagieren mit dem primären Reaktionsprodukt und es entsteht ein unlöslicher Azofarbstoff (sekundäre Reaktion) (Lojda et al., 1979). Die Farbe des entstandenen Farbkomplexes ist abhängig von der Art des eingesetzten Salzes. Fast Blue führt zu einer blauen, Fast Red hingegen zu einer roten Färbung. Bei Verwendung hexazotierten Pararosanilins anstatt eines Salzes entsteht ebenfalls ein rotes Reaktionsprodukt (Romeis, 1989). Neben den Präzipitationsreaktionen gibt es viele weitere Methoden zum Nachweis von Enzymen, beispielsweise sukzessive Azokupplungsreaktionen (Lojda et al., 1979), Synthesereaktionen und Substratfilmverfahren (Lojda et al., 1979); (Sinowatz, 2006b). Darüber hinaus kann man die antigenen Eigenschaften des Enzymproteins (Immunhistochemie) nachweisen, die die zelluläre Lokalisation anzeigen, jedoch keinen Rückschluss auf die Aktivität des Enzyms zulassen. Zudem kann die spezifische Bindung von markierten Hemmsubstanzen oder anderen Substraten nachgewiesen werden (Romeis, 2010). Die Vorbehandlung des Präparates hat einen bedeutenden Einfluss auf den Nachweis eines Enzyms (Sinowatz, 2006b); (Romeis, 2010). Es sollten möglichst immer frische Proben verwendet werden, eine Fixierung kann zu einer Inaktivierung der Enzymaktivität führen (Romeis, 2010).

Aus dem großen Spektrum der enzymhistochemischen Nachweismethoden sollen nun kurz jene Techniken dargestellt werden, die auch in meiner Arbeit angewendet werden.

3.2.1 Phosphatasen

Phosphatasen gehören zur Gruppe der Hydrolasen, wobei die saure und die alkalische Phosphatase im Speziellen zu den Hydrolasen der Phosphomonoester gehören: *Monoester der o-Phosphorsäure + H₂O ↔ Alkohol + Orthophosphat* (Lojda et al., 1979).

Die saure Phosphatase kommt in erythroiden Vorläuferzellen, Megakaryozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten und Granulozyten vor, wobei bei den Erythrozyten und den Leukozyten verschiedene, für die jeweiligen Zellen charakteristische, Isoenzyme existieren (Raskin und Valenciano, 2000). Ihr Nachweis dient vor allem der Darstellung des lysosomalen Apparates (Romeis, 1989). Das pH-Optimum für die Enzymaktivität liegt in der Regel zwischen 4 und 5 (Lojda et al., 1979). Die häufigste Nachweismethode für die saure Phosphatase stellt das

Azokupplungsverfahren dar (Romeis, 1989), wobei als Substrat unter anderem Naphthol-AS-BI-Phosphat zum Einsatz kommen kann (Lojda et al., 1979); (Romeis, 1989). Die alkalische Phosphatase dient als Marker der neutrophilen Granulozyten (Romeis, 1989). Das pH-Optimum für die Enzymaktivität liegt generell im stark alkalischen Bereich (Lojda et al., 1979); (Romeis, 1989), beim Schaf im Speziellen bei pH 9,0 - 9,2 (Rausch und Moore, 1975). Das Enzym wird durch verschiedene Ionen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) aktiviert (Lojda et al., 1979), wobei bei Schafen vor allem Mg^{2+} für die maximale Aktivität benötigt wird (Rausch und Moore, 1975). Phosphat- und Arsenatanionen hingegen inhibieren die Enzymaktivität (Lojda et al., 1979). Die Methode der Wahl für den Enzymnachweis stellt das Azokupplungsverfahren dar (Romeis, 1989).

3.2.2 Peroxidasen

Peroxidasen stellen Hämproteine dar und katalysieren die Oxidation verschiedener Substanzen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, das dabei zu Wasser reduziert wird (Romeis, 1989): $Donator + H_2O_2 \rightarrow oxidierter\ Donator + 2\ H_2O$ (Lojda et al., 1979). Sie dienen als Marker für neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten (Raskin und Valenciano, 2000). Die Peroxidase der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten wird als Myeloperoxidase (MPO) bezeichnet, jene der eosinophilen Granulozyten als eosinophile Peroxidase (EPO) (Daimon et al., 1985). Für den Nachweis der Enzyme sollten möglichst immer frische Präparate verwendet werden, da die MPO äußerst empfindlich ist und die Enzymaktivität mit der Zeit nachlässt (Raskin und Valenciano, 2000). Die am meisten angewendete Technik zum Nachweis der Peroxidasen ist die Diaminobenzidinmethode nach Graham und Karnovsky (1966), bei der Diaminobenzidin oxidiert wird (Romeis, 1989). Benzidinomische zeichnen sich im Allgemeinen durch ihre hohe Sensitivität zum Enzymnachweis aus, sie stellen jedoch potente Karzinogene dar (Raskin und Valenciano, 2000).

3.2.3 β -Glucuronidase

Die β -Glucuronidase zählt zu den sauren Hydrolasen und katalysiert folgende Reaktion: β -Glucuronid + $H_2O \leftrightarrow$ Glucuronat + Aglykon (Lojda et al., 1979). Sie kommt in Thrombozyten (Jain, 1993), Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten vor (Raskin und Valenciano, 2000), wobei sie in den Lysosomen, im endoplasmatischen Retikulum (Lojda et al., 1979) und in den Mikrosomen lokalisiert ist. Das pH-Optimum für die Enzymaktivität liegt zwischen 4,4 und 5,4 (Lorbacher et al., 1967). Die Methode der Wahl zum Enzymnachweis stellt die simultane Azokupplungsreaktion nach Hayashi et al. (1964) dar. Als Substrat dient hierbei Naphthol AS-BI

β -Glucuronid, das eine sehr hohe Hydrolyserate aufweist und eine äußerst genaue Lokalisierung der Enzymaktivität ermöglicht (Lojda et al., 1979).

3.2.4 Esterasen

Esterasen lassen sich generell in unspezifische und spezifische Esterasen einteilen (Raskin und Valenciano, 2000). Stobbe (1970) definiert die unspezifischen Esterasen als solche Enzyme, die bei den Substraten α -Naphthyl-Azetat und Naphthol-AS-Azetat eine Esterase-Aktivität aufweisen (Stobbe, 1970). Zu den spezifischen Esterasen zählt unter anderem die Chlorazetat-Esterase. Die beiden Gruppen der Esterasen können biochemisch durch Separation ihrer Isoenzyme mittels Gelelektrophorese unterschieden werden (Raskin und Valenciano, 2000), zudem sind die spezifischen Esterasen resistent gegenüber einer Hemmung durch Natrium-Fluorid (Romeis, 1989); (Raskin und Valenciano, 2000).

Die unspezifischen Esterasen zählen zu den Carboxylester-Hydrolasen (Lojda et al., 1979) und sind im endoplasmatischen Retikulum, in den Lysosomen, in den Mitochondrien und im Hyaloplasma lokalisiert (Lojda et al., 1979). In der Regel zeigen Erythrozyten, Thrombozyten, (Fey und Kuntze, 1970), T-Lymphozyten (Jain, 1993), Monozyten und Granulozyten eine Enzymaktivität (Raskin und Valenciano, 2000). Der Name „unspezifische Esterasen“ beruht auf der Tatsache, dass sie eine hohe Bandbreite ihrer Substratspezifität aufweisen und ihre Aktivität in unterschiedlichen pH-Bereichen nachzuweisen ist (Raskin und Valenciano, 2000). Das pH-Optimum der meisten unspezifischen Esterasen liegt zwischen 5,0 und 8,0 (Lojda et al., 1979). Ristau et al. (1985) verwendeten zum Nachweis der α -Naphthyl-Azetat-Esterase einen pH-Wert von 5,8 (Ristau et al., 1985), Osbaldiston und Sullivan (1978) erzielten beim Schaf mit einem pH-Wert zwischen 6,0 und 6,5 das beste Färbeergebnis (Osbaldiston und Sullivan, 1978). Zum Enzymnachweis werden meist Azokupplungsreaktionen durchgeführt, wobei die angewendeten Substrate Ester von einfachen oder substituierten Naphtholen oder Indoxylen darstellen, die auch von Cholinesterasen oder manchen Peptidasen hydrolysiert werden können (Lojda et al., 1979). Die Chlorazetat-Esterase ist äußerst substratspezifisch (Stobbe, 1970) und stellt einen Marker für die neutrophilen Granulozyten und deren Vorläuferzellen dar (Romeis, 1989). Sie liefert spezifischere Ergebnisse als die Peroxidase, weist jedoch eine geringere Sensitivität auf (Raskin und Valenciano, 2000). Der Enzymnachweis erfolgt vor allem mittels Azokupplungsverfahren (Romeis, 1989), wobei die Reaktion vermutlich durch das Zusammenwirken mehrerer Enzyme, wie beispielsweise Chymotrypsin und Elastase, zustande kommt. Diese hydrolysierten Ester, die mit dem Substrat Naphthol-AS-D-Chlorazetat verbunden sind (Raskin und Valenciano, 2000). Osbaldiston und Sullivan (1978) erzielten bei einem pH-Wert zwischen 5,5 bis 6,5 das beste

Färbeergebnis (Osbaldiston und Sullivan, 1978).

3.3 Enzymausstattung der ovinen Blutzellen

Auf die zytochemischen Eigenschaften der Blutzellen wurde bereits bei der Charakterisierung der einzelnen Zellen in dieser Arbeit eingegangen. In diesem Kapitel erfolgt deshalb lediglich eine tabellarische Zusammenfassung (vgl. Tab. II.2) der enzymatischen Ausstattung der Blutzellen des Schafes im Hinblick auf die Phosphatasen, die Peroxidase, die β -Glucuronidase und die Esterasen. Dabei wurden verschiedene Quellen berücksichtigt (Atwal und McFarland, 1967); (Jain, 1967); (Gajanna und Nair, 1968); (Jain, 1968); (Fey und Kuntze, 1970); (Jain, 1970); (Diallo et al., 1975); (Rausch und Moore, 1975); (Schnabl, 1976); (Osbaldiston und Sullivan, 1978); (Daimon et al., 1985); (Ristau et al., 1985); (Styrt, 1989); (Buchta, 1990); (Gleich et al., 1993); (Jain, 1993); (Bienzle, 2000); (Raskin und Valenciano, 2000); (Scott und Stockham, 2000); (Smith, 2000); (Steffens, 2000); (Young, 2000); (Olivier et al., 2001); (Sinowitz, 2006a); (Al Izzi et al., 2007).

Tabelle II.2: Enzymatische Ausstattung der Blutzellen des Schafes

	AP	SP	POX	β G	CAE	NSE
Erythrozyten	-	-/x	-		-	x
Thrombozyten	-	x	-	x	-	x
Lymphozyten	-	x	-	x	-	-/x
Monozyten	-	x	-/x	x	-/x	x
Neutrophile Granulozyten	x	x	x	x	x	-/x
Eosinophile Granulozyten	-/x	x	x	x	-	-/x
Basophile Granulozyten		-	-	x	-	

AP = Alkalische Phosphatase, SP = Saure Phosphatase, POX = Peroxidase, β G = β -Glucuronidase, CAE = Chlorazetat-Esterase, NSE = unspezifische Esterasen, x = Enzymaktivität nachgewiesen, - = Enzymaktivität nicht nachgewiesen, Grün = in Literatur speziell zum Schaf, Blau = in Literatur generell zu den Haussäugetieren

4. Immunhistochemie

4.1 Definition und Anwendung

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis von Oberflächenantigenen, zytoplasmatischen Antigenen und Kernantigenen mit Hilfe von Antikörpern (Freund, 2008), sie basiert also auf Antigen-Antikörper-Reaktionen (Kolb, 1991); (Welsch und Sobotta, 2003). Antikörper gehören, wie bereits in Kapitel 2.3.4 erwähnt, zum humoralen Immunsystem und schützen den Körper vor fremden Substanzen. Antigene hingegen sind Proteine, Glykoproteine, Lipoproteine oder

Polysaccharide, die vom Immunsystem erkannt werden. Das Epitop, auch als antigene Determinante bezeichnet, stellt den Bereich des Antigens dar, an den der Antikörper spezifisch bindet. Auf einem Antigen kommen meist viele verschiedene Epitope vor, wodurch die Bindung unterschiedlicher Antikörper möglich wird (Romeis, 2010). Immunhistochemische Färbemethoden spielen sowohl in der biologisch-medizinischen Forschung als auch in der histopathologischen und zytopathologischen Diagnostik eine große Rolle (Denk, 1989).

4.2 Technik

Die Immunhistochemie beruht im Allgemeinen darauf, dass eine Probe mit dem nachzuweisenden Antigen mit einer Lösung inkubiert wird, die einen spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Antigen enthält (Welsch und Sobotta, 2003). Es kann grundsätzlich zwischen der direkten und der indirekten Methode unterschieden werden (Denk, 1989); (Kolb, 1991); (Sinowatz, 2006b). Bei der direkten Methode wird der spezifische Antikörper direkt auf das Präparat aufgebracht und bindet an das spezifische Antigen. Bei der indirekten Methode wird die Empfindlichkeit des immunzytochemischen Nachweises erhöht, indem zunächst ein spezifischer, unmarkierter Antikörper gegen das gesuchte Antigen auf den Ausstrich aufgetragen wird. Nach Abspülen des Präparats folgt die Zugabe von markierten Antikörpern, die gegen die zuerst aufgetragenen Antikörper gerichtet sind. Diese Anti-Antikörper stammen aus dem Serum einer anderen Tierart (Sinowatz, 2006b). Die höhere Empfindlichkeit ist dadurch bedingt, dass jeder Antikörper des ersten Säugers mehrere Anti-Antikörper binden kann (Kolb, 1991). Die Antikörper können auf verschiedene Weise markiert werden, um die Bindung des Antigens nachzuweisen. Die Immunfluoreszenz beschreibt die Kopplung der Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome), wie beispielsweise FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) oder TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat), die bei Licht einer bestimmten Wellenlänge gelb-grün bzw. rot fluoreszieren (Denk, 1989). Die Fluoreszenzfärbung hat den Nachteil, dass die Präparate relativ schnell ausbleichen (Denk, 1989); (Freund, 2008) und zur Darstellung ein Fluoreszenzmikroskop notwendig ist. Die Antikörper können weiterhin durch verschiedene Enzyme (immunenzymatische Methode) oder kolloidale Goldpartikel (Immuno-Gold-Reaktion) markiert werden (Denk, 1989). Die Avidin-Biotin-Technik ist ein häufig angewendetes Verfahren, das im Vergleich zu anderen immunhistochemischen Methoden ein stärkeres Signal liefert (Romeis, 2010). Dabei nutzt man die hohe Bindungsaffinität des Hühnereiweiß-Glykoproteins Avidin zum Vitamin Biotin. Anstelle des Avidins kann ebenso das aus *Streptomyces Avidinii* stammende Protein Streptavidin eingesetzt werden. Es werden biotinylierte Antikörper verwendet, wobei bei der direkten Methode der primäre Antikörper, bei der indirekten Methode hingegen der sekundäre Antikörper biotinyliert ist (Denk, 1989); (Romeis, 2010).

Avidin oder Streptavidin bilden mit einem biotinylierten Marker einen Komplex, wobei maximal drei Biotinmoleküle an ein Avidin- bzw. Streptavidinmolekül gebunden werden können und die vielen markierten Biotinmoleküle durch Avidin- bzw. Streptavidinmoleküle zusammengehalten werden. Dieser ABC (Avidin-biotin-complex) wird nach der Antikörperinkubation auf das Präparat gegeben und bindet an den biotinylierten Antikörper. Streptavidin wird in der Anwendung bevorzugt, da es sich durch eine höhere Sensitivität auszeichnet und eine geringere unspezifische Hintergrundmarkierung verursacht. Da es im Gegensatz zu Avidin nicht glykosyliert ist, reagiert es nicht mit Lektinen oder anderen Kohlenhydrat bindenden Proteinen im Präparat (Romeis, 2010). Die Spezifität der Antikörper und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Komponenten sind wesentliche Voraussetzungen für die Qualität der Untersuchung (Denk, 1989). Die Präparate sollten innerhalb von 24 Stunden verarbeitet werden, um intakte Oberflächenstrukturen zu bewahren (Freund, 2008). Die spezifischen Antikörper werden durch Immunisierung eines Tieres (z.B. Kaninchen, Schaf, Maus, Huhn) gewonnen (Sinowatz, 2006b). Generell kann zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern unterschieden werden. Die polyklonalen Antikörper sind gegen unterschiedliche Determinanten des Antigens gerichtet und führen deshalb durch Kreuzreaktionen teilweise zu falsch-positiven Ergebnissen, die Empfindlichkeit ist jedoch sehr hoch. Die monoklonalen Antikörper hingegen richten sich nur gegen ein Epitop des Antigens und sind somit sehr spezifisch. Der Nachteil hingegen besteht in der geringeren Sensitivität und Stabilität. Bei schlechter Antigenerhaltung, wie beispielsweise nach routinemäßiger Fixation, können sich falsch-negative Ergebnisse ergeben (Denk, 1989).

4.3 Immunhämatologische Differenzierung von Lymphozyten

Die B- und T-Lymphozyten und deren Untergruppen können im Allgemeinen anhand ihrer Zelloberfläche, ihrer Funktion und bestimmter Enzymaktivitäten unterteilt werden (Jain, 1993). Die Immunhämatologie befasst sich mit antigenen Strukturen auf den Blutzellen und Krankheiten des Blutes, die aus Antigen-Antikörper-Reaktionen resultieren. Sie ist von großer Bedeutung für Bluttransfusionen und Organtransplantationen und wichtig für die Untersuchung der Rolle des Immunsystems bei verschiedenen Krankheiten. Die antigenen Strukturen auf den Leukozyten können in Histokompatibilitäts-, Blutgruppen- und Leukozyten-spezifische Antigene unterteilt werden (Jain, 1993). In diesem Kapitel wird jedoch nur auf die Strukturen der Zelloberfläche zur Unterscheidung der Lymphozyten eingegangen.

Die Oberfläche der Lymphozyten ist, je nach Lymphozytenart, mit dem B-Zell-Rezeptor (BCR) oder T-Zell-Rezeptor (TCR) besetzt, die beide zur Klasse der Immunglobulin-Superfamilie gehören. Der BCR kann im Gegensatz zum TCR auch ein Antigen binden, wenn er sich in löslicher Form (als Antikörper) in Körperflüssigkeiten befindet. Sowohl die einzelnen B-Zellen

als auch die einzelnen T-Zellen tragen zahlreiche identische BCRs bzw. TCRs, weshalb ein Lymphozyt immer nur ein einziges Antigen erkennen und binden kann (Tizard, 2000). Die auf der Oberfläche der B-Lymphozyten vorkommenden Immunglobuline (Ig) (Ey, 1973b); (Outeridge, 1985); (Jain, 1993); (Naessens, 1997); (Liebich, 2004) repräsentieren den BCR (Ey, 1973b); (Tizard, 2000). Ey (1973) beschreibt beim Schaf sowohl IgM als auch zu einem geringeren Teil IgG auf der Oberfläche von Lymphozyten (Ey, 1973a); (Ey, 1973b), Naessens (1997) hingegen konnte bei Schafen ausschließlich IgM auf der Membran der B-Lymphozyten nachweisen (Naessens, 1997). Der TCR stellt ein Heterodimer mit hochvariablen $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -Ketten dar (Evans et al., 1994); (Liebich, 2004). Bei den meisten Haussäugern tragen die T-Lymphozyten einen TCR aus $\alpha\beta$ -Ketten (Lösch et al., 2000), bei Schafen hingegen kommen auch T-Zellen mit einem TCR aus $\gamma\delta$ -Ketten vor (Hein und Mackay, 1991); (Lösch et al., 2000). $\gamma\delta$ -T-Zellen weisen weder CD2 noch CD4 oder CD8 auf (Evans et al., 1994); (Tizard, 2000). Der Großteil dieser Lymphozytenpopulation trägt jedoch das Oberflächenmolekül T19 (Hein und Mackay, 1991); (Evans et al., 1994); (Pillai et al., 2007), lediglich 1 - 3 % der $\gamma\delta$ -T-Zellen fehlt dieses Molekül (Hein und Mackay, 1991). T19 wird speziell beim Schaf auch als „ovine workshop cluster 1“ (OvWC1) bezeichnet. WC-Antigene stellen im Allgemeinen Oberflächenmoleküle dar, zu denen weder beim Mensch noch bei der Maus ein Homolog identifiziert werden konnte (Tizard, 2000). Die Zahl der $\alpha\beta$ -T-Zellen und der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut variiert mit dem Alter der Schafe (Hein und Mackay, 1991); (Tizard, 2000). Während der ersten beiden Lebenswochen nimmt die Zahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen rasch zu (Hein und Mackay, 1991) bis diese bis zu 60 % des T-Zell-Pools ausmachen. Mit zunehmenden Alter nimmt deren Zahl wieder ab, bis sie mit einem Alter von 5 Jahren nur noch 5 % der T-Zellpopulation ausmachen (Tizard, 2000). Bei adulten Wiederkäuern sind somit die $\alpha\beta$ -T-Zellen vorherrschend (Hein und Mackay, 1991). Der Grund für das vermehrte Vorkommen der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei den großen Haussäugern nach der Geburt scheint die Sicherstellung einer frühen zellvermittelten Immunantwort zu sein, da deren Immunglobuline die Plazenta nicht durchqueren und die $\gamma\delta$ -T-Zellen unter den T-Zellen am stärksten reagieren und zudem zytotoxische Wirkungen aufweisen (Tizard, 2000).

Die Untergruppen der B- und T-Zellen werden meist anhand spezifischer Zellmembranantigene, nämlich den bereits erwähnten CD-Antigenen (siehe Kapitel 2.3.3) unterschieden (Jain, 1993). Die Entwicklung monoklonaler Antikörper revolutionierte die Art der Untersuchung des Immunsystems (Mackay, 1988). Deren Einsatz ermöglicht die genaue Charakterisierung der einzelnen Oberflächenmoleküle und somit die Differenzierung der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen (Hein und Mackay, 1991). So exprimieren T-Helferzellen CD4, zytotoxische T-Zellen hingegen CD8 (Davis und Hamilton, 1998); (Tizard, 2000); (Thrall und Weiser, 2004); (Sinowatz, 2006a). Mackay (1988) berichtet über dreizehn verschiedene Leukozytenmoleküle beim Schaf (Mackay, 1988). Die Tabelle II.3 zeigt eine Zusammenfassung seiner Ergebnisse.

Tabelle II.3: Leukozytenmoleküle des Schafes

Leukozytenmolekül	Vorkommen
CD1 (T6)	Thymozyten, dendritische Zellen, manche B-Zellen
CD2	T-Zellen
CD3 (T3)	T-Zellen
CD4 (T4)	60 % der T-Zellen, Thymozyten
CD5 (T1)	T-Zellen, Thymozyten, manche B-Zellen
CD8 (T8)	30 % der T-Zellen, Thymozyten
CD44 (Pgp-1)	Lymphozyten, Thymozyten, Makrophagen, Granulozyten
CD45 (LCA)	alle Leukozyten
B5-5	T-Zellen, reife B-Zellen, Thymozyten
LCAp220	B-Zellen
T11TS	T-Zellen (Ligand für CD2)
T19	10 - 30 % der T-Zellen (CD4 ⁺ , CD8 ⁺)
T80	T-Zellen

Pgp-1 = phagocyte glycoprotein-1, LCA = leukocyte common antigen, T11TS = T11 target structure

Im Jahre 1993 wurden vierzehn ovine CD-Antigene bei den Leukozyten identifiziert, nämlich neben den von Mackay (1988) bereits beschriebenen CD1, CD2, CD4, CD5, CD8, CD44 und CD45 zusätzlich CD6 (T12) bei T-Zellen und Thymozyten, CD25 bei aktivierten T-Zellen, CD11a, CD11b, CD11c, CD18 und CD45R. Weiterhin wurden sechs WC-Antigene, nämlich neben WC1 auch WC2 bei T-Zellen, WC3 und WC4 bei B-Zellen und dendritischen Zellen, WC6 und WC9 beschrieben (Hopkins et al., 1993). T-Lymphozyten tragen auf ihrer Zelloberfläche gewöhnlich das Theta-Antigen (Thy-1) (Banks, 1981), dessen Vorkommen jedoch bei den verschiedenen Spezies variiert (Davis und Hamilton, 1998); (Tizard, 2000). Zudem dient CD3 als Marker für alle T-Zellen, da der TCR immer mit dem so genannten CD3-Komplex assoziiert ist (Tizard, 2000).

5. Zytoskelett

5.1 Aufbau des Zytoskeletts

Das Zytoskelett stellt ein dreidimensionales Geflecht aus Filamenten und Mikrotubuli in eukaryotischen Zellen dar (Pschyrembel, 2002). Es organisiert das Zellinnere und teilt es in verschiedene Domänen auf. Den Großteil bildet eine Matrix im gesamten Zytoplasma. Die zweite Region stellt das auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisierte Membranskelett dar. Schließlich befinden sich zytoskelettale Elemente in der perinukleären Region (Georgatos und Marchesi, 1985). Das Zytoskelett setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen, nämlich den

Aktinfilamenten (Mikrofilamenten), den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli (Pruss et al., 1981); (Fuchs und Weber, 1994); (Xu et al., 2009). Diese werden wiederum von drei verschiedenen Proteinfamilien gebildet (Alberts et al., 2004); (Khismatullin, 2009). Aber auch das an Bewegungsprozessen vieler Zellen beteiligte Myosin kann dem Zytoskelett zugeordnet werden (Welsch und Sobotta, 2003).

Das Aktinfilamentsystem kommt in allen eukaryotischen Zellen vor (Vicente-Manzanares et al., 2002). Aktin ist Bestandteil der Muskelfasern und der Mikrofilamente des Zytoskeletts (Pschyrembel, 2002) und macht in nicht-muskulären Zellen ca. 10 % des zytoplasmatischen Proteingehalts aus (Richelme et al., 1996). In der Zelle liegen das Monomer G-Aktin (globuläres Aktin) und das Polymer F-Aktin (filamentäres Aktin) im Gleichgewicht (Pschyrembel, 2002). Die Aktinfilamente haben einen Durchmesser von 5 - 9 nm und werden durch zwei helikal umeinander gewundene Protofilamente gebildet. Sie treten als flexible Gebilde in Erscheinung, die sich zu linearen Bündeln oder flächigen Netzen organisieren (Alberts et al., 2004). Die Filamente sind charakterisiert durch eine molekulare Polarität mit einem schnell wachsenden Plus-Ende und einem langsam wachsenden Minus-Ende (Khismatullin, 2009). Obwohl diese Filamente überall in der Zelle verteilt sind, erreichen sie ihre höchste Dichte in der Zellperipherie direkt unter der Plasmamembran (Alberts et al., 2004) und bilden dort das kortikale Zytoskelett (Khismatullin, 2009). Es existiert eine große Anzahl Aktin bindender Proteine (ABP), die mit den Aktinfilamenten interagieren. Zu den ABPs zählen Proteine zur Sequestration von G-Aktin und Kappenproteine zur Regulation der Aktinpolymerisation, Fragmentierungsproteine sowie Aktin quervernetzende Proteine (Richelme et al., 1996). Manche Proteine verbinden jedoch auch Aktin mit anderen Zellstrukturen. Sowohl Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Familie) als auch Talin verankern Aktin an der Zellmembran (Richelme et al., 1996); (Fox, 2001). Connectin hingegen interagiert gleichzeitig mit Mikrofilamenten der Zelle und Laminin der extrazellulären Matrix (Richelme et al., 1996).

Die Intermediärfilamente werden durch eine Vielfalt gewebsspezifischer Proteine gebildet (Oshima, 2007). Diese weisen teilweise nur eine 20 %ige Sequenzhomologie auf (Fuchs und Weber, 1994), haben aber alle ein gemeinsames antigenes Epitop (Pruss et al., 1981); (Oshima, 2007). Die lang gestreckten, faserförmigen Bausteine bestehen aus drei Abschnitten, nämlich dem amino-terminalen Ende (Kopf), der α -helikal gewundenen, zentralen Domäne und dem carboxyl-terminalen Ende (Schwanz) (Khismatullin, 2009). Zwei solcher Monomere winden sich parallel und α -helikal zu einem Dimer und bilden somit eine Doppelwendel („coiled-coil“) (Fuchs und Weber, 1994). Ein Tetramer entsteht wiederum durch die Kopf-zu-Schwanz Anordnung zweier solcher Dimere (Khismatullin, 2009) und stellt den Grundbaustein der Protofilamente dar, wobei zwei seitlich aneinander gelagerte Protofilamente eine Protofibrille formen. Ein ganzes

Intermediärfilament besteht schließlich aus meist vier umeinander gewundenen Protofibrillen und weist einen Durchmesser von ca. 10 nm auf (Fuchs und Weber, 1994). Die Intermediärfilamente formen ein dreidimensionales Netzwerk innerhalb der Zelle (Khismatullin, 2009). Sie sind sowohl mit der Kern- als auch mit der Plasmamembran verbunden (Fuchs und Weber, 1994); (Brown et al., 2001) und dehnen sich über das ganze Zytoplasma aus (Alberts et al., 2004). Zudem bilden die Intermediärfilamente die Kernlamina (Aebi et al., 1986); (Fuchs und Weber, 1994); (Alberts et al., 2004); (Oshima, 2007) und kommen gehäuft in der perinukleären Region vor (Lehto et al., 1978); (Georgatos und Marchesi, 1985). So genannte Intermediärfilament assoziierte Proteine (IFAP) spielen sowohl beim Aufbau und der Aufrechterhaltung der Netzwerke als auch bei dynamischen Umstrukturierungen bei Wachstum und Differenzierung eine wichtige Rolle (Fuchs und Weber, 1994). Es können verschiedene Klassen der Intermediärfilamentproteine unterschieden werden. Die Klassen I und II werden durch die in Epithelien und Haaren vorkommenden sauren und basischen Keratine gebildet. Klasse III schließt die homopolymeren Proteine Vimentin, Desmin, saures Gliafaserprotein und Peripherin ein (Oshima, 2007). Vimentin stellt darunter den häufigsten Baustein dar (Fuchs und Weber, 1994), da es in allen Zellen mesenchymalen Ursprungs, also auch in Blutzellen, vorkommt (Lazarides, 1980). Klasse IV besteht aus Neurofilamentproteinen, α -Internexin, Nestin, Synemin und Syncolin und Klasse V aus den die Kernlamina bildenden Laminen A, B1, B2, und C (Oshima, 2007).

Mikrotubuli finden sich nahezu in allen Zellen vor (Moll, 2006). Sie bestehen aus Tubulin, wobei eine Tubulin-Untereinheit eines Protofilaments aus den zwei kugelförmigen Proteinen α -Tubulin und β -Tubulin besteht. Diese werden durch nicht-kovalente Bindungen fest zusammengehalten (Alberts et al., 2004) und bilden somit ein Heterodimer (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004); (Khismatullin, 2009). Die Mikrotubuli stehen im Gleichgewicht mit den im Zytoplasma vorliegenden, globulären Tubulin-Untereinheiten (Welsch und Sobotta, 2003). Sie stellen relativ starre, lange Hohlzylinder (Alberts et al., 2004) mit einem Innendurchmesser von 14 nm und einem Außendurchmesser von 25 nm dar (Khismatullin, 2009). Sie werden von dreizehn parallel angeordneten Protofilamenten gebildet. Die Mikrotubuli entspringen dem Mikrotubuli organisierenden Zentrum (microtubule-organising center, MOC), das auch als Zentrosom bezeichnet wird (Alberts et al., 2004); (Khismatullin, 2009). Dieses befindet sich im Zytoplasma in Kernnähe (Frankel, 1976); (Osborn et al., 1978); (Khismatullin, 2009) und besteht aus einer Matrix, die ein Zentriolenpaar enthält (Welsch und Sobotta, 2003). Ein sehr wichtiger Baustein des MOC ist γ -Tubulin, dem eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuer Tubulinpolymere zugeschrieben wird (Vicente-Manzanares et al., 2002). Die Mikrotubuli stellen dynamische, polarisierte Strukturen mit Plus- und Minus-Enden dar (Hartwig, 2007), wobei die Polymerisierung an den vom Zentrosom weg weisenden Plus-Enden stattfindet (Khismatullin, 2009). Sie durchspannen das Zytoplasma oft über die gesamte Distanz zwischen Kern und

Plasmamembran (Osborn et al., 1978); (Weber und Osborn, 1981), wobei sie neben den Intermediärfilamenten in der perinukleären Region vermehrt vorkommen (Georgatos und Marchesi, 1985). So genannte Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAP) interagieren mit den Mikrotubuli und übernehmen wichtige Aufgaben bei deren Polymerisation, Quervernetzung und Stabilisierung. Die Motorproteine der Kinesin- und Dynein-Superfamilie stellen weitere regulatorische Proteine dar, die an dem intrazellulären Transport von Vesikeln und Organellen entlang der Mikrotubuli und an der Spindelformation beteiligt sind (Vicente-Manzanares et al., 2002). Sie vermitteln zudem äußerst starke Interaktionen zwischen Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (Khismatullin, 2009). Bei migrierenden B-Lymphozyten kann diese Wechselbeziehung durch eine koordinierte Bewegung des Zentrosoms und des Vimentinnetzwerkes veranschaulicht werden (Sumoza-Toledo und Santos-Argumedo, 2004).

5.2 Funktionen des Zytoskeletts

Das Zytoskelett verleiht eukaryotischen Zellen bestimmte räumliche und mechanische Eigenschaften zur Selbstorganisation und zur Kontaktaufnahme mit der Umwelt (Alberts et al., 2004). Die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts erfüllen durch ihren speziellen Aufbau und ihre jeweilige Anordnung charakteristische Funktionen.

Die Aktinfilamente sorgen durch die Stabilisierung der Plasmamembran für die Aufrechterhaltung der äußeren Zellform (Alberts et al., 2004), ermöglichen aber auch eine passive Zelldeformation und die aktive Fortbewegung der Zelle. Des weiteren wird ihnen eine Rolle bei der Exozytose, der Signaltransduktion (Richelme et al., 1996) und der Phagozytose zugeschrieben (Ryder et al., 1982). Für die mechanische Stabilität der Zelle und den Widerstand gegen Scherkräfte sorgen vor allem die Intermediärfilamente (Alberts et al., 2004). Diese sind im Gegensatz zu den anderen Komponenten des Zytoskeletts äußerst stabil, da der Großteil der Filamente in vollständig polymerisiertem Zustand in der Zelle vorliegt, vorausgesetzt diese befindet sich in der Interphase und nicht in Mitose (Khismatullin, 2009). Die Intermediärfilamente sorgen weiterhin für die Verankerung des Zellkernes im Zytoskelett (Lehto et al., 1978); (Lazarides, 1980), wobei vor allem Vimentin eng mit dem Zellkern assoziiert ist (Lazarides, 1980). Die Lamine der Kernhülle leisten sowohl strukturelle als auch regulatorische Funktionen (Oshima, 2007). Sie bilden durch Ummantelung der Innenfläche der Kernmembran (Alberts et al., 2004) einen Schutz für die DNA (Aebi et al., 1986) und leisten vermutlich einen Beitrag zur Chromatinorganisation bzw. DNA-Replikation (Fuchs und Weber, 1994). Da die Mikrotubuli ausgeprägten dynamischen Veränderungen unterliegen, tragen sie vermutlich nicht wesentlich zur Aufrechterhaltung der Zellform bei (Khismatullin, 2009). Eine Ausnahme bildet hier die Mikrotubuliwendel, die für die diskoidale Gestalt der Thrombozyten verantwortlich ist (Gresele und Falcinelli, 2005); (Hartwig,

2007). Die mögliche Variation der Mikrotubuluslänge ist jedoch für die Organisierung der Lage von Zellorganellen bei Modifikationen der Zellform, wie im Falle von Migrationsprozessen (Khismatullin, 2009), Wachstum oder Teilung, von großer Bedeutung (Alberts et al., 2004). Die Mikrotubuli regulieren, wie bereits in Kapitel 5.1 erwähnt, intrazelluläre Transportprozesse wie den von Phagosomen, Granula oder Vesikeln (Ryder et al., 1982). Dabei stellen die Motorproteine der Kinesin- und Dynein-Superfamilie wichtige regulatorische Proteine dar. Kinesine bewegen die „Fracht“ zum Plus-Ende, Dyneine zum Minus-Ende (Welsch und Sobotta, 2003). Während der Mitose verschwinden die zytoplasmatischen Mikrotubuli (Brinkley et al., 1975), ordnen sich zur bipolaren Mitosespindel um, ziehen die Chromatiden auseinander und sorgen für die Trennung der sich teilenden Zellen (Alberts et al., 2004).

5.3 Zytoskelett der Blutzellen

5.3.1 Erythrozyten

Das Zytoskelett der Erythrozyten besteht aus Spektrin, Aktin und weiteren Proteinen (Calvert et al., 1979). Mehrere Spektrinmoleküle bilden mit kurzen Aktinfilamenten ein flaches Netzwerk (Bennett, 1990), das submembranös lokalisiert ist und über bestimmte Adaptorproteine mit Bestandteilen der Plasmamembran verknüpft ist (Jöns, 2001). Beispiele für solche Proteine sind Adduktin (Sinard et al., 1994); (Li und Bennett, 1996), Ankyrin (Bennett und Stenbuck, 1979); (Shen et al., 1986); (Bennett, 1990) und Protein 4.1 (Bennett, 1990). Spektrin stellt ein stabförmiges Molekül dar, das als Tetramer eine Länge von bis zu 200 nm erreichen kann (Bennett, 1990). Die Aktinfilamente hingegen bestehen durchschnittlich nur aus 12 - 14 β -Aktinmonomeren und sind mit einer Länge von ca. 33 - 37 nm relativ kurz (Bennett, 1990). An einen dieser „Aktin-Knoten“ binden ungefähr sechs Spektrinfilamente über das Protein 4.1 (Gov, 2007). Die Struktur und die Länge der Aktinfilamente werden durch Aktin bindende Proteine (ABP) kontrolliert. Tropomyosin stabilisiert die Filamente (Bennett, 1990); (Fowler, 1996) und schützt diese vor Scherkräften und Aktin depolymerisierenden Proteinen (Bennett, 1990). Am schnell wachsenden Ende der Filamente sitzt Adduktin als Kappe, es bindet darüber hinaus aber auch an seitliche Anteile der Aktinfilamente zu deren Bündelung. Am langsam wachsenden Ende befindet sich das Tropomyosin bindende Tropomodulin. Beide Kappenproteine verhindern sowohl die Elongation als auch die Depolymerisation der Aktinfilamente und sorgen somit für die Erhaltung der Filamentlänge (Fowler, 1996). Die ausgereiften Erythrozyten besitzen weder Mikrotubuli (Moll, 2006) noch Intermediärfilamente. Vimentin kommt gewöhnlich in sich entwickelnden Erythroblasten vor, geht aber nach Ausstoßung des Kernes verloren (Georgatos und Marchesi, 1985). Die Hauptfunktion des erythrozytären Zytoskeletts stellt die Unterstützung

der Membranstruktur dar, wodurch eine lange Lebensdauer der roten Blutkörperchen gewährleistet wird (Bennett, 1990). Die spezifischen Interaktionen zwischen Zytoskelett und Membranbestandteilen verleihen den Erythrozyten eine hohe Elastizität und Flexibilität bei gleichzeitiger starker Rigidität, wodurch hohen Scherbelastungen in der Zirkulation standgehalten werden kann (Jöns, 2001).

5.3.2 Thrombozyten

Das Zytoskelett der Thrombozyten teilt sich im Allgemeinen in ein spektrinbasiertes Membranskelett, ein das Zytoplasma ausfüllendes Aktinnetzwerk und eine am Zellrand verlaufende Mikrotubuliwendel auf (Fox, 2001); (Hartwig, 2007).

Das Membranskelett der Thrombozyten besteht, wie bei den Erythrozyten, aus Spektrinsträngen, die sowohl miteinander als auch mit Aktinfilamenten verbunden sind. Aktin stellt das am häufigsten vorkommende Protein der Blutplättchen dar. In unstimulierten Thrombozyten liegt es zu 35 - 40 % polymerisiert vor, in stimulierten hingegen zu 60 - 80 % (Boyles et al., 1985). Obwohl über den genauen Aufbau des Membranskeletts und dessen Verbindung mit der Plasmamembran bei den Thrombozyten weniger bekannt ist als bei den Erythrozyten, können einzelne Unterschiede festgehalten werden. Die Aktinfilamente der Thrombozyten sind im Gegensatz zu den kurzen Aktinoligomeren der Erythrozyten relativ lang. Weiterhin fehlt den Thrombozyten das Kappenprotein Tropomodulin. Ein Teil der Minus-Enden wird stattdessen vom Arp2/3-Komplex bedeckt, ein beträchtlicher Anteil trägt beim ruhenden Thrombozyten jedoch kein Kappenprotein (Hartwig, 2007). Der Arp2/3-Komplex ist außerdem bei der Querverbindung der Aktinfilamente und bei der Aktinneubildung von Bedeutung (Fox, 2001); (Hartwig, 2007). Adduktin sitzt als Kappenprotein an den schnell wachsenden Enden der Aktinfilamente und sorgt außerdem für die Verbindung von Aktinfilamenten mit dem spektrinbasierten Membranskelett (Hartwig, 2007).

Der Großteil der Aktinfilamente kommt bei den Thrombozyten im Zytoplasma vor (White, 2007). Bei unstimulierten Zellen sind die Filamente an verschiedenen Stellen durch eine Vielzahl Aktin querverbindender Proteine zusammengeschaltet und bilden somit ein mechanisch starres Netzwerk im Zytoplasma (Fox, 2001); (Hartwig, 2007). Filamin, Talin und die ERM-Familie verbinden die Aktinfilamente mit Proteinen der Zellmembran (Fox, 2001). Das zytoplasmatische Aktinnetzwerk fungiert in der ruhenden Zelle als Matrix, die der räumlichen Organisation der Zellorganellen und anderer struktureller Komponenten dient (White, 2007). Das mit den Aktinfilamenten interagierende Myosin (Hartwig, 2007) stellt ein langes, asymmetrisches Molekül mit einer bipolaren Filamentstruktur dar (Cerecedo et al., 2002). In den Thrombozyten

kommen nicht-muskuläres Myosin IIA und IIB vor, wobei achtundzwanzig dieser Moleküle Filamente mit einer Länge von ca. 300 nm bilden. Durch Bindung an Aktin kann das Motorprotein die kontraktile Kraft auf die Aktinfilamente ausüben, wobei es zu einem Gleiten der Filamente in eine Richtung kommt (Hartwig, 2007). Diese Aktin-Myosin-Interaktionen befähigen die Thrombozyten zur Änderung der Zellform, zur Kontraktion des hämostatischen Pfropfens und zur Blutgerinnselretraktion. Weiterhin tragen sie zur Zentralisation der Granula aktiverter Thrombozyten bei, da das Aktomyosinnetzwerk die Mikrotubuliwendel zusammenzieht (White, 2007). In kernhaltigen Zellen erfolgen Exozytosevorgänge gewöhnlich durch Fusion der Membranen einzelner oder verschmolzener Granula mit der Plasmamembran, die Thrombozyten hingegen verfügen zudem über einen modifizierten Sekretionsvorgang (Flaumenhaft et al., 2005). In Folge einer ausreichend starken Stimulation kommt es mit Hilfe von kontraktilen Kräften des Aktomyosinskeletts nach Zentralisation der Granula (White, 2007) zur Ausschleusung deren Inhalts über das OCS vom Zellzentrum ausgehend (Flaumenhaft et al., 2005); (Hartwig, 2007); (White, 2007). Die Granulasekretion wird zusätzlich durch das dichte, zytoplasmatische Aktinnetzwerk reguliert (Flaumenhaft et al., 2005); (Cerecedo et al., 2010), da eine Wanderung der Granula in die Zellperipherie weitgehend verhindert (Hartwig, 2007) und folglich eine inadäquate Freisetzung thrombogener Substanzen aus den Blutplättchen vermieden wird. Eine weitere Steuerung der Sekretion gewährleistet eine Umhüllung der Granula mit F-Aktin, die möglicherweise Membranfusionen zu verhindern vermag (Flaumenhaft et al., 2005).

Tubulin kommt bei ruhenden Thrombozyten vor allem in der polymerisierten Form vor (White, 2007). Die Mikrotubuli erscheinen in Form einer Wendel (Hartwig, 2007); (White, 2007) mit einer Länge von ca. 100 μm (Hartwig, 2007). Diese verläuft im Zytoplasma entlang des größten Zellumfangs unterhalb der Zellmembran (White, 2007) und ist für die Aufrechterhaltung der diskoidalen Form der Blutplättchen verantwortlich (Nachmias, 1980); (Schwer et al., 2001); (Cerecedo et al., 2002); (Hartwig, 2007); (White, 2007). Im aktivierte Zustand liegt die Mikrotubuliwendel, wie bereits erwähnt, im Zellzentrum zusammengedrängt oder fragmentiert vor. Thrombozyten exprimieren neben α -Tubulin vier verschiedene β -Tubuline (Hartwig, 2007). Das am häufigsten vorkommende $\beta 1$ -Tubulin (Schwer et al., 2001); (Gresele und Falcinelli, 2005); (Hartwig, 2007) wird speziell von Thrombozyten und reifen Megakaryozyten exprimiert und ist von großer Wichtigkeit für Funktion, Synthese und Struktur der Blutplättchen (Schwer et al., 2001). Durch Kälteeinwirkung kann es zu einem Abbau der die Wendel bildenden Mikrotubuli (Hartwig, 2007); (White, 2007) und somit zu einem Verlust der scheibenförmigen Gestalt der Thrombozyten kommen (White, 2007).

5.3.3 Leukozyten

Das Zytoskelett der Leukozyten besteht aus Aktinfilamenten, Myosin, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli (Strukov et al., 1983); (Vicente-Manzanares et al., 2002). Die verschiedenen zytoskelettalen Elemente beeinflussen maßgeblich wichtige Funktionen der Leukozyten im Abwehrgeschehen wie Motilität (Strukov et al., 1983), Extravasion, Antigenerkennung, Zellaktivierung (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004), Bindung und Phagozytose verschiedener Substanzen, Degranulation sowie Fusion der Granula mit der phagozytischen Vakuole (Strukov et al., 1983).

Bei der Migration ermöglicht das Zytoskelett die Anpassung der Zellform an äußere Gegebenheiten (Richelme et al., 1996). Der Vorgang des Gefäßaustritts zirkulierender Leukozyten setzt eine vorherige Aktivierung der Zelle mit einer Aktinpolymerisation im peripheren Zellbereich voraus, die eine Verformbarkeit der Zelle ermöglicht (Khismatullin, 2009). Dadurch kommt es zu einer für die aktive Migration notwendige Polarisierung der Zelle (Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999); (Brown et al., 2001); (Khismatullin, 2009) mit Ausbildung eines Lamellipodiums am vorderen und eines Uropodiums am hinteren Teil der Zelle (Khismatullin, 2009). Im Lamellipodium befindet sich ein Aktinnetzwerk mit definierter Architektur parallel zur Migrationsrichtung, wobei in der vordersten Region die Aktinpolymerisation stattfindet und die Plus-Enden der wachsenden Filamente nach außen gerichtet sind (Vicente-Manzanares et al., 2002). Das Uropodium enthält Aktinfilamente, Mikrotubuli, das MOC, Vimentinfilamente, ERM-Proteine, das Verknüpfungsprotein Plektin (Burkhardt et al., 2008), Myosin II (Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999) und andere bei der Migration nicht benötigte Moleküle (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004). Filopodia sind weitere Strukturen, die bei beweglichen Zellen auftreten. Sie stellen lange und dünne Zellfortsätze dar, die aus Aktinfilamenten bestehen (Vicente-Manzanares et al., 2002). Die Leukozyten exprimieren mehrere Isoformen des Motorproteins Myosin, die für die Motilität der Zelle von Bedeutung sind (Richelme et al., 1996). Das zweiköpfige Myosin II kann zwei Aktinfilamente binden und diese vom Minus-Ende zum Plus-Ende bewegen, wodurch eine Bewegung des einen Filaments gegen das andere zustande kommt (Vicente-Manzanares et al., 2002). Einköpfiges Myosin I trägt ebenfalls zur Beweglichkeit bei, indem es sowohl an Aktin als auch an die Membran bindet (Richelme et al., 1996). Die tatsächliche Leukozytenbewegung ist amöboid (Burkhardt et al., 2008) und erfolgt durch Extensionen der Lamellipodia und Filopodia gefolgt von Retraktionen des Uropodiums (Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999). Die im Uropodium durch Kontraktionen erzeugte Kraft bewegt den Großteil des Zytoplasmas nach vorne (Burkhardt et al., 2008). Das wichtigste Intermediärfilamentprotein der Leukozyten stellt Vimentin dar (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004); (Khismatullin, 2009). Aufgrund

der extremen Formveränderungen der Leukozyten während der Migration brauchen diese Zellen ein dynamisches Zytoskelett. Die Dynamik des Vimentinnetzwerkes kommt durch eine enge Interaktion der Vimentinfilamente mit Mikrofilamenten und Mikrotubuli zustande (Khismatullin, 2009). Die Verformbarkeit zirkulierender Lymphozyten wird erst durch den Abbau des Vimentinnetzwerkes während der Zellpolarisation ermöglicht (Brown et al., 2001), die Rigidität der Zellen basiert demnach hauptsächlich auf den Vimentinfilamenten (Brown et al., 2001); (Sumoza-Toledo und Santos-Argumedo, 2004); (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004). Die Fähigkeit zur Phagozytose beruht auf einem kontraktilen System aus Aktin und Myosin (Ryder et al., 1982), wobei die Myosinisoformen Ic, II, V, VII und IX an dem Vorgang beteiligt sind. Myosin VII reguliert zu Beginn die Adhäsion an das Zielobjekt. Durch Aktinpolymerisation und hauptsächlicher Mitwirkung von Myosin II bildet die phagozytierende Zelle aktingestützte Ausstülpungen zur Umfassung und Ingestion des Fremdpartikels. Dadurch kommt es zur Entstehung eines Phagosoms (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004), das hauptsächlich durch Mikrofilamente, aber auch durch Mikrotubuli stabilisiert wird (Ryder et al., 1982); (Xu et al., 2009). Die Auflösung des Aktinnetzwerkes führt vermutlich zur Translokation von Lysosomen und deren Fusion mit dem Phagosom, wodurch es zur Eliminierung des Pathogens kommt (Vicente-Manzanares et al., 2002). Bei der Degranulation sind die Mikrotubuli maßgeblich beteiligt. Die Granula und Vesikel sind entlang der Mikrotubuli ausgerichtet und um die Phagosomen herum sind die Mikrotubuli konzentriert. Es wird angenommen, dass die Mikrotubuli als Art Leitschienen in der Zelle fungieren. Dadurch könnten entweder die im Zellzentrum befindlichen Granula entlang der Mikrotubuli zu der peripher gelegenen phagozytischen Vakuole oder die phagozytische Vakuole in das granulareiche Zentrum der Zelle gelangen (Ryder et al., 1982). Bei den neutrophilen Granulozyten wird angenommen, dass aufgrund einer engen Assoziation von Aktin und den Granula deren Transport zur Plasmamembran und somit deren Exozytose reguliert bzw. limitiert wird, wodurch die Freisetzung destruktiver Enzyme bei unstimulierten Zellen verhindert wird (Jog et al., 2007). Bei den T-Lymphozyten spielt das Aktinfilamentsystem eine bedeutende Rolle bei der Zellaktivierung (Vicente-Manzanares et al., 2002); (Burkhardt et al., 2008). Im Verlauf der Antigenerkennung reguliert es die molekulare Reorganisation der T-Zell-Oberfläche, wodurch ein Kontakt zwischen Lymphozyt und Antigen präsentierender Zelle hergestellt werden kann (Vicente-Manzanares et al., 2002). Neben Mikrofilamenten tragen aber auch Mikrotubuli zur Bildung dieser „immunologischen Synapse“ zwischen beiden Zellen bei. Polymerisiertes Aktin dient als Gerüst für die Entstehung und Stabilisierung des Signalkomplexes, die Mikrotubuli sind vermutlich für die Aufrechterhaltung des initialen Kontaktes zuständig (Vicente-Manzanares et al., 2002).

6. Glykohistochemie

6.1 Definition des Begriffes „Lektin“

Der Begriff „Lektin“ wurde 1954 von Boyd und Shapleigh eingeführt und entstammt dem lateinischen Wort „legere“ für auswählen. Der Terminus umfasste zu diesem Zeitpunkt Substanzen aus bestimmten Pflanzen mit der Fähigkeit, Erythrozyten zu agglutinieren und die sich somit wie Antikörper verhalten. Zudem wurde zu dieser Zeit herausgefunden, dass es sich bei den Lektinen um blutgruppenspezifische Präzipitine handelt (Boyd und Shapleigh, 1954). Bald wurden lektinähnliche Substanzen aber nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Bakterien, Pilzen und Tieren nachgewiesen und somit definierten Goldstein et al. (1980) den Begriff „Lektin“ neu und bezeichneten ein Lektin als ein Zucker bindendes Protein oder Glykoprotein nicht-immunogenen Ursprungs, das Zellen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs agglutiniert und/oder Glykokonjugate präzipitiert. Aus dieser Definition geht hervor, dass Lektine mindestens zwei Bindungsstellen für Zucker besitzen, die Zuckerspezifität im Allgemeinen durch das die Agglutination hemmende Mono- oder Oligosaccharid bestimmt wird und andere Zucker bindende Proteine wie Enzyme, Transportproteine, Hormone oder Toxine (Ricin oder Abrin) von den Lektinen zu unterscheiden sind (Goldstein et al., 1980). Diese Definition wurde von manchen Wissenschaftlern bemängelt, da sie die agglutinierende Wirkung besonders hervorhebt. Die Definition der Lektine sollte nach deren Meinung eher auf den physikochemischen Eigenschaften der Lektine, also der Interaktion mit Kohlenhydraten, basieren. Außerdem werden mit dieser Definition solche Lektine ausgeschlossen, die nur eine Bindungsstelle besitzen und/oder die toxische oder hormonähnliche Eigenschaften aufweisen, wie im Falle von Ricin oder Abrin. Folglich sollten drei Punkte bei der Definition beachtet werden: Erstens besitzen die Lektine mindestens eine Zuckerbindungsstelle, wobei die Interaktion mit den Kohlenhydraten durch bestimmte Zucker gehemmt werden kann. Zweitens stehen die Lektine in keinem Zusammenhang mit einer Immunantwort und haben eine andere Struktur als Immunglobuline. Drittens weisen sie keine enzymatische Aktivität an den gebundenen Zuckern auf (Kocourek und Horejsi, 1981).

Eine aktuelle Definition von Gabius et al. im Jahre 2011 bezeichnet Lektine als Kohlenhydrat bindende Proteine, die keine enzymatische Aktivität an ihrem Liganden aufweisen und von Antikörpern und Sensor- bzw. Transportproteinen für freie Mono- und Oligosaccharide zu unterscheiden sind. Besitzen die Lektine eine Aktivität in Agglutinationsversuchen, werden sie auch als Agglutinine (Proteine mit der Fähigkeit, Zellen zu agglutinieren), Hämagglutinine (Proteine mit der Fähigkeit, Erythrozyten zu agglutinieren) oder Phytohämagglutinine (Proteine aus Pflanzen mit der Fähigkeit, Erythrozyten zu agglutinieren) bezeichnet (Gabius et al., 2011).

6.2 Einteilung, Struktur und Bindungseigenschaften der Pflanzen-Lektine

Die Kategorisierung der Pflanzen-Lektine erfolgt gewöhnlich anhand ihrer so genannten nominalen Zuckerspezifität. Diese Klassifizierung beruht auf den Ergebnissen von Agglutinationsversuchen mit dem Einsatz von Hemmzuckern (Monosacchariden) und gilt daher als sehr stark vereinfacht (Roth, 2011). Die Tabelle II.4 zeigt eine Einteilung ausgewählter Pflanzen-Lektine anhand ihrer Zuckerspezifität mit Aufführung ihrer botanischen Herkunft unter Berücksichtigung verschiedener Angaben in der Literatur (Goldstein und Poretz, 1986); (Rüdiger und Gabius, 2001); (Gabius et al., 2004); (Wu et al., 2008); (Rüdiger und Gabius, 2009); (Lohr et al., 2010); (Gabius, 2011); (Gabius et al., 2011); (Habermann et al., 2011).

Tabelle II.4: Einteilung ausgewählter Pflanzen-Lektine anhand ihrer Zuckerspezifität

Kategorie	Botanische Herkunft des Lektins	Abk. des Lektins
Glukose/Mannose bindende Lektine	<i>Concanavalia ensiformis</i> (Schwertbohne) <i>Lens culinaris</i> (Speiselinse) <i>Pisum sativum</i> (Erbse) <i>Vicia faba</i> (Saubohne)	ConA LCA PSA VFA
Galaktose bindende Lektine	<i>Arachis hypogaea</i> (Peanut/Erdnuss) <i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne) <i>Viscum album</i> (Mistel)	PNA RCA VAA
N-Acetyl-Galaktosamin bindende Lektine	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrik. Pferdebohne) <i>Griffonia simplicifolia I</i> (Afrik. Schwarzbohne) <i>Sophora japonica</i> (Chin. Schnurbaum)	DBA GSL-I SJA
Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin bindende Lektine	<i>Glycine max</i> (Soybean/Sojabohne) <i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	SBA SNA
N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure bindende Lektine	<i>Triticum vulgare</i> (Wheat Germ/Weizen)	WGA
L-Fukose bindende Lektine	<i>Ulex europaeus I</i> (Stechginster)	UEA-I
Oligosaccharid bindende Lektine*	<i>Maackia amurensis I</i> (Asiat. Gelbholz) <i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	MAA-I PHA-E/-L

* keine Monosaccharide als Liganden bekannt

Vor allem die Struktur der Lektine aus den Hülsenfrütlern (*Leguminosen*) ist gut erforscht (Rüdiger, 1998). Diese Lektine weisen trotz einer beachtlichen Homologie in ihrer Sequenz eine auffällig varierende Zuckerspezifität bei den verschiedenen Pflanzenspezies auf (Rüdiger, 1998);

(Rüdiger und Gabius, 2001). In einer einzelnen Pflanze können außerdem Lektine mit verschiedener Zuckerspezifität gefunden werden (Lis und Sharon, 1986). Lektine von der gleichen Pflanze mit unterschiedlicher Zuckerspezifität haben jedoch im Allgemeinen einen geringeren Verwandtschaftsgrad als solche aus verschiedenen Pflanzen mit gleicher Zuckerspezifität. Ihrer chemischen Natur nach handelt es sich bei den meisten Lektinen um Glykoproteine mit einem Kohlenhydratanteil von 2 - 50 %, ConA und WGA hingegen enthalten keine Zucker (Rüdiger, 1982). Der Kohlenhydratanteil der Glycoprotein-Lektine ist folglich nicht für deren biologische Aktivität erforderlich (Lis und Sharon, 1986). Ihre Struktur betreffend können Einketten- von Zweiketten-Lektinen unterschieden werden. Die Einketten-Lektine ConA oder PHA bestehen aus vier nahezu gleichartigen Untereinheiten. Die Zweiketten-Lektine PSA oder VFA hingegen setzen sich aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammen, nämlich einer kleineren α - und einer größeren β -Kette, die sich paarweise zu tetrameren Molekülen zusammenschließen (Rüdiger, 1981). Interessanterweise lassen sich zwischen manchen Ein- und Zweiketten-Lektinen übereinstimmende Sequenzen nachweisen (Lis und Sharon, 1986). Van Damme et al. (2008) teilen die Lektine anhand ihrer Gesamtstruktur in verschiedene Gruppen ein. Die am häufigsten vorkommenden Hololektine bestehen ausschließlich aus Zucker bindenden Domänen, wohingegen Chimerolektine zusammengesetzte Proteine darstellen und zusätzlich eine weitere Domäne enthalten, die von der Lektindomäne unabhängig ist. Besitzt ein Hololektin nur eine Zucker bindende Domäne, wird es als Merolektin bezeichnet. Superlektine stellen Hololektine mit zwei verschiedenen Zucker bindenden Domänen dar (Van Damme et al., 2008).

Viele Pflanzen-Lektine interagieren mit spezifischen Monosacchariden (Van Damme et al., 2008), wobei sie in den meisten Fällen an terminale Glykosylgruppen von Kohlenhydraten binden. Manche Lektine interagieren aber auch mit internen Zuckerresten. Die Stellung der Hydroxylgruppe an den C3- und C4-Atomen im Pyranosering der jeweiligen Zucker ist für die spezifische Lektinbindung von Bedeutung. Mannose/Glukose spezifische Lektine interagieren nicht mit Galaktose und umgekehrt, N-Acetyl-Glukosamin bindende Lektine nicht mit N-Acetyl-Galaktosamin. Mannose und Glukose werden von den gleichen Lektinen gebunden, da Veränderungen am C2-Atom von vielen Lektinen toleriert werden (Goldstein und Poretz, 1986). Die Affinität für Monosaccharide ist aber im Gegensatz zur derjenigen für komplexe Kohlenhydrate häufig viel geringer. Besonderes Augenmerk gilt der Tatsache, dass die Pflanzen-Lektine, abgesehen von einigen Ausnahmen, bevorzugt an Mono- oder Oligosaccharideinheiten komplexer N-Glykane binden (Van Damme et al., 2008). Die Wechselwirkung zwischen Lektin und Zucker erfolgt über nicht-kovalente Bindungen (Slifkin und Doyle, 1990) und ist im Vergleich zu Antigen-Antikörper-Interaktionen weitaus schwächer. Die Lektine können aber auch mit unpolaren Verbindungen, die keinen Zuckeranteil besitzen, mittels hydrophober Wechselwirkungen interagieren (Roth, 2011). ConA beispielsweise bindet, wenn auch nur

schwach, an das Pflanzenhormon β -Indolessigsäure oder Tryptophan (Rüdiger, 1998). Außerdem ist eine Bindung an anionische Gruppen über elektrostatische Wechselwirkungen möglich (Roth, 2011).

6.3 Lektinhistochemie: Definition, Technik und Anwendung

Die Lektinhistochemie dient der spezifischen Lokalisation von Kohlenhydratstrukturen in Zellen und Geweben mittels Lektinen (Brooks et al., 1997), die durch verschiedene Marker wie fluoreszierende Moleküle (z.B. FITC) oder Enzyme (z.B. alkalische Phosphatase) mikroskopisch sichtbar gemacht werden kann. Die Protokolle sind ähnlich wie bei den immunhistochemischen Methoden (siehe Kapitel 4.2), anstelle eines Primärantikörpers kommt es hier jedoch zum Einsatz eines spezifischen Lektins. Häufige Anwendung finden biotinylierte Lektine, die mit Avidin oder Streptavidin, welche wiederum mit einem Marker (z.B. Streptavidin-FITC) versehen sind, interagieren. Mit Hilfe der sogenannten Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) sind sehr sensitive Zuckernachweise möglich. Der Komplex besteht aus Avidin bzw. Streptavidin und markiertem Biotin. Drei der vier Bindungsstellen von Avidin bzw. Streptavidin für Biotin sind besetzt, eine Bindungsstelle bleibt frei für die Bindung eines biotinylierten Lektins. Zur Kontrolle sollte stets eine Vorinkubation mit einem spezifischen Hemmzucker erfolgen. Dies sollte bei der nachfolgenden Inkubation mit dem Lektin seine Bindungsstellen vollständig hemmen oder zumindest deutlich abschwächen (Romeis, 2010). Die Lektine binden, wie bereits erwähnt, spezifisch an bestimmte Mono-, Di- oder Polysaccharide (Khan et al., 2002). Sie können aber nicht nur verschiedene Zucker, sondern häufig auch α - und β - Anomere oder Oligosaccharide mit verschiedener Kettenlänge voneinander unterscheiden (Rüdiger, 1981). Aufgrund dieser Eigenschaften dienen sie als wichtiges Werkzeug bei der Erkennung, Isolierung und Charakterisierung von Glykokonjugaten (v.a. Glykoproteinen) sowie bei der histochemischen Charakterisierung von verschiedenen Zellen und Geweben (Sharon und Lis, 2004). Die Lektinhistochemie wird häufig für die Untersuchung von Kohlenhydraten auf Zelloberflächen eingesetzt, wobei vor allem Veränderungen der Zuckerstrukturen im Zuge physiologischer oder pathologischer Prozesse, die von Zelldifferenzierung bis Krebs reichen, analysiert werden (Sharon und Lis, 2004).

6.4 Anwendung der Pflanzen-Lektine in der Forschung

Die Lektine sind aufgrund ihrer Zuckerspezifität, ihrer großen Stabilität und da sie ohne negative Auswirkungen auf ihre Aktivität markiert werden können, in der Forschung zu einem wichtigen Hilfsmittel geworden. Neben dem Einsatz der Lektine in der Lektinhistochemie (siehe Kapitel

6.3), finden einige Pflanzen-Lektine Anwendung in verschiedensten Bereichen (Rüdiger und Gabius, 2009). Die Blutgruppenspezifität der Lektine war vor allem in den Anfängen der Lektinforschung von großem Interesse (Franz, 1990). Neben mono- und polyklonalen Antikörpern können hier beim Menschen beispielsweise die Lektine aus *Dolichos biflorus* (Anti-A₁), *Helix pomatia* (Anti-A) (Franz, 1990), *Vicia cracca* (Anti-A), *Griffonia simplicifolia* (Anti-B) oder *Vicia graminea* (Anti-N) als Marker für die Bestimmung der Blutgruppen eingesetzt werden (Khan et al., 2002). Die Anwendung der Lektine zur routinemäßigen Blutgruppenbestimmung hat sich jedoch nicht etabliert (Rüdiger, 1981). Großes Interesse gilt der Tatsache, dass manche Lektine die Mitose von Lymphozyten stimulieren können, wobei vor allem T-Zellen, teilweise aber auch B-Zellen betroffen sind (Rüdiger und Gabius, 2009). Beispiele für solch mitogen wirkenden Lektine sind ConA (Djilali et al., 1987); (Franz, 1990), PHA-L, LCA und VAA (Gabius et al., 2004). Diese Eigenschaft nutzte man zur genaueren Untersuchung des Immunsystems von Mensch und Tier (Rüdiger, 1982). Sowohl die mitogene Aktivität als auch die lektinvermittelte Freisetzung von Mediatoren, wie proinflammatorischer Zytokine, weisen auf ein therapeutisches Potential der Pflanzen-Lektine hin (Rüdiger und Gabius, 2009). Weiterhin werden Lektine unter anderem in der Zellbiologie, der Biochemie (Rüdiger und Gabius, 2009), der Medizin (Alroy et al., 1984); (Rüdiger und Gabius, 2009), der Histopathologie (Walker, 1985), der mikrobiellen Forschung (Slifkin und Doyle, 1990), der Krebsforschung (Aub et al., 1963); (Aub et al., 1965); (Lis und Sharon, 1986); (Franz, 1990); (Rüdiger und Gabius, 2001); (Sharon und Lis, 2004) oder auch zur Abwehr von Insekten eingesetzt (Murdock et al., 1990); (Zhu et al., 1996); (Zhu-Salzman et al., 1998); (Rüdiger und Gabius, 2001). Seit neuestem finden Lektine auch Anwendung in der Chip-Technologie (Lektin-Mikroarrays) (Tateno et al., 2009). Durch die Kombination verschiedener Lektine in einem Versuch kann ein glykanbasiertes, molekularer Fingerabdruck der einzelnen Zellen erstellt werden (Lohr et al., 2010). Der Lektin-Mikroarray ist bei der Qualitätskontrolle verschiedener Glykoprotein-Produkte (z.B. Antikörper-Medikamente) von Nutzen (Tateno et al., 2009).

6.5 Zuckerstrukturen auf ovinen Blutzellen

Die Zellmembran wird durch eine Lipiddoppelschicht aus Phospholipiden, Cholesterin und Glykolipiden gebildet, wobei die hydrophoben Anteile einander zugekehrt sind und die hydrophilen Anteile in die Extrazellulärflüssigkeit bzw. in das Zytosol ragen. Die Oberfläche der Zelle wird weitgehend von der Glykokalix bedeckt, die durch die Zuckeranteile der in der Zellmembran eingelagerten Glykoproteine und Glykolipide gebildet wird (Silbernagl und Despopoulos, 2001). Die Hauptzucker der Zellmembranen sind Galaktose, Mannose, Glukose, Fukose, Galaktosamin, Glukosamin und Sialinsäuren. Die Sialinsäuren befinden sich vor allem an

den Enden der Zuckerketten und sind folglich für die negative Ladung der Zelloberflächen bei den Eukaryoten verantwortlich (Djilali et al., 1987). Durch Unterschiede in den Verknüpfungen der Zucker, den anomerischen Positionen (α oder β), den Ringgrößen (Furanose oder Pyranose) oder durch die Ausbildung von Kettenverzweigungen zeichnet sich die Struktur der Kohlenhydrate durch eine starke Vielseitigkeit mit einer großen Kodierungskapazität aus. Dies wird als Zucker-Code bezeichnet (Gabius, 2008). Die bestimmte Strukturinformation, die sich aus der räumlichen Gestalt der baumartig verzweigten Oligosaccharidketten ergibt, kann durch spezifische Lektine erkannt werden (Lindhorst, 2000). Da die Zuckerketten insgesamt wesentliche Bauelemente verschiedenster Zellbestandteile darstellen, werden diesen fundamentale Funktionen zugeschrieben (Rüdiger und Gabius, 2001). Die biologische Rolle der Oligosaccharideinheiten von Glykoproteinen ist äußerst vielfältig. Häufig vermitteln sie die spezifische Erkennung bestimmter Strukturen und gewährleisten eine Regulierung biologischer Prozesse (Varki, 1993).

Bei den Schafen wurden vor allem die Kohlenhydrate der Erythrozytenmembran genauer erforscht. Glykoproteine stellen einen Hauptbestandteil der Erythrozytenoberfläche dar. Der Monosaccharidgehalt der Erythrozyten des Schafes liegt bei 8,36 mg/100 mg Protein. Obwohl Schafe, Rinder und Pferde qualitativ die gleichen Monosaccharide aufweisen, kann ein deutlicher Unterschied in Bezug auf den Anteil der einzelnen Zucker beobachtet werden (Hudson et al., 1975). Die Erythrozyten der Schafe tragen vor allem Galaktose und Sialinsäuren. Es kommen aber auch N-Acetyl-Galaktosamin, N-Acetyl-Glukosamin (Hudson et al., 1975); (Fletcher et al., 1978) und zu einem geringen Anteil Glukose, Mannose und Fukose vor (Hudson et al., 1975). Kusui und Takasaki (1998) berichten von einer nur äußerst geringen Fukosekonzentration auf der Erythrozytenmembran der Schafe (Kusui und Takasaki, 1998). Hamaguchi und Cleve (1972) konnten Sialinsäuren auf der Erythrozytenmembran von Schafen ebenfalls nachweisen (Hamaguchi und Cleve, 1972). Die Sialinsäuren N-Acetyl-Neuraminsäure und N-Glykol-Neuraminsäure treten dort in einem Verhältnis von 1 : 2,7 auf (Kusui und Takasaki, 1998). Die Membran der ovinen Thrombozyten besteht in etwa zu 49 % aus Proteinen, zu 47 % aus Lipiden und zu 3,4 % aus Kohlenhydraten und ist reich an Sialinsäuren, Cholesterol und Phospholipiden (Lanillo und Cabezas, 1981). Die aus amorphen Material bestehende Glykokalix ist bei den Thrombozyten der Haussäuger gut ausgebildet und mit einer Stärke von 150 - 200 nm (Jain, 1993) dicker als bei den anderen Blutzellen (White, 2007). Im Vergleich zu Schwein und Mensch ist der Kohlenhydratanteil der Thrombozytenmembran beim Schaf jedoch insgesamt geringer (Lanillo und Cabezas, 1981).

6.6 Lektinbindungsstellen auf ovinen Blutzellen

Über Lektinbindungsstellen auf ovinen Blutzellen liegen erst wenige Befunde vor. So konnte

gezeigt werden, dass die Erythrozyten und die Lymphozyten der Schafe genetisch determinierte ConA-Rezeptoren auf ihrer Membran tragen (Schmid und Cwik, 1974); (Schmid und Buschmann, 1985). Weiterhin bindet PHA an die ovinen Erythrozyten (Hamaguchi und Cleve, 1972); (Schmid, 1973); (Leca et al., 1985), genauer gesagt an den CD2 Rezeptor der roten Blutkörperchen (Leca et al., 1985). Die Bindung ist jedoch schwächer als bei Menschen und Schweinen (Hamaguchi und Cleve, 1972). PNA stellt beim Schaf einen Marker für die T-Lymphozyten dar (Fahey, 1980); (Outeridge, 1985); (Ristau et al., 1985); (Djilali et al., 1987); (Djilali und Parodi, 1987). Djilali und Parodi (1987) fanden heraus, dass die peripheren Lymphozyten im Blut von Schafen, die PNA binden, keine Immunglobuline auf der Zelloberfläche besitzen und folglich die T-Zellen repräsentieren müssen (Djilali und Parodi, 1987). Weiterhin beschreiben Ristau et al. (1985) SJA als einen Marker für die ovinen T-Zellen (Ristau et al, 1985). Die Membran der B- und T-Lymphozyten der Schafe bindet weiterhin PHA. Bei Lämmern ist dies ausgeprägter als bei adulten Tieren (Outeridge, 1985). Außerdem wurde eine Bindung von WGA an B- und T-Lymphozyten der Schafe nachgewiesen, nicht aber von DBA und UEA-I (Djilali et al., 1987).

7. Blutgruppen beim Schaf

7.1 Allgemeines zu den Blutgruppen

Unter Blutgruppen versteht man erbliche, strukturelle Eigenschaften von Blutbestandteilen, die sich aufgrund einer genetischen Vielgestaltigkeit bei verschiedenen Individuen bzw. Gruppen unterscheiden und mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können (Pschyrembel, 2002). Die Blutgruppen sind im Allgemeinen durch Antigene auf der Erythrozytenoberfläche charakterisiert (Lösch et al., 2000); (Penedo, 2000). Die antigenen Determinanten stellen vor allem Phospholipide, Glykolipide und Glykoproteine dar (Pschyrembel, 2002), wobei die serologische Spezifität durch deren Kohlenhydratanteil bestimmt wird. Die verschiedenen, speziespezifischen Antigene können verschiedenen Blutgruppensystemen zugeordnet werden. Dabei werden solche Blutgruppenantigene zu einem System zusammengefasst, die von den Allelen eines Genes oder eng verknüpften Genen kodiert werden. Die Antigene aller Blutgruppensysteme sind auf jedem einzelnen Erythrozyten vorhanden. Manche Blutgruppenantigene sind auch auf Thrombozyten, Leukozyten oder in Geweben zu finden, jedoch in weitaus geringerer Konzentration (Jain, 1993). Ein Beispiel hierfür ist das R-Antigen, das in den 70er Jahren neben den Erythrozyten auch auf Lymphozyten von Schafen nachgewiesen wurde (Schmid und Cwik, 1975). Bestimmte Blutgruppensubstanzen können auch in löslicher Form in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie dem Blutplasma, dem Speichel oder der Milch

nachgewiesen werden. Beim Schaf sind dies die R- und O-Antigene (Rasmussen, 1962); (Jain, 1993), auf die in Kapitel 7.3 noch genauer eingegangen wird.

Bezüglich der Vererbung der Blutgruppen ist die Anwesenheit eines Antigens generell dominant gegenüber seiner Abwesenheit und kodominant zu anderen Allelen des Gens (Miller, 1976). Es gibt jedoch Ausnahmen. Das O-Allel bei Schafen ist beispielsweise rezessiv gegenüber dem R-Allel, das R-Allel hingegen vererbt sich dominant (Stormont, 1951). Außerdem existiert beim Schaf als Besonderheit ein epistatisches Gen (Suppressor-Gen i) über dem R-O-Lokus (Rendel et al., 1954), auf das ebenso in Kapitel 7.3 näher eingegangen wird. Eine epistatische Wirkung dieses Gens auf den C-Lokus ist ebenfalls nicht auszuschließen (Schmid und Buschmann, 1985).

7.2 Technik

Die Technik der Blutgruppenbestimmung variiert bei den verschiedenen Spezies. Im Allgemeinen finden Hämolyse-, Agglutinations- und Antiglobulintests Anwendung. Bei Schafen stellt der Hämolysetest die Methode der Wahl dar (Jain, 1993); (Penedo, 2000), da deren Erythrozyten in der Regel nicht zur Agglutination neigen (Jain, 1993). Bei dem Hämolysetest wird ein Blutgruppenreagenz (Antiserum) mit Erythrozyten vom Schaf und Komplementfaktoren vermischt und nach einiger Zeit der Hämolysegrad (0 - 4) bestimmt. Bei negativer Reaktion bleiben die Erythrozyten intakt, bei vollständiger Hämolyse (Grad 4) sind keine Erythrozyten mehr erkennbar und die Reaktionsflüssigkeit stellt sich klar und rötlich dar. Als Quelle von Komplementfaktoren wird vorrangig das Serum von Kaninchen verwendet (Penedo, 2000). Da die Erythrozyten der Kaninchen im Gegensatz zu denjenigen der Schafe kein Forssmann-Antigen besitzen und somit das Serum der Kaninchen natürlich vorkommende Antikörper gegen dieses Antigen aufweist, müssen diese Antikörper vor dem Einsatz des Serums durch Zugabe von Erythrozyten der zu untersuchenden Spezies absorbiert werden (Stormont, 1982); (Penedo, 2000). Die Antigene des D-Systems der Schafe werden als Besonderheit mit dem Agglutinationstest ermittelt. Dieser ist im Allgemeinen wie der Hämolysetest aufgebaut, es wird jedoch kein Komplement hinzu gegeben (Penedo, 2000). Das originale D-Reagenz vermag D-positive Erythrozyten bei Abwesenheit von Komplement zu agglutinieren, bei Anwesenheit von Kaninchen-Komplement führt es jedoch zur Hämolyse dieser Zellen (Rasmussen, 1962). Die Testsera (Antisera) zur Differenzierung der Blutgruppen erhält man durch Isoimmunisierung, bei der Blut von einem Individuum auf ein anderes, gruppendifferentes Tier der gleichen Art übertragen wird. Da die Antikörperbildung nach der Erstimmunisierung meist unzureichend ist, wird eine Reimmunisierung (Boosterung) nach mindestens drei Monaten notwendig (Schmid, 1971). Neben diesen vom Schaf stammenden Isoantikörpern können aber auch Heteroantikörper aus anderen Tieren zur Herstellung von Testsera eingesetzt werden (Tucker, 1971). Mit speziell

bei der Blutgruppenerforschung der Rinder angewendeten Normal- und Isoimmunsera können aufgrund einer Homologie mancher Blutgruppensysteme von Rindern und Schafen teilweise auch die Blutgruppen der Schafe untersucht werden. Nguyen (1972) ermittelte zwölf bovine Testsera, deren Antikörper den Nachweis von zehn ovinen Blutgruppenfaktoren erlauben (Nguyen, 1972).

7.3 Blutgruppensysteme der Schafe

Laut Rasmusen (1962), Tucker (1971), Nguyen (1972), Nguyen und Ruffet (1975), Marai et al. (1992) und Penedo (2000) existieren beim Schaf sieben Blutgruppensysteme, nämlich das A-, B-, C-, D-, M-, R-, und X-System (Rasmusen, 1962); (Tucker, 1971); (Nguyen, 1972); (Nguyen und Ruffet, 1975); (Marai et al., 1992); (Penedo, 2000). Jedes Blutgruppensystem weist eine unterschiedliche Anzahl an Blutgruppenfaktoren auf, Penedo (2000) beschreibt beim Schaf insgesamt zweiundzwanzig Faktoren (Penedo, 2000). Aufgrund einer Homologie mancher Blutgruppensysteme bei Schafen und Rindern ist deren Blutgruppennomenklatur sehr ähnlich (Nguyen, 1972). Jedes einzelne System wird mit einem großen Buchstaben und die einzelnen Faktoren in dem jeweiligen System mit einem kleinen Buchstaben bezeichnet (Penedo, 2000). Trotz der gleichen Namensgebung mittels Buchstaben sind die Antigene bei den verschiedenen Tierarten nicht gleich (Jain, 1993). Die Tabelle II.5 führt eine Zusammenfassung der verschiedenen Blutgruppensysteme der Schafe mit den dazugehörigen Blutgruppenfaktoren, der Zahl der Allele und der Zahl der Phänogruppen aus den verschiedenen Angaben in der Literatur (Rasmusen, 1962); (Tucker, 1971); (Nguyen, 1972); (Nguyen und Ruffet, 1975); (Schmid und Buschmann, 1985); (Marai et al., 1992); (Penedo, 2000) auf.

Tabelle II.5: Blutgruppensysteme der Schafe

System	Faktoren	Zahl der Allele	Zahl der Phänogruppen
A-System	a, b	3	4
B-System	a, b, c, d, e, f, g, h, i	> 50	117
C-System	a, b	4	3
D-System	a, b	2	2
M-System	a, b, c	4	6
R-System (R-O)	R, O	2	3
X-System (X-Z)	X, Z	2	3

Das B-, C-, M- und R-System der Schafe scheint je homolog zu dem B-, C-, S- bzw. J-System der Rinder zu sein (Rasmusen, 1962); (Nguyen, 1972). Die B- und C-Systeme sind sehr komplex und variabel, da diese viele Allele umfassen (Nguyen, 1972); (Penedo, 2000). Das B-System stellt jedoch das komplexeste aller Systeme dar (Nguyen und Ruffet, 1975). Schmid und Buschmann

(1985) konnten im B-System der Schafe hundertsiebzehn verschiedene Phänogruppen als charakteristische Erbeinheiten nachweisen, die unter der Kontrolle von über fünfzig verschiedenen Allelen stehen (Schmid und Buschmann, 1985). Als Phänogruppen werden unteilbare, geschlossen vererbte Kombinationen der Blutgruppenfaktoren bezeichnet (Schmid, 1971). Bei den Schafen sind die Gene, welche die Antigene des C-Systems kontrollieren, sehr wahrscheinlich mit dem I Lokus, auf den bei dem R-O-System näher eingegangen wird, eng verknüpft. Auch mit dem Tr Lokus, der für die Kontrolle des Aminosäuretransports der Erythrozyten eine Rolle spielt, besteht für diese Gene eine enge Verbindung. Es kann somit angenommen werden, dass sich die Gene der Tr, I und C Loki auf dem selben Chromosom befinden (Nguyen, 1985).

Das natürlich am häufigsten vorkommende Blutgruppensystem der Schafe ist das R-O-System (Greenwood, 1977). Die löslichen R- und O-Antigene werden in den Geweben produziert und in das Blutplasma abgegeben, um schließlich von den Erythrozyten in der Zirkulation aufgenommen zu werden. Im Serum der Schafe befinden sich natürlich vorkommende R- oder O-Antikörper (Alloantikörper), jedoch nur in niedriger Konzentration (Jain, 1993). Das R-O-System wird im Gegensatz zu den „immunologischen Blutgruppensystemen“ aufgrund des Vorkommens dieser natürlichen Antikörper auch als „natürliches Blutgruppensystem“ bezeichnet (Tucker, 1971); (Marai et al., 1992). Zellen der R-Gruppe werden durch Anti-R Serum lysiert, solche der O-Gruppe durch Anti-O Serum. Zellen, die hingegen keiner Lyse durch diese Antisera unterliegen, werden der i-Gruppe zugeordnet. Anti-R tritt im Serum der Schafe mit Blutgruppe O auf. Aber auch bei manchen Schafen mit der Blutgruppe i kommt Anti-R vor. Anti-O hingegen ist bei Schafen der Blutgruppe i sehr selten vorzufinden (Greenwood, 1977). Das Gen für die R-Gruppe ist dominant gegenüber dem Gen für die O-Gruppe (Rendel et al., 1954); (Greenwood, 1977); (Penedo, 2000), die Blutgruppe O ist somit rezessiv gegenüber der Blutgruppe R (Stormont, 1951). Daraus ergibt sich, dass heterozygote Individuen (R/O) serologisch nicht von homozygoten Tieren der R-Gruppe (R/R) unterscheidbar sind (Greenwood, 1977). Die Expression sowohl des R- als auch des O-Antigens wird, wie bereits in Kapitel 7.1 erwähnt, bei den Schafen durch das Gen I kontrolliert (Penedo, 2000). Schafe mit dem Genotyp i/i (homozygot rezessiv) besitzen weder R- noch O-Antigene (Rendel et al., 1964); (Nguyen, 1985); (Penedo, 2000). Das Suppressor-Gen i ist epistatisch gegenüber den R- und O-Genen und verhindert sehr wahrscheinlich die Sekretion von R- und O-Antigenen in das Serum (Rendel et al., 1954). Nur bei Vorhandensein des I-Allels, das dominant gegenüber dem rezessiven Suppressor-Gen i ist, sind R- oder O-Antigene im Plasma und auf den Blutzellen zu finden (Rendel et al., 1954). Die Erythrozyten von neugeborenen Schafen besitzen weder R- noch O-Substanzen (Rendel et al., 1954); (Rasmussen, 1962); (Greenwood, 1977), im Serum können sie jedoch durch Inhibitionstests nachgewiesen werden (Rasmussen, 1962). Das R-Antigen erscheint durchschnittlich 16,4, das O-

Antigen erst ca. 28,4 Tage nach der Geburt auf den roten Blutkörperchen (Rasmussen, 1962).

7.4 Bedeutung der Blutgruppenbestimmung beim Schaf

Die Blutgruppen spielen eine wesentliche Rolle als Marker für die Vererbung bestimmter biochemischer und physiologischer Merkmale (Marai et al., 1992); (Jain, 1993). Das M-System hat Einfluss auf den Kaliumgehalt der Erythrozyten beim Schaf, da Mb vermutlich den aktiven Kaliumtransport in die Zelle hemmt (Schmid und Buschmann, 1985); (Penedo, 2000). Zellen mit hoher Kaliumkonzentration (HK) sind demnach immer Mb-negativ (Penedo, 2000), solche mit niedriger Kaliumkonzentration (LK) immer Mb-positiv (Schmid und Buschmann, 1985); (Penedo, 2000). LK-Zellen können entweder heterozygot oder homozygot sein. Da homozygote Lämmer (Mb x Mb) mit niedriger Kaliumkonzentration eine höhere Überlebenschance haben als heterozygote Lämmer, kann dem Polymorphismus im M-System der Schafe eine erhebliche wirtschaftliche Bedeutung zugeschrieben werden (Schmid und Buschmann, 1985). Weiterhin spielt der Nachweis einer durch Blutgruppen markierbaren Mono- bzw. Heterozygotie eine bedeutende Rolle, da Lämmer, die in mindestens einem der sieben Blutgruppensysteme heterozygot sind, ein höheres Gewicht beim Absetzen aufweisen als homozygote Tiere. Zudem scheint ein Zusammenhang zwischen einer Heterozygotie und der erwünschten Ausbildung der Lämmer zum Fleischtyp zu bestehen (Stansfield et al., 1964). Beim Schaf steht das C-System, wie bereits in Kapitel 7.3 erwähnt, in direktem Zusammenhang mit dem Aminosäuretransport der roten Blutkörperchen. Erythrozyten mit einem ungestörten Transport sind entweder Cb-positiv oder Cb-negativ, solche mit einem fehlerhaften Transport sind jedoch nie Cb-negativ (Tucker et al., 1980). Durch Störung des Cysteintransports kommt es zu einem Abfall der Glutathionkonzentration in der Zelle, was eine verminderte Überlebenszeit der Erythrozyten zur Folge hat (Schmid und Buschmann, 1985). Die Erythrozyten der Schafe mit dem O-Antigen produzieren die alkalische Phosphatase B, wohingegen solche mit dem R-Antigen die alkalische Phosphatase A in das Serum freisetzen (Rendel et al., 1964). Dies ist ein Beispiel für die Kopplung einer für den Stoffwechsel wichtigen Enzymaktivität und einem Blutgruppenmerkmal, wodurch sich möglicherweise Wege zur Leistungsverbesserung in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung ergeben können (Schmid und Buschmann, 1985). Zudem existiert ein nennenswerter Einfluss der Blutgruppen-Genotypen auf die genetischen Merkmale der Wolle wie Faserlänge, Faserdurchmesser, Stapellänge oder Kräuselung. Das Wissen über die Beziehung zwischen der Blutgruppe und den für die Wollqualität- und quantität verantwortlichen Charakteristiken ist für die Wollproduktion von großem Nutzen (Marai et al., 1992).

Da jedes einzelne Schaf, abgesehen von eineiigen Zwillingen, über seine eigene,

individualspezifische Blutgruppenstruktur verfügt, stellt die Blutgruppenformel die zuverlässigste Identitätssicherung dar und ist in ihrer Bedeutung mit dem Fingerabdruck des Menschen vergleichbar. Die Blutgruppenuntersuchung erweist sich außerdem als ein äußerst sicheres Verfahren zum Nachweis der Abstammung eines Schafes und kommt neben der Abstammungskontrolle von Zuchttieren auch nach künstlichen Besamungen für die Klärung strittiger Abkommen zum Einsatz. Bei Lämmern kann bereits in den ersten Tagen nach der Geburt die Vaterschaft oder Mutterschaft bestätigt oder ausgeschlossen werden, da die Mehrzahl der Blutgruppenfaktoren nicht rezessiv sondern dominant vererbt werden und somit ein Lamm nur solche Blutgruppen besitzen kann, die bei einem oder beiden Elternteilen nachweisbar sind (Schmid und Buschmann, 1985). Fehlt mindestens eine Blutgruppe in Mutter und Vater, kann die Elternschaft ausgeschlossen werden (Bouw, 1977).

Weiterhin kann die Blutgruppenbestimmung der Voraussage der zu erwartenden Fruchtbarkeit weiblicher Tiere aus verschiedengeschlechtlichen Mehrlingsgeburten dienen. Durch eine Ausbildung von Blutgefäßanastomosen der Mehrlinge während der Fetalzeit kommt es zu einem Austausch von Blutstammzellen, wodurch derartige Chimärenzwillige zeitlebens zwei verschiedene Blutzellpopulationen (Blutzellchimärismus) mit unterschiedlicher Antigenstruktur ausbilden, die blutgruppenserologisch nachgewiesen werden können. Bei verschiedengeschlechtlichen Zwillingen ist der weibliche Zwillingsspartner aufgrund einer Verkümmерung des Müller'schen Gangsystems steril, Zwicken sind beim Schaf jedoch im Gegensatz zu Rindern sehr selten (Schmid und Buschmann, 1985). Nach Einschätzung von Stormont et al. (1953) kommt es bei ca. 5 % der Schafszwillinge zu einer plazentären Anastomose der Blutgefäße, wobei Schafe mit dem sogenannten Freemartin-Syndrom in weit weniger als 0,8 % auftreten (Stormont et al., 1953).

Die Bedeutung der Blutgruppen bei der Bluttransfusion hat bei den Tieren einen geringeren Stellenwert als beim Menschen (Bouw, 1977). Angesichts der vielen verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Blutgruppenfaktoren ist es sehr unwahrscheinlich, einen gruppengleichen Spender zu finden. Außerdem ist bei den Haustieren im Gegensatz zu den Menschen eine Gruppenungleichheit des Blutes nicht mit einer Unverträglichkeit gleichzusetzen (Schmid und Buschmann, 1985). Bei Schafen kann aufgrund der Blutgruppenvielfalt eine erstmalige Bluttransfusion in der Regel ohne vorherige Tests durchgeführt werden. Bei einer zweiten Transfusion sollten jedoch Kreuzproben erfolgen, bei denen sowohl das Serum des Empfängers auf Antikörper gegen die Erythrozyten des Spenders als auch das Serum des Spenders auf Antikörper gegen die Erythrozyten des Empfängers getestet werden (Penedo, 2000).

III Material und Methoden

1. Untersuchungsmaterial

Für meine Arbeit wurde Blut von insgesamt vierzig Schafen verwendet. Die Blutproben stammen von fünfunddreißig weiblichen und fünf männlichen Tieren unterschiedlichen Alters (vgl. Tab. III.1). Die Schafe wurden von der Klinik für Gynäkologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München gehalten. Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis mit Hilfe eines sterilen Vakutainer Systems der Firma Synlab.vet Augsburg. Von jedem Tier wurden 4 ml Blut in zwei verschiedenen EDTA-Röhrchen gesammelt. Die Firma Synlab.vet Augsburg erstellte von allen Tieren ein kleines Blutbild und ein Differentialblutbild.

Von jedem Schaf wurden ungefähr fünfzig Blautausstriche auf SuperFrost® Objektträgern angefertigt. Ein Teil der Blautausstriche wurde für bestimmte Untersuchungen 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixiert. Die Aufbewahrung der Blautausstriche erfolgte nach Lufttrocknung in lichtdicht abgeschlossenen Kassetten bei Kühlschranktemperatur. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde Serum-Blut entnommen und schnellstmöglich zentrifugiert. Für die enzymhistochemischen Untersuchungen wurde frisch entnommenes Blut von zehn Tieren ohne Zugabe eines Antikoagulans direkt nach der Blutentnahme auf SuperFrost® Objektträger ausgestrichen und die Färbungen innerhalb von 48 Stunden durchgeführt. Die Tabelle III.1 zeigt eine Zusammenstellung der untersuchten Schafe mit Angaben zu Rasse, Alter und Geschlecht.

Tabelle III.1: Übersicht über die für die Doktorarbeit herangezogenen Schafe

Identifikation	Nummer	Rasse	Alter	Geschlecht
64 blau	1	Weißen Bergschaf	4 Jahre	weiblich
14 weiß	2	Weißen Bergschaf	6 Jahre	weiblich
61 weiß	3	Weißen Bergschaf	5 Jahre	weiblich
9 weiß	4	Weißen Bergschaf	5 Jahre	weiblich
80 blau	5	Weißen Bergschaf	3,5 Jahre	weiblich
95 blau	6	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
109 blau	7	Brillenschaf	2 Jahre	weiblich
81 blau	8	Brillenschaf	3,5 Jahre	weiblich
72 blau	9	Weißen Bergschaf	3,5 Jahre	weiblich
91 blau	10	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
111 blau	11	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
16 blau	12	Weißen Bergschaf	6 Jahre	weiblich
97 blau	13	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
87 blau	14	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
54 weiß	15	Weißen Bergschaf	6 Jahre	weiblich
19 weiß	16	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
131 blau	17	Brillenschaf	3 Jahre	weiblich
88 blau	18	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
21 weiß	19	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
120 blau	20	Weißen Bergschaf	1 Jahr	weiblich
143 blau	21	Weißen Bergschaf	1 Jahr	weiblich
125 blau	22	Weißen Bergschaf	1 Jahr	weiblich
119 blau	23	Weißen Bergschaf	1,5 Jahre	weiblich
121 blau	24	Weißen Bergschaf	1,5 Jahre	weiblich
126 blau	25	Weißen Bergschaf	1 Jahr	weiblich
960 rot	26	Weißen Bergschaf	7 Jahre	männlich
30 blau	27	Weißen Bergschaf	5 Jahre	männlich
77 gelb	28	Weißen Bergschaf	6 Jahre	männlich
33 weiß	29	Weißen Bergschaf	5 Jahre	männlich
76702	30	Weißen Bergschaf	4 Jahre	männlich
143 blau	31	Weißen Bergschaf	2 Jahre	weiblich
50 weiß	32	Weißen Bergschaf	2 Jahre	weiblich
9 weiß	33	Weißen Bergschaf	5 Jahre	weiblich
2 weiß	34	Weißen Bergschaf	6 Jahre	weiblich
154 blau	35	Weißen Bergschaf	1 Jahr	weiblich
47 weiß	36	Weißen Bergschaf	1,5 Jahre	weiblich
155 blau	37	Weißen Bergschaf	1 Jahr	weiblich
29 weiß	38	Weißen Bergschaf	3 Jahre	weiblich
49 weiß	39	Weißen Bergschaf	2 Jahre	weiblich
89 blau	40	Weißen Bergschaf	3,5 Jahre	weiblich

2. Lichtmikroskopie

2.1 Übersichtsfärbungen

Die Blutausstriche wurden für eine exakte Differenzierung der einzelnen Zelltypen sechs verschiedenen lichtmikroskopischen Übersichtsfärbungen unterzogen.

2.1.1 Diff-Quick-Färbung

Bei dieser Färbung handelt es sich um eine Schnellfärbemethode, die aus drei gebrauchsfertig gelieferten Reagenzien (Labor+Technik, Berlin) besteht. Sie setzt sich aus einer Fixierlösung, einem Xanthen-Farbstoff (Färbelösung 1) und einem Thiazin-Farbstoff (Färbelösung 2) zusammen und dient in erster Linie der raschen Differenzierung der einzelnen Leukozyten.

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche für 5 Sekunden in die Fixierlösung tauchen und abtropfen lassen.
2. Ausstriche für 5 Sekunden in die Färbelösung 1 tauchen und abtropfen lassen.
3. Ausstriche für 5 Sekunden in die Färbelösung 2 tauchen und abtropfen lassen.
4. Ausstriche mit demineralisiertem Wasser spülen.
5. Ausstriche abtropfen und lufttrocknen lassen.
6. Ausstriche mit Eukitt® (Sigma, Steinheim) eindecken.

Färbeergebnis:

Die Zellkerne der Lymphozyten, der Monozyten und der Granulozyten sind dunkelblau bis dunkelviolettfarbt. Die Granula der neutrophilen Granulozyten färben sich rosa bis violett, die der eosinophilen Granulozyten orange bis rot und die der basophilen Granulozyten dunkelviolettfarbt bis schwarz. Das Zytoplasma nimmt bei den Lymphozyten eine hellviolette, bei den Monozyten eher eine hellblaue Farbe an. Die Erythrozyten stellen sich rot und die Thrombozyten violett dar.

2.1.2 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung stellt eine einfache Differentialfärbemethode für zytologische Präparate dar. Die Färbelösung enthält die Farbstoffe Azur A und Azur B, Methylenblau und Eosin. Die basischen Farbstoffe bilden mit dem Eosin Salze, nämlich Azur-A-Eosinat, Azur-B-Eosinat und Methylenblau-Eosinat, die den Romynowsky-Giemsa-Effekt, also die typische rötlich-violette

Anfärbung des Zellkernchromatins, bewirken. Zur optimalen Lösung der Farbstoffe kommt Methanol als Lösungsmittel und Glyzerin als Stabilisator zum Einsatz (Romeis, 2010). Zur Färbung werden gebrauchsfertige, konzentrierte Stammlösungen verwendet. Die Färbelösung sollte vor der Verwendung möglichst filtriert werden, da Verunreinigungen den Färbevorgang durch Auskristallisation und somit Niederschlagsbildung auf den Präparaten stören (Stobbe, 1970).

Herstellung der Färbelösung:

Die konzentrierte Giemsa-Stammlösung (Merck, Darmstadt) wird im Verhältnis von 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und lufttrocknen lassen.
2. Einstellen der Objektträger in verdünnte Giemsa-Lösung für 30 - 45 Minuten.
3. Abgießen der Färbelösung und Spülen mit demineralisiertem Wasser.
4. Abtropfen und lufttrocknen lassen.
5. Objektträger mit Eukitt® (Sigma, Steinheim) eindecken.

Färbeergebnis:

Einwandfrei gefärbte Ausstriche sollten eine rosa Färbung aufweisen (Stobbe, 1970). Ein zu hoher pH-Wert bei der Färbung führt zu einem Blaustich, ein zu niedriger zu einem Rotstich (Romeis, 2010). Die Zellkerne nehmen bei optimalem pH-Wert eine rot-violette Farbe an (Romanowsky-Giemsa-Effekt). Die Granula der neutrophilen Granulozyten erscheinen rötlich-violett, die der eosinophilen Granulozyten rötlich-braun und die der basophilen Granulozyten blau. Das Zytoplasma der Lymphozyten und der Monozyten stellt sich blau dar und schließt bei manchen Zellen feine Azurkörnchen ein. Die Erythrozyten färben sich blassrötlich (bei steigendem pH-Wert bläulich) und die Thrombozyten blau mit violettem Innenkörper (Romeis, 1989).

2.1.3 Färbung nach May-Grünwald

Die Färbetechnik nach May-Grünwald stellt ebenfalls eine einfache Differentialfärbung mit eosinsaurem Methylenblau dar. Der basische Farbstoff Methylenblau bildet mit Eosin ein Salz, das Methylenblau-Eosinat. Zur Herstellung der Färbelösung wird Methanol angewendet, da Methylenblau und Methyleneosinat schlecht wasserlöslich sind. Eine kommerziell erhältliche Farbstofflösung standardisiert die Ergebnisse und ist generell vorzuziehen (Romeis, 2010). Bei

älteren Ausstrichen ist eine vorherige Fixierung ratsam (Romeis, 1989).

Durchführung der Färbung:

1. May-Grünwald-Lösung (Merck, Darmstadt) auf Objektträger tropfen und 3 - 5 Minuten färben.
2. Verdünnen der Farbstofflösung durch Auftröpfen der gleichen Menge an destilliertem Wasser und weitere 5 - 10 Minuten färben (erst hier findet die eigentliche Anfärbung statt).
3. Abgießen der Färbelösung und Spülen mit demineralisiertem Wasser.
4. Abtropfen und luftröcknen lassen.
5. Objektträger mit Eukitt® (Sigma, Steinheim) eindecken.

Färbeergebnis:

Die Zellkerne färben sich mit dieser Methode blau-violett. Das Zytoplasma von Lymphozyten und Monozyten nimmt eine blaue Farbe an, wobei Azurkörnchen enthalten sein können. Die Granula der neutrophilen Granulozyten färben sich hellviolettt bis rötlich, die der eosinophilen Granulozyten ziegelrot und die der basophilen Granulozyten kräftig blau-violett. Die Erythrozyten nehmen eine rötliche Farbe an und die Thrombozyten erscheinen violett (Romeis, 2010).

2.1.4 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Diese Färbetechnik stellt eine Kombination der Giemsa- mit der May-Grünwald-Färbung dar und ist eine sehr wichtige Färbung in der Zytodiagnostik. Die basische Komponente stellt Methylenblau, die saure Komponente Eosin dar.

Herstellung der Färbelösungen:

Die May-Grünwald-Stammlösung (Merck, Darmstadt) wird im Verhältnis von 1:2, die Giemsa-Stammlösung (Merck, Darmstadt) im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und luftröcknen lassen.
2. Ausstriche mit May-Grünwald-Gebrauchslösung überschichten und 5 - 8 Minuten färben.
3. Abgießen der Färbelösung.
4. Ausstriche mit Giemsa-Gebrauchslösung überschichten und 10 Minuten färben.
5. Spülen mit demineralisiertem Wasser.

6. Abtropfen und lufttrocknen lassen.
7. Objektträger mit Eukitt® (Sigma, Steinheim) eindecken.

Färbeergebnis:

Die Zellkerne nehmen mit dieser Methode eine rötlich-violette bis blaue Farbe an. Das Zytoplasma der Lymphozyten erscheint hellblau, das der Monozyten eher grau-blau (Romeis, 2010) und das der neutrophilen Granulozyten zartrosa (Stobbe, 1970). Lymphozyten und Monozyten können zudem Azurkörnchen enthalten (Romeis, 1989). Die Granula der neutrophilen Granulozyten färben sich hellviolett, die der eosinophilen Granulozyten ziegelrot bis orange und die der basophilen Granulozyten dunkelviolett. Die roten Blutkörperchen erscheinen rosa (Romeis, 2010). Die Thrombozyten zeigen sich bläulich mit rötlichen Granula (Stobbe, 1970).

2.1.5 Sirius Red-Färbung

Durch diese Färbung können gezielt eosinophile Granulozyten dargestellt werden. Die eosinophilen Granula färben sich intensiv rot an.

Herstellung der Färbelösung:

500 mg Sirius Red (Reactifs Ral, Martillac) werden in 45 ml bidestilliertem Wasser und 50 ml Ethanol absolut (Merck, Darmstadt) gelöst. Anschließend werden 1 ml 1 %ige NaOH-Lösung und 4 ml 20 %ige NaCl-Lösung hinzu gegeben. Die Lösung wird vor Verwendung filtriert. Sie ist bei Raumtemperatur ungefähr zwei Monate haltbar.

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und lufttrocknen lassen.
2. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 10 Minuten.
3. Spülen für 15 Minuten in fließendem Leitungswasser („Bläuen“).
4. Einstellen in Sirius-Red-Färbelösung für 60 Minuten.
5. Kurzes Spülen mit demineralisiertem Wasser.
6. Abtropfen und lufttrocknen lassen.
7. Objektträger mit Eukitt® (Sigma, Steinheim) eindecken.

Färbeergebnis:

Die Granula der neutrophilen Granulozyten färben sich in einem zarten Rot an, diejenigen der

eosinophilen Granulozyten in einem kräftigen, intensiven Rot. Das Zytoplasma der Lymphozyten und Monozyten stellt sich grau-blau dar. Die Zellkerne sind blau gefärbt.

2.1.6 Toluidinblau-Färbung nach Undritz

Diese Färbung dient der gezielten Darstellung basophiler Granulozyten (Freund, 2008), die durch den Mukopolysaccharidgehalt ihrer Spezialgranula metachromatische Eigenschaften besitzen und sich somit deutlich von den eosinophilen und neutrophilen Granulozyten unterscheiden (Stobbe, 1970). Die metachromatische Granulation findet bei saurem pH-Wert statt, nicht jedoch bei neutraler Umgebung (Raskin und Valenciano, 2000); (Scott und Stockham, 2000). Eine metachromatische Färbung bezeichnet generell die Färbung einer Struktur in einen anderen Farbton als den der Farbstofflösung, wobei besonders Thiazinfarbstoffe zur Darstellung der Metachromasie geeignet sind (Parwaresch und Lennert, 1969). Saure Schleimsubstanzen färben sich mit dem blauen Farbstoff Toluidinblau O somit nicht blau (orthochromatisch), sondern rot-violett (metachromatisch) an (Romeis, 2010).

Herstellung der Färbelösung:

1g Toluidinblau (Roth, Karlsruhe) werden in 100 ml Methanol (Merck, Darmstadt) gelöst. Die Lösung ist unbegrenzt haltbar (Stobbe, 1970); (Freund, 2008).

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und lufttrocknen lassen.
2. Ausstriche 5 Minuten in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) waschen.
3. Einstellen in Toluidinblau-Färbelösung für 15 Minuten.
4. Kurzes Spülen mit demineralisiertem Wasser.
5. Abtropfen und lufttrocknen lassen.
6. Objektträger mit Eukitt® (Sigma, Steinheim) eindecken.

Färbeergebnis:

Aufgrund der Reaktion von Toluidinblau mit den sauren Mukopolysacchariden entsteht ein metachromatischer Komplex (Raskin und Valenciano, 2000). Die Granula der basophilen Granulozyten nehmen dadurch eine leuchtend rot-violette Farbe an, alle anderen Zellen stellen sich grau-blau dar (Stobbe, 1970).

2.2 Substrathistochemische Färbungen

2.2.1 Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

Die PAS-Reaktion stellt eine weit verbreitete Spezialfärbung zum Nachweis von Kohlenhydraten bzw. kohlenhydrathaltigen Strukturen und Substanzen dar (Romeis, 2010). Bei dieser Technik werden freie Hydroxylgruppen benachbarter C-Atome von Polysacchariden mittels Perjodsäure durch Spaltung der C-C-Bindung zu Aldehyden oxidiert, die mit dem Schiffschen Reagens (fuchinschwefelige Säure) sichtbar gemacht werden (Stobbe, 1970); (Sinowitz, 2006b). Durch Reaktion der Aldehyde mit dem Sulfit des Schiffschen Reagens wird Fuchsin frei, das zu einer roten Anfärbung führt (Romeis, 2010). Diese Reaktion dient somit dem Nachweis von Polysacchariden (Glykogen), Glykoproteinen ohne Carboxyl- und Sulfatgruppen, neutralen Glykoproteinen und zum Teil sauren Mukopolysacchariden, die reich an Hydroxylgruppen sind (Romeis, 2010).

Herstellung der 0,5 %igen wässrigen Perjodsäure-Lösung (immer frisch ansetzen):

1g Perjodsäure (Merck, Darmstadt) werden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst.

Herstellung des Sulfit/SO₂-Wassers (immer frisch ansetzen):

30 ml 1 N Salzsäure-Lösung (Roth, Karlsruhe) werden mit 30 ml 10 %iger Natriumdisulfit-Lösung und 600 ml Leitungswasser vermischt.

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und lufttrocknen lassen.
2. Einstellen in 0,5 %ige wässrige Perjodsäure-Lösung unter Lichtabschluss für 5 Minuten.
3. Spülen mit Leitungswasser.
4. Einstellen in Schiffsches Reagenz (Roth, Karlsruhe) unter Lichtabschluss für 15 Minuten.
5. Zweimaliges Spülen in Sulfit/SO₂-Wasser für je 2 Minuten.
6. Spülen mit Leitungswasser.
7. Kernfärbung durch Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 5 Minuten.
8. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 5 Minuten.
9. Abtropfen und lufttrocknen lassen.
10. Objektträger mit Eukitt® (Sigma, Steinheim) eindecken.

Färbeergebnis:

Strukturen mit einer PAS-postiven Reaktion nehmen eine rosa bis violette Farbe an (Romeis, 1989), wobei das Reaktionsprodukt eine fokale, diffuse oder granuläre Erscheinung aufweisen kann (Raskin und Valenciano, 2000). Die Zellkerne färben sich blau an (Romeis, 2010).

2.2.2 Alcianblau-Färbung

Diese Färbung wird ebenfalls zum Nachweis von Kohlenhydraten verwendet und kann gut mit der PAS-Reaktion kombiniert werden. Alcianblau 8 GX ist ein wasserlöslicher Phthalocyanin-Farbstoff und dient der selektiven Färbung von Mukosubstanzen, wobei zwischen sauren Mukopolysacchariden mit Carboxyl- oder Sulfatgruppen unterschieden werden kann. Carboxylgruppenreiche Mukosubstanzen werden bei einem pH-Wert von 2,5 nachgewiesen, sulfatierte Muzine hingegen bei einem pH-Wert von 1,0. Ein Vergleich beider Methoden ist stets sinnvoll (Romeis, 2010).

Herstellung der Alcianblau-Färbelösungen:

- *Alcianblau-Färbelösung pH 2,5:* 5 g Alcianblau 8 GX Certistain® (Merck, Darmstadt) werden unter Rühren in 500 ml einer 3 %igen Essigsäure-Lösung gelöst.
- *Alcianblau-Färbelösung pH 1,0:* 5 g Alcianblau 8 GX Certistain® (Merck, Darmstadt) werden in 500 ml 0,1 N Salzsäure (Roth, Karlsruhe) gelöst.

Herstellung der Kernechtrotlösung:

5g Aluminiumsulfat (Merck, Darmstadt) werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Erhitzen der Lösung werden 0,1 g Kernechtrot Certistain® (Merck, Darmstadt) bis zur Lösung des Farbstoffes eingerührt. Nach Erkalten wird die Lösung zuletzt filtriert.

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und lufetrocknen lassen.
2. Einstellen in Alcianblau-Lösung für 5 Minuten.
3. Spülen in fließendem Leitungswasser für 3 Minuten.
4. Kurzes Spülen mit demineralisiertem Wasser.
5. Einstellen in Kernechtrot-Lösung für 10 Minuten.
6. Spülen in fließendem Leitungswasser für 3 Minuten.

7. Kurzes Spülen mit demineralisiertem Wasser.
8. Abtropfen und lufttrocknen lassen.
9. Objektträger mit Eukitt® (Sigma, Steinheim) eindecken.

Färbeergebnis:

Saure und sulfatierte Mukosubstanzen färben sich leuchtend blau an. Die Zellkerne werden durch Alcianblau nicht angefärbt, die Gegenfärbung mit Kernechtrot färbt diese rosa und den Hintergrund zartrosa (Romeis, 1989).

2.3 Enzymhistochemische Färbungen

Insgesamt wurden sieben Enzymfärbungen bei Blautausstrichen von je fünf weiblichen und fünf männlichen Tieren durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden frische, native Blautausstriche verwendet. Es wurden keine Antikoagulantien (z.B. EDTA) eingesetzt, da diese zu einer deutlichen Abschwächung mancher Enzymaktivitäten führen können. Das Blut wurde deshalb direkt nach der Entnahme aus der Vena jugularis auf die Objektträger aufgetropft und ausgestrichen. Die Präparate wurden in den ersten 48 Stunden nach der Blutabnahme bearbeitet.

2.3.1 Nachweis der sauren Phosphatase

Die saure Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphomonoestern bei niedrigem pH-Wert. Bei der hier angewendeten Azokupplungsreaktion wird aus Naphthol AS-OL Phosphorsäure Naphthol-AS-BI freigesetzt, das mit Pararosanilin zu einem in der Zelle ausfallenden Azofarbstoff gekuppelt wird.

Herstellung der Färbelösung:

Zuerst werden 2 ml Naphthol AS-OL Phosphorsäure (Merck, Darmstadt) und 0,8 g Natriumazetat (Merck, Darmstadt) nacheinander in 60 ml destilliertem Wasser gelöst. Dann werden 5 Tropfen Pararosanilin-HCl-Lösung (2N) (Merck, Darmstadt) mit 5 Tropfen Nitrit-Lösung (Merck, Darmstadt) in einem kleinen Reagenzglas gemischt und nach 1 Minute dem ersten Ansatz hinzugegeben. Diese Färbemischung wird vor Verwendung in eine Färbeküvette filtriert. Die Färbelösung ist zwar maximal 3,5 Stunden stabil, die Färbung sollte jedoch innerhalb der ersten 15 Minuten nach der Herstellung erfolgen.

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Blutausstriche in Leucognost® Fixiergemisch (Merck, Darmstadt) für 1 - 3 Minuten.
2. Abspülen mit destilliertem Wasser.
3. Einstellen in frisch angesetzte Färbelösung für 2,5 Stunden unter Lichtabschluss.
4. Abspülen mit destilliertem Wasser.
5. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 15 Minuten.
6. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 2 Minuten.
7. Ausstriche lufttrocknen lassen.
8. Eindecken mit Aquatex® (Merck, Darmstadt).

An Stellen der Enzymaktivität zeigt sich ein rotes bzw. rot-braunes Reaktionsprodukt. Die Zellkerne stellen sich blau dar.

2.3.2 Nachweis der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphomonoestern bei hohem pH-Wert. Bei dieser Azokupplungsreaktion wird aus 1-Naphthylphosphat 1-Naphthol freigesetzt, das mit dem Diazoniumsalz an Stellen der Enzymaktivität ein unlösliches Produkt bildet.

Herstellung der Färbelösung:

Lösung A wird hergestellt, indem 1,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt) in 100 ml destilliertem Wasser gelöst werden. Durch Mischen von 15 ml 1-Naphthylphosphat-Natriumsalz (Merck, Darmstadt) und 15 ml der Lösung A in einer Färbeküvette entsteht Lösung B. Lösung C entsteht durch Mischen von 68 mg Variamin®-Blausalz B (Merck, Darmstadt) und 45 ml der Lösung A. Danach wird 2 Minuten kräftig geschüttelt und die Reagenzlösung C in die Färbeküvette zu Lösung B filtriert. Beide Lösungen werden zuletzt gut gemischt. Die Färbelösung ist maximal 1,5 Stunden stabil.

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Blutausstriche in Leucognost® Fixiergemisch (Merck, Darmstadt) für 1 - 3 Minuten.
2. Abspülen mit destilliertem Wasser.

3. Ausstriche lufttrocknen lassen.
4. Einstellen in frisch angesetzte Färbelösung für 10 - 15 Minuten.
5. Abspülen mit destilliertem Wasser.
6. Ausstriche lufttrocknen lassen.
7. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 5 Minuten.
8. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 2 Minuten.
9. Ausstriche lufttrocknen lassen.
10. Eindecken mit Aquatex® (Merck, Darmstadt).

Das Reaktionsprodukt zeigt sich als brauner Niederschlag in der Zelle. Die Zellkerne stellen sich blau dar.

2.3.3 Nachweis der Peroxidase

Diese Katalase überträgt Wasserstoff von einem Donator auf Wasserstoffperoxid. Als Donator wird hier, anstatt dem gewöhnlich eingesetzten, karzinogenen Benzidin, 4-Chlor-1-naphthol verwendet. Dieses wird durch Oxidation in einen unlöslichen Farbstoff umgewandelt.

Herstellung der Färbelösung:

Zunächst werden 15 ml 4-Chlor-1-naphthol (Merck, Darmstadt) in 15 ml Ethanol (Merck, Darmstadt) gelöst und dies in eine Färbeküvette gegeben. Unter Umrühren werden 45 ml destilliertes Wasser, 10 Tropfen Tris(hydroxymethyl-aminomethan)-HCl-Puffer (Merck, Darmstadt) und 2 Tropfen Wasserstoffperoxid-Lösung (Merck, Darmstadt) nacheinander hinzugegeben. Die Reagenzlösung ist farblos und ungefähr 3 Stunden stabil.

Durchführung der Färbung:

1. Fixieren der Blutausstriche in Leucognost® Fixiergemisch (Merck, Darmstadt) für 1 Minute.
2. Spülen in fließendem Leitungswasser für 10 Sekunden.
3. Einstellen in frisch angesetzte Färbelösung für 10 Minuten.
4. Abspülen mit destilliertem Wasser für 10 Sekunden.
5. Ausstriche lufttrocknen lassen.
6. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 2 Minuten.

7. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 3 - 5 Minuten.

8. Ausstriche lufttrocknen lassen.

9. Eindecken mit Aquatex® (Merck, Darmstadt).

Orte der Enzymaktivität stellen sich schwarz-braun dar. Die Zellkerne sind blau gefärbt.

2.3.4 Nachweis der β -Glucuronidase

Bei der hier angewendeten Azokupplungsreaktion wird durch die β -Glucuronidase, die zu den sauren Hydrolasen zählt, das Substrat Naphthol AS-BI β -Glucuronid zu Naphthol abgebaut, das wiederum durch Bindung an hexazotiertes Pararosanilin ein rotes, unlösliches Reaktionsprodukt entstehen lässt.

Herstellung der Färbelösung:

Zuerst werden 19 ml einer 0,2 M Natriumazetat-Lösung mit 1 ml hexazotiertem Pararosanilin in einem Kolben gemischt und mit 1 N NaOH (Roth, Karlsruhe) und 0,1 N HCl (Roth, Karlsruhe) auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt. Dann werden 4 mg Naphthol AS-BI β -Glucuronid (Sigma, Steinheim) in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) gelöst und diese Lösung der Inkubationslösung beigefügt. Zuletzt erfolgt eine Filtration der Färbelösung in einen Erlenmeyerkolben.

Durchführung der Färbung:

1. Betropfen der Ausstriche mit frisch angesetzter Färbelösung.

2. Inkubation in Feuchtkammer bei 37°C für 3 Stunden.

3. Abspülen mit destilliertem Wasser.

4. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 8 Minuten.

5. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 15 Minuten.

6. Ausstriche lufttrocknen lassen.

7. Eindecken mit Aquatex® (Merck, Darmstadt).

Stellen der Enzymaktivität färben sich rot an. Die Zellkerne nehmen eine blaue Farbe an.

2.3.5 Nachweis der α -Naphthyl-Azetat-Esterase nach Löffler

Bei dieser Azokupplungsreaktion bildet das aus 2-Naphthyl-Azetat hydrolytisch abgespaltene Naphthol mit dem Diazoniumsalz einen unlöslichen Azofarbstoff am Ort der Enzymaktivität.

Herstellung der Färbelösung:

20 mg 2-Naphthyl-Azetat (Sigma, Steinheim) werden als erstes in einem Kolben in 0,4 ml Aceton (Merck, Darmstadt) gelöst. Hierbei ist es wichtig, dass das 2-Naphthyl-Azetat in das Aceton gegeben wird und nicht umgekehrt. Als nächstes werden 80 ml 0,1 M Phosphatpuffer in die Lösung gegeben und kräftig gerührt bis die Trübung verschwindet. Dann werden 100 mg Fast Blue BB Salt hemi (2 mg/ml) (Sigma, Steinheim) hinzu gegeben und geschüttelt. Zuletzt erfolgt die Filtration in eine Färbeküvette.

Durchführung der Färbung:

1. Fixation der Blutausstriche in Formoldampf (Formaldehyd 37 %) (Roth, Karlsruhe) für 4 Minuten.
2. Einstellen in frisch angesetzte Färbelösung für 30 Minuten.
3. Abspülen mit fließendem Leitungswasser.
4. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 8 Minuten.
5. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 15 Minuten.
6. Ausstriche lufttrocknen lassen.
7. Eindecken mit Aquatex® (Merck, Darmstadt).

An Stellen der Enzymaktivität bildet sich ein blauer, fein granulärer Niederschlag. Die Zellkerne färben sich blau.

2.3.6 Nachweis der Naphthol-AS-Azetat-Esterase nach Löffler

Bei folgender Azokupplungsreaktion wird aus Naphthol-AS-Azetat Naphthol freigesetzt, das mit dem Diazoniumsalz an Stellen der Enzymaktivität ein unlösliches Farbstoffpräzipitat bildet.

Herstellung der Färbelösung:

Zuerst werden 8 mg Naphthol-AS-Azetat (Applichem, Darmstadt) in 1 ml Aceton (Merck, Darmstadt) gelöst. Dieses wird dann unter starkem Schütteln tropfenweise zu 80 ml 0,1 M Phosphatpuffer zugegeben. Dann folgt die Zugabe von 100 mg Fast Blue BB Salt hemi (2 mg/ml)

(Sigma, Steinheim) und zuletzt die Filtration in eine Färbeküvette.

Durchführung der Färbung:

1. Fixation der Blutausstriche in Formoldampf (Formaldehyd 37 %) (Roth, Karlsruhe) für 4 Minuten.
2. Einstellen in frisch angesetzte Färbelösung für 70 Minuten.
3. Abspülen mit fließendem Leitungswasser.
4. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 8 Minuten.
5. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 15 Minuten.
6. Ausstriche lufttrocknen lassen.
7. Eindecken mit Aquatex® (Merck, Darmstadt).

An Stellen der Enzymaktivität bildet sich ein blauer, fein granulärer Niederschlag. Die Zellkerne färben sich blau.

2.3.7 Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase

Bei dieser Azokupplungsreaktion wird aus Naphthol-AS-D-Chlorazetat Naphthol freigesetzt, das mit dem Diazoniumsalz an Stellen der Enzymaktivität zu einem unlöslichen Azofarbstoff gekuppelt wird.

Herstellung der Inkubationslösung:

24 mg Naphthol-AS-D-Chlorazetat (Applichem, Darmstadt) werden als erstes in 4 ml N,N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) gelöst. Dann werden 80 mg Fast Blue BB Salt hemi (2 mg/ml) (Sigma, Steinheim) in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer gelöst. Zuletzt werden Lösungen gemischt und in eine Färbeküvette filtriert.

Durchführung der Färbung:

1. Fixation der Blutausstriche in kaltem (4°C), 10 % igem Methanol-Formol für 30 Sekunden.
2. Einstellen in frisch angesetzte Färbelösung für 30 Minuten.
3. Abspülen mit fließendem Leitungswasser.
4. Einstellen in saures Hämalaun nach Mayer für 8 Minuten.
5. Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) für 15 Minuten.

6. Ausstriche lufttrocknen lassen.
7. Eindecken mit Aquatex® (Merck, Darmstadt).

An Stellen der Enzymaktivität bildet sich ein blauer, fein granulärer Niederschlag. Die Zellkerne färben sich blau an.

3. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit Blutproben von insgesamt sechs Schafen, davon drei weibliche Tiere im Alter von 1, 2 und 3 Jahren und drei männliche Tiere im Alter von 4, 5 und 6 Jahren, durchgeführt. Die Proben wurden folgendermaßen bearbeitet:

Zuerst wurde das Serum-Blut 20 Minuten bei 2000 U/Min zentrifugiert, wodurch drei Schichten entstanden. Die obere Schicht wurde vom Plasma gebildet, die mittlere von Leukozyten und Thrombozyten und die untere von Erythrozyten. Nach Abpipettieren des überstehenden Plasmas folgte die Isolierung der mittleren Schicht und deren „Sortierung“ auf einer Petrischale. Nach Auftragung des gleichen Volumens an Karnovsky-Gebrauchslösung auf die Zellschicht folgte bei 4°C für eine Stunde die Fixierung der Proben, wodurch eine Verfestigung der Schicht resultierte. Das entstandene Zellpellet wurde als Nächstes in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,2) gespült und über Nacht nochmals in Karnovsky-Lösung eingebracht. Am nächsten Tag wurde das Pellet in 1 mm³ große Blöcke geschnitten und in Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,2) dreimal gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit 1 %igem Osmiumtetroxid und 1,5 %igem Kaliumferrocyanid in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer für 2 Stunden bei 4°C kontrastiert und dann erneut dreimal für je 20 Minuten mit 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer gewaschen. Darauf folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, und zwar in 30 %igem und in 50 %igem Ethanol für je 20 Minuten, dann in 70 %igem, in 90 %igem und dreimal in absolutem Ethanol (Merck, Darmstadt) für je 30 Minuten. Daraufhin fand die schrittweise Einbettung in Epon statt, nämlich zuerst zweimal je 15 Minuten in Propylenoxid (Merck, Darmstadt), dann 1 Stunde in Propylenoxid-Polyembed-Gemisch 2:1, danach über Nacht in Propylenoxid-Polyembed-Gemisch 1:1 und zuletzt am folgenden Tag 1 Stunde in reines Polyembed auf dem Schüttler. Als Letztes wurden die Proben in Flacheinbettungsformen aus Silikon gleichmäßig verteilt, mit Polyembed bedeckt und bei 60°C für 24 - 36 Stunden polymerisiert. An einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) wurden dann 1 µm dicke Semidünnschnitte für die erste Übersicht erstellt und nach Richardson (Romeis, 2010) gefärbt. Für diese Färbung wurde erst 1 %iges Methylenblau (Merck, Darmstadt) mit 1 %igem Borax (Dinatriumtetraborat-decahydrat) (Serva, Heidelberg) 1:1 gemischt und dieses darauf 1:1 mit 1 % igem Azur II (Merck, Darmstadt)

vermischt. Darauf folgte die Anfertigung von 40 - 60 nm dicken Ultradünnschnitten von ausgewählten Blöcken. Diese wurden auf Kupfer-Grids (150 Mesh) aufgezogen und mit gesättigtem Uranylazetat (Agar Scientific, Stansted) für 20 Minuten und einer Bleizitrat-Lösung nach Reynolds (Reynolds, 1963) für 5 Minuten nachkontrastiert. Zuletzt wurden die Grids auf Filterpapier getrocknet.

4. Fluoreszenzmikroskopie

4.1 Untersuchungen des Zytoskeletts oviner Blutzellen

Für die Untersuchungen des Zytoskeletts der ovinen Blutzellen wurden unfixierte Blutausstriche von fünf weiblichen und fünf männlichen Schafen verwendet. Der Nachweis von Aktin erfolgte durch das aus dem Pilz *Amanita phalloides* stammende Toxin Phalloidin. Dieses bindet und stabilisiert mit hoher Affinität F-Aktin, ohne mit G-Aktin zu interagieren (Richelme et al., 1996). Der an das Phalloidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) macht die Bindung von F-Aktin durch rote Fluoreszenz sichtbar. Myosin, Vimentin, Zytokeratin und Tubulin hingegen wurden durch indirekte immunhistochemische Methoden mit unmarkierten Primärantikörpern und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die Antikörperbindung wird durch eine grüne Fluoreszenz sichtbar. Als Positivkontrollen dienten Blutausstriche von Pferd, Rind, Strauß oder Kaninchen. Als Negativkontrollen kamen bei Myosin, Tubulin, Vimentin und Zytokeratin solche Ausstriche zum Einsatz, auf die nur der fluoreszierende Sekundärantikörper aufgetragen wurde, nicht jedoch der Primärantikörper. Da die Fluoreszenzfarbstoffe sehr lichtempfindlich sind, wurden die Schritte ab der Inkubation mit Phalloidin-TRITC oder den FITC-markierten Sekundärantikörpern in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Das Gegenfärbeln der Blutausstriche mit einer DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)-Lösung diente der Identifikation der Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte in lichtgeschützten Behältnissen bei 7°C im Kühlschrank. Die Tabelle III.2 zeigt die in dieser Arbeit untersuchten Zytoskelettproteine mit Angaben zu Konzentration und Herkunft der hierfür verwendeten Agenzien.

Tabelle III.2: In dieser Arbeit untersuchte Zytoskelettproteine

	F-Aktin bindendes Agens	Konz	Herkunft			
Aktin	Phalloidin-TRITC (500µg/ml DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim)	1:500 1 µg/ml	<i>Amanita phalloides</i>			
	Primär-AK	Konz	Herkunft	Sekundär-AK	Konz	Herkunft
Myosin	Rabbit polyclonal to non-muscle myosin IIA (Abcam, Cambridge)	1:500 2 µg/ml	Kan	Fluoreszin anti-rabbit IgG (Vector, Burlingame)	1:300	Zg
Vimentin	Monoclonal mouse anti-vimentin clone vim 3B4 (Dako, Glostrup)	1:500	Ms	Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/FITC (Dako, Glostrup)	1:20	Kan
Zytokeratin	Pancytokeratin plus (Biocarta, Hamburg)	1:100	Ms	Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/FITC (Dako, Glostrup)	1:20	Kan
Tubulin	Mouse monoclonal (DM1A+ DM1B) to tubulin (Abcam, Cambridge)	2 µg/ml	Ms	Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/FITC (Dako, Glostrup)	1:20	Kan

Konz = Konzentration, DMSO = Dimethylsulfoxid, AK = Antikörper, Kan = Kaninchen, Zg = Ziege, Ms = Maus

4.1.1 Nachweis von Aktin durch Phalloidin-TRITC

Durchführung der Färbung:

1. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten.
2. Ausstriche mit Dako Protein Block Serum Free (Dako, Hamburg) zur Reduktion der Hintergrundfärbung bedecken.
3. Inkubation in Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 10 Minuten.
4. Abgießen des Dako Protein Block Serum Free.
5. 100 µl des in Antikörper-Diluent (Dako, Hamburg) gelösten Phalloidin-TRITC in einer Konzentration von 1:500 auf die Objektträger aufpipettieren.
6. Inkubation in abgedunkelter Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 45 Minuten.

7. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten.
8. Gegenfärben und Eindecken der Objektträger mit Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector, Burlingame) und Verschließen der Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack (Klarlack).

4.1.2 Immunhistochemischer Nachweis von Myosin, Vimentin, Zytokeratin und Tubulin

Durchführung der Färbung:

1. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten.
2. Ausstriche mit Dako Protein Block Serum Free (Dako, Hamburg) zur Reduktion der Hintergrundfärbung bedecken.
3. Inkubation in Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 10 Minuten.
4. Abgießen des Dako Protein Block Serum Free.
5. 100 µl des in Antikörper-Diluent (Dako, Hamburg) gelösten Primärantikörpers in der jeweiligen Konzentration (siehe Tabelle III.2) auf die Objektträger aufpipettieren.
6. Inkubation in Feuchtkammer im Kühlschrank bei 4 - 6°C über Nacht.
7. Am nächsten Tag dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten
8. 100 µl des in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) gelösten, FITC-markierten Sekundärantikörpers in der jeweiligen Konzentration (siehe Tabelle III.2) auf die Ausstriche aufbringen.
9. Inkubation in abgedunkelter Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
10. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten.
11. Gegenfärben und Eindecken der Objektträger mit Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector, Burlingame) und Verschließen der Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack (Klarlack).

4.2 Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden hauptsächlich FITC-gekoppelte Pflanzen-Lektine verwendet. Für manche Zuckernachweise kamen auch biotinylierte Pflanzen-Lektine zum Einsatz. Durch Zugabe von Hemmzuckern wurde zudem in Kontrolluntersuchungen die Spezifität der Bindung deutlich positiv reagierender FITC-markierter Pflanzen-Lektine untersucht. Darüber hinaus wurde durch Vorbehandlung mit Neuraminidase das Bindungsverhalten der negativ oder nur schwach positiv reagierenden FITC-markierten Pflanzen-Lektine analysiert. Da der Fluoreszenzfarbstoff FITC sehr lichtempfindlich ist, wurden die Schritte ab dessen Verwendung in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Das Gegenfärbeln der Blutausstriche mit einer DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)-Lösung diente der Identifikation der Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte in lichtgeschützten Behältnissen bei 7°C im Kühlschrank.

4.2.1 FITC-markierte Pflanzen-Lektine

Insgesamt wurden vierzehn FITC-gekoppelte Pflanzen-Lektine (Vector, Burlingame) verwendet. Pro Lektin wurden jeweils vierzehn Blutausstriche auf die Bindungsfähigkeit der Lektine untersucht. Als Positivkontrollen wurden Blutausstriche von Rindern, deren Lektinbindungseigenschaften bekannt sind, verwendet. Um die Eigenfluoreszenz der Blutzellen beurteilen zu können, wurden zudem Negativkontrollen angefertigt, bei denen kein Lektin aufgetragen, sondern nur die Kernfärbung durchgeführt wurde. Die in dieser Arbeit herangezogenen FITC-gekoppelten Pflanzen-Lektine sind mit ihrer jeweiligen Herkunft und Zuckerspezifität in Tabelle III.3 aufgelistet.

Tabelle III.3: In dieser Arbeit verwendete FITC-markierte Pflanzen-Lektine

	Abk	Herkunft	Spezifität für Mono-saccharide	Potente Oligosaccharide
Concanavalin Agglutinin	ConA	<i>Concanavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)	Man/Glc ¹	GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 2Man α 3) Man β 4GlcNac ¹
Lens culinaris Agglutinin	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)	Man/Glc ¹	Bindung an N-Glykane wird durch Core-Fucosylierung verstärkt ¹
Pisum sativum Agglutinin	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	Man/Glc ²	Bindung an N-Glykane wird durch Core-Fucosylierung verstärkt ²
Peanut Agglutinin	PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuss)	Gal ²	Gal β 3GalNAc α / β ²
Ricinus communis Agglutinin	RCA	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)	Gal ³	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6(Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3)Man β 4GlcNAc ⁴
Wheat germ Agglutinin	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	GlcNAc/ NeuNAc ⁵	(GlcNAc β 4)n, (Man β 4)GlcNAc β 4GlcNAc(1,N-Asn); Geclusterte sialysierte Tn/Tn-Antigene in Muzinen; O-GlcNAcylierung von Proteinen ⁵
Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	GlcNAc	a
Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikanische Pferdebohne)	GalNAc ⁶	GalNAc α 3GalNAc α 3Gal β 4Gal β 4Glc ₆
Soybean Agglutinin	SBA	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	Gal ⁴ , GalNAc ⁵	GalNAc α 3Gal(β 6Glc); Sialidase-vorbehandelte submaxillare Muzine ⁵
Griffonia simplicifolia I Agglutinin	GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)	GalNAc ¹	GalNAc α 3Gal, GalNAc α 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc ₁
Sophora japonica Agglutinin	SJA	<i>Sophora japonica</i> (Chinesischer Schnurbaum)	GalNAc ¹	GalNAc β 6Gal; Gal β 3GalNAc ¹
Ulex europaeus I Agglutinin	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	Fuc ¹	Fuc α 2Gal β 4GlcNAcB6R ¹
Phaseolus vulgaris Agglutinin E	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	b ^{2,6}	geteilte, komplexe N-Glykane: Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 2Man α 3)(GlcNAc β 4)Man β 4GlcNAc ^{2,5}
Phaseolus vulgaris Agglutinin L	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	b ^{2,6}	“tetraantennary” und “triantennary” N-Glykane mit β 6-Verzweigung ^{2,5}

Abk = Abkürzung, Man = Mannose, Glc = Glukose, Gal = Galaktose, GlcNAc = N-Acetyl-Glukosamin, NeuNAc = N-Acetyl-Neuraminsäure, GalNAc = N-Acetyl-Galaktosamin, Fuc = Fukose, a = Die Succinylierung von WGA führt in Folge einer negativen Ladung von WGAs bei physiologischem pH-Wert zu einer reduzierten Bindung an N-Acetyl-Neuraminsäure (Monsigny et al., 1980), b = keine Spezifität für Monosaccharide bekannt, ¹(Rüdiger und Gabius, 2009), ²(Gabius et al., 2011), ³(Goldstein und Poretz, 1986), ⁴(Rüdiger und Gabius, 2001), ⁵(Habermann et al., 2011), ⁶(Gabius, 2011)

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und lufttrocknen lassen.
2. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten.
3. 100 µl des in PBS-Puffer gelösten FITC-gekoppelten Lektins in einer Konzentration von 10 µg/ml auf die Objekträger mittels einer Pipette auftragen.
4. Inkubation in abgedunkelter Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 60 Minuten.
5. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 - 8 Minuten.
6. Gegenfärben und Eindecken der Objekträger mit Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector, Burlingame) und Verschließen der Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack (Klarlack).

4.2.2 Inhibition mit Hemmzuckern

Bei den stark positiv reagierenden FITC-gekoppelten Pflanzen-Lektinen ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs wurde untersucht, ob sich die Lektinbindung mittels des für sie spezifischen Kohlenhydrats vermindern oder hemmen lässt. Dafür wurde das jeweilige Lektin vor dem Auftragen auf den Ausstrich mit dem entsprechenden Hemmzucker 30 bzw. 60 Minuten lang vorinkubiert. Die Inhibitoren wurden hierfür in einer bestimmten Konzentration (siehe Tab. III.4) zu den in PBS-Puffer gelösten Lektinen dazugegeben. Dieses Lektin-Hemmstoff-Gemisch wurde nach der Inkubationszeit auf je zwei Ausstriche aufgetragen. Das weitere Vorgehen entsprach demjenigen, welches in Kapitel 4.2.1 beschrieben wurde, anstelle des reinen Lektins wurde jedoch das Lektin-Hemmstoff-Gemisch aufgetragen. Als Positivkontrollen dienten Blutausstriche vom Rind, als Negativkontrollen hingegen Blutsausstriche, auf die das Lektin ohne Hemmstoff aufgetragen wurde. Die Tabelle III.4 führt die verwendeten Lektine mit den dazugehörigen Hemmstoffen, deren Konzentration und die Inkubationszeit auf.

Tabelle III.4: In dieser Arbeit verwendete Hemmzucker

Lektin	Hemmzucker	Konzentration	Zeit
ConA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	60 Min
LCA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	60 Min
PSA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	60 Min
WGA	Chitin-Hydrolysat (Vektor, Burlingame, USA)	1:4	30 Min
WGAs	Chitin-Hydrolysat (Vektor, Burlingame, USA)	1:4	30 Min

4.2.3 Vorbehandlung mit Neuraminidase

Die negativen (PNA, RCA, DBA und SBA) und nur schwach positiven (SJA und UEA-I) FITC-gekoppelten Pflanzen-Lektine wurden auf die Neuraminidase-Spezifität hin untersucht. Es kamen je drei Blutausstriche zum Einsatz. Das Enzym Neuraminidase spaltet im Allgemeinen die endständigen Sialinsäuren, die N- bzw. O-substituierte Derivate der Neuraminsäure darstellen, von verschiedenen Glykoproteinen ab, wodurch deren Zuckermoleküle zugängig werden. Durch diese Methode kann demnach herausgefunden werden, ob nach vorheriger Behandlung des Blutausstriches mit dem Enzym vorher negative Lektine nun binden oder schwach positive Lektine nun besser binden können. Die für diese Untersuchung verwendete Neuraminidase stammt aus *Vibrio cholerae* (Sigma-Aldrich, Steinheim) und spaltet bevorzugt $\alpha(2 \rightarrow 3)$ Verbindungen der Sialinsäure, aber auch $\alpha(2 \rightarrow 6)$ und $\alpha(2 \rightarrow 8)$ Verbindungen. Für die Wirksamkeit des Enzyms werden eine Temperatur von 37°C, ein pH-Wert von 5,0 und Kalziumionen benötigt. Die folgende Methode wurde unter Zuhilfenahme von menschlichen Blutproben zunächst etabliert und daraufhin beim Schaf angewendet. Als Positivkontrollen dienten Blutausstriche vom Mensch, als Negativkontrollen Blutsausstriche, auf die das Lektin ohne vorherige Neuraminidase-Behandlung aufgetragen wurde.

Herstellung der Gebrauchslösung:

Zunächst erfolgt die Herstellung eines Natriumazetat-Kalziumchlorid-Puffers (pH 5,0), indem 8,2 g Natriumazetat (Merck, Darmstadt) in 1 l demineralisiertem Wasser gelöst werden und anschließend 0,294 g Kalziumchlorid (Merck, Darmstadt) hinzugegeben werden. Die Einstellung auf einen pH-Wert von 5,0 erfolgt mit 1 M HCl (Roth, Karlsruhe). Zu 1 ml der Pufferlösung werden 3 μ l der Neuraminidase-Lösung von *Vibrio cholerae* (Sigma-Aldrich, Steinheim) gegeben, was 0,02 Einheiten entspricht. Die Temperatur des Puffers muss vor Zugabe des Enzyms 37°C betragen, darf jedoch 40°C nicht überschreiten.

Versuchsdurchführung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und lufttrocknen lassen.
2. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in Natriumazetat-Puffer (pH 5,5) für jeweils 5 Minuten.
3. 200 μ l der verdünnten Neuraminidase-Lösung in einer Konzentration von 0,02 U/ml auf die Objektträger mittels einer Pipette auftragen.
4. Inkubation in abgedunkelter Feuchtkammer bei 37°C für 60 Minuten.
5. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten.
6. 100 μ l des in PBS-Puffer gelösten FITC-gekoppelten Lektins in einer Konzentration von 10

µg/ml auf die Objekträger mittels einer Pipette auftragen.

7. Inkubation in abgedunkelter Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 60 Minuten.
8. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 - 8 Minuten.
9. Gegenfärbung und Eindecken der Objekträger mit Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector, Burlingame) und Verschließen der Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack (Klarlack).

4.2.4 Biotinylierte Pflanzen-Lektine

Mittels der Streptavidin-Biotin-Methode wurde die Bindung der biotinylierten Lektine MAA-I (Biozol, Eching), SNA (Biozol, Eching) und VAA (Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Fakultät, München) nachgewiesen. Bei dieser Methode ist das Lektin, das an seine spezifische Kohlenhydratstruktur bindet, an das Vitamin Biotin gekoppelt. Gibt man einen Streptavidin-FITC-Komplex (Dako, Hamburg) zu dem mit einem biotinylierten Lektin inkubierten Ausstrich, bindet das von *Streptomyces Avidinii* stammende Protein Streptavidin mit hoher Affinität an das Biotinmolekül. Die Bindungsstelle des Lektins wird durch FITC sichtbar gemacht. Pro Lektin wurden je zehn Blautausstriche untersucht. Als Positivkontrollen wurden auch hier Blautausstriche vom Rind herangezogen. Als Negativkontrollen dienten Ausstriche, auf die nur Streptavidin/FITC, nicht jedoch das biotinylierte Lektin aufgetragen wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten biotinylierten Pflanzen-Lektine sind mit ihrer jeweiligen Herkunft und Zuckerspezifität in Tabelle III.5 aufgelistet.

Tabelle III.5: In dieser Arbeit verwendete biotinylierte Pflanzen-Lektine

	Abk	Herkunft	Spezifität für Mono-saccharide	Potente Oligosaccharide
Maackia amurensis Agglutinin I	MAA-I	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholtz)	a ¹	NeuNAc α 3Gal β 4GlcNAc/Glc 3'-Sulfatierung wird toleriert ¹
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	Gal/GalNAc ^{1,2}	NeuNAc α 6Gal/GalNAc Geclustertes T _n -Antigen 9' O-Acetylierung wird toleriert ^{1,2}
Viscum album Agglutinin	VAA	<i>Viscum album</i> (Mistel)	Gal ^{2,3}	Gal β 2(3)Gal; Gal α 3(4)Gal; Fuc α 2Gal; Gal β 3(4)GlcNAc ohne/mit α 2,6-Sialisierung ^{2,3}

Abkürzung = Abkürzung, NeuNAc = N-Acetyl-Neuraminsäure, Gal = Galaktose, GlcNAc = N-Acetyl-Glukosamin, GalNAc = N-Acetyl-Galaktosamin, Fuc = Fukose, a = keine Spezifität für Monosaccharide bekannt, ¹(Gabius et al., 2011), ²(Gabius, 2011), ³(Habermann et al., 2011)

Durchführung der Färbung:

1. Ausstriche 10 Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und lufttrocknen lassen.
2. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten.
3. Ausstriche mit Dako Protein Block Serum Free (Dako, Hamburg) zur Reduktion der Hintergrundfärbung bedecken.
4. Inkubation in Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 10 Minuten.
5. Abschütteln des Dako Protein Block Serum Free.
6. 100 µl des in PBS-Puffer gelösten biotinylierten Lektins in einer Konzentration von 10 µg/ml (MAA-I und SNA) bzw. 2 µg/ml (VAA) auf die Objektträger mittels einer Pipette auftragen.
7. Inkubation in Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 60 Minuten.
8. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 Minuten.
9. 100 µl des in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) verdünnten Streptavidin/FITC (Dako, Hamburg) in einer Konzentration von 1:500 auf die Objektträger mittels einer Pipette auftragen.
10. Inkubation in abgedunkelter Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
11. Dreimaliges Waschen der Ausstriche in PBS-Puffer (pH 7,4 - 7,6) für jeweils 5 - 8 Minuten.
12. Gegenfärben und Eindecken der Objektträger mit Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector, Burlingame) und Verschließen der Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack (Klarlack).

5. Auswertung

Die Auswertung der Präparate mit den Übersichtsfärbungen, den substrathistochemischen Färbungen und den enzymhistochemischen Färbungen erfolgte unter dem Lichtmikroskop Aristoplan der Firma Leitz (Leitz, Wetzlar). Die Fotos wurden mit einer Canon-Powershot A 95 Digitalkamera aufgenommen.

Die Beurteilung und die photographische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Proben erfolgten unter dem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 902 (Zeiss, Oberkochen).

Die Blutausstriche, die den Fluoreszenzfarbstoff FITC oder TRITC enthalten, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Dialux 20 der Firma Leitz (Leitz, Wetzlar) ausgewertet. Die dazugehörigen Fotos wurden mit der Kamera Progress®CF cool aufgenommen.

IV Ergebnisse

1. Blutbild der verwendeten Schafe

Von allen Schafen wurden von der Firma Synlab.vet Augsburg ein kleines Blutbild und ein Differentialblutbild erstellt. In den Tabellen IV.1 und IV.2 sind die Blutwerte der einzelnen Tiere aufgelistet. Die Referenzbereiche sind jeweils in Klammern angegeben.

Tabelle IV.1: Kleines Blutbild der verwendeten Schafe

Sf	Leu x10 ³ /µl (4,2-6,2)	Ery x10 ⁶ /µl (6,5-11,3)	Hb g/l (87-128)	Hkt % (30-38)	MCV fl (34-46)	MCH pg (13-14)	MCHC % (29-34)	Thr x10 ³ /µl (280-650)
1	4,6	11,44	125	36	31,6	10,9	34,6	282
2	5,4	9,88	106	34	34,8	10,7	30,8	255
3	5,4	9,88	125	33	33,5	12,7	37,8	245
4	4,7	12,12	147	38	30,9	12,0	38,9	214
5	5,7	11,99	139	36	30,0	11,6	38,6	201
6	5,6	11,92	134	36	29,8	11,2	37,7	211
7	8,1	11,37	138	31	26,9	12,1	45,1	120
8	4,0	11,84	133	34	29,0	11,2	38,8	161
9	5,3	10,31	118	31	29,7	11,4	38,6	236
10	6,0	11,89	126	35	29,6	10,6	35,8	130
11	6,3	13,9	148	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	186
12	6,2	11,24	121	31	27,7	10,8	38,9	239
13	6,1	10,91	121	31	28,0	11,1	39,7	153
14	6,8	12,63	134	34	27,0	10,6	39,3	171
15	3,9	12,47	135	36	29,2	10,8	37,1	174
16	6,2	11,13	121	34	30,9	10,9	35,2	180
17	5,7	13,15	145	39	29,7	11,0	37,2	247
18	4,8	11,94	134	35	29,0	11,2	38,7	162
19	7,1	10,96	132	31	28,6	12,0	42,0	158
20	8,6	10,19	120	35	34,0	11,8	34,7	119
21	8,8	11,43	133	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	302
22	3,4	10,53	150	43	35,4	12,5	35,2	290
23	6,0	10,51	119	30	28,1	11,3	40,3	224
24	8,7	10,76	128	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	206
25	10,1	11,58	138	37	29,0	10,9	37,5	284
26	6,6	9,84	118	45	45,9	12,0	26,1	351
27	3,5	10,53	151	42	35,3	12,6	35,6	278
28	7,1	7,62	105	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	311
29	8,3	9,85	127	30	29,9	12,9	43,1	120
30	7,2	11,89	148	33	25,8	11,7	45,3	180
31	6,9	9,62	117	27	27,1	11,6	42,7	194
32	5,6	9,86	122	28	27,0	11,6	43,1	251
33	4,6	11,07	149	40	32,6	12,2	37,3	185
34	3,4	9,97	130	37	34,5	12,0	34,8	147
35	8,6	11,46	124	32	27,3	10,6	38,8	231
36	10,7	10,78	113	29	26,4	10,2	38,8	171
37	7,4	10,69	126	28	25,6	11,4	44,5	109
38	8,2	9,73	114	27	26,8	11,2	41,9	305
39	9,0	7,42	99	27	34,1	12,4	36,4	433
40	7,1	11,70	141	38	29,9	11,1	37,1	269

Sf = Schaf, Leu = Leukozyten, Ery = Erythrozyten, Hb = Hämoglobin, Hkt = Hämatokrit, MCV = mean corpuscular volume, MCH = mean corpuscular hemoglobin, MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration, Thr = Thrombozyten, n.b. = nicht bestimmt

Tabelle IV.2: Differentialblutbild der verwendeten Schafe

Sf	Neu % (20-45)	Neu x10 ³ / μl (0,7-4)	St % (0-2)	St x10 ³ / μl (<200)	Ly % (40-65)	Ly x10 ³ / μl (2-4)	M % (2-6)	Mo x10 ³ / μl (0-0,7)	Eos % (1-10)	Eos x10 ³ / μl (0,1-1)	Bas % (0-3)	Bas x10 ³ / μl (0-0,3)
1	37	1,70	0	0	60	2,76	1	0,05	1	0,05	1	0,05
2	50	2,70	0	0	39	2,11	2	0,11	8	0,43	0	0
3	51	2,75	0	0	42	2,27	2	0,11	5	0,27	0	0
4	50	2,35	0	0	42	1,97	1	0,05	7	0,33	0	0
5	45	2,57	0	0	49	2,79	3	0,17	4	0,23	0	0
6	30	1,68	0	0	63	3,53	1	0,06	6	0,34	0	0
7	44	3,56	0	0	51	4,13	2	0,16	3	0,24	0	0
8	52	2,08	0	0	42	1,68	1	0,04	5	0,20	0	0
9	40	2,12	0	0	55	2,92	3	0,16	2	0,11	0	0
10	33	1,98	0	0	61	3,66	2	0,12	4	0,24	1	0,06
11	39	2,46	0	0	57	3,59	1	0,06	2	0,13	0	0
12	39	2,42	0	0	48	2,98	2	0,12	10	0,62	1	0,06
13	31	1,89	0	0	59	3,60	5	0,31	4	0,24	0	0
14	44	2,99	0	0	50	3,40	2	0,14	3	0,20	0	0
15	38	1,48	0	0	55	2,15	2	0,08	6	0,23	0	0
16	48	2,98	0	0	43	2,67	2	0,12	7	0,43	0	0
17	43	1,45	0	0	49	2,79	2	0,11	5	0,29	0	0
18	33	1,58	0	0	60	2,88	1	0,05	6	0,29	0	0
19	45	3,20	0	0	49	3,48	2	0,14	4	0,28	0	0
20	35	3,01	0	0	57	4,90	2	0,17	5	0,43	1	0,09
21	28	2,46	0	0	64	5,63	1	0,09	6	0,53	1	0,09
22	56	1,90	0	0	40	1,36	1	0,03	4	0,14	0	0
23	43	2,58	0	0	52	3,12	4	0,24	2	0,12	0	0
24	35	3,05	0	0	59	5,13	2	0,17	3	0,26	0	0
25	30	3,03	0	0	65	6,57	1	0,10	4	0,40	0	0
26	35	2,31	0	0	53	3,50	1	0,07	12	0,79	0	0
27	60	2,10	0	0	36	1,26	0	0	4	0,14	0	0
28	50	3,55	0	0	40	2,84	1	0,07	9	0,64	0	0
29	60	4,98	0	0	36	2,99	1	0,08	3	0,25	0	0
30	50	3,60	0	0	46	3,31	1	0,07	3	0,22	0	0
31	41	2,83	0	0	49	3,38	4	0,28	6	0,41	0	0
32	50	2,80	0	0	40	2,24	2	0,11	8	0,45	0	0
33	42	1,93	0	0	52	2,39	1	0,05	5	0,23	0	0
34	46	1,56	0	0	44	1,50	2	0,07	8	0,27	0	0
35	n.b.	1,81	n.b.	0	n.b.	6,45	n.b.	0,34	n.b.	0	n.b.	0
36	35	3,75	0	0	61	6,53	2	0,21	2	0,21	0	0
37	45	3,33	0	0	50	3,70	2	0,15	3	0,22	0	0
38	47	3,85	0	0	45	3,69	3	0,25	5	0,41	0	0
39	49	4,41	0	0	41	3,69	2	0,18	8	0,72	0	0
40	30	2,13	0	0	66	4,69	2	0,14	2	0,14	0	0

Sf = Schaf, Neu = Neutrophile Granulozyten, St = Stabkernige Leukozyten, Ly = Lymphozyten, Mo = Monozyten, Eos = Eosinophile Granulozyten, Bas = Basophile Granulozyten, n.b. = nicht bestimmt

Zur Feststellung eines Alterseinflusses auf die Blutparameter wurden die Schafe in drei verschiedene Altersgruppen eingeteilt. Zur 1. Gruppe gehören Tiere, die jünger als 2 Jahre sind. Die Schafe der 2. Gruppe sind 2 - 4 und diejenigen der 3. Gruppe 5 - 7 Jahre alt. Zudem wurde eine mögliche Auswirkung des Geschlechts auf die Blutwerte berücksichtigt.

Der durchschnittliche Leukozytenwert der Schafe unter 2 Jahren ist mit $8,03 \times 10^3/\mu\text{l}$ weitaus höher als derjenige der 5 - 7 jährigen Schafe mit $5,37 \times 10^3/\mu\text{l}$. Bei den Schafen der 2. Gruppe errechnet sich ein Wert von $5,55 \times 10^3/\mu\text{l}$. Die Leukozytenzahlen scheinen demnach mit zunehmendem Alter zu sinken. Zudem zeigen die Böcke im Schnitt etwas höhere Werte des weißen Blutbildes als die Zibben. Das rote Blutbild betreffend lässt sich bei den untersuchten Tieren kein deutlicher Unterschied in Abhängigkeit vom Alter feststellen. Die Hämoglobinkonzentration, der Hämatokrit, das mittlere Zellvolumen des einzelnen Erythrozyten (MCV), der Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten (MCH) und die Hämoglobinkonzentration aller zellulären Bestandteile im Blut (MCHC) weisen bei den männlichen Tieren jedoch durchschnittlich höhere Werte auf als bei den weiblichen Tieren. Bei der Zahl der Thrombozyten ist hier keine Beeinflussung durch das Alter oder das Geschlecht ersichtlich. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten liegt bei den jungen Tieren der 1. Gruppe mit 38,38 % unter denen der 2. Gruppe (41,55 %) und der 3. Gruppe (47,36 %). Mit steigendem Alter nimmt also der Anteil an neutrophilen Granulozyten bei den untersuchten Schafen etwas zu. Bei den Lymphozyten ist es genau umgekehrt. Deren Wert ist bei den Tieren unter 2 Jahren mit 56 % deutlich höher als bei den Tieren der 3. Gruppe, bei denen sie nur 44,27 % der Gesamtleukozyten ausmachen. Die Tiere der 2. Gruppe liegen mit einem Wert von 51,75 % zwischen der 1. und der 3. Gruppe. Der Anteil der Lymphozyten sinkt folglich mit steigendem Alter bei den untersuchten Schafen. Bei den Böcken ist ein geringfügiges Überwiegen der neutrophilen Granulozyten gegenüber den Lymphozyten festzustellen, bei den Zibben liegen umgekehrte Verhältnisse vor. Die Monozyten zeigen weder einen wesentlichen altersabhängigen Verlauf noch eine Beeinflussung durch das Geschlecht. Die eosinophilen Granulozyten hingegen lassen bei den älteren Tieren mit 7 % einen deutlich höheren Anteil an den Gesamtleukozyten als bei den jüngeren Tieren mit 4,35 % erkennen. Der Wert der Tiere der 2. Gruppe liegt zwischen den beiden genannten. Die eosinophilen Granulozyten nehmen bei den untersuchten Schafen demzufolge mit steigendem Alter anteilig zu. Basophile Granulozyten wurden lediglich bei vier Tieren gefunden, wobei in diesen Fällen deren Anteil am weißen Blutbild unter 0,1 % beträgt.

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

2.1 Übersichtsfärbungen

Die Blutausstriche der Schafe wurden, wie bereits erwähnt, für eine exakte Differenzierung der einzelnen Zellen sechs verschiedenen Übersichtsfärbungen unterzogen. Zur Bestimmung der Größe der einzelnen Blutzellen wurde aus je fünfzig Zellen ein Durchschnittswert errechnet.

2.1.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten der Schafe stellen sich als rundliche, kernlose Zellen mit einem homogenen Inhalt und einer meist glatten Zellmembran dar. Ihre Größe variiert stark und liegt bei den untersuchten Tieren zwischen 3,8 und 6,1 μm . Der durchschnittliche Durchmesser beläuft sich auf 4,4 μm . In vielen Ausstrichen kann eine Anisozytose (vgl. Abb. IV-4), in manchen auch eine Poikilozytose beobachtet werden. Der Großteil der Erythrozyten zeigt eine zentrale Aufhellung des Zytosplasmas (vgl. Abb. IV-1), die durch die meist bikonkav Scheibenform mit einer Eindellung in der Mitte bedingt ist. Da jedoch beim Schaf auch unikonkav Erythrozyten vorkommen, ist die zentrale Aufhellung nicht immer zu sehen. In sehr seltenen Fällen zeigen die Erythrozyten eine Stechapfelform, die durch kleine Ausläufer der Zelloberfläche bedingt ist und meist einen Artefakt darstellen dürfte. Die roten Blutkörperchen werden in diesem Fall als Echinozyten bezeichnet. Lediglich bei einzelnen Präparaten kann die so genannte Geldrollenbildung der Erythrozyten beobachtet werden, die beim Schaf nur in geringem Ausmaß physiologisch vorkommt. Bei keinem der untersuchten Tiere können eine basophile Tüpfelung oder Howell-Jolly-Körperchen gefunden werden. Die Anfärbung der Erythrozyten mit den verschiedenen Methoden ist in Tabelle IV.3 zusammengefasst.

Tabelle IV.3: Übersichtsfärbungen der Erythrozyten

	Zytosplasma
Diff-Quick	braun-rot
Giemsa	grau-blau
May-Grünwald	hellrot
Pappenheim	rosa bis hellrot
Sirius Red	grau-blau bis hellrosa
Toluidinblau	grau-blau bis hellgrau

2.1.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten stellen ebenfalls sehr kleine, kernlose Zellen dar. Ihre Form ist meist unregelmäßig, nicht selten lässt sich jedoch eine runde bis ovale Gestalt erkennen. Ihr Durchmesser reicht von 1,4 - 3,0 μm , durchschnittlich liegt er bei 2,1 μm . In manchen Färbungen kann deutlich eine dunkle, granuläre Zentralzone (Granulomer) von einer durchsichtigen Randzone (Hyalomer) unterschieden werden (vgl. Abb. IV-2) Bei einzelnen Zellen können fadenförmige, zytoplasmatische Projektionen beobachtet werden (vgl. Abb. IV-1, IV-14). Häufig liegen die Blutplättchen in Gruppen zusammen gelagert im Blutausstrich (vgl. Abb. IV-1, IV-2), manchmal sind sie aber auch einzeln verstreut und/oder mit einem neutrophilen Granulozyten assoziiert. Die Anfärbung der Thrombozyten ist in Tabelle IV.4 zusammengefasst.

Tabelle IV.4: Übersichtsfärbungen der Thrombozyten

	Zytoplasma
Diff-Quick	violett
Giemsa	Hyalomer hellblau, Granulomer violett
May-Grünwald	violett
Pappenheim	Hyalomer hellblau, Granulomer violett
Sirius Red	grau-blau bis hellgrau
Toluidinblau	grau-blau

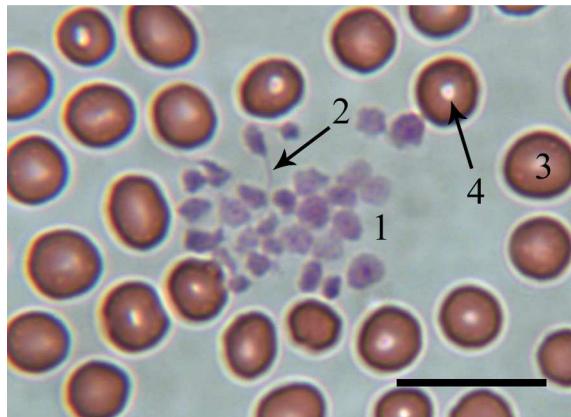


Abbildung IV-1: Thrombozyten, Diff-Quick-Färbung (Schaf, m, 5 Jahre)

Die Thrombozyten (1) liegen im Blutausstrich zusammen gelagert und weisen vereinzelt fadenförmige Projektionen (2) auf. Bei den Erythrozyten (3) ist in den meisten Fällen eine zentrale Aufhellung (4) zu sehen. SB = 10 μm

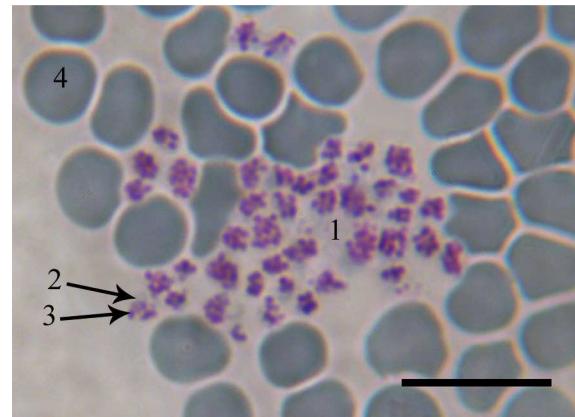


Abbildung IV-2: Thrombozyten, Giemsafärbung (Schaf, w, 3 Jahre)

Bei den Thrombozyten (1) kann deutlich zwischen dem hellblauen Hyalomer (2) und dem violetten Granulomer (3) unterschieden werden.

4 = Erythrozyt, SB = 10 μm

2.1.3 Lymphozyten

Da das Schaf ein lymphozytäres Blutbild aufweist, sind die Lymphozyten in jedem Ausstrich zahlreich vorhanden. Sie treten als runde (vgl. Abb. IV-4) bis ovale Zellen (vgl. Abb. IV-5) mit meist glatter Oberfläche in Erscheinung. Die Größe der Lymphozyten variiert stark. Ihre Durchschnittsgröße beläuft sich auf 10,8 μm , wobei Größen von 8 - 13,1 μm vorkommen. 24 % sind kleiner als 10 μm , 32 % liegen zwischen 10 und 11 μm , 28 % zwischen 11 und 12 μm und 16 % sind größer als 12 μm . Bei dem Großteil der Lymphozyten füllt der Kern die Zelle bis auf einen mehr oder weniger schmalen Zytoplasmasaum fast vollständig aus (vgl. Abb. IV-3). Je größer die Lymphozyten werden, desto mehr Zytoplasma ist vorhanden und desto kleiner wird das Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Der Kern erscheint meist dunkel und kompakt (vgl. Abb. IV-3) und lässt bei manchen Zellen ein fleckenförmiges Muster erkennen. Er weist eine runde bis ovale Form auf und liegt entweder zentral (vgl. Abb. IV-4) oder exzentrisch in der Zelle (vgl. Abb. IV-3, IV-6). Bei manchen Zellen, vor allem bei den etwas größeren Lymphozyten, kann eine Einkerbung des Kernes an einer Seite (Kerninvagination) beobachtet werden (vgl. Abb. IV-6). Das Zytoplasma stellt sich meist klar, homogen und basophil (vgl. Abb. IV-4, IV-6) dar. In manchen Lymphozyten können im Zytoplasmasaum jedoch kleine, runde bis stabförmige Azurgranula vorkommen (vgl. Abb. IV-5, IV-6), die sich vor allem bei der Giemsa- und der May-Grünwald-Färbung deutlich darstellen. Gelegentlich sind Lymphozyten mit einem dunkelblauen Zytoplasma, das sie als reaktive Zellen ausweist, zu finden (vgl. Abb. IV-7). Seltener können Lymphozyten mit einem tief dunkelblauen, von Vakuolen durchsetzten Zytoplasma und einem exzentrisch liegenden Kern identifiziert werden. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um plasmazytoide Lymphozyten (vgl. Abb. IV-8). Die Anfärbungen von Zellkern, Zytoplasma und Granula der Lymphozyten mit den verschiedenen Methoden ist in Tabelle IV.5 zusammengefasst.

Tabelle IV.5: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten

	Zellkern	Zytoplasma	Granula
Diff-Quick	dunkelviolett	hellviolett	-
Giemsa	rot-violett	blau	rot-violett
May-Grünwald	rot-violett bis blau-violett	blau bis hellviolett	dunkelviolett
Pappenheim	blau-violett bis blau	blau	rot-violett
Sirius Red	blau	grau-blau	-
Toluidinblau	blau-violett	hellviolett	rot-violett



Abbildung IV-3: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung (Schaf, w, 1 Jahr)

Der Kern (2) des Lymphozyten (1) liegt exzentrisch in der Zelle und erscheint dunkel und kompakt. Er füllt die Zelle bis auf einen schmalen Zytoplasmasaum (3) fast vollständig aus.
 4 = Thrombozyten, 5 = Erythrozyt,
 SB = 10 μ m

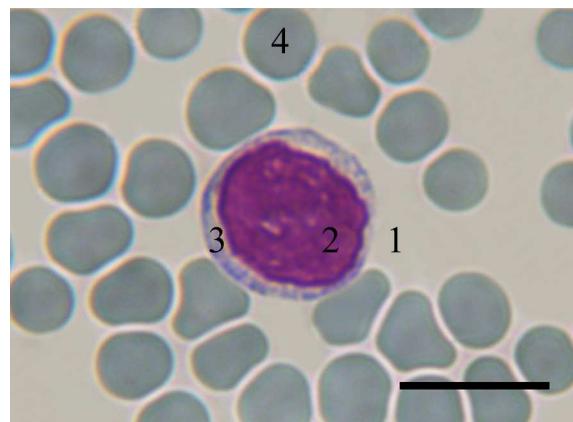


Abbildung IV-4: Lymphozyt, Giemsa-Färbung (Schaf, w, 3,5 Jahre)

Der Lymphozyt (1) weist eine runde Gestalt auf, wobei der Kern (2) weitgehend zentral in der Zelle liegt. Das Zytoplasma (3) stellt sich leicht basophil dar. Bei den Erythrozyten (4) kann eine Anisozytose beobachtet werden.
 SB = 10 μ m

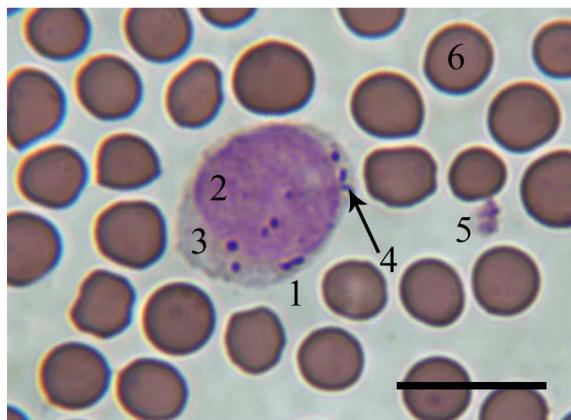


Abbildung IV-5: Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung (Schaf, w, 3 Jahre)

Dieser Lymphozyt (1) weist eine ovale Gestalt auf. In dessen Zytoplasma (3) sind rundliche Granula (4) zu erkennen, die teilweise über dem Kern (2) liegen.
 5 = Thrombozyt, 6 = Erythrozyt,
 SB = 10 μ m

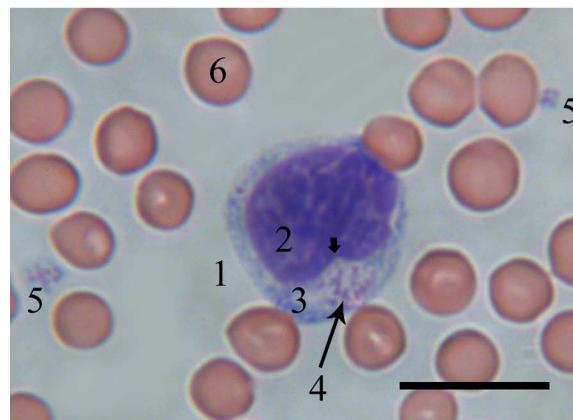


Abbildung IV-6: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Der Kern (2) des Lymphozyten (1) liegt exzentrisch in der Zelle und zeigt eine Invagination (kleiner Pfeil), in deren Bereich im basophilen Zytoplasma (3) einige, sehr feine Granula (4) zu sehen sind.
 5 = Thrombozyten, 6 = Erythrozyt,
 SB = 10 μ m

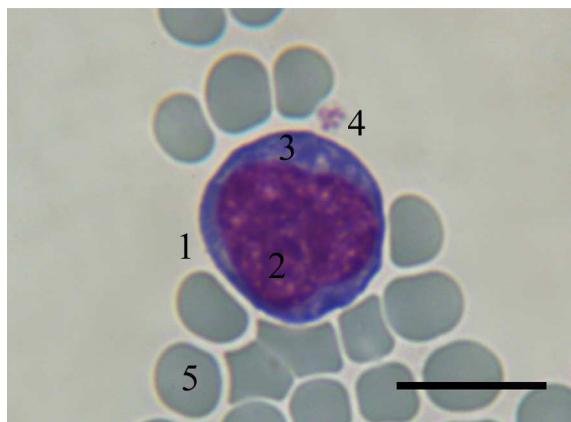


Abbildung IV-7: Reaktiver Lymphozyt, Giemsa-Färbung (Schaf, w, 3 Jahre)

Der Kern (2) des reaktiven Lymphozyten (1) ist von einem tiefblauen Zytoplasmasaum (3) umgeben.

4 = Thrombozyt, 5 = Erythrozyt,
SB = 10 µm

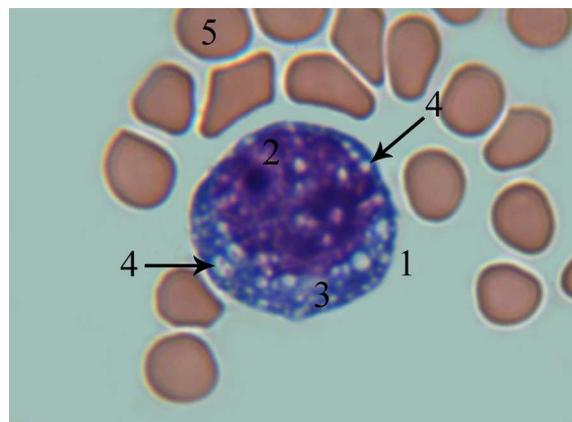


Abbildung IV-8: Reaktiver Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung (Schaf, m, 7 Jahre)

Der Kern (2) dieses reaktiven Lymphozyten (1) ist rund und liegt exzentrisch in der Zelle. Das dunkelblaue Zytoplasma (3) ist von zahlreichen Vakuolen (4) durchsetzt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen plasmazytoiden Lymphozyten.
5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

2.1.4 Monozyten

Die Monozyten sind mit einem Durchmesser von 14,2 µm die größten Zellen im Blut der Schafe. Ihre Größe reicht bei den untersuchten Tieren von 11,6 - 17,5 µm. Die äußere Form ist in der Regel unregelmäßig, nicht selten aber auch rund oder oval. Der große Kern liegt meist exzentrisch in der Zelle (vgl. Abb. IV-9) und zeichnet sich durch eine stark ausgeprägte Polymorphie aus. Der Kern kann rund, oval, bohnenförmig, hufeisenförmig (vgl. Abb. IV-10), teilweise aber auch gelappt (vgl. Abb. IV-11) sein. Das im Vergleich zu den Lymphozyten hellere Chromatin erscheint aufgelockert (vgl. Abb. IV-10) und lässt ein geflecht- oder netzartiges Muster erkennen. Das reichlich vorhandene, oft basophil erscheinende Zytoplasma (vgl. Abb. IV-9, IV-11) ist mit einer teils wabigen Struktur nicht immer homogen und enthält bei einigen Monozyten mehrere, unterschiedlich große Vakuolen, die sich vorwiegend in der Nähe des Zellkernes befinden (vgl. Abb. IV-9, IV-11, IV-12). Teilweise scheinen auch im Zellkern Vakuolen enthalten zu sein (vgl. Abb. IV-12). In keinem der lichtmikroskopisch untersuchten Ausstriche können bei den Monozyten Azurgranula gefunden werden. Die Anfärbungen von Zellkern, Zytoplasma und Granula der Monozyten mit den verschiedenen Methoden ist in Tabelle IV.6 zusammengefasst.

Tabelle IV.6: Übersichtsfärbungen der Monozyten

	Zellkern	Zytoplasma	Granula
Diff-Quick	dunkelviolett	hellblau bis hellviolett	-
Giemsa	rot-violett	blau bis hellviolett	-
May-Grünwald	rot-violett bis blau-violett	blau	-
Pappenheim	rot-violett bis blau-violett	blau bis grau-blau	-
Sirius Red	blau	grau-blau	-
Toluidinblau	blau-violett	hellviolett	-

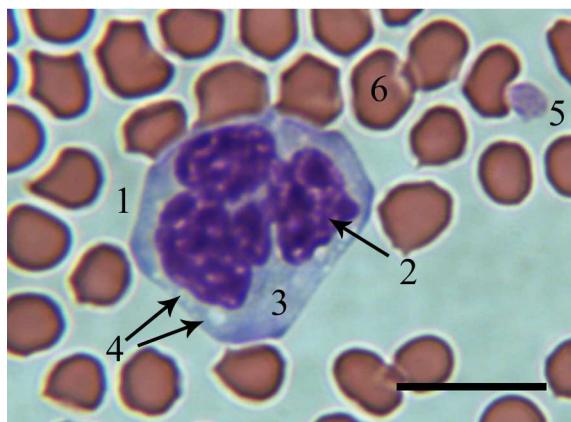


Abbildung IV-9: Monozyt, Diff-Quick-Färbung (Schaf, m, 7 Jahre)

Im reichlich vorhandenen, basophilen Zytoplasma (3) des Monozyten (1) sind einige, unterschiedlich große Vakuolen (4) in direkter Nähe zum exzentrisch liegenden Zellkern (2) zu erkennen.
 5 = Thrombozyt, 6 = Erythrozyt,
 SB = 10 µm

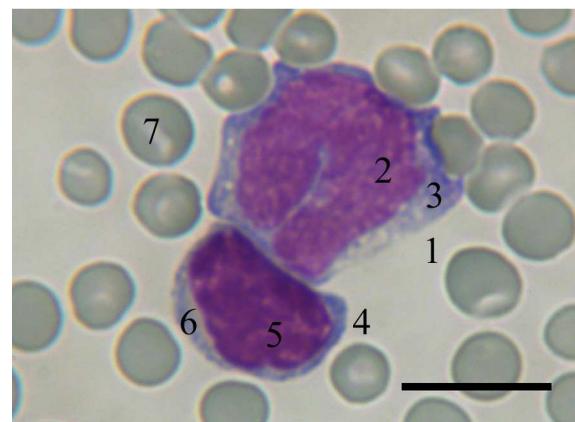


Abbildung IV-10: Monozyt und Lymphozyt, Giemsa-Färbung (Schaf, w, 3 Jahre)

Der große, hufeisenförmige Kern (2) des Monozyten (1) erscheint im Gegensatz zu dem Kern (5) des Lymphozyten (4) heller und weist eine aufgelockerte Struktur auf.
 3 = Zytoplasma des Monozyten,
 6 = Zytoplasma des Lymphozyten,
 7 = Erythrozyt, SB = 10 µm

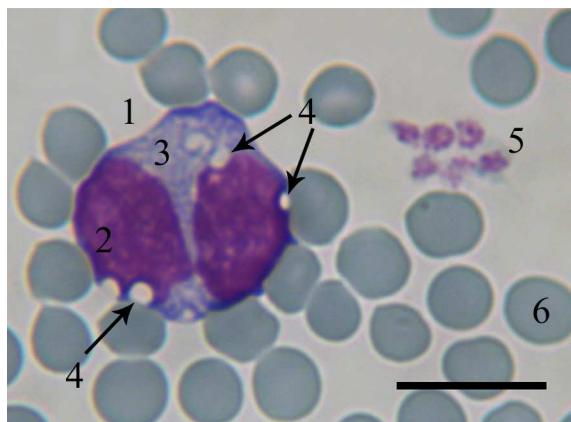


Abbildung IV-11: Monozyt, Giemsa-Färbung (Schaf, w, 6 Jahre)

Der Zellkern (2) dieses Monozyten (1) ist gelappt. Das basophile Zytoplasma (3) enthält mehrere Vakuolen (4).

5 = Thrombozyten, 6= Erythrozyt,
SB = 10 μ m

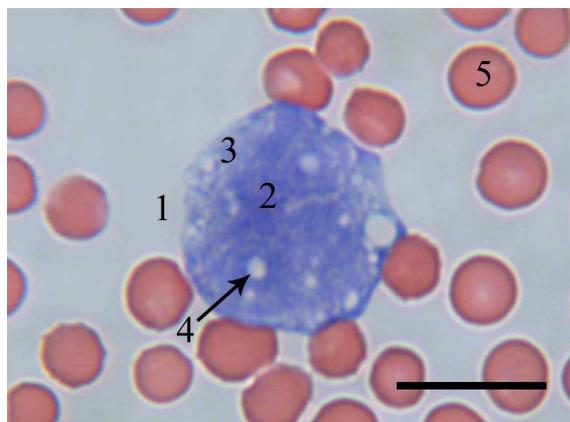


Abbildung IV-12: Monozyt, Pappenheim-Färbung (Schaf, w, 1 Jahr)

Bei diesem Monozyten (1) scheint sogar der Zellkern (2) neben dem Zytoplasma (3) Vakuolen (4) zu enthalten.

5 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

2.1.5 Neutrophile Granulozyten

Auch die neutrophilen Granulozyten sind in jedem Präparat in großer Anzahl zu finden. Sie messen im Durchschnitt 12,5 μ m, wobei Größen von 10,9 - 14 μ m vorkommen. Sie weisen eine runde bis ovale Form auf und besitzen eine glatte Oberfläche. Je nach Morphologie des Zellkernes lassen sich verschiedene Reifungsformen unterscheiden, nämlich die unreifen, stabkernigen von den reifen, segmentkernigen Granulozyten. Die in den Ausstrichen sehr selten vorkommenden, stabkernigen Granulozyten besitzen einen länglichen, unsegmentierten, meist stark gebogenen Kern (vgl. Abb. IV-15). Der Kern der überwiegend auftretenden, segmentkernigen Granulozyten ist in mehrere, unterschiedlich große Abschnitte unterteilt (vgl. Abb. IV-13, IV-16) und zudem oft mehrfach gewunden und verschlungen. Bei manchen Zellen sind zwischen den Segmenten kleine, dünne Chromatinfäden erkennbar, welche die einzelnen Kernabschnitte miteinander verbinden (vgl. Abb. IV-13, IV-16). In vielen Kernbereichen erscheint das Chromatin verdichtet bzw. geklumpt (vgl. Abb. IV-15), wobei in direkter Umgebung hellere Bereiche beobachtet werden können. Ein so genannter „drum-stick“ kann in keinem der untersuchten Präparate bei den Kernen der neutrophilen Granulozyten weiblicher Tiere sicher identifiziert werden. Das Zytoplasma ist reichlich vorhanden (vgl. Abb. IV-13) und sowohl bei den stabkernigen als auch bei den segmentkernigen Granulozyten sind dort sehr feine Granula zu erkennen (vgl. Abb. IV-13, IV-14, IV-15, IV-16, IV-17). Sie kommen zahlreich vor, sind diffus in der Zelle verteilt und können teilweise auch den Zellkern überlagern (vgl. Abb. IV-17). Je nach Färbung können die neutrophilen Granula mehr oder weniger deutlich identifiziert werden. Am besten gelingt deren

Darstellung mit der May-Grünwald-Färbung (vgl. Abb. IV-17). Bei der Diff-Quick- (vgl. Abb. IV-13, IV-14) und der Pappenheim-Färbung (vgl. Abb. IV-16) lassen sich diese jedoch auch gut erkennen. Die Anfärbungen von Zellkern, Zytoplasma und Granula der neutrophilen Granulozyten mit den verschiedenen Methoden ist in Tabelle IV.7 zusammengefasst.

Tabelle IV.7: Übersichtsfärbungen der neutrophilen Granulozyten

	Zellkern	Zytoplasma	Granula
Diff-Quick	dunkelviolett	weiß-grau	rosa bis violett
Giemsa	rot-violett	weiß-grau	rosa bis violett
May-Grünwald	blau-violett	weiß-grau	rötlich bis violett
Pappenheim	blau-violett	zartes rosa	hellrot
Sirius Red	blau	rosa	rot
Toluidinblau	blau-violett	grau-blau	zartes blau

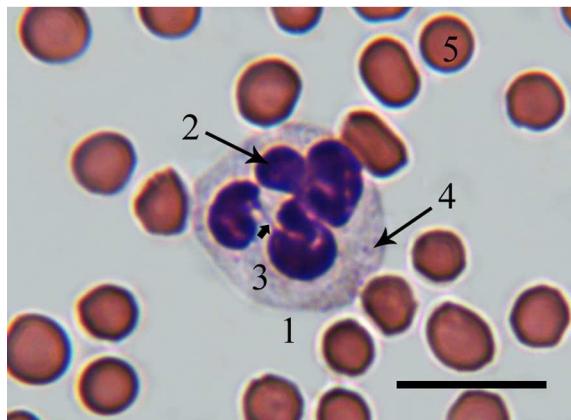


Abbildung IV-13: Neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung (Schaf, w, 1 Jahr)

Der Kern (2) des neutrophilen Granulozyten (1) ist segmentiert, wobei ein dünner Chromatinfaden (kleiner Pfeil) zwischen zwei Segmenten zu sehen ist. Das reichlich vorhandene Zytoplasma (3) enthält zahlreiche, violette Granula (4).
5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

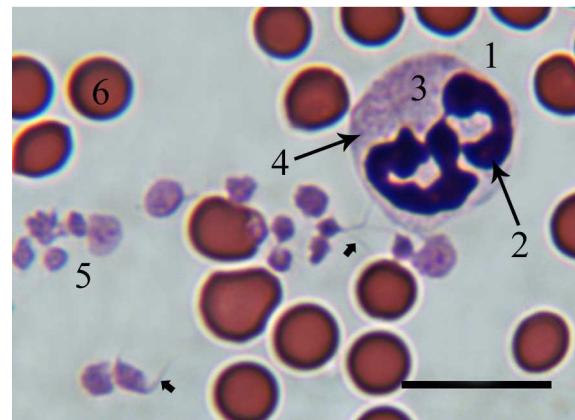


Abbildung IV-14: Neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung (Schaf, m, 6 Jahre)

Der Zellkern (2) des neutrophilen Granulozyten (1) wirkt dicht und kompakt. Die Granula (4) im Zytoplasma (3) sind hier etwas deutlicher zu erkennen. Die Thrombozyten (5) tragen teilweise fadenförmige Zellausläufer (kleine Pfeile).
6 = Erythrozyt, SB = 10 µm



Abbildung IV-15: Neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung (Schaf, w, 3,5 Jahre)

Dieser neutrophile Granulozyt (1) weist einen unsegmentierten, stabförmigen Kern (2) auf. Das Chromatin wirkt teilweise verdichtet bzw. geklumpt. Im Zytoplasma (3) sind die Granula (4) nur undeutlich zu erkennen.
 5 = Thrombozyten, 6 = Erythrozyt,
 SB = 10 µm

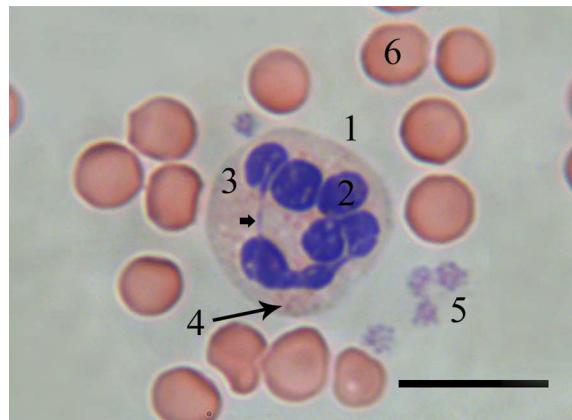


Abbildung IV-16: Neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Der Kern (2) des neutrophilen Granulozyten (1) ist stark segmentiert. Ein dünner Chromatinfaden (kleiner Pfeil) durchspannt das Zytoplasma (3) und verbindet zwei Kernsegmente. Die feinen Granula (4) stellen sich hellrot dar.
 5 = Thrombozyten, 6 = Erythrozyt,
 SB = 10 µm

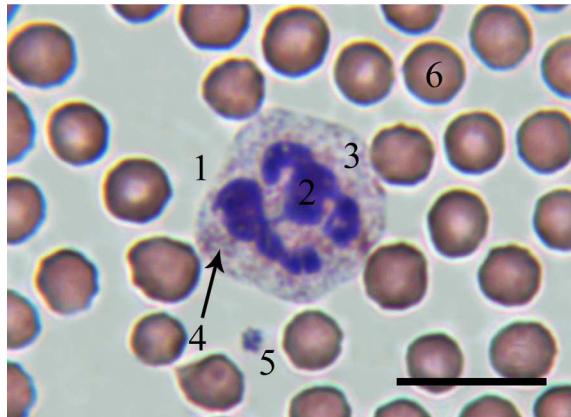


Abbildung IV-17: Neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung (Schaf, w, 6 Jahre)

Die Granula (4) im Zytoplasma (3) des neutrophilen Granulozyten (1) lassen sich bei dieser Färbung besonders deutlich erkennen und überlagern teilweise sogar den Zellkern (2).
 5 = Thrombozyt, 6 = Erythrozyt,
 SB = 10 µm

2.1.6 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten kommen seltener vor als die neutrophilen Granulozyten, können aber in jedem Blutausstrich gefunden werden. Sie stellen sich ebenso als runde (vgl. Abb. IV-21) bis ovale Zellen mit einer glatten Oberfläche dar, sind jedoch mit einem Durchmesser von durchschnittlich 13,5 µm größer als die neutrophilen Granulozyten der Schafe. Die Größe der Zellen reicht bei den untersuchten Schafen von 12 - 15 µm. Nicht selten zeigen sie einen gelappten Kern (vgl. Abb. IV-20) mit Brillen- oder Hantelform, häufig erscheint er aber auch gewunden, segmentiert oder polymorph. Die Kernabschnitte der eosinophilen Granulozyten wirken im Vergleich zu den länglichen und schmalen Segmenten der neutrophilen Granulozyten rundlicher bzw. kugeliger (vgl. Abb. IV-20). Das Chromatin erscheint teilweise geklumpt und ist dunkel gefärbt (vgl. Abb. IV-18). Die relativ großen, rot gefärbten, runden bis ovalen Granula (vgl. Abb. IV-18, IV-19, IV-20, IV-21) füllen das basophil erscheinende Zytoplasma (vgl. Abb. IV-18, IV-19) bis auf wenige periphere Bereiche meist gänzlich aus und bedecken sehr oft den Kern (vgl. Abb. IV-19, IV-20, IV-21). Die Anfärbungen von Zellkern, Zytoplasma und Granula der eosinophilen Granulozyten mit den verschiedenen Methoden ist in Tabelle IV.8 zusammengefasst.

Tabelle IV.8: Übersichtsfärbungen der eosinophilen Granulozyten

	Zellkern	Zytoplasma	Granula
Diff-Quick	dunkelviolett	weiß-grau bis hellviolett	rot-orange
Giemsa	rot-violett	weiß-grau bis hellblau	hellrot-orange
May-Grünwald	blau-violett	weiß-grau bis hellblau	dunkelrot
Pappenheim	blau	weiß-grau bis hellblau	rot
Sirius Red	blau	weiß-grau bis hellblau	rot
Toluidinblau	blau	grau-blau	hellgrau

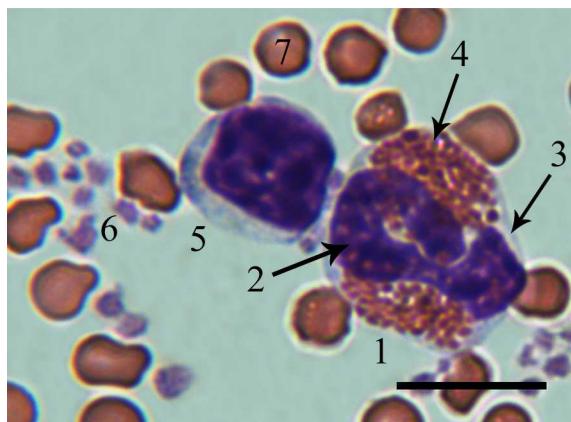


Abbildung IV-18: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung (Schaf, w, 1 Jahr)

Der Kern (2) des eosinophilen Granulozyten (1) erscheint dunkel und kompakt. Das leicht basophile Zytoplasma (3) enthält zahlreiche rote Granula (4).
 5 = Lymphozyt, 6 = Thrombozyten,
 7 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

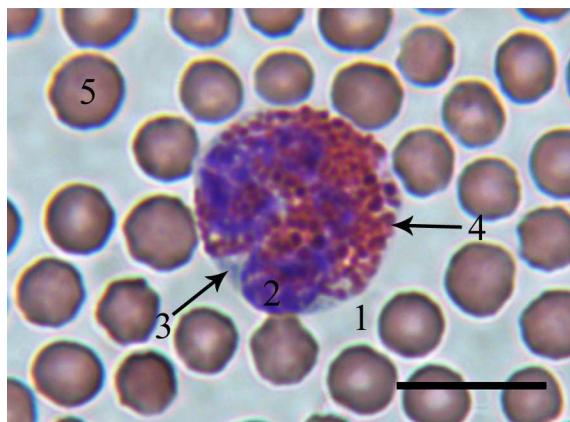


Abbildung IV-19: Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung (Schaf, w, 6 Jahre)

Die Granula (4) des eosinophilen Granulozyten (1) sind größer als die neutrophilen Granula und überlagern zum Teil den Zellkern (2). Granulafreie Regionen lassen die Basophilie des Zytoplasmas (3) erkennen.
 5 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

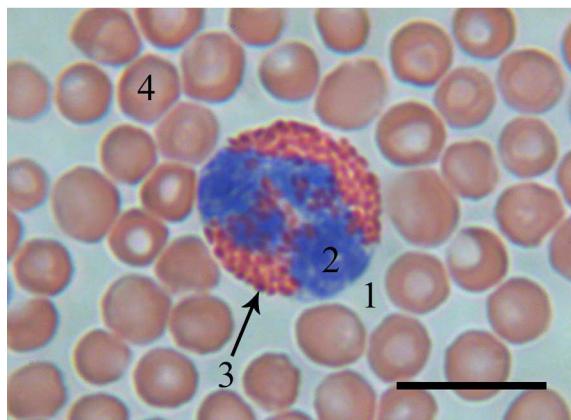


Abbildung IV-20: Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Dieser eosinophile Granulozyt (1) besitzt einen gelappten Kern (2) mit rundlichen bzw. kugeligen Segmenten, die teilweise von den eosinophilen Granula (3) bedeckt werden.
 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

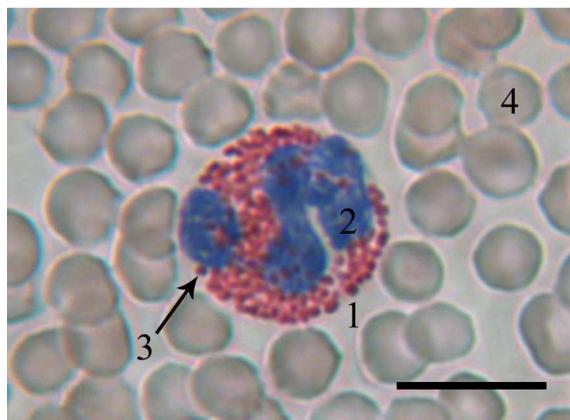


Abbildung IV-21: Eosinophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung (Schaf, w, 5 Jahre)

Die Gestalt des eosinophilen Granulozyten (1) ist rund. Die Granula (3) stellen sich bei dieser Färbung in einem sehr kräftigen Rot dar und bedecken teilweise den Zellkern (2).
 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

2.1.7 Basophile Granulozyten

Aufgrund des geringen Vorkommens der basophilen Granulozyten im Blut der Schafe können diese nur bei sehr wenigen Ausstrichen identifiziert werden. Lediglich bei der May-Grünwald-

(vgl. Abb. IV-22) und der Toluidinblau-Färbung (vgl. Abb. IV-23) sind einzelne Zellen zu beobachten. Auch sie präsentieren sich als runde bis ovale Zellen und sind mit einem Durchmesser von durchschnittlich $10,6 \mu\text{m}$ die kleinsten Granulozyten. Bei den wenigen gefundenen basophilen Granulozyten kann der Kern nicht deutlich vom Zytoplasma abgegrenzt werden. Im Zytoplasma sind zahlreiche, dunkle, intensiv gefärbte Granula verteilt (vgl. Abb. IV-22, IV-23). Bei der Toluidinblau-Färbung ist eine deutliche Metachromasie der basophilen Granula zu sehen, da diese sich violett anstatt blau anfärben (vgl. Abb. IV-23). Die Granula haben eine runde Form und bedecken zum Teil den Zellkern (vgl. Abb. IV-22, IV-23). Die Anfärbungen von Zellkern, Zytoplasma und Granula der basophilen Granulozyten sind in Tabelle IV.9 zusammengefasst.

Tabelle IV.9: Übersichtsfärbungen der basophilen Granulozyten

	Zellkern	Zytoplasma	Granula
Diff-Quick	-	-	-
Giemsa	-	-	-
May-Grünwald	blau	blau	dunkelblau-violett
Pappenheim	-	-	-
Sirius Red	-	-	-
Toluidinblau	blau	blau	dunkelviolett

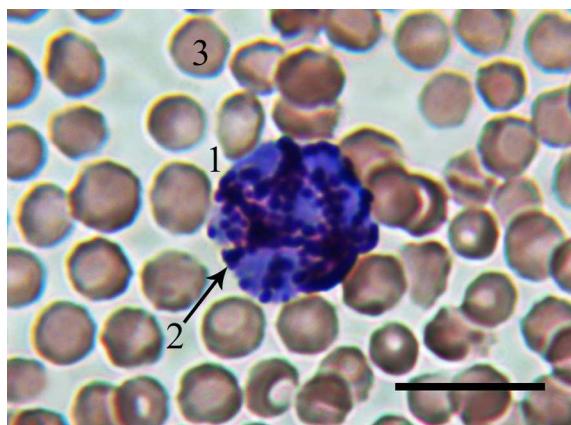


Abbildung IV-22: Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung (Schaf, w, 1 Jahr)

Der basophile Granulozyt (1) ist der kleinste unter den Granulozyten. Die basophilen Granula (2) färben sich dunkelblau-violett an. 3 = Erythrozyt, SB = $10 \mu\text{m}$

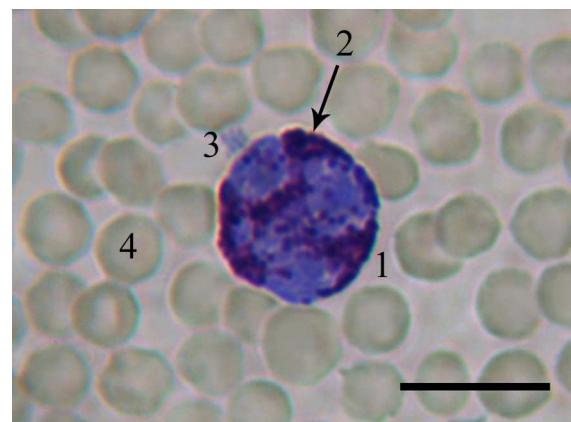


Abbildung IV-23: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung (Schaf, w, 6 Jahre)

Die Granula (2) des basophilen Granulozyten (1) färben sich metachromatisch (violett) an. 3 = Thrombozyt, 4 = Erythrozyt, SB = $10 \mu\text{m}$

2.2 Substrathistochemische Färbungen

Die Blutausstriche der Schafe wurden zwei verschiedenen lichtmikroskopischen Methoden, der Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Reaktion und der Alcianblau-Färbung, zum Nachweis von Kohlenhydraten unterzogen. Die Anfärbung mit Alcianblau erfolgte bei zwei verschiedenen pH-Werten, nämlich bei pH 1,0 und pH 2,5. Sowohl für die PAS-Reaktion als auch für die Alcianblau-Färbung wurde eine Tabelle mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse erstellt. Dabei wurde zwischen keiner Reaktion (0), einer fraglichen Reaktion ((+)), einer schwach positiven (+), einer deutlich positiven (++) und einer stark positiven (+++) Reaktion unterschieden. Zusätzlich wurden die Farbe des Reaktionsprodukts, dessen Lokalisation und die Farbe des Zellkernes aufgeführt. Basophile Granulozyten wurden in keinem der untersuchten Präparate gefunden.

2.2.1 Periodic-Acid-Schiff-Reaktion

Eine deutlich positive PAS-Reaktion ist nur bei den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten zu beobachten. Die Thrombozyten zeigen entweder keinen oder nur ein sehr schwachen Reaktionsausfall, der zu einer rosafarbenen Anfärbung der Zelle führt (vgl. Abb. IV-26). Die Lymphozyten reagieren überwiegend negativ. Im Falle einer positiven Reaktion lässt sich jedoch eine leichte, diffuse, rosafarbene Anfärbung des Zytosplasmas erkennen (vgl. Abb. IV-24). Bei den neutrophilen Granulozyten kann bei allen Zellen eine stark positive PAS-Reaktion beobachtet werden. In den meisten Zellen kommt es zu einer diffusen, rosafarbenen Anfärbung des ganzen Zytosplasmas, in dem zudem mehrere, grobe, pinkfarbene Reaktionsprodukte verschiedener Größe ungleichmäßig verteilt sind. Zusätzlich ist eine granuläre Reaktion zu beobachten (vgl. Abb. IV-25, IV-26). Die eosinophilen Granulozyten zeigen im Gegensatz zu den neutrophilen eine weitaus schwächere PAS-Reaktion. Das Zytosplasma färbt sich intergranulär meist nur in einem zarten Rosa an, die bei den neutrophilen Granulozyten beobachteten, fokalen, kräftig pinkfarbenen Reaktionsprodukte stellen sich deutlich schwächer dar und die eosinophilen Granula zeigen keine Reaktion (vgl. Abb. IV-27). Die Erythrozyten (vgl. Abb. IV-24) und Monozyten reagieren negativ, deren Zytosplasma stellt sich hellgrau bzw. grau-blau dar. Die Ergebnisse der Periodic-Acid-Schiff-Reaktion bei den verschiedenen Zellen sind in Tabelle IV.10 zusammengefasst.

Tabelle IV.10: Periodic-Acid-Schiff-Reaktion

	Reaktion	Anfärbung	Lokalisation	Farbe Zellkern
Erythrozyten	0	-	-	-
Thrombozyten	0 - +	rosa	diffus	-
Lymphozyten	0 - +	rosa	diffus	blau-violett
Monozyten	0	-	-	blau-violett
Neutrophile Granulozyten	+++	rosa bis pink	diffus/fokal/granulär	blau-violett
Eosinophile Granulozyten	0 - ++	rosa bis pink	intergranulär/fokal	blau-violett
Basophile Granulozyten	-	-	-	-

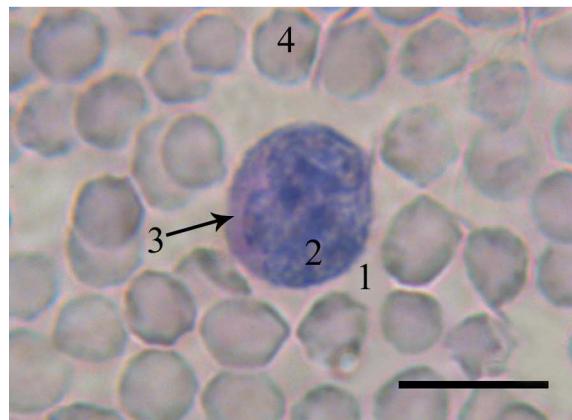


Abbildung IV-24: Lymphozyt, PAS-Reaktion (Schaf, w, 6 Jahre)

Im Zytosplasma (3) des Lymphozyten (1) lässt sich eine leichte, homogene, rosa-farbene Anfärbung erkennen. Die Erythrozyten (4) zeigen keine Reaktion.
2 = Zellkern, SB = 10 µm



Abbildung IV-25: Neutrophiler Granulozyt, PAS-Reaktion (Schaf, w, 1 Jahr)

Bei dem neutrophilen Granulozyten (1) zeigt sich eine homogene, rosa-farbene Anfärbung des Zytosplasmas (3), welches zudem grobe, pink-farbene Reaktionsprodukte (4) enthält.
5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

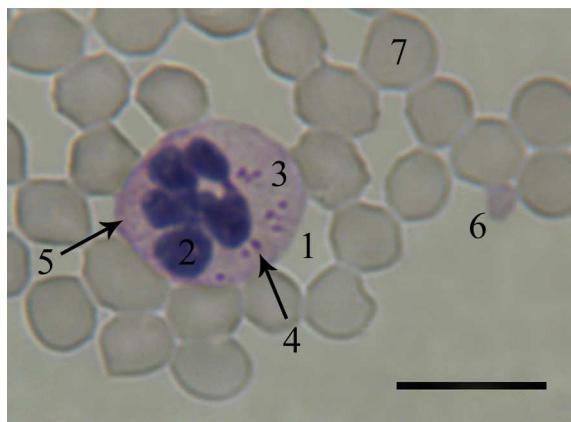


Abbildung IV-26: Neutrophiler Granulozyt, PAS-Reaktion (Schaf, w, 3 Jahre)

Im Zytoplasma (3) dieses neutrophilen Granulozyten (1) lässt sich neben mehreren, rundlichen Reaktionsprodukten (4) eine feine Granulation (5) erkennen. Der Thrombozyt (6) reagiert in Form einer rosafarbenen Anfärbung nur leicht positiv.
 2 = Zellkern, 7 = Erythrozyt, SB = 10 µm

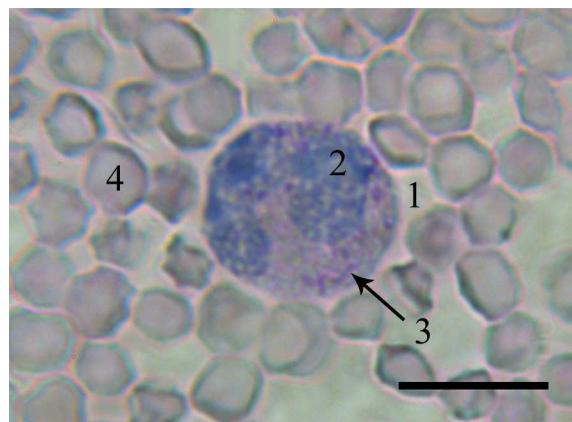


Abbildung IV-27: Eosinophiler Granulozyt, PAS-Reaktion (Schaf, w, 1 Jahr)

Der eosinophile Granulozyt (1) zeigt eine diffuse, intergranuläre Anfärbung. Zudem sind mehrere, rundliche Reaktionsprodukte (3) ungleichmäßig in der Zelle verteilt. Die eosinophilen Granula reagieren negativ.
 2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 µm

2.2.2 Alcianblau-Färbung

Bei einem pH-Wert von 1,0 kann nur bei den Thrombozyten eine deutliche Anfärbung mit Alcianblau beobachtet werden (vgl. Abb. IV-28). Alle anderen myeloischen und lymphatischen Zellen reagieren negativ und stellen sich weiß bis gräulich dar.

Bei einem pH-Wert von 2,5 zeigen nur die Thrombozyten und die neutrophilen Granulozyten eine eindeutige Anfärbung mit Alcianblau. Die Thrombozyten lassen stets eine starke, diffuse, türkisblaue Färbung erkennen (vgl. Abb. IV-29, IV-30). Die neutrophilen Granulozyten reagieren mit einem granulären Muster ebenfalls immer stark positiv (vgl. Abb. IV-30). Bei den eosinophilen Granulozyten kann selten eine positive Reaktion durch eine intergranuläre, diffuse Anfärbung zwischen den ungefärbten, weißen Granula vermutet werden. In den meisten Fällen reagieren sie jedoch negativ (vgl. Abb. IV-31). Die Erythrozyten, die Lymphozyten (vgl. Abb. IV-29) und die Monozyten lassen sich auch bei einem pH-Wert von 2,5 nicht mit Alcianblau anfärben, das Zytoplasma erscheint hier ebenfalls weiß bis gräulich. Die Ergebnisse der Alcianblau-Färbung bei den verschiedenen Zellen sind in Tabelle IV.11 zusammengefasst.

Tabelle IV.11: Alcianblau-Färbung pH 2,5

	Reaktion	Anfärbung	Lokalisation	Farbe Zellkern
Erythrozyten	0	-	-	-
Thrombozyten	+++	türkis-blau	diffus	-
Lymphozyten	0	-	-	-
Monozyten	0	-	-	rosa-rot
Neutrophile Granulozyten	+++	türkis-blau	granulär	rosa-rot
Eosinophile Granulozyten	0 - (+)	bläulich	intergranulär	rosa-rot
Basophile Granulozyten	-	-	-	-



Abbildung IV-28: Thrombozyten und Lymphozyt, Alcianblau-Färbung pH 1,0 (Schaf, w, 3 Jahre)

Die Thrombozyten (1) lassen sich bei einem pH-Wert von 1,0 mit Alcianblau anfärben. Der Lymphozyt (2) reagiert negativ. SB = 10 µm

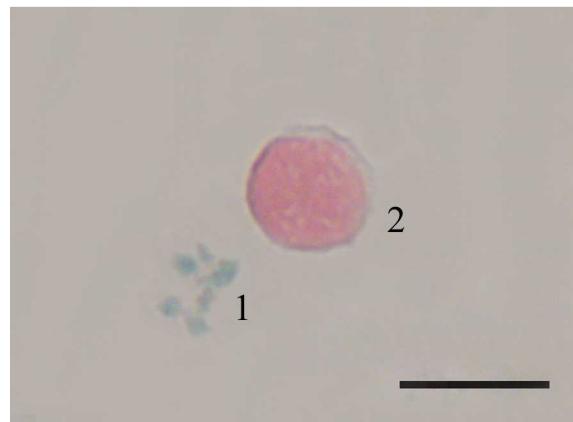


Abbildung IV-29: Thrombozyten und Lymphozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5 (Schaf, w, 3 Jahre)

Die Thrombozyten (1) stellen sich blau dar. Der Lymphozyt (2) zeigt auch bei einem pH-Wert von 2,5 keine Anfärbung. SB = 10 µm



Abbildung IV-30: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5 (Schaf, w, 3 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des neutrophilen Granulozyten (1) ist eine granuläre, türkisblaue Anfärbung zu sehen. Der Thrombozyt (4) stellt sich ebenfalls blau dar.
2 = Zellkern, SB = 10 µm



Abbildung IV-31: Eosinophile Granulozyten, Alcianblau-Färbung pH 2,5 (Schaf, w, 6 Jahre)

Weder das Zytoplasma noch die Granula der eosinophilen Granulozyten zeigen eine Anfärbung mit Alcianblau.
SB = 10 µm

2.3 Enzymhistochemische Färbungen

Es wurden jeweils zehn frische Blutausstriche hinsichtlich der verschiedenen Enzymaktivitäten untersucht. Für jedes Enzym wurde eine Tabelle mit einer Zusammenfassung der Enzymaktivität erstellt. Dabei wurde zwischen keiner Reaktion (0), einer fraglichen Reaktion ((+)), einer schwach positiven (+), einer deutlich positiven (++) und einer stark positiven (+++) Reaktion unterschieden. Zusätzlich wurden die Farbe des Reaktionsprodukts und die Lokalisation der Enzymaktivität berücksichtigt. Basophile Granulozyten wurden in keinem der untersuchten Präparate gefunden.

2.3.1 Nachweis der sauren Phosphatase

Eine Aktivität der sauren Phosphatase kann eindeutig in den Lymphozyten, den Monozyten, den neutrophilen und den eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden, jedoch reagieren nicht alle Zellen positiv und die Intensität der positiven Reaktion variiert teilweise stark. Die Lymphozyten weisen meist eine mittlere bis starke Enzymaktivität auf, sind jedoch auch oft negativ. Die positive Reaktion ist durch ein bis mehrere, kräftig rote Reaktionsprodukte im Zytoplasma gekennzeichnet, die entweder verteilt im gesamten Zytoplasma vorliegen oder sich zusammen gelagert in einem bestimmten Bereich der Zelle befinden (vgl. Abb. IV-32). Bei den

Monozyten fällt die Reaktion etwas schwächer und uneinheitlicher aus als bei den Lymphozyten, jedoch weisen alle Zellen eine Enzymaktivität auf. Sie zeigen zumeist eine diffuse, rote Anfärbung im Bereich der Kerninvagination (vgl. Abb. IV-33), teilweise in Verbindung mit einer leichten Granulation. Bei den Granulozyten ist die Aktivität der sauren Phosphatase durch granuläre Reaktionsprodukte in der Zelle gekennzeichnet, wobei sich bei beiden Zellarten stets nur ein Teil der Granula anfärbt. Die neutrophilen Granulozyten reagieren größtenteils nur schwach positiv, oft auch negativ. Zumeist sind nur wenige, rot gefärbte Granula im Zytoplasma erkennbar (vgl. Abb. IV-34). In seltenen Fällen stellen sich jedoch auch ganze Abschnitte der Zelle rot dar, wodurch eine strukturelle Zuordnung der Anfärbung unmöglich wird. Die eosinophilen Granulozyten reagieren meist stärker als die neutrophilen Granulozyten. Bei ihnen färbt sich ein größerer Teil der Granula in einem kräftigen Rot an (vgl. Abb. IV-35). Es kann kein eosinophiler Granulozyt ohne eine Enzymaktivität gefunden werden. Bei den Erythrozyten (vgl. Abb. IV-32) und den Thrombozyten (vgl. Abb. IV-34) kann keine Aktivität der sauren Phosphatase nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Enzymaktivität bei den jeweiligen Zellen sind in Tabelle IV.12 zusammengefasst.

Tabelle IV.12: Nachweis der sauren Phosphatase

	Reaktion	Farbe	Lokalisation
Erythrozyten	0	-	-
Thrombozyten	0	-	-
Lymphozyten	0 - +++	rot	fokal/granulär
Monozyten	+ - +++	rot	diffus/granulär
Neutrophile Granulozyten	0 - +++	rot	granulär
Eosinophile Granulozyten	++ - +++	rot	granulär
Basophile Granulozyten	-	-	-

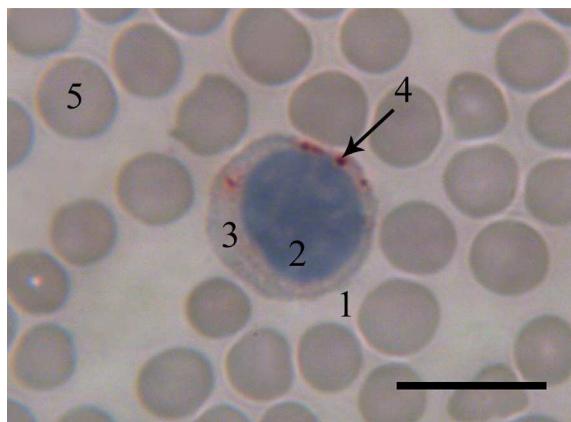


Abbildung IV-32: Lymphozyt, Saure Phosphatase (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) sind kräftig rote, rundliche Reaktionsprodukte (4) zu beobachten. Die Erythrozyten (5) zeigen keine Reaktion.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

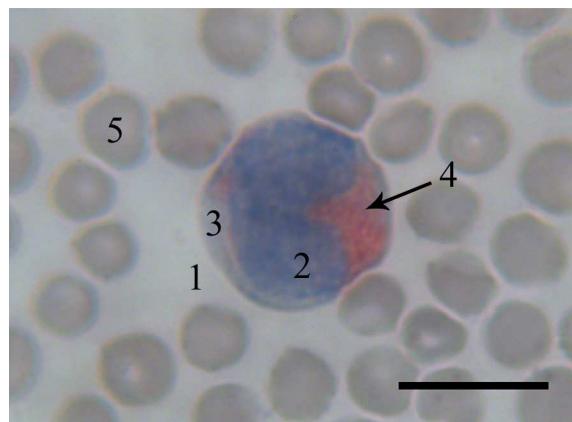


Abbildung IV-33: Monozyt, Saure Phosphatase (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des Monozyten (1) zeigt sich vor allem im Bereich der Kerninvagination ein diffuser Farbstoffniederschlag (4).
2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

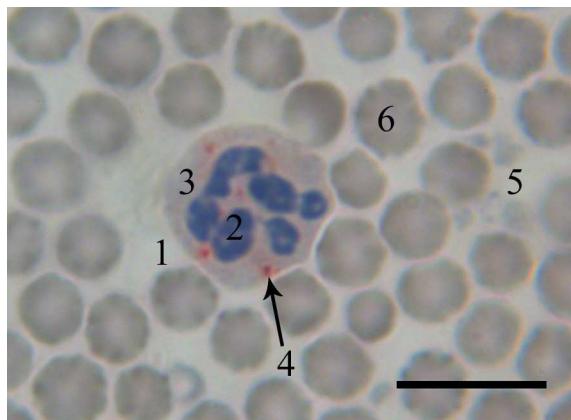


Abbildung IV-34: Neutrophiler Granulozyt, Saure Phosphatase (Schaf, w, 1 Jahr)

Dieser neutrophile Granulozyt (1) zeigt eine schwache bis deutliche Enzymaktivität in Form einzelner, roter Reaktionsprodukte (4) im Zytoplasma (3). Die Thrombozyten (5) reagieren negativ.
2 = Zellkern, 6 = Erythrozyt, SB = 10 µm

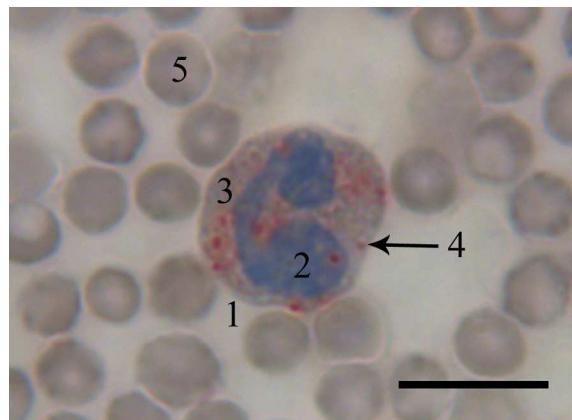


Abbildung IV-35: Eosinophiler Granulozyt, Saure Phosphatase (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Bei dem eosinophilen Granulozyten (1) kommt es zu einer deutlichen granulären Reaktion (4) im Zytoplasma (3). Es färben sich jedoch nicht alle Granula an.
2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

2.3.2 Nachweis der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase kann nur bei den neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Der Großteil dieser Zellen zeigt eine Enzymaktivität, jedoch nicht alle. Zudem variiert die Intensität der Anfärbung bei den positiv reagierenden Zellen stark. Es kann jedoch kein Einfluss

des Reifegrades der Zelle, der sich aus der Segmentierung des Kernes ableiten lässt, auf die Reaktionsstärke vermerkt werden. Ein positiver Reaktionsausfall stellt sich sehr häufig als eine ungleichmäßig starke, braune Färbung des Zytoplasmas dar, die ein mehr oder weniger deutliches, granuläres Muster erkennen lässt (vgl. Abb. IV-36, IV-37). Bei manchen Zellen kommt es zu einer die ganze Zelle ausfüllenden, starken Anfärbung, die teilweise sogar den Kern überdeckt und mehrere dunkelbraune Reaktionsprodukte erkennen lässt. Bei anderen Zellen wiederum sind mehrere braune Farbinseln im Zytosoma (vgl. Abb. IV-37) oder eine sehr feine Granulation zu beobachten. Erythrozyten (vgl. Abb. IV-36), Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten (vgl. Abb. IV-39) und eosinophile Granulozyten (vgl. Abb. IV-38) reagieren negativ. Die Ergebnisse der Enzymaktivität bei den jeweiligen Zellen sind in Tabelle IV.13 zusammengefasst.

Tabelle IV.13: Nachweis der alkalischen Phosphatase

	Reaktion	Farbe	Lokalisation
Erythrozyten	0	-	-
Thrombozyten	0	-	-
Lymphozyten	0	-	-
Monozyten	0	-	-
Neutrophile Granulozyten	0 - +++	braun	diffus/granulär
Eosinophile Granulozyten	0	-	-
Basophile Granulozyten	-	-	-

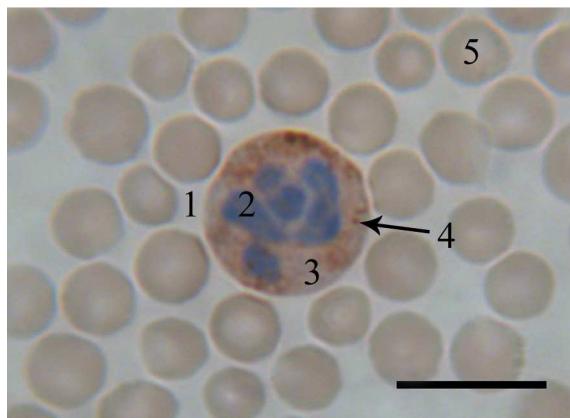


Abbildung IV-36: Neutrophiler Granulozyt, Alkalische Phosphatase (Schaf, m, 5 Jahre)

Im Zytosoma (3) des neutrophilen Granulozyten (1) ist ein brauner, deutlich granulärer Reaktionsausfall (4) zu beobachten. Die Erythrozyten (5) zeigen keine Enzymaktivität.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

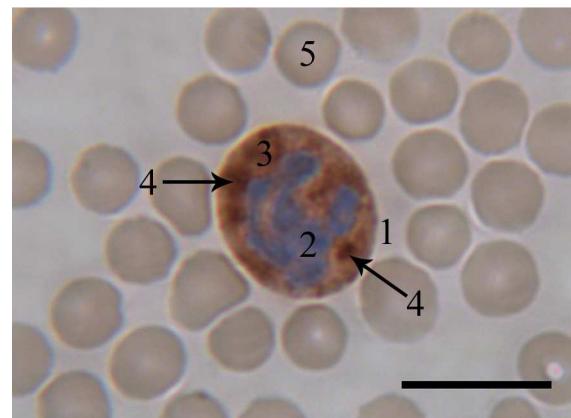


Abbildung IV-37: Neutrophiler Granulozyt, Alkalische Phosphatase (Schaf, m, 5 Jahre)

Im Zytosoma (3) des neutrophilen Granulozyten (1) lassen sich neben einem granulären Muster mehrere, dunkle Farbinseln (4) erkennen.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

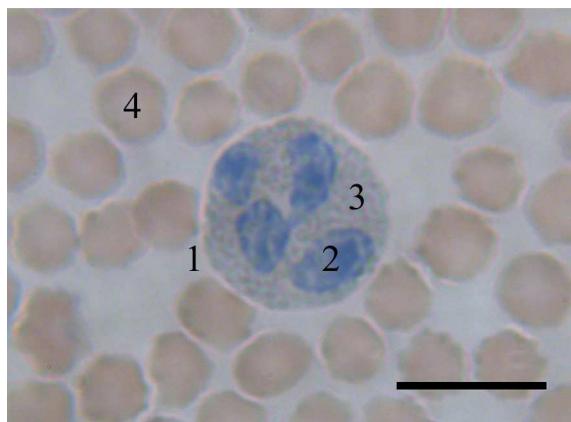


Abbildung IV-38: Eosinphiler Granulozyt, Alkalische Phosphatase (Schaf, m, 7 Jahre)

Die Granula (3) des eosinophilen Granulozyten (1) zeigen keine Aktivität der alkalischen Phosphatase.
2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

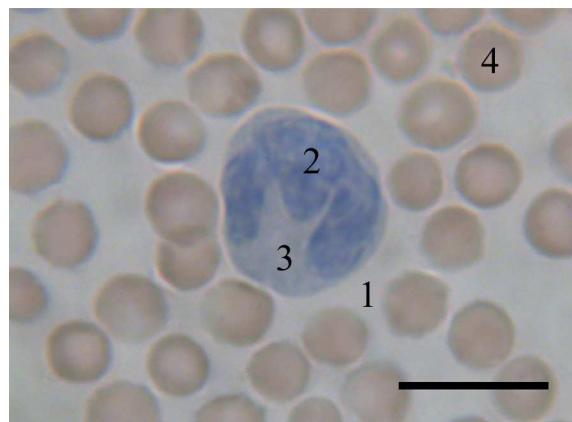


Abbildung IV-39: Monozyt, Alkalische Phosphatase (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Bei dem Monozyten (1) kann keine Enzymaktivität festgestellt werden.
2 = Zellkern, 3 = Zytoplasma, 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

2.3.3 Nachweis der Peroxidase

Eine Aktivität der Peroxidase kann in nahezu allen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, wenn auch in leicht unterschiedlicher Intensität, beobachtet werden. In diesen Zellen zeigt sich ausschließlich eine granuläre Reaktion, die sich über die ganze Zelle erstreckt und teilweise sogar den Kern bedeckt (vgl. Abb. IV-40, IV-41, IV-42). Bei den neutrophilen Granulozyten ist erkennbar, dass sich nicht alle Granula anfärben (vgl. Abb. IV-40). Bei den eosinophilen Granulozyten präsentiert sich der Reaktionsausfall stärker und größer als bei den neutrophilen Granulozyten (vgl. Abb. IV-41). Bei zwei Monozyten der zehn Blutausstriche ist eine Aktivität der Peroxidase in Form eines sehr feinen, staubartigen Niederschlags in der Zelle erkennbar (vgl. Abb. IV-43). Erythrozyten (vgl. Abb. IV-40), Thrombozyten und Lymphozyten (vgl. Abb. IV-42) reagieren stets negativ. Die Ergebnisse der Enzymaktivität bei den jeweiligen Zellen sind in Tabelle IV.14 zusammengefasst.

Tabelle IV.14: Nachweis der Peroxidase

	Reaktion	Farbe	Lokalisation
Erythrozyten	0	-	-
Thrombozyten	0	-	-
Lymphozyten	0	-	-
Monozyten	0 - +	braun	fein granulär
Neutrophile Granulozyten	++ - +++	braun-schwarz	granulär
Eosinophile Granulozyten	+++	braun-schwarz	granulär
Basophile Granulozyten	-	-	-

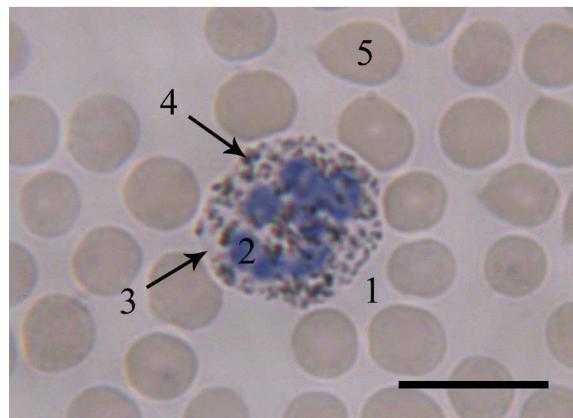


Abbildung IV-40: Neutrophiler Granulozyt, Peroxidase (Schaf, m, 5 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des neutrophilen Granulozyten (1) sind braun-schwarz gefärbte Granula (4) erkennbar, die zum Teil den Zellkern (2) überlagern. Die Erythrozyten (5) reagieren negativ.
SB = 10 µm

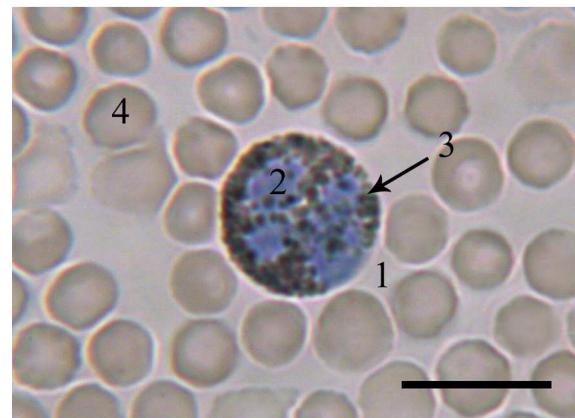


Abbildung IV-41: Eosinophiler Granulozyt, Peroxidase (Schaf, m, 5 Jahre)

Die Granula (3) des eosinophilen Granulozyten (1) zeigen eine starke Peroxidase-Reaktion und bedecken ebenso teilweise den Zellkern (2).
4 = Erythrozyt, SB = 10 µm

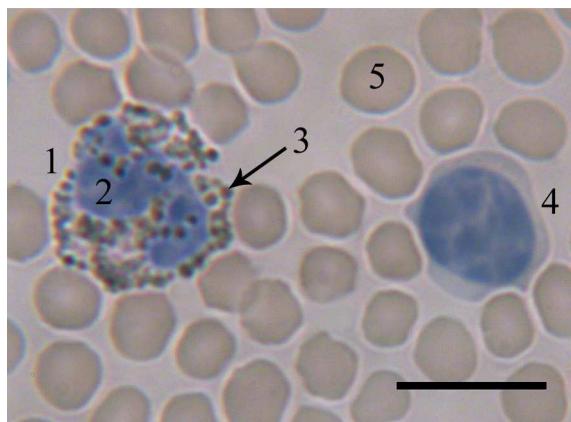


Abbildung IV-42: Eosinphiler Granulozyt und Lymphozyt, Peroxidase (Schaf, w, 1 Jahr)

Der Lymphozyt (4) zeigt im Gegensatz zu den Granula (3) des eosinophilen Granulozyten (1) keine Enzymaktivität.
2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

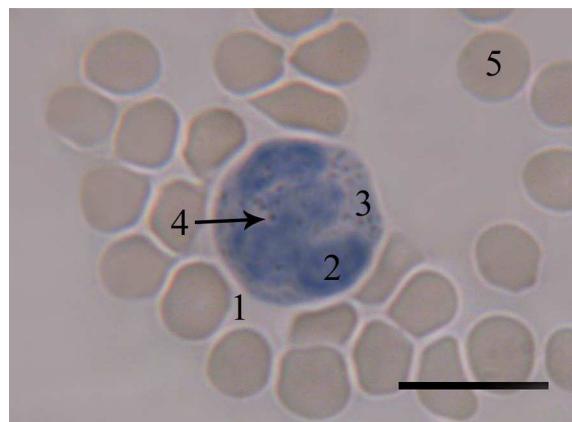


Abbildung IV-43: Monozyt, Peroxidase (Schaf, m, 4 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des Monozyten (1) sind sehr feine, braune, punktförmige Reaktionsprodukte (4) zu sehen.
2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

2.3.4 Nachweis der β -Glucuronidase

Eine Aktivität der β -Glucuronidase kann in Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden, jedoch reagieren nicht alle Zellen positiv. Der Großteil der Lymphozyten zeichnet sich durch eine überwiegend stark positive Reaktion aus. Diese ist durch Vorhandensein ein bis mehrerer, feiner bis grober, meist kräftig roter Reaktionsprodukte im Zytoplasma gekennzeichnet (vgl. Abb. IV-44). Diese liegen entweder verteilt im gesamten Zytoplasmasaum vor oder befinden sich zusammen gelagert an einem Zellpol. Dabei kann nicht selten eine Anfärbung der zytoplasmatischen Granula vermutet werden. Teilweise ist auch eine leicht diffuse Reaktion im Zytoplasma zu sehen. Es werden aber auch Lymphozyten ohne Anfärbung gefunden (vgl. Abb. IV-49). Bei den Monozyten lässt sich vorwiegend eine schwach bis deutlich positive, diffuse Anfärbung der Zelle beobachten. Nicht selten ist jedoch auch eine granuläre Reaktion, vorwiegend im Bereich einer Kerninvagination, erkennbar (vgl. Abb. IV-45). Nur sehr wenige Monozyten zeigen keine Anfärbung. Die neutrophilen Granulozyten weisen größtenteils eine nur schwache, manchmal aber auch keine Enzymaktivität auf. Meistens lässt sich lediglich eine schwache, diffuse Reaktion des Zytosplasmas erkennen (vgl. Abb. IV-46). Bei manchen Zellen kommt es jedoch zusätzlich zu einer Anfärbung eines Teils der Granula in unterschiedlicher Intensität (vgl. Abb. IV-47). Nur selten zeigt sich eine starke, rote Anfärbung der gesamten Zelle, so dass eine strukturelle Zuordnung der Reaktion unmöglich wird. Die eosinophilen Granulozyten zeigen ein ähnliches Muster der Enzymaktivität wie die neutrophilen Granulozyten, die Reaktion ist jedoch in den

meisten Fällen stärker (vgl. Abb. IV-48, IV-49). Erythrozyten (vgl. Abb. IV-44) und Thrombozyten reagieren negativ. Die Ergebnisse der Enzymaktivität bei den jeweiligen Zellen sind in Tabelle IV.15 zusammengefasst.

Tabelle IV.15: Nachweis der β -Glucuronidase

	Reaktion	Farbe	Lokalisation
Erythrozyten	0	-	-
Thrombozyten	0	-	-
Lymphozyten	0 - +++	rot	fokal/granulär/diffus
Monozyten	0 - +++	rot	fokal/granulär/diffus
Neutrophile Granulozyten	0 - +++	rot	diffus/granulär
Eosinophile Granulozyten	0 - +++	rot	diffus/granulär
Basophile Granulozyten	-	-	-



Abbildung IV-44: Lymphozyt, β -Glucuronidase (Schaf, w, 2 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) sind mehrere, kräftig rote Reaktionsprodukte (4) zu sehen. Die Erythrozyten (5) reagieren negativ.

2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

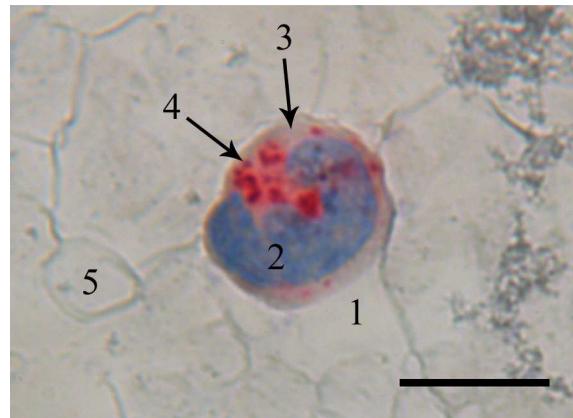


Abbildung IV-45: Monozyt, β -Glucuronidase (Schaf, w, 2 Jahre)

Das Zytoplasma (3) des Monozyten (1) zeigt eine starke granuläre Reaktion (4) im Bereich der Kerninvagination.

2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 μ m



Abbildung IV-46: Neutrophiler Granulozyt, β -Glucuronidase (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Der neutrophile Granulozyt (1) lässt eine schwache, diffuse Anfärbung des Zytoplasmas (3) erkennen. Die neutrophilen Granula zeigen keine Reaktion.
2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

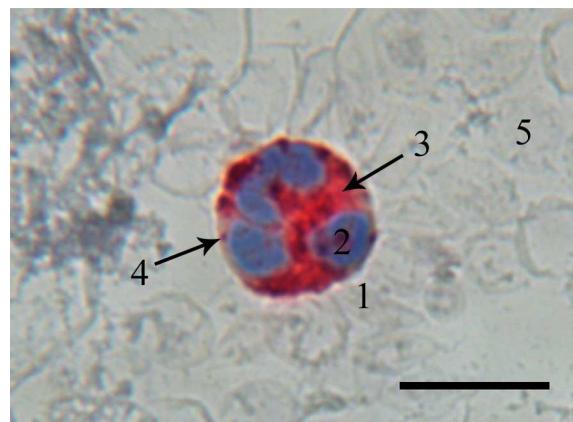


Abbildung IV-47: Neutrophiler Granulozyt, β -Glucuronidase (Schaf, w, 2 Jahre)

Dieser neutrophile Granulozyt (1) hingegen zeigt eine starke Enzymaktivität in Form einer Anfärbung des Zytoplasmas (3), in dem zudem eine granuläre Reaktion (4) erkennbar ist.
2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

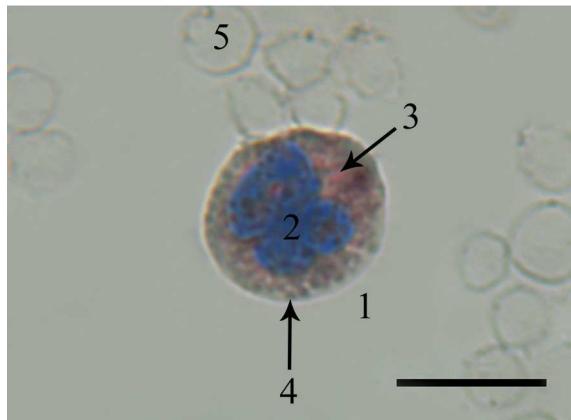


Abbildung IV-48: Eosinophiler Granulozyt, β -Glucuronidase (Schaf, w, 2 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des eosinophilen Granulozyten (1) ist eine schwache, diffuse Anfärbung zu sehen. Die eosinophilen Granula (4) reagieren negativ.
2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 μ m



Abbildung IV-49: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, β -Glucuronidase (Schaf, w, 2 Jahre)

Das Zytoplasma (3) dieses eosinophilen Granulozyten (1) hingegen zeigt eine starke, diffuse Anfärbung. Zusätzlich scheinen einige Granula positiv zu reagieren. Lymphozyt (4) ohne nachweisbare Enzymaktivität.
2 = Zellkern, SB = 10 μ m

2.3.5 Nachweis der α -Naphthyl-Azetat-Esterase

Eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase kann nur bei den Lymphozyten und den Monozyten eindeutig nachgewiesen werden, jedoch reagieren nicht alle Zellen positiv. Die Lymphozyten zeigen überwiegend eine deutlich positive Reaktion, die sich durch eine diffuse, körnige Anfärbung des Zytoplasmas auszeichnet (vgl. Abb. IV-51). Bei manchen Zellen sind zudem ein oder mehrere grobe, dunkelblaue Punkte erkennbar, die entweder im gesamten Zytoplasmasaum verteilt sind oder an einer Kernbucht zusammen gelagert vorliegen (vgl. Abb. IV-50). In fast allen Monozyten lässt sich eine positive Reaktion beobachten, die von einer relativ gleichmäßigen, diffusen, körnigen, blauen Anfärbung des gesamten Zytoplasmas bis hin zu blauen Farbniederschlägen an mehreren Stellen im Bereich der Plasmamembran reicht (vgl. Abb. IV-52). Die neutrophilen Granulozyten reagieren größtenteils negativ (vgl. Abb. IV-54), bei manchen Zellen jedoch kann ein feiner granulärer Niederschlag beobachtet werden (vgl. Abb. IV-53). Bei den eosinophilen Granulozyten färben sich manche Granula bläulich (positive Reaktion) anstatt bräunlich (negative Reaktion) an (vgl. Abb. IV-55). Der Nachweis einer Enzymaktivität bei den Granulozyten ist als nicht ganz sicher zu betrachten. Die Erythrozyten (vgl. Abb. IV-50, IV-51) und Thrombozyten (vgl. Abb. IV-51) zeigen keine Reaktion. Die Ergebnisse der Enzymaktivität bei den jeweiligen Zellen sind in Tabelle IV.16 zusammengefasst.

Tabelle IV.16: Nachweis der α -Naphthyl-Azetat-Esterase

	Reaktion	Farbe	Lokalisation
Erythrozyten	0	-	-
Thrombozyten	0	-	-
Lymphozyten	0 - ++	blau	diffus/fokal
Monozyten	0 - ++	blau	diffus/fokal
Neutrophile Granulozyten	0 - (+)	blau	granulär
Eosinophile Granulozyten	0 - (+)	blau	granulär
Basophile Granulozyten	-	-	-

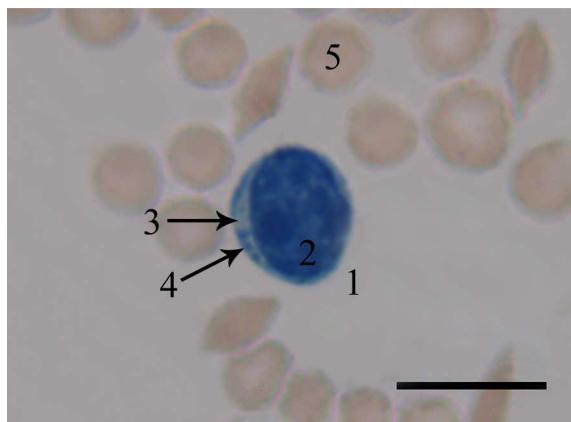


Abbildung IV-50: Lymphozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 2 Jahre)

Im Zytoplasmasaum (3) des Lymphozyten (1) sind dunkelblaue, rundliche Reaktionsprodukte (4) zu sehen. Die Erythrozyten (5) zeigen keine Reaktion.
2 = Zellkern, SB = 10 μ m

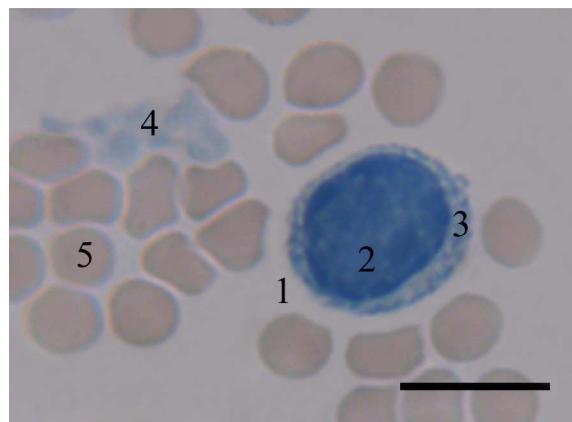


Abbildung IV-51: Lymphozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 3,5 Jahre)

Das gesamte Zytoplasma (3) dieses Lymphozyten (1) zeigt eine diffuse, körnige Anfärbung. Die Thrombozyten (4) und die Erythrozyten (5) reagieren negativ.
2 = Zellkern, SB = 10 μ m

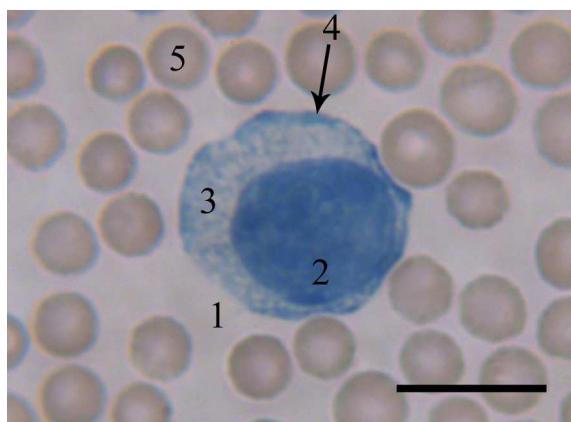


Abbildung IV-52: Monozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 3,5 Jahre)

Neben einer diffusen, körnigen Anfärbung des gesamten Zytoplasmas (3) lassen sich bei dem Monozyten (1) mehrere Farbstoffniederschläge im Bereich der Plasmamembran (4) erkennen.
2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 μ m



Abbildung IV-53: Neutrophiler Granulozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 2 Jahre)

Im Zytoplasma (3) dieses neutrophilen Granulozyten (1) kann ein feiner, granulärer Niederschlag beobachtet werden.
2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

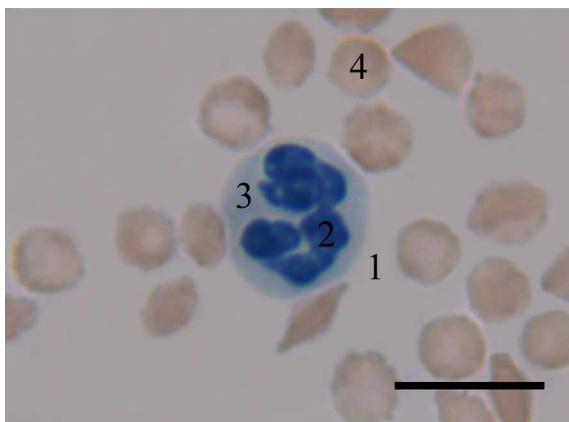


Abbildung IV-54: Neutrophiler Granulozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 2 Jahre)

Bei diesem neutrophilen Granulozyten (1) hingegen zeigt sich keine granuläre Reaktion im Zytoplasma (3).

2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

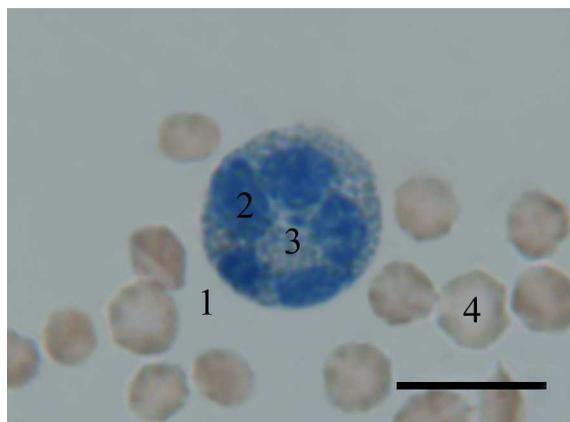


Abbildung IV-55: Eosinophiler Granulozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 2 Jahre)

Manche Granula des eosinophilen Granulozyten (1) scheinen sich bläulich (positive Reaktion) anstatt bräunlich (negative Reaktion) anzufärben.

2 = Zellkern, 3 = Zytoplasma, 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

2.3.6 Nachweis der Naphthol-AS-Azetat-Esterase

Die Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase präsentiert sich im Gegensatz zu derjenigen der α -Naphthyl-Azetat-Esterase etwas stärker. Sie kann beim Schaf bei allen Zellarten des Blutes nachgewiesen werden, wobei in einer Zelllinie jedoch nicht alle Zellen positiv reagieren. Eine deutlich positive Enzymaktivität zeigen nahezu alle Erythrozyten durch meist mehrere, zarte bis grobe, blaue Reaktionsprodukte, die ungleichmäßig in der Zelle verteilt sind (vgl. Abb. IV-56, IV-57, IV-58, IV-59, IV-60, IV-61). Nicht selten lässt sich jedoch eine vorwiegend periphere Lokalisation dieser Reaktionsprodukte erkennen (vgl. Abb. IV-59). Bei einzelnen Thrombozyten kann ebenso ein blauer Farbniederschlag in der Zelle beobachtet werden (vgl. Abb. IV-59). Eine größtenteils deutlich positive Enzymaktivität der Lymphozyten reicht von einer blauen Anfärbung des gesamten Zytoplasmas (vgl. Abb. IV-57) bis zu mehreren, ungleichmäßig im Zytoplasma verteilten, blauen Reaktionsprodukten (vgl. Abb. IV-56, IV-57). Die positive Reaktion der Monozyten zeigt sich ebenfalls in Form einer gleichmäßigen, blauen Anfärbung des Zytoplasmas, die sich jedoch häufig im Bereich der Plasmamembran zu einem dunkleren Kranz verdichtet. Einzelne fokale Reaktionsprodukte sind zusätzlich zu erkennen (vgl. Abb. IV-58). Bei den neutrophilen Granulozyten lässt sich eindeutig ein granuläres Reaktionsmuster erkennen (vgl. Abb. IV-59, IV-60). Bei den eosinophilen Granulozyten hingegen kann eine Anfärbung einzelner Granula nur vermutet werden (vgl. Abb. IV-61). Die Ergebnisse der Enzymaktivität bei den

jeweiligen Zellen sind in Tabelle IV.17 zusammengefasst.

Tabelle IV.17: Nachweis der Naphthol-AS-Azetat-Esterase

	Reaktion	Farbe	Lokalisation
Erythrozyten	0 - ++	blau	diffus
Thrombozyten	0 - +	blau	diffus
Lymphozyten	0 - ++	blau	diffus/fokal
Monozyten	0 - ++	blau	diffus/fokal
Neutrophile Granulozyten	0 - ++	blau	granulär
Eosinophile Granulozyten	0 - (+)	blau	granulär
Basophile Granulozyten	-	-	-

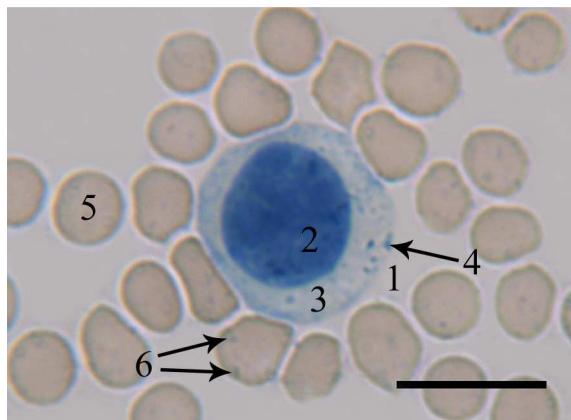


Abbildung IV-56: Lymphozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des Lymphozyten (1) sind mehrere zarte, runde Reaktionsprodukte (4) zu erkennen. Auch die Erythrozyten (5) zeigen ungleichmäßig in der Zelle verteilte Farbniederschläge (6).
 2 = Zellkern, SB = 10 μ m

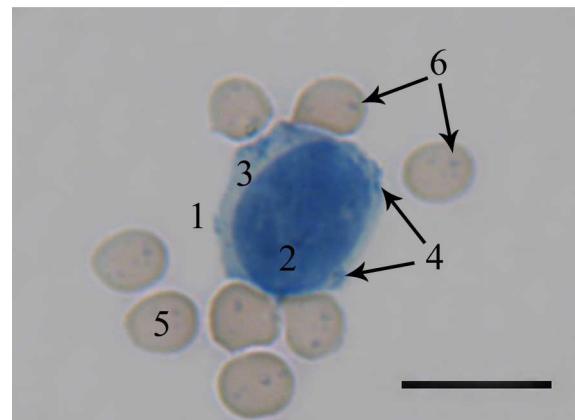


Abbildung IV-57: Lymphozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Die rundlichen Reaktionsprodukte (4) sind im gesamten, blau gefärbten Zytoplasmasaum (3) des Lymphozyten (1) verteilt. Erythrozyten (5) mit punktförmigen Farbniederschlägen (6).
 2 = Zellkern, SB = 10 μ m

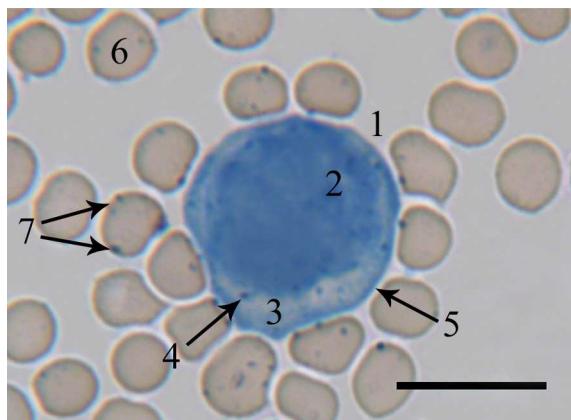


Abbildung IV-58: Monozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Die diffuse, blaue Anfärbung des gesamten Zytoplasmas (3) des Monozyten (1) verdichtet sich im Bereich der Plasmamembran zu einem dunklen Kranz (5). Zudem sind einige, rundliche Reaktionsprodukte (4) in der gesamten Zelle zu erkennen. Erythrozyten (6) mit punktförmigen Farbniederschlägen (7).
2 = Zellkern, SB = 10 µm

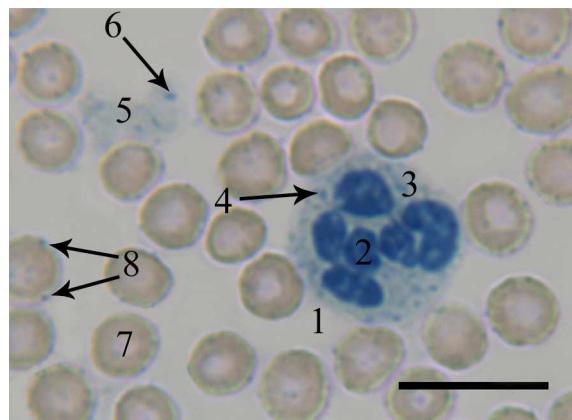


Abbildung IV-59: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des neutrophilen Granulozyten (1) ist ein granulärer Niederschlag (4) zu sehen. Bei den Thrombozyten (5) können punktförmige Reaktionsprodukte (6) beobachtet werden. Erythrozyten (7) mit meist peripheren, punktartigen Farbniederschlägen (8).
2 = Zellkern, SB = 10 µm

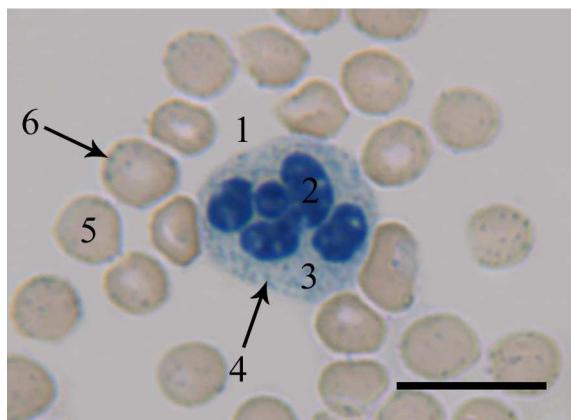


Abbildung IV-60: Neutrophiler Granulozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Bei diesem neutrophilen Granulozyten (1) zeigt sich die granuläre Reaktion (4) im Zytoplasma (3) ebenfalls deutlich. Erythrozyten (5) mit punktförmigen Farbstoffniederschlägen (6).
2 = Zellkern, SB = 10 µm

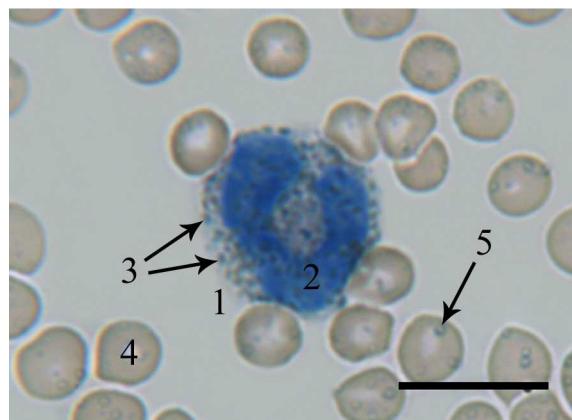


Abbildung IV-61: Eosinophiler Granulozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0 (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Manche Granula (3) des eosinophilen Granulozyten (1) scheinen sich bläulich (positive Reaktion) anstatt bräunlich (negative Reaktion) anzufärben. Erythrozyten (4) mit punktförmigen Reaktionsprodukten (5).
2 = Zellkern, SB = 10 µm

2.3.7 Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase

Der Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase erfolgt bei pH-Wert 7,0. Eine Enzymaktivität kann nur bei den neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Es reagieren nahezu alle Zellen positiv, wenn auch in unterschiedlicher Intensität. Die Enzymaktivität präsentiert sich als eine homogene, blaue Anfärbung des gesamten Zytoplasmas in Verbindung mit einem granulären Farbniederschlag (vgl. Abb. IV-62, IV-63). Bei einem pH-Wert von 5,5 reagieren die neutrophilen Granulozyten negativ (vgl. Abb. IV-64). Alle anderen Zellen zeigen keine Reaktion. Die Ergebnisse der Enzymaktivität bei den jeweiligen Zellen sind in Tabelle IV.18 zusammengefasst.

Tabelle IV.18: Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase

	Reaktion	Farbe	Lokalisation
Erythrozyten	0	-	-
Thrombozyten	0	-	-
Lymphozyten	0	-	-
Monozyten	0	-	-
Neutrophile Granulozyten	+ - +++	blau	diffus/granulär
Eosinophile Granulozyten	0	-	-
Basophile Granulozyten	-	-	-

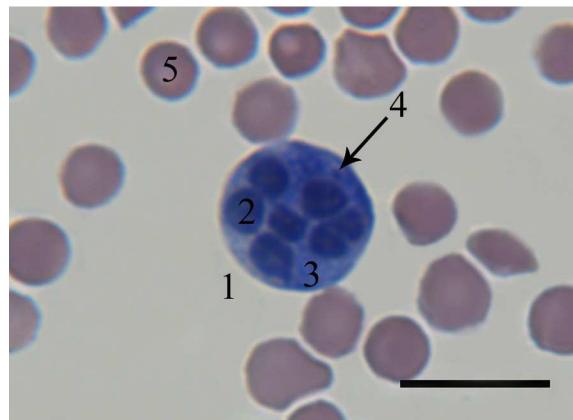


Abbildung IV-62: Neutrophiler Granulozyt, Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase pH 7,0 (Bock, 6 Jahre)

Neben einer homogenen, blauen Anfärbung des Zytoplasmas (3) des neutrophilen Granulozyten (1) zeigt sich ein granulärer Farbniederschlag (4). Die Erythrozyten (5) zeigen keine Enzymaktivität.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

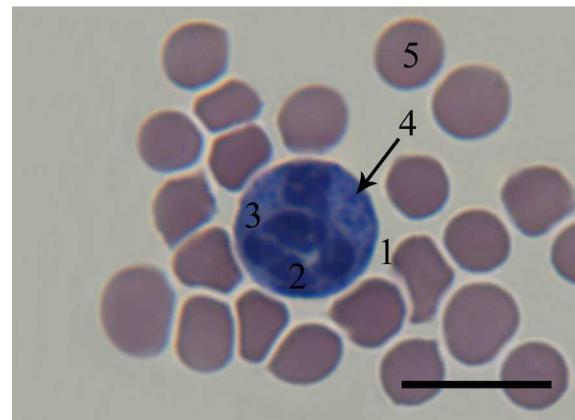


Abbildung IV-63: Neutrophiler Granulozyt, Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase pH 7,0 (Bock, 6 Jahre)

Bei diesem neutrophilen Granulozyten (1) ist die granuläre Reaktion (4) im Zytoplasma (3) noch etwas deutlicher zu erkennen.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

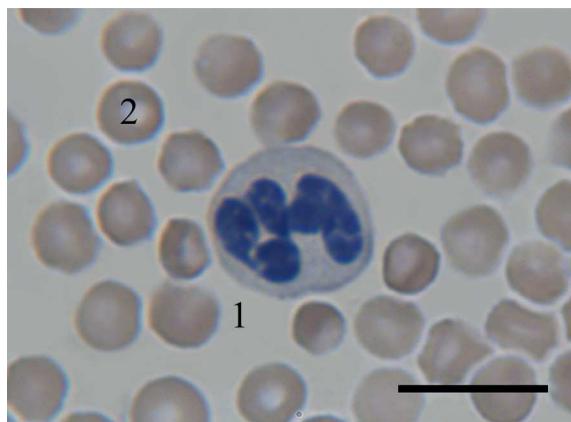


Abbildung IV-64: Neutrophiler Granulozyt, Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase pH 5,5 (Schaf, w, 1 Jahr)

Bei einem pH-Wert von 5,5 lässt sich bei dem neutrophilen Granulozyten (1) keine Enzymaktivität nachweisen.

2 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.1 Erythrozyten

Die Anschnitte der roten Blutkörperchen der Schafe zeigen im Elektronenmikroskop große Unterschiede in ihrer Form und Größe. Sie besitzen eine glatte Zellmembran, die keine Ausstülpungen oder Mikrovilli ausbildet. Das mäßig elektronendichte Zytoplasma, das mit dem relativ elektronendichten Hämoglobin ausgefüllt ist, stellt sich homogen und fein granuliert dar (vgl. Abb. IV-66, IV-67, IV-68, IV-69, IV-70, IV-72, IV-73).

3.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten weisen unterschiedliche Formen auf. Es können runde, ovale und stäbchenförmige Blutplättchen beobachtet werden. Sie sind meist 1 - 2 μ m groß. Die Zellmembran ist in der Regel glatt und stellt sich bei einigen Thrombozyten deutlich dar. Ein Zellkern fehlt. Eine homogene Zytoplasmazone (Hyalomer) umgibt das granulare Zellzentrum (Granulomer). Manche Granula befinden sich jedoch auch in direkter Nähe zur Zellmembran. Morphologisch können zwei verschiedene Granula-Typen unterschieden werden (vgl. Abb. IV-65). Die α -Granula haben eine runde bis ovale Form und zeigen einen relativ homogenen und elektronendichten Inhalt (vgl. Abb. IV-65, IV-67). Sie werden von einer Membran umgeben und sind ca. 0,3 - 0,4 μ m groß. Die so genannten „dense bodies“ sind in den

meisten Fällen 0,2 - 0,3 μm groß und kommen in einer geringeren Anzahl vor. Sie weisen eine klar definierte Membran auf und besitzen einen exzentrisch gelegenen, äußerst elektronendichten, runden Innenkörper, der von der Membran durch einen elektronendurchlässigen Zwischenraum getrennt wird (vgl. Abb. IV-65). Bei manchen Zellen sind im Zytoplasma auch Vesikel (vgl. Abb. IV-65), Mitochondrien und Glykogenpartikel zu sehen.

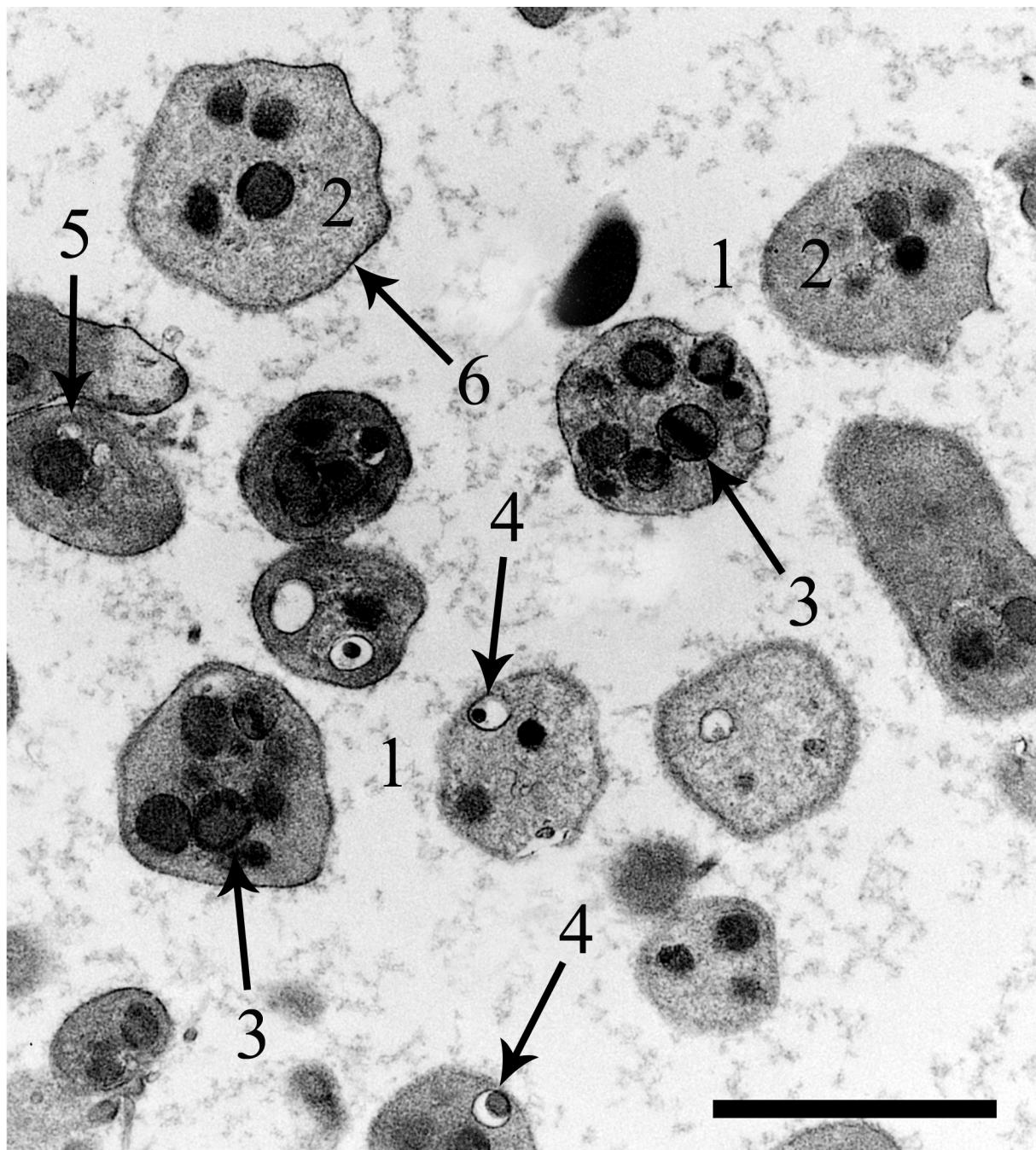


Abbildung IV-65: Ultrastruktur von Thrombozyten (Schaf, w, 3 Jahre)

Bei den Thrombozyten (1) kann die periphere Randzone, das Hyalomer (2), von der granulareichen Zentralzone, dem Granulomer, unterschieden werden. Die α -Granula (3) sind meist rund und relativ elektronendicht. Die dense bodies (4) sind von einer deutlichen Membran umgeben. Ein runder, elektronendichter Innenkörper liegt in einer elektronendurchlässigen Matrix. Weiterhin können Vesikel (5) gefunden werden. Die Zellmembran (6) ist glatt.

SB = 2 μ m

3.3 Lymphozyten

Die Lymphozyten stellen sich als runde (vgl. Abb. IV-66) bis ovale Zellen (vgl. Abb. IV-67) von unterschiedlicher Größe dar. Die Zellmembran ist in der Regel glatt (vgl. Abb. IV-67) und trägt bei manchen Zellen unterschiedlich lange Zytoplasmatausläufer (Pseudopodien) (vgl. Abb. IV-66). Der große Kern weist oft eine runde bis ovale Form auf und liegt entweder zentral oder exzentrisch (vgl. Abb. IV-67) in der Zelle. Bei manchen Lymphozyten weist er unterschiedlich tiefe Einziehungen auf. Das zentral gelegene, locker gepackte, wenig elektronendichte Euchromatin kann deutlich von dem peripher gelegenen, dicht gepackten, elektronendichten Heterochromatin unterschieden werden (vgl. Abb. IV-66, IV-67). Bei den meisten Lymphozyten füllt der Kern die Zelle bis auf einen schmalen Zytoplasmasaum fast vollständig aus (vgl. Abb. IV-66), woraus sich ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis ergibt. Bei größeren Lymphozyten ist deutlich mehr Zytoplasma vorhanden und das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist kleiner. Im insgesamt organellenarmen Zytoplasma befinden sich Mitochondrien (vgl. Abb. IV-66, IV-67), teilweise sind auch kleine Vesikel zu erkennen (vgl. Abb. IV-67). Ein Golgi-Apparat ist nur äußerst selten zu beobachten. Bei einigen Lymphozyten kommen rundliche, elektronendichte Granula im Zytoplasma vor (vgl. Abb. IV-66). Diese sind ca. 0,2 µm groß und befinden sich entweder im Bereich einer Kerninvagination oder liegen verstreut im Zytoplasmasaum vor.

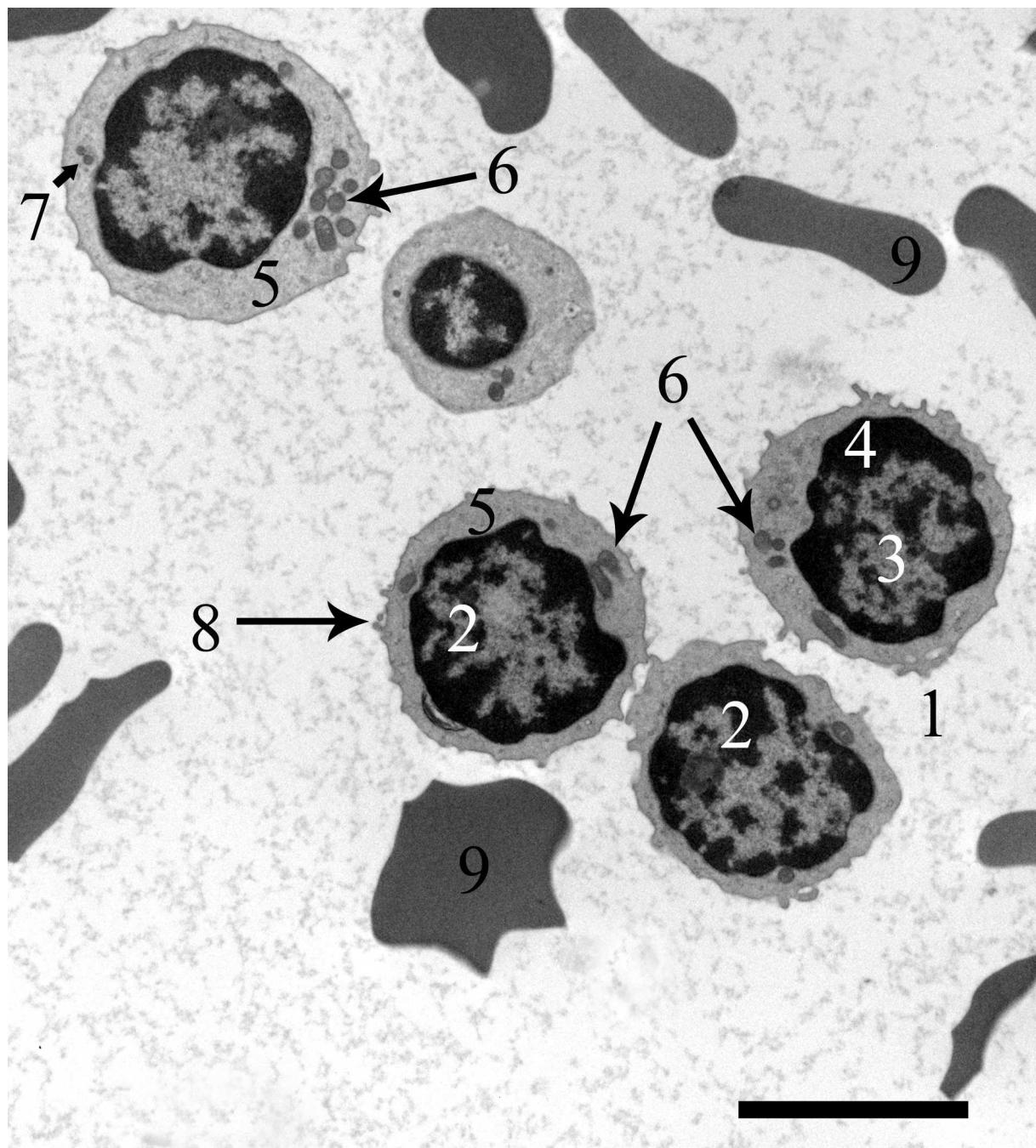


Abbildung IV-66: Ultrastruktur von Lymphozyten und Erythrozyten (Schaf, m, 5 Jahre)

Die Lymphozyten (1) weisen eine rundliche Form auf. Im Zellkern (2) lässt sich das zentrale, locker gepackte Euchromatin (3) von dem peripheren, dicht gepackten Heterochromatin (4) unterscheiden. Der Kern füllt die Zelle bis auf einen nur relativ schmalen Zytoplasmarand (5) fast vollständig aus. Das Zytosol enthält einige Mitochondrien (6). In manchen Zellen sind auch kleine Granula (7) zu erkennen. Die Zellmembran ist glatt und trägt viele kleine, fingerförmige Ausstülpungen (8). Die Erythrozyten (9) sind unregelmäßig geformt und mäßig elektronendicht.

SB = 5 μ m

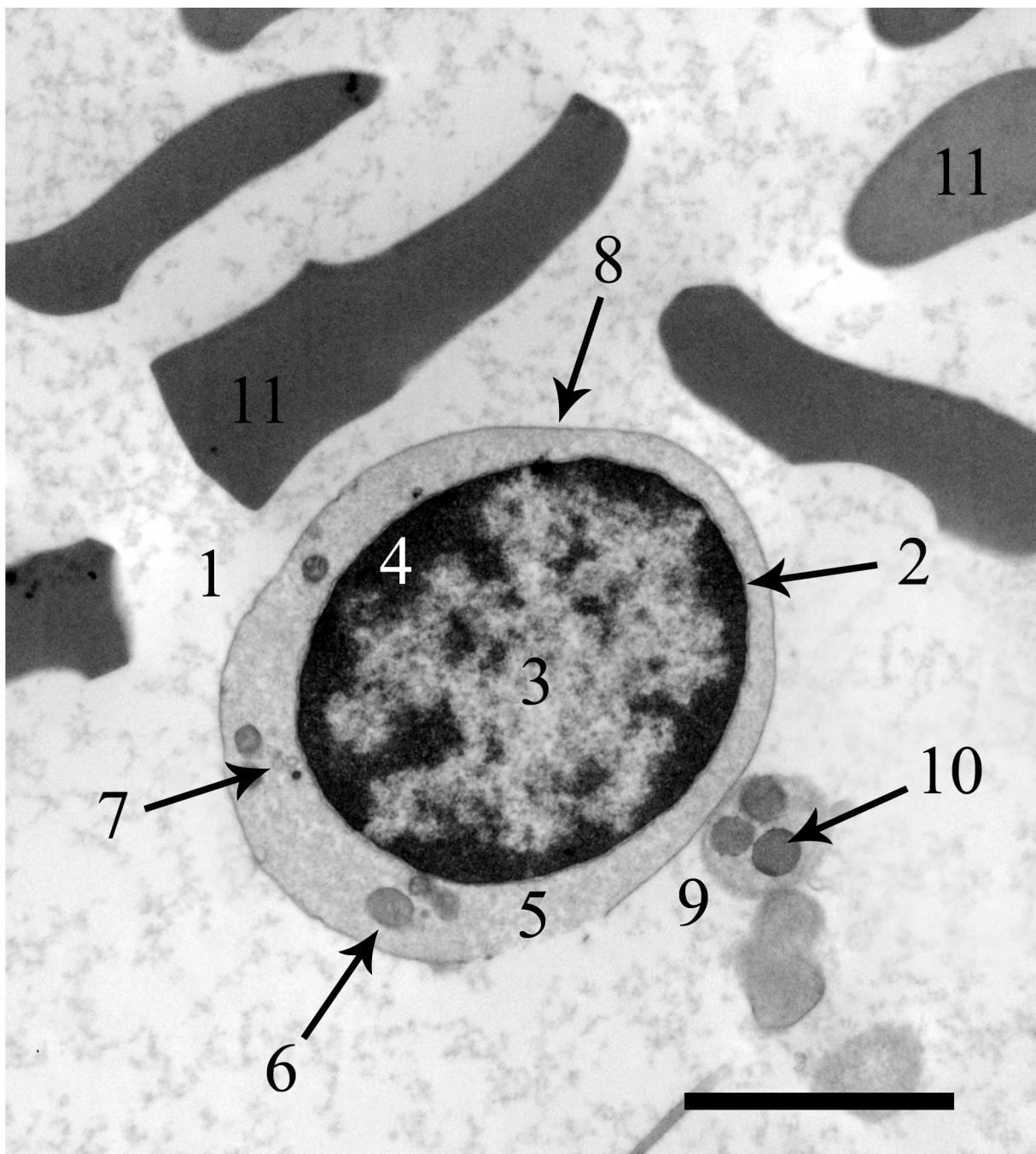


Abbildung IV-67: Ultrastruktur eines Lymphozyten, eines Thrombozyten und mehrerer Erythrozyten (Schaf, w, 1 Jahr)

Dieser Lymphozyt (1) weist eine ovale Form auf. Der Zellkern (2) liegt leicht exzentrisch in der Zelle und zeichnet sich durch ein zentral gelegenes, helleres Euchromatin (3) und ein peripher gelegenes, dunkles Heterochromatin (4) aus. Das Zytoplasma (5) stellt sich fein granuliert dar und enthält mehrere Mitochondrien (6) und kleine Vesikel (7). Die Zellmembran (8) ist glatt und scharf konturiert. Thrombozyt (9) mit homogenen α -Granula (10).

11 = Erythrozyten

SB = 2,5 μ m

3.4 Monozyten

Die Monozyten sind die größten Zellen im Blut der Schafe. Sie haben meist eine unregelmäßige (vgl. Abb. IV-68), nicht selten aber eine runde (vgl. Abb. IV-69) bis ovale Form. Die Oberfläche ist oft gerafft und weist deutliche Falten und Furchen auf. Die Zellmembran ist glatt und trägt bei dem Großteil der Zellen unterschiedlich große, fingerförmige Projektionen (Pseudopodien) (vgl. Abb. IV-68, IV-69). Der große Zellkern liegt zentral oder exzentrisch (vgl. Abb. IV-69) in der Zelle und zeichnet sich durch eine äußerst variable Gestalt aus. Oft ist er oval, hufeisenförmig (vgl. Abb. IV-68) oder auch gelappt. Das zentral gelegene, hellere Euchromatin wird von dem dunkleren Heterochromatin umgeben (vgl. Abb. IV-68, IV-69). Ein bis zwei Nukleoli können gefunden werden (vgl. Abb. IV-69). Das reichlich vorhandene Zytoplasma der Monozyten lässt mehr Organellen erkennen als das der Lymphozyten. Es enthält einen Golgi-Apparat (vgl. Abb. IV-68), Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (vgl. Abb. IV-69), Mitochondrien und viele kleine Vesikel (vgl. Abb. IV-68, IV-69).

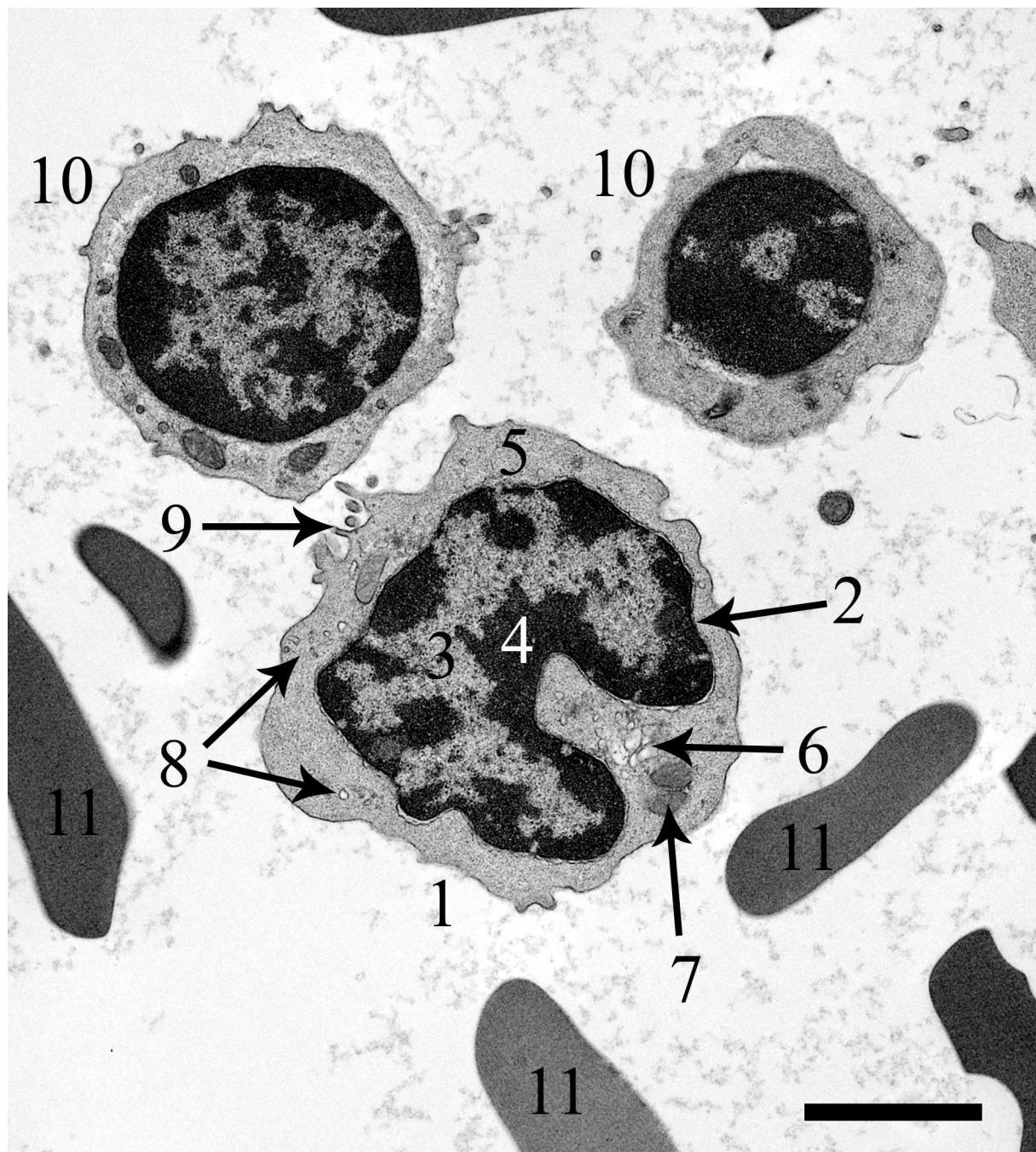


Abbildung IV-68: Ultrastruktur eines Monozyten, zweier Lymphozyten und mehrerer Erythrozyten (Schaf, w, 2 Jahre)

Der Monozyt (1) weist eine unregelmäßige Form auf. Der Zellkern (2) hat eine hufeisenförmige Gestalt. Das hellere Euchromatin (3) wird vom dunkleren Heterochromatin (4) umgeben. Das Zytoplasma (5) ist reichlich vorhanden und beinhaltet den Golgi-Apparat (6) im Bereich der Kerninvagination, Mitochondrien (7) und einige kleine Vesikel (8). Die Zelloberfläche ist gerafft und weist viele Falten und Einbuchtungen sowie Pseudopodien (9) auf.

10 = Lymphozyten

11 = Erythrozyten

SB = 3 µm

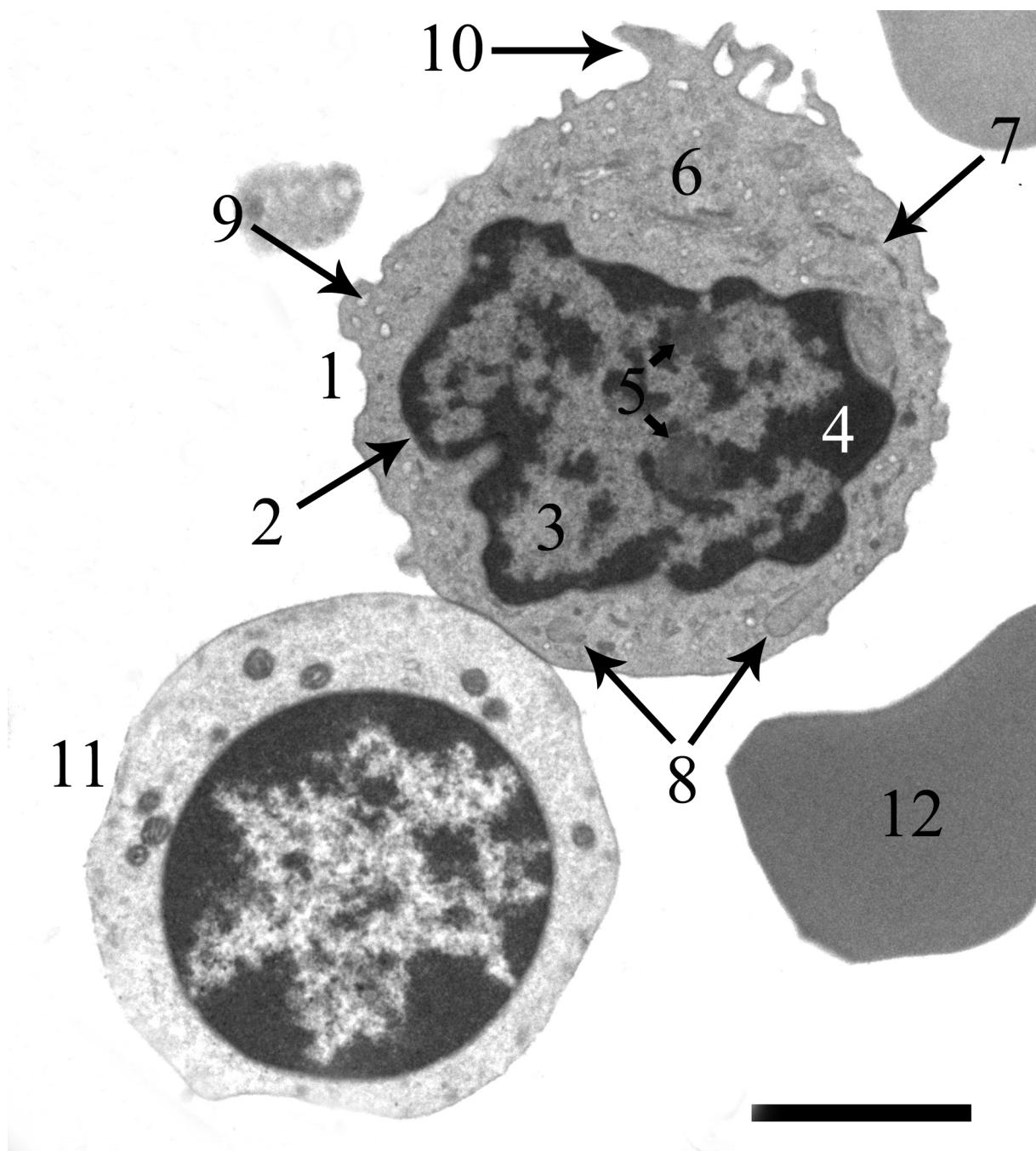


Abbildung IV-69: Ultrastruktur eines Monozyten, eines Lymphozyten und eines Erythrozyten (Schaf, m, 4 Jahre)

Dieser Monozyt (1) weist eine annähernd runde Form auf. Im exzentrisch liegenden Zellkern (2) lässt sich das hellere Euchromatin (3) vom dunkleren Heterochromatin (4) unterscheiden. Außerdem sind bei dieser Schnittführung zwei Nukleoli (5) zu sehen. Das Zytoplasma (6) ist reichlich vorhanden und beinhaltet im Vergleich zum Lymphozyten (11) mehr Zellorganellen. Neben Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (7) sind Mitochondrien (8) und einige Vesikel (9) zu sehen. Die Zelloberfläche ist gerafft und lässt deutliche Falten und Furchen erkennen. An einigen Stellen sind pseudopodienartige Projektionen (10) ausgebildet.

12 = Erythrozyt

SB = 2,5 µm

3.5 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten treten im Blut als runde bis ovale (vgl. Abb. IV-70) Zellen auf. Die Zellmembran ist in der Regel glatt und trägt unterschiedlich stark ausgebildete Pseudopodien (vgl. Abb. IV-70, IV-71). Der Zellkern weist unterschiedlich elektronendichte Bereiche auf, wobei das hellere Euchromatin von dem dunkleren Heterochromatin umgeben wird (vgl. Abb. IV-70, IV-71). In den meisten Zellen überwiegt das Heterochromatin (vgl. Abb. IV-71). Die reifen, segmentkernigen neutrophilen Granulozyten besitzen einen aus mehreren, unterschiedlich großen Anschnitten bestehenden Kern. Die einzelnen Kernsegmente sind nicht selten durch Chromatinbrücken miteinander verbunden. Das Zytoplasma enthält zahlreiche Granula mit einer großen Variationsbreite, was Form, Größe, Elektronendichte und Struktur betrifft (vgl. Abb. IV-71). Die primären Granula haben eine längliche Gestalt und sind ca. 0,4 - 0,5 μm lang. Die häufiger vorkommenden, sekundären Granula hingegen weisen eine runde Form auf und sind mit einer Größe von ca. 0,2 - 0,3 μm kleiner als die primären Granula. Teilweise erscheinen sie außerdem elektronendichter als die primären Granula (vgl. Abb. IV-71). Weiterhin enthält das Zytoplasma unterschiedlich große Vakuolen und Vesikel (vgl. Abb. IV-70, IV-71), wenige Mitochondrien, einen Golgi-Apparat, Zisternen des endoplasmatisches Retikulums (vgl. Abb. IV-70) und Glykogenpartikel (vgl. Abb. IV-71).

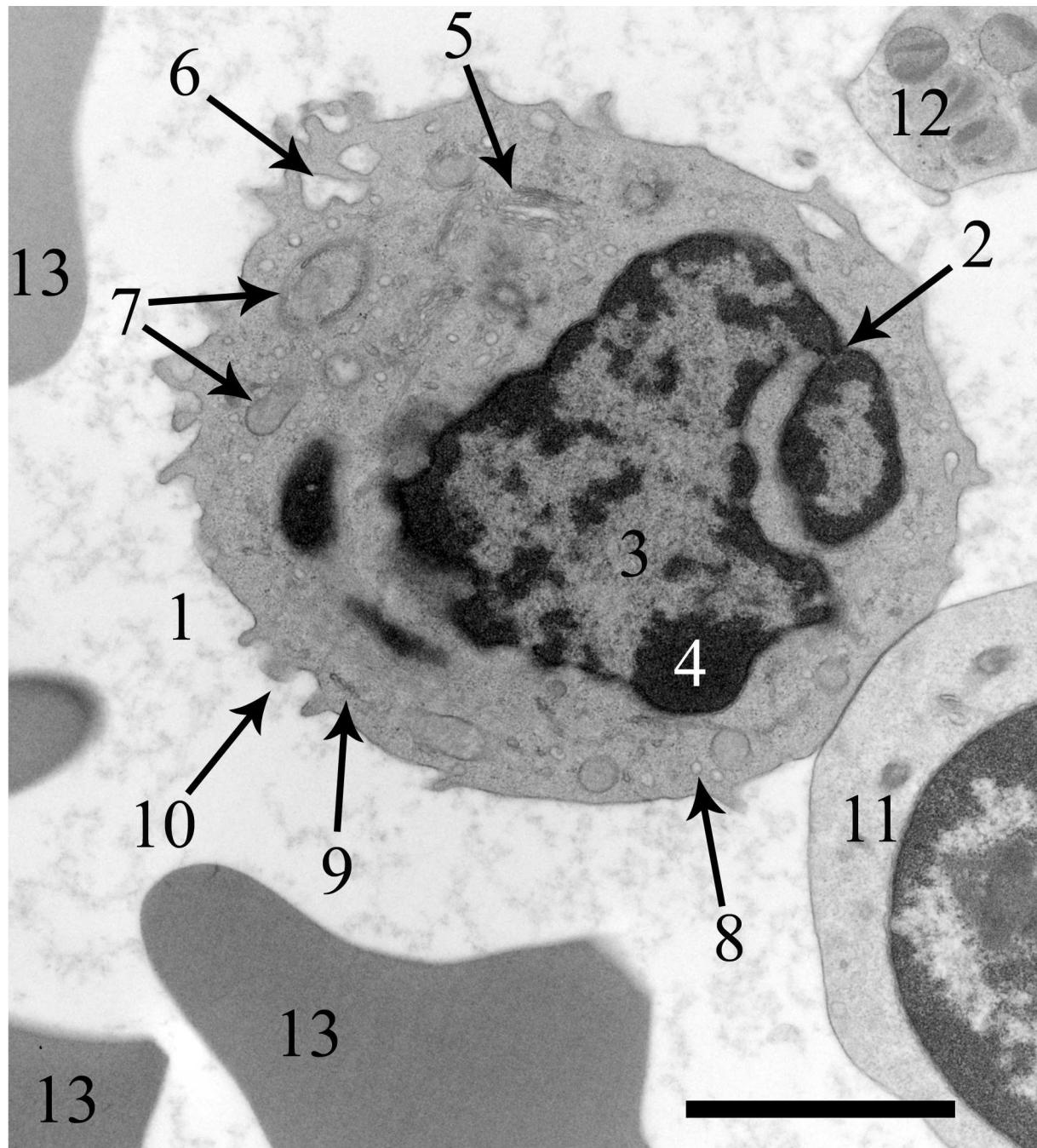


Abbildung IV-70: Ultrastruktur eines neutrophilen Granulozyten, eines Lymphozyten, eines Thrombozyten und mehrerer Erythrozyten (Schaf, w, 3 Jahre)

Der neutrophile Granulozyt (1) hat eine ovale Gestalt. Der Zellkern zeigt an einer Stelle eine deutliche Einschnürung (2) und lässt das locker gepackte Euchromatin (3) vom dicht gepackten Heterochromatin (4) unterscheiden. Das Zytosol enthält zahlreiche Zellorganellen. Neben dem Golgi-Apparat (5) sind Vakuolen (6), Mitochondrien (7), viele kleine Vesikel (8) und Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (9) zu sehen. Die Zelloberfläche bildet unterschiedlich große Pseudopodien (10) aus.

11 = Lymphozyt

12 = Thrombozyt

13 = Erythrozyten

SB = 2 μm

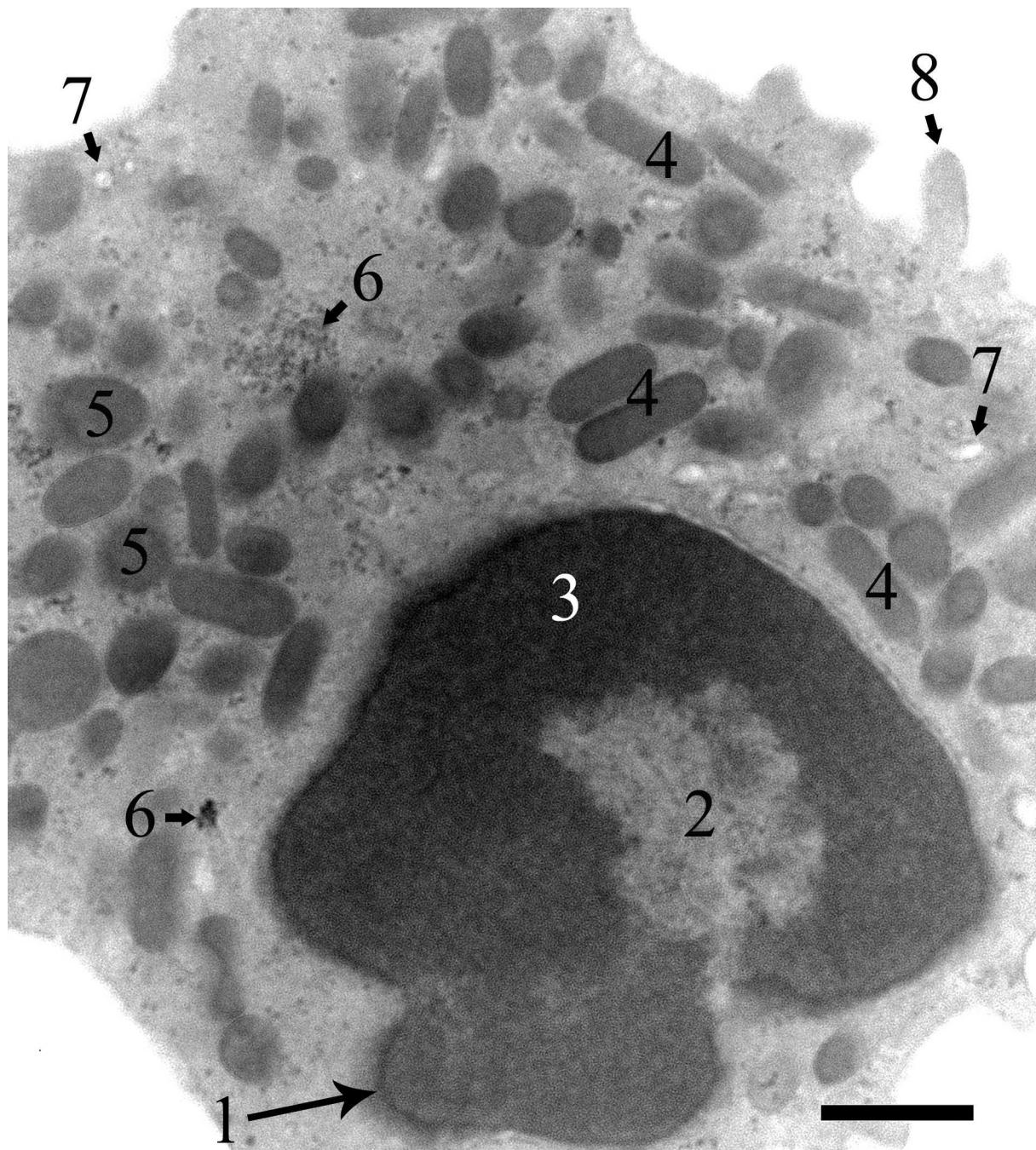


Abbildung IV-71: Ultrastruktur eines neutrophilen Granulozyten (Schaf, m, 6 Jahre)

Der Kern des neutrophilen Granulozyten ist von einer definierten Membran (1) umgeben und unterteilt sich in das zentral gelegene Euchromatin (2) und das peripher gelegene, dominierende Heterochromatin (3). Im Zytoplasma sind zahlreiche Granula zu sehen. Die primären Granula (4) weisen eine längliche Gestalt auf und sind ca. 0,4 - 0,5 μm lang. Die spezifischen Granula (5) sind mit einer Größe von etwa 0,2 - 0,3 μm kleiner als die primären Granula und haben eine runde Form. Manche erscheinen besonders elektronendicht. Im Zytoplasma kommen weiterhin einige Glykogenpartikel (6) und zahlreiche Vesikel (7) vor. Die Zellmembran bildet pseudopodienartige Ausstülpungen (8) aus.

SB = 0,5 μm

3.6 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten stellen die größten Granulozyten dar und haben eine runde bis ovale Gestalt. Die Zellmembran ist glatt und bildet unterschiedlich große Pseudopodien aus (vgl. Abb. IV-72, IV-73). Der Zellkern ist gelappt oder segmentiert (vgl. Abb. IV-72, IV-73). In ihm lässt sich ebenfalls das zentrale, helle Euchromatin vom peripheren, dunklen Heterochromatin deutlich unterscheiden (vgl. Abb. IV-72, IV-73). Im Zytoplasma kommen zahlreiche Granula mit unterschiedlicher Größe, Form und Struktur vor (vgl. Abb. IV-72, IV-73). Ihr Durchmesser liegt in den meisten Fällen zwischen 0,4 und 1,1 μm (vgl. Abb. IV-73). Die Form reicht von rund über oval bis spindelförmig. Der Inhalt der Granula erscheint meist kristallin mit äußerst elektronendichten, lamellären Einschlüssen, die in eine homogene Matrix eingebettet sind. Seltener werden Granula mit einem homogenen Inhalt gefunden (vgl. Abb. IV-73). Bei manchen Granula ist eine deutliche Membran zu sehen. Das Zytoplasma enthält weiterhin einen Golgi-Apparat (vgl. Abb. IV-72), Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (vgl. Abb. IV-72), Mitochondrien und zahlreiche Vesikel (vgl. Abb. IV-72).

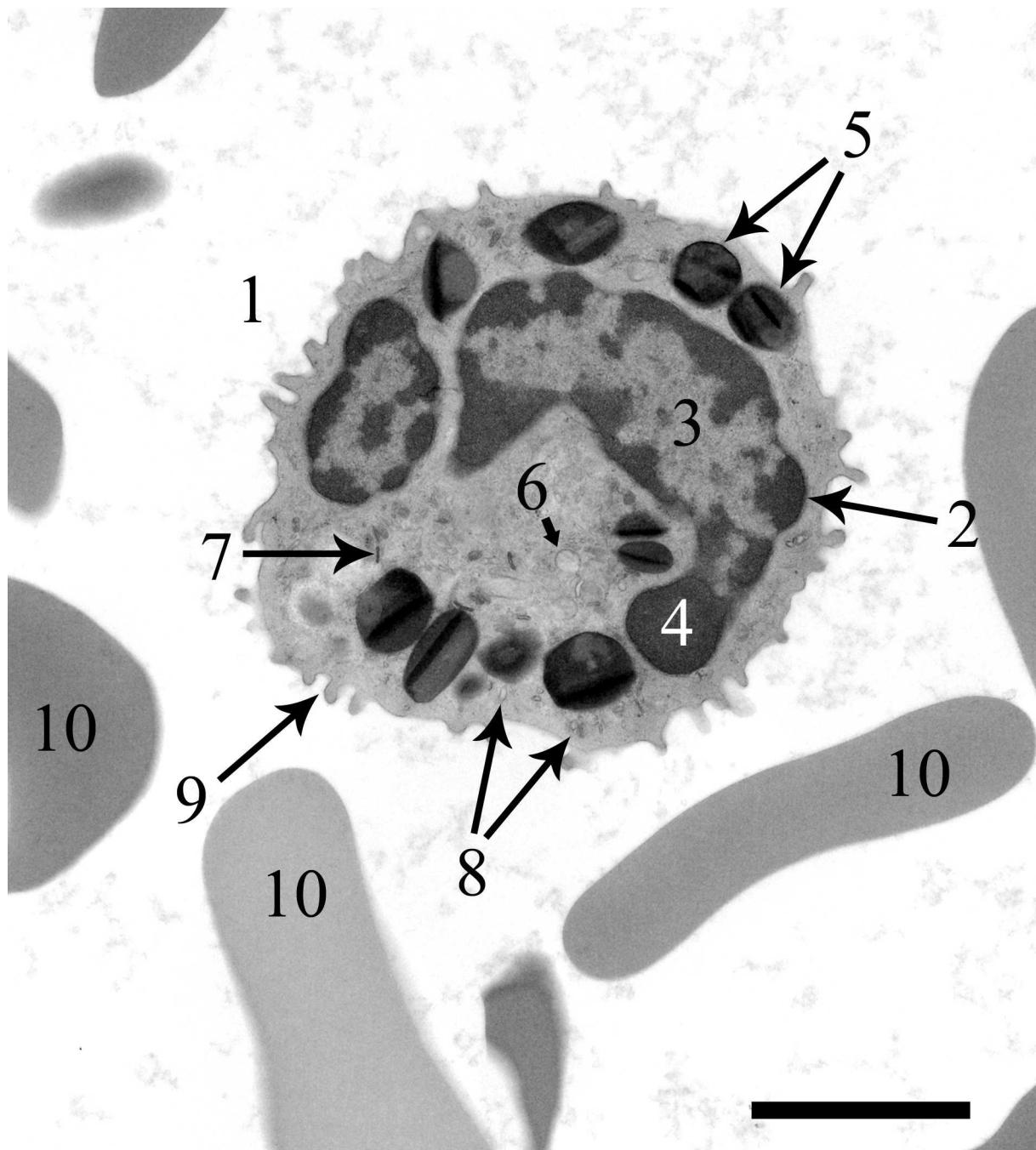


Abbildung IV-72: Ultrastruktur eines eosinophilen Granulozyten und mehrerer Erythrozyten (Schaf, w, 3 Jahre)

Der Zellkern (2) des eosinophilen Granulozyten (1) ist segmentiert. Es kann das hellere, zentrale Euchromatin (3) vom dunkleren, peripheren Heterochromatin (4) unterschieden werden. Im Zytosoma sind große, elektronendichte Granula (5) mit kristallinen Innenstrukturen verteilt. Außerdem sind ein Golgi-Apparat (6) im Zellzentrum, Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (7) und zahlreiche kleine Vesikel (8) zu sehen. Die Zellmembran ist glatt und trägt unterschiedlich große Pseudopodien (9).

10 = Erythrozyten

SB = 2 μ m

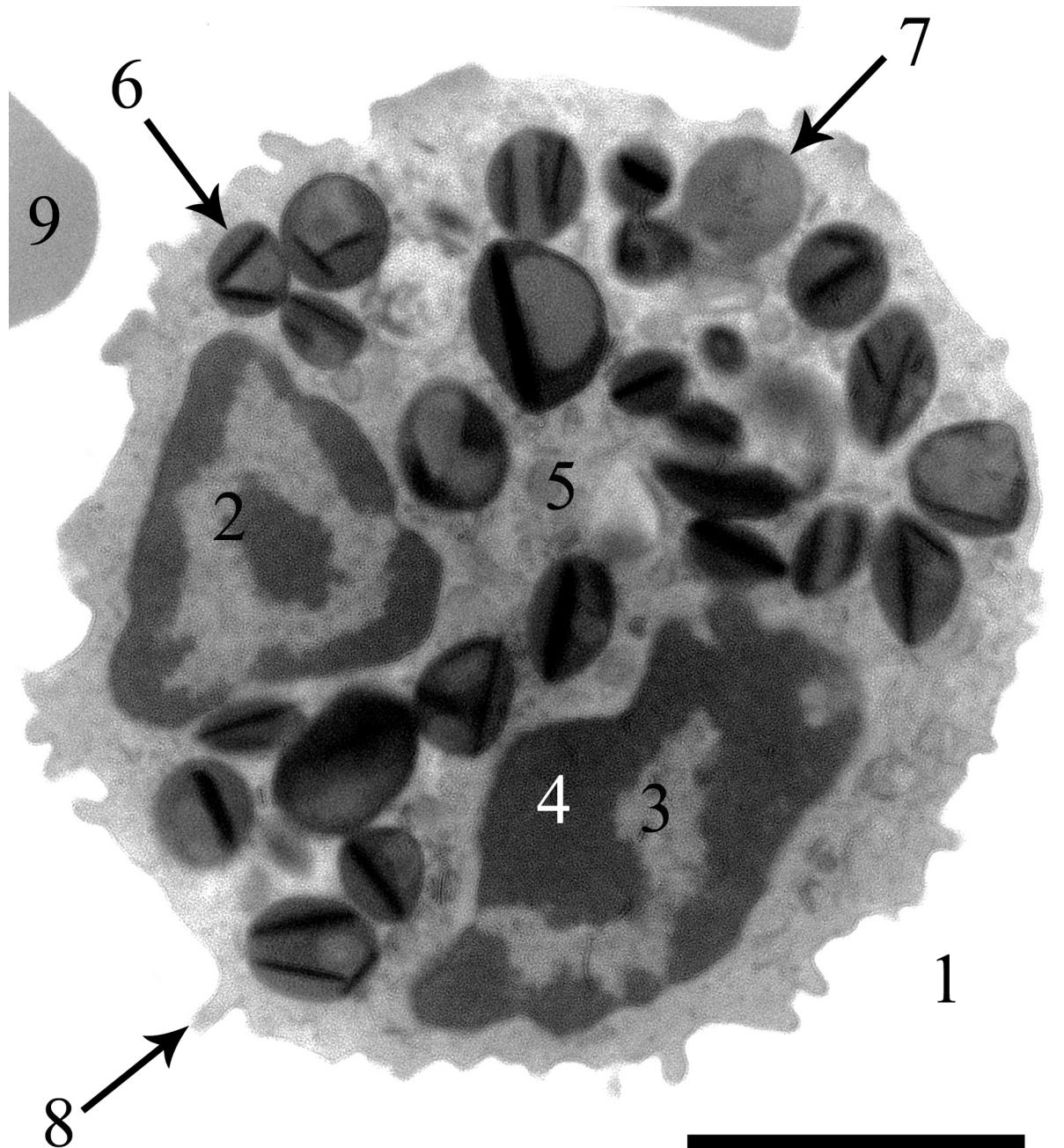


Abbildung IV-73: Ultrastruktur eines eosinophilen Granulozyten und eines Erythrozyten (Schaf, m, 6 Jahre)

Der Zellkern (2) des eosinophilen Granulozyten (1) ist segmentiert und lässt hellere Euchromatin-(3) von dunkleren Heterochromatinbereichen (4) unterscheiden. Im Zytoplasma (5) befinden sich zahlreiche Granula mit unterschiedlicher Größe, Form und Struktur. Die Größe reicht von ca. 0,4 bis 1,1 μm . Die meisten Granula weisen eine kristalline Ultrastruktur auf und besitzen stäbchenförmige Einschlüsse, die in einer homogenen Grundsubstanz liegen (6). Selten kommen auch Granula mit einer homogenen Innenstruktur vor (7). Die Zellmembran trägt viele zytoplasmatische Projektionen (8).

9 = Erythrozyt

SB = 2 μm

3.7 Basophile Granulozyten

Aufgrund des geringen Vorkommens der basophilen Granulozyten im Blut der Schafe konnte keine dieser Zellen unter dem Elektronenmikroskop sicher identifiziert werden.

4. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

4.1 Untersuchungen des Zytoskeletts oviner Blutzellen

Es wurden je zehn Blutausstriche auf die Bindung von Phalloidin an F-Aktin bzw. von verschiedenen Antikörpern an Myosin, Vimentin, Zytokeratin und Tubulin untersucht. Für jedes zytoskelettale Element wurde eine Tabelle mit einer Zusammenfassung der Phalloidin- bzw. Antikörperbindung an die einzelnen Blutzellen erstellt. Dabei wurde zwischen keiner Reaktion (0), einer schwach positiven (+), einer deutlich positiven (++) und einer stark positiven (+++) Reaktion unterschieden. Unter „Stärke der Reaktion“ ist der prozentuale Anteil der Tiere aufgelistet, bei dem diese Bindungsstärke auftrat. Unter „Anteil der positiven Präparate“ steht der prozentuale Anteil der Ausstriche, die den Antikörper gebunden haben. Da manche Präparate aufgrund schlechter Qualität nicht auswertbar waren, ergab sich eine unterschiedliche Anzahl an Gesamtausstrichen. Auch Zellen mit fehlender Antikörperbindung konnten identifiziert werden, da sich mit Hilfe der DAPI-Kernfärbung die Kerne leuchtend blau anfärbten. Basophile Granulozyten konnten in keinem der untersuchten Ausstriche identifiziert werden.

4.1.1 Nachweis von Aktin

Eine starke Bindung von Phalloidin-TRITC an filamentöses Aktin (F-Aktin) kann an alle Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten festgestellt werden. Die roten Blutkörperchen reagieren nur schwach und weisen eine homogene Anfärbung auf (vgl. Abb. IV-75). Die Thrombozyten zeigen stets eine starke Reaktion in der gesamten Zelle. Sowohl der kortikale Bereich als auch das Zellzentrum färben sich stark an, wobei im Zytoplasma teilweise ein retikuläres Muster erkannt werden kann (vgl. Abb. IV-74, IV-76, IV-77). Bei den Lymphozyten zeigt sich eine annähernd homogene Anfärbung des Zytoplasmas. Im Bereich der Plasmamembran lässt sich eine deutliche, ringartige Verdichtung in Verbindung mit einer stärkeren Fluoreszenz beobachten (vgl. Abb. IV-74). Das Zytoplasma der Monozyten hingegen weist ein wabenartiges Muster der Anfärbung auf (vgl. Abb. IV-75). Eine stärkere Farbintensität in der submembranösen Region ist hier nicht so ausgeprägt wie bei den Lymphozyten. Die Bindung von Phalloidin-TRITC an F-Aktin der neutrophilen (vgl. Abb. IV-76) und eosinophilen Granulozyten (vgl. Abb. IV-77) zeigt sich in

Form einer starken Fluoreszenz im Zytoplasma, die ebenfalls teilweise ein retikuläres Muster erkennen lässt und sich in der Zellperipherie verdichtet. In Tabelle IV.19 sind die Ergebnisse der Bindung von Phalloidin-TRITC an F-Aktin bei den jeweiligen Zellen aufgeführt.

Tabelle IV.19: Bindung von Phalloidin-TRITC

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten	20 %	80 %	0 %	0 %	80 %
Thrombozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Lymphozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Monozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Neutrophile Granulozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-

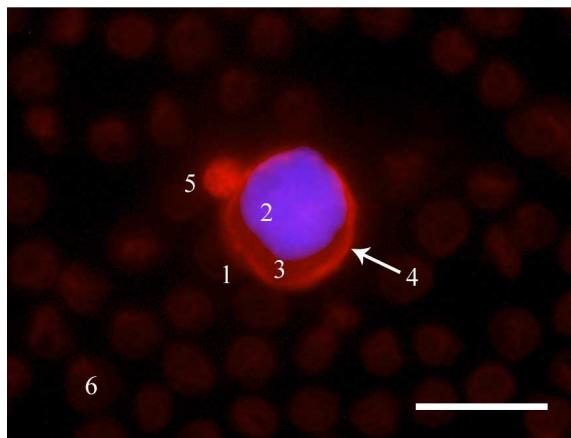


Abbildung IV-74: Lymphozyt und Thrombozyt, Phalloidin-TRITC (Schaf, w, 1 Jahr)

Der Lymphozyt (1) zeigt neben einer schwachen Anfärbung des Zytosplasmas (3) eine starke Fluoreszenz im Bereich der Plasmamembran (4). Der Thrombozyt (5) weist ein retikuläres Anfärbungsmuster auf. 2 = Zellkern, 6 = Erythrozyt, SB = 10 µm

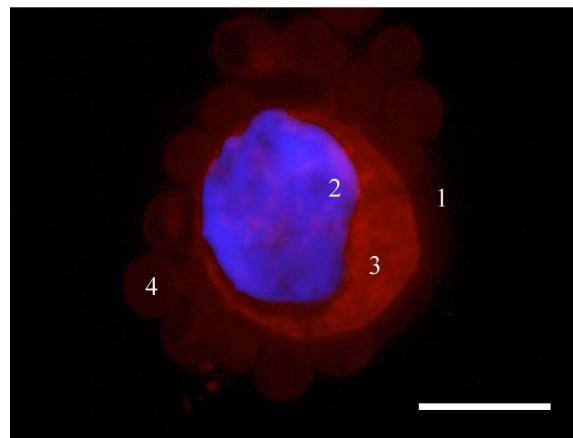


Abbildung IV-75: Monozyt, Phalloidin-TRITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Im gesamten Zytosplasma (3) des Monozyten (1) lässt sich eine Fluoreszenz mit einem wabenartigen Muster erkennen. Die Erythrozyten (4) zeigen nur eine leichte, homogene Anfärbung.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

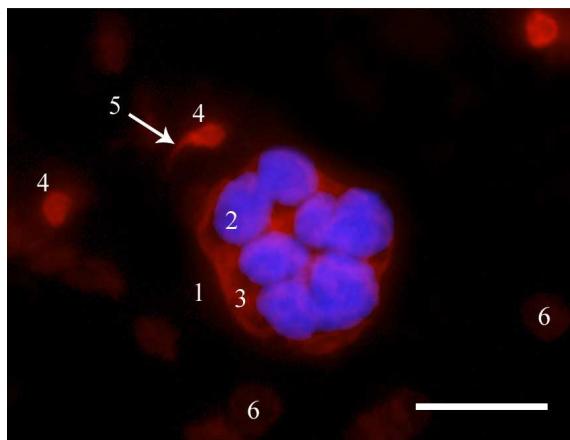


Abbildung IV-76: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten, Phalloidin-TRITC (Schaf, w, 3 Jahre)

Im Zytoplasma (3) des neutrophilen Granulozyten (1) ist eine netzartige Anfärbung zu sehen. Die Thrombozyten (4) färben sich intensiv an, wobei bei einer Zelle ein fluoreszierender, fingerförmiger Ausläufer (5) zu beobachten ist.
2 = Zellkern, 6 = Erythrozyt, SB = 10 µm

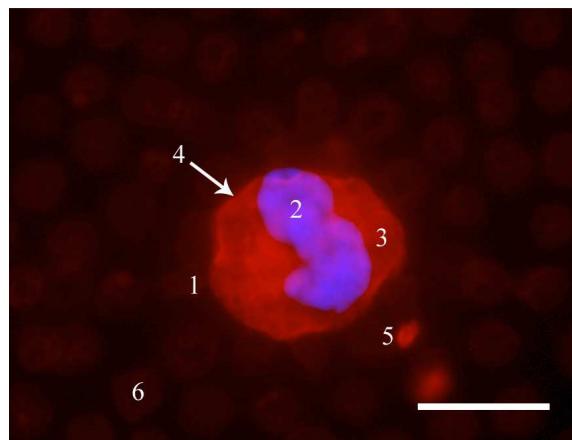


Abbildung IV-77: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, Phalloidin-TRITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Das Zytoplasma (3) des eosinophilen Granulozyten (1) zeigt eine starke Reaktion mit einem netzartigen Muster. Im Bereich der Plasmamembran ist eine Zone mit stärkerer Fluoreszenz erkennbar (4). Die Erythrozyten (6) zeigen eine homogene Anfärbung.
2 = Zellkern, 5 = Thrombozyt, SB = 10 µm

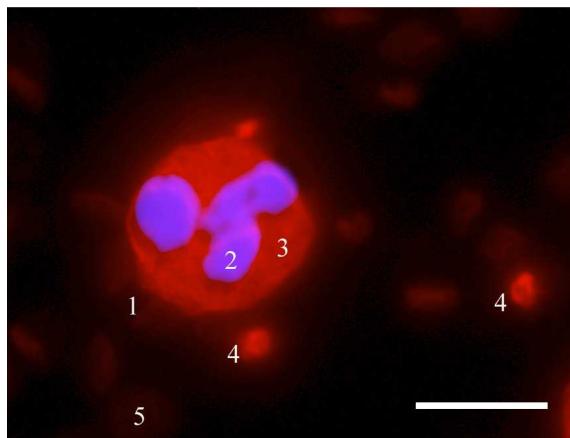


Abbildung IV-78: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, Phalloidin-TRITC (Schaf, w, 3 Jahre)

Bei diesem eosinophilen Granulozyten (1) ist eine äußerst intensive Fluoreszenz im Zytoplasma (3) zu sehen.
2 = Zellkern, 4 = Thrombozyten,
5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

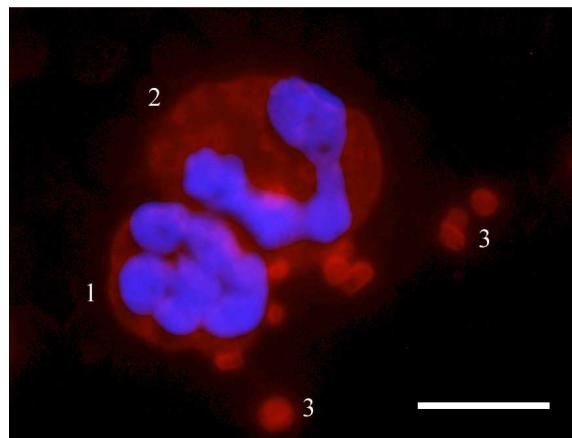


Abbildung IV-79: Neutrophiler Granulozyt, eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, Phalloidin-TRITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Sowohl der neutrophile Granulozyt (1) als auch der eosinophile Granulozyt (2) zeigen eine weniger deutliche Fluoreszenz in ihrem Zytoplasma.
3 = Thrombozyten, SB = 10 µm

4.1.2 Nachweis von Myosin

Bei dem immunhistochemischen Nachweis von Myosin lässt sich eine größtenteils starke Fluoreszenz aller Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten beobachten. Bei den Thrombozyten färbt sich die Zellperipherie im Gegensatz zum Zellzentrum meist stärker an (vgl. Abb. IV-80, IV-84, IV-85). Die Lymphozyten (vgl. Abb. IV-81) und die Monozyten (vgl. Abb. IV-82) zeigen gleichmäßig über das Zytoplasma verteilte, punktförmige Anfärbungen. Bei den neutrophilen (vgl. Abb. IV-83) und eosinophilen Granulozyten (vgl. Abb. IV-84, IV-85) färbt sich, wie bei den Thrombozyten, das granulareiche Zellzentrum deutlich schwächer an als die Zellperipherie, in der deutlich ein punktförmiges Reaktionsmuster beobachtet werden kann. In Tabelle IV.20 sind die Ergebnisse der Bindung von Rabbit polyclonal to non-muscle myosin IIA an Myosin IIA („Myosin IIA-Antikörpern“) bei den jeweiligen Zellen aufgeführt.

Tabelle IV.20: Bindung der Myosin IIA-Antikörper

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Thrombozyten	0 %	20 %	0 %	80 %	100 %
Lymphozyten	0 %	0 %	20 %	80 %	100 %
Monozyten	0 %	0 %	11,1 %	88,9 %	100 %
Neutrophile Granulozyten	0 %	10 %	10 %	80 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0 %	0 %	22,2 %	77,8 %	100 %
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-

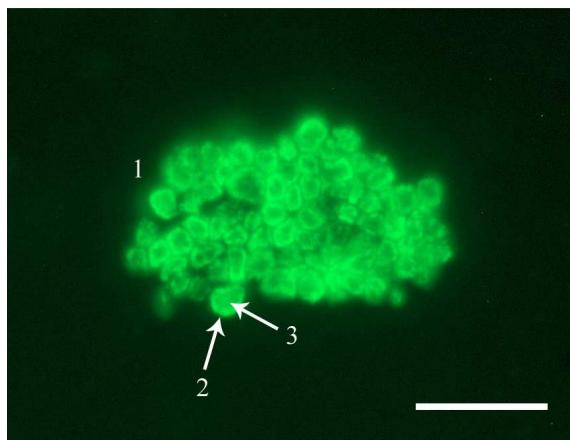


Abbildung IV-80: Thrombozyten, Myosin IIA-Antikörper (Schaf, m, 5 Jahre)

Die Thrombozyten (1) liegen zusammen gelagert im Blutausstrich vor und zeigen eine stärkere Fluoreszenz der Zellperipherie (2) im Vergleich zum Zellzentrum (3).

SB = 10 µm

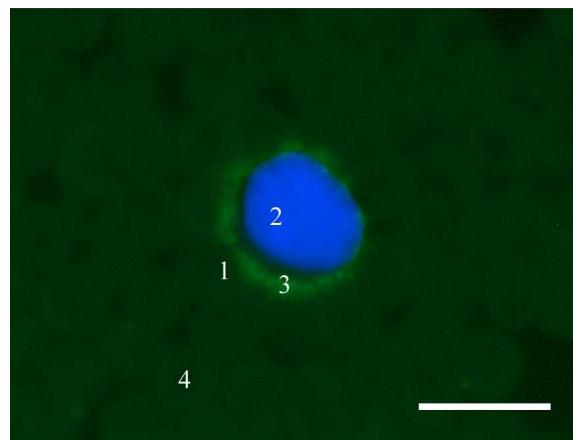


Abbildung IV-81: Lymphozyt, Myosin IIA-Antikörper (Schaf, m, 4 Jahre)

Bei diesem Lymphozyten (1) lässt sich eine granuläre Fluoreszenz im Zytoplasmaum (3) erkennen. Die Erythrozyten (4) reagieren negativ.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

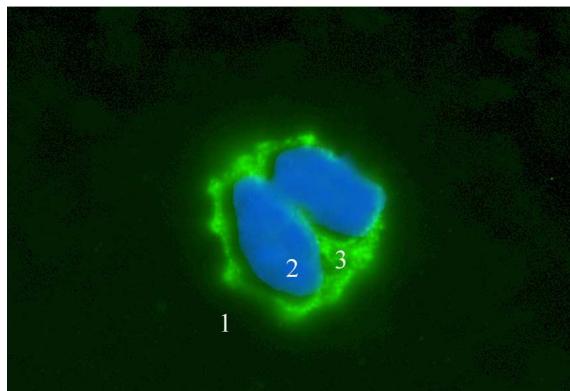


Abbildung IV-82: Monozyt, Myosin IIA-Antikörper (Schaf, w, 1 Jahr)

Im Zytoplasma (3) des Monozyten (1) ist eine starke Fluoreszenz mit einem körnigen Muster zu erkennen.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

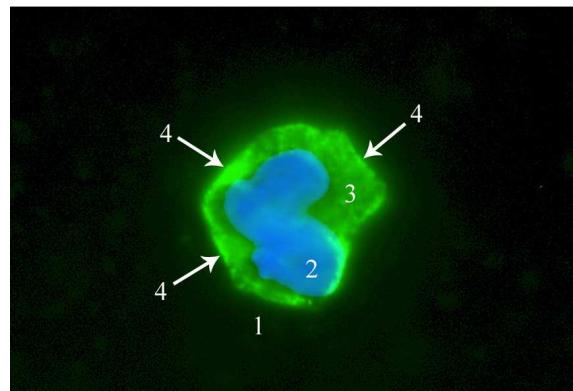


Abbildung IV-83: Neutrophiler Granulozyt, Myosin IIA-Antikörper (Schaf, m, 7 Jahre)

Auch das Zytoplasma (3) des neutrophilen Granulozyten (1) zeigt ein überwiegend körniges Muster der Anfärbung. Im Bereich der Plasmamembran sind Zonen mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität (4) zu sehen.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

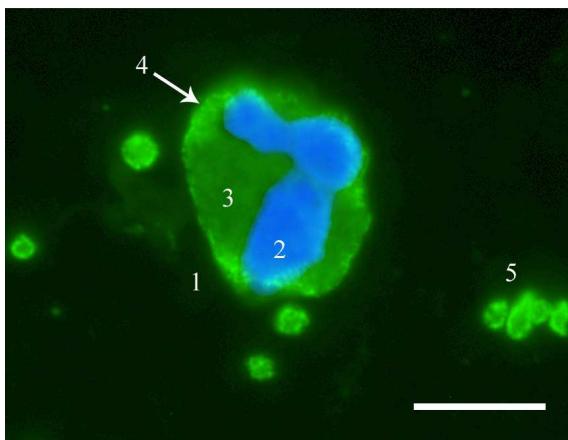


Abbildung IV-84: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, Myosin IIA-Antikörper (Schaf, w, 1 Jahr)

Bei diesem eosinophilen Granulozyten (1) färbt sich das granulareiche Zytoplasma (3) weniger stark an als die Zellperipherie (4).
2 = Zellkern, 5 = Thrombozyten,
SB = 10 µm

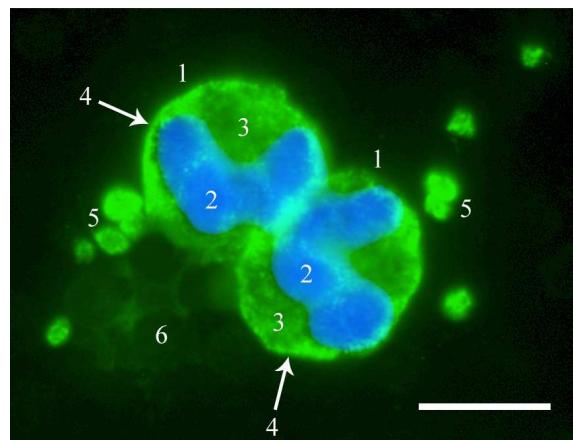


Abbildung IV-85: Eosinophile Granulozyten und Thrombozyten, Myosin IIA-Antikörper (Schaf, m, 7 Jahre)

Das Zytoplasma (3) der beiden eosinophilen Granulozyten (1) ist auch hier in peripheren Bereichen (4) deutlicher angefärbt als im Zellzentrum.
2 = Zellkerne, 5 = Thrombozyten,
6 = Erythrozyt, SB = 10 µm

4.1.3 Nachweis von Vimentin

Eine Bindung des Antikörpers an das Intermediärfilament aus Vimentin kann bei den mononukleären Zellen, also den Lymphozyten und den Monozyten, sowie den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden, die stets eine starke Reaktion zeigen. Die Erythrozyten (vgl. Abb. IV-88) und die Thrombozyten hingegen reagieren beim immunhistochemischen Nachweis von Vimentin negativ. Bei den positiven Blutzellen zeigt sich oft ein mehr oder weniger netzartiges Muster, das sich meist über die ganze Zelle erstreckt (vgl. Abb. IV-86, IV-89). Bei den filamentförmigen Strukturen kann zum Teil deren Verlauf von der Plasmamembran bis hin zum Kern verfolgt werden (vgl. Abb. IV-88, IV-90), wobei sich vor allem bei den neutrophilen und den eosinophilen Granulozyten in der perinukleären Region nicht selten eine Verdichtung des Netzwerkes beobachten lässt (vgl. Abb. IV-88, IV-91). Besonders bei den Lymphozyten und den neutrophilen Granulozyten lässt sich, je nach Ebene, ein deutlicher Längs- und/oder Querverlauf der Filamente erkennen (vgl. Abb. IV-86, IV-89). Je nach Ebene wird der Zellkern mehr oder weniger durch die fadenförmigen Anfärbungen maskiert (vgl. Abb. IV-86, IV-89). Neben den filamentären Strukturen treten aber auch punktförmige Anfärbungen vor allen in peripheren Zytoplasmabereichen der verschiedenen Zellen in Erscheinung (vgl. Abb. IV-87, IV-88). In Tabelle IV.21 sind die Ergebnisse der Bindung von Monoclonal mouse anti-vimentin clone vim 3B4 („Vimentin-Antikörpern“) an Vimentin bei den jeweiligen Zellen

aufgeführt.

Tabelle IV.21: Bindung der Vimentin-Antikörper

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Thrombozyten	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Lymphozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Monozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Neutrophile Granulozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-

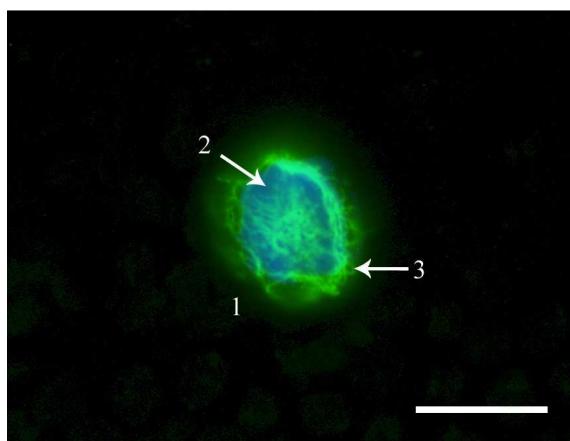


Abbildung IV-86: Lymphozyt, Vimentin-Antikörper (Schaf, w, 1 Jahr)

Bei diesem Lymphozyten (1) lässt sich der Verlauf der filamentförmigen Strukturen (3) deutlich erkennen. Diese lassen einen grobmaschigen Käfig entstehen und überlagern in dieser Ebene den Kern (2).
SB = 10 µm

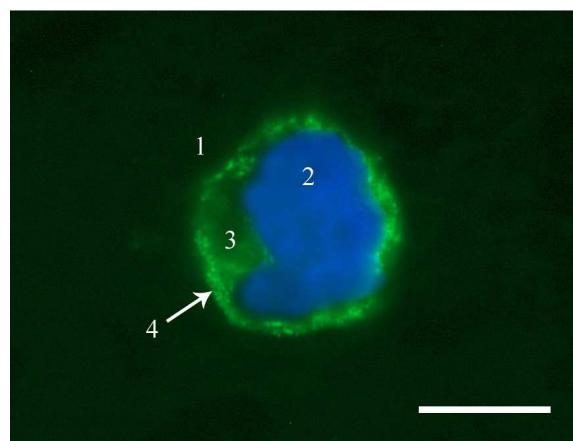


Abbildung IV-87: Monozyt, Vimentin-Antikörper (Schaf, m, 7 Jahre)

Der Monozyt (1) zeigt in dieser Ebene vor allem in peripheren Bereichen des Zytoplasmas (3) viele punktförmige Anfärbungen (4). Der Zellkern (2) bleibt ausgespart.
SB = 10 µm

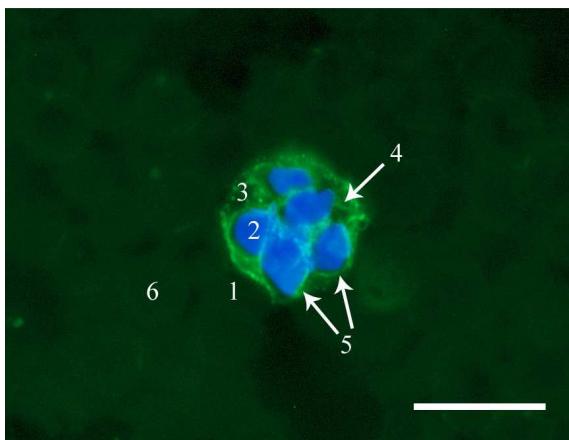


Abbildung IV-88: Neutrophiler Granulozyt, Vimentin-Antikörper (Schaf, m, 5 Jahre)

Bei diesem neutrophilen Granulozyten (1) ist im Zytosol (3) neben punktförmigen Anfärbungen eine fadenförmige Struktur (4), die vom Kern (2) bis zur Membran reicht, zu sehen. In der perinukleären Region (5) zeigt sich eine erhöhte Intensität der Fluoreszenz. Die Erythrozyten (6) reagieren negativ.
SB = 10 µm

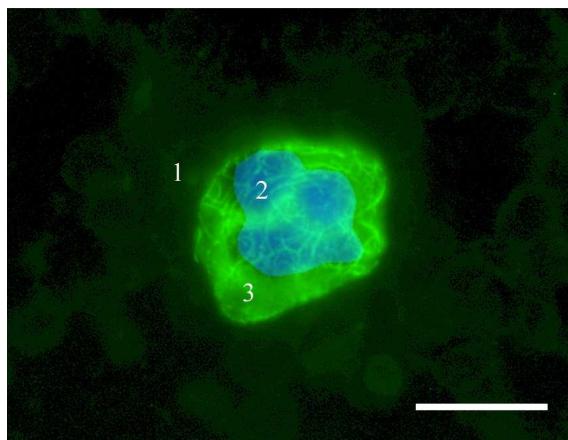


Abbildung IV-89: Neutrophiler Granulozyt, Vimentin-Antikörper (Schaf, w, 1 Jahr)

In dieser Ebene lässt sich bei dem neutrophilen Granulozyten (1) eine deutliche, relativ dichte, filamentförmige Fluoreszenz im Zytosol (3) erkennen. Es bildet sich eine Art grobmaschiges Netzwerk, das den Zellkern (2) maskiert.
SB = 10 µm

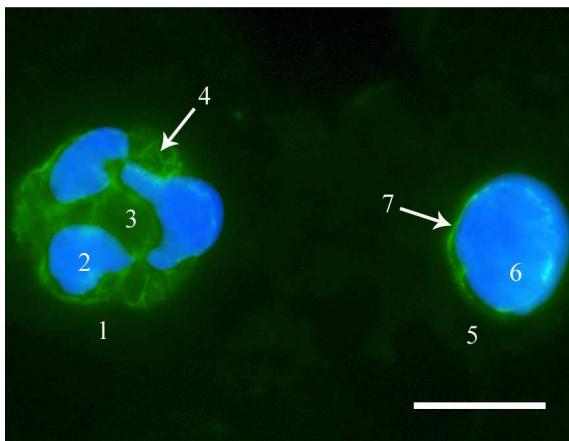


Abbildung IV-90: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, Vimentin-Antikörper (Schaf, w, 1 Jahr)

Im Zytosol (3) des eosinophilen Granulozyten (1) sind fadenförmige Strukturen (4) zu sehen, deren Verlauf zwischen Zellkern (2) und Zellmembran zum Teil verfolgt werden kann. Der Lymphozyt (5) zeigt in dieser Ebene eine Fluoreszenz in der Zellperipherie (7), der Kern (6) bleibt unmaskiert.
SB = 10 µm

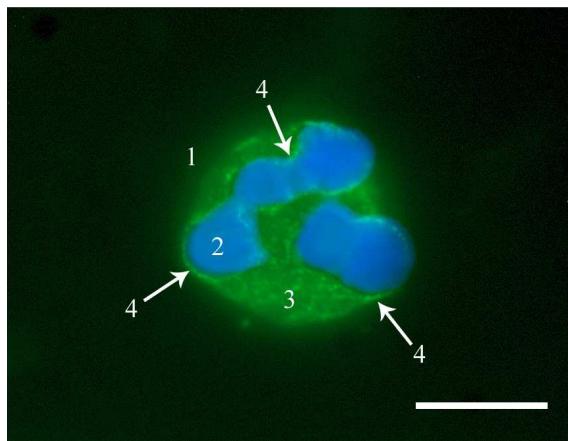


Abbildung IV-91: Eosinophiler Granulozyt, Vimentin-Antikörper (Schaf, w, 1 Jahr)

Bei diesem eosinophilen Granulozyten (1) ist ein feines Netzwerk im gesamten Zytosol (3) erkennbar. In der perinukleären Region kann eine Verdichtung dieses Netzwerkes (4) beobachtet werden. Der Zellkern (2) wird in dieser Ebene nicht maskiert.
SB = 10 µm

4.1.4 Nachweis von Zytokeratin

Bei keinem der untersuchten Ausstriche kann eine positive Reaktion beim immunhistochemischen Nachweis von Zytokeratin beobachtet werden. Parallel angefertigte Positivkontrollen des Blutes von Pferd, Rind, Strauß und Kaninchen reagieren ebenso negativ.

4.1.5 Nachweis von Tubulin

Bei keinem der untersuchten Ausstriche fällt der immunhistochemische Nachweis von Tubulin positiv aus. Parallel angefertigte Positivkontrollen des Blutes von Strauß und Kaninchen zeigen eine Bindung der Tubulin-Antikörper vor allem an die Thrombozyten und vereinzelt auch an die Leukozyten.

4.2 Glykohistochemische Untersuchungen

Bei den FITC-markierten Pflanzen-Lektinen wurden je vierzehn, bei den biotinylierten Pflanzen-Lektinen je zehn Blautausstriche auf die Bindung der verschiedenen Lektine untersucht. Für jedes Lektin wurde eine Tabelle mit einer Zusammenfassung der Bindung an die einzelnen Blutzellen erstellt. Dabei wurde zwischen keiner Reaktion (0), einer schwach positiven (+), einer deutlich positiven (++) und einer stark positiven (+++) Reaktion unterschieden. Bei der Auswertung wurden pro Objektträger je zehn Blutzellen einzeln bewertet und anschließend ein Mittelwert der häufigsten Reaktion gebildet. Unter „Stärke der Reaktion“ ist der prozentuale Anteil der Tiere aufgelistet, bei dem diese Bindungsstärke aufgetreten ist. Unter „Anteil der positiven Präparate“ steht der prozentuale Anteil der Ausstriche, die das Lektin gebunden haben. Da manche Präparate aufgrund schlechter Qualität nicht auswertbar waren, ergab sich eine unterschiedliche Anzahl an Gesamtausstrichen. Auch Zellen mit fehlender Lektinbindung konnten identifiziert werden, da sich mit Hilfe der DAPI-Kernfärbung die Kerne leuchtend blau anfärbten. Aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz waren die Erythrozyten auch ohne Lektinbindung deutlich zu erkennen. Die Thrombozyten wurden dagegen nur bei Bindung des Lektins sichtbar.

4.2.1 Glukose/Mannose-spezifische Lektine

4.2.1.1 Bindung von *Concanavalia ensiformis* Agglutinin (ConA-FITC)

Bei allen Ausstrichen kann eine deutliche bis starke Bindung von ConA-FITC an die Membran der Erythrozyten beobachtet werden (vgl. Abb. IV-92, IV-93, IV-94, IV-95, IV-96, IV-97) . Das

Zytoplasma reagiert überwiegend negativ, bei einigen Zellen aber auch leicht bis deutlich positiv (vgl. Abb. IV-95). Das Granulomer der Thrombozyten lässt stets eine deutliche bis starke Fluoreszenz erkennen, das Hyalomer und die Membran sind stets negativ (vgl. Abb. IV-92). Die Lymphozyten (vgl. Abb. IV-92, IV-93) zeigen bei allen Tieren, die Monozyten (vgl. Abb. IV-95) bei weniger als der Hälfte der Tiere eine Reaktion der zytoplasmatischen Granula in unterschiedlicher Intensität. Zudem kann bei einigen Lymphozyten (vgl. Abb. IV-92, IV-93) und Monozyten (vgl. Abb. IV-95) eine schwache bis deutliche Fluoreszenz der Membran beobachtet werden. Das Zytoplasma zeigt bei den Lymphozyten keine Reaktion, bei den Monozyten hingegen kann meist eine starke, diffuse, teilweise körnige Fluoreszenz beobachtet werden (vgl. Abb. IV-94, IV-95). Die Membran der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten reagiert bei ungefähr der Hälfte der Zellen positiv. Bei den neutrophilen Granulozyten kann stets eine starke Reaktion der Granula erkannt werden, das Zytoplasma scheint stets negativ zu sein (vgl. Abb. IV-96, IV-97). Die eosinophilen Granulozyten hingegen zeigen lediglich eine Fluoreszenz des Zytosplasmas ohne Reaktion der eosinophilen Granula (vgl. Abb. IV-97). In der Tabelle IV.22 sind die Ergebnisse der ConA-Bindung zusammengefasst.

Tabelle IV.22: Einzelauswertung Lektine: ConA-FITC

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	0 %	0 %	28,6 %	71,4 %	100 %
- Zytoplasma	57,1 %	35,7 %	7,2 %	0 %	42,9 %
Thrombozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Hyalomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granulomer	0 %	0 %	21,4 %	78,6 %	100 %
Lymphozyten					
- Membran	28,6 %	50 %	21,4 %	0 %	71,4 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	14,3 %	35,7 %	50 %	100 %
Monozyten					
- Membran	50 %	41,7 %	8,3 %	0 %	50 %
- Zytoplasma	0 %	8,3 %	16,7 %	75 %	100 %
- Granula	58,3 %	16,7 %	16,7 %	8,3 %	41,7 %
Neutrophile Granulozyten					
- Membran	50 %	50 %	0 %	0 %	50 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Eosinophile Granulozyten					
- Membran	41,7 %	50 %	8,3 %	0 %	58,3 %
- Zytoplasma	8,3 %	75 %	16,7 %	0 %	91,7 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Basophile Granulozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-

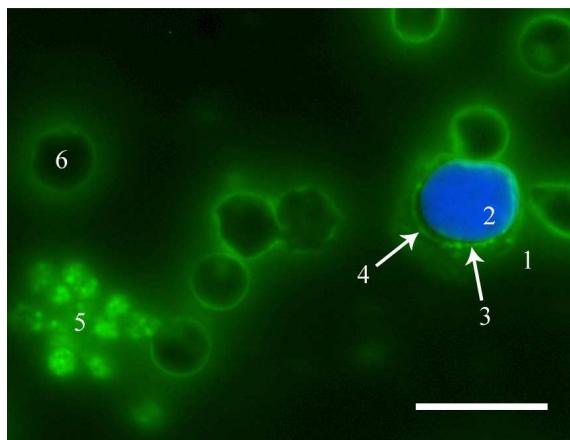


Abbildung IV-92: Lymphozyt und Thrombozyten, ConA-FITC (Schaf, m, 6 Jahre)

Bei dem Lymphozyten (1) ist eine Fluoreszenz der zytoplasmatischen Granula (3) und der Zellmembran (4) zu sehen. Die Thrombozyten (5) zeigen eine positive Reaktion des Granulomers und die Erythrozyten (6) der Membran. 2 = Zellkern, SB = 10 µm

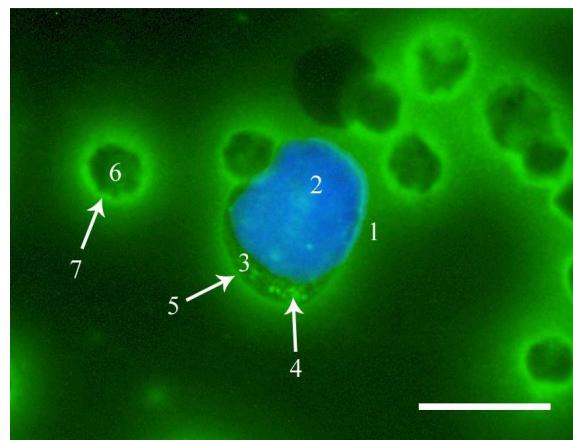


Abbildung IV-93: Lymphozyt, ConA-FITC (Schaf, m, 6 Jahre)

Auch bei diesem Lymphozyten (1) lässt sich eine Fluoreszenz der Granula (4) und der Membran (5) erkennen. Die Membran (7) der Erythrozyten (6) reagiert stark positiv. 2 = Zellkern, 3 = Zytoplasma, SB = 10 µm

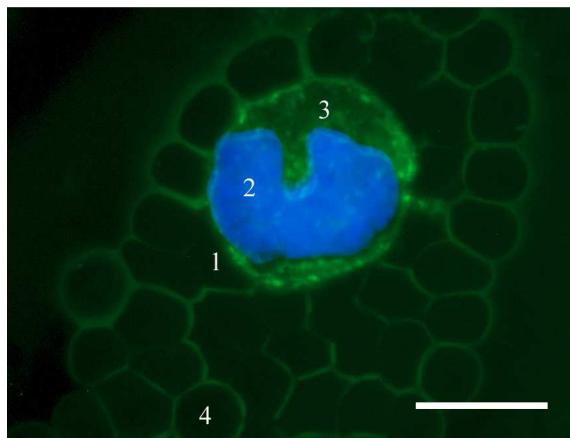


Abbildung IV-94: Monozyt, ConA-FITC (Schaf, w, 3,5 Jahre)

Bei dem Monozyten (1) lässt sich eine diffuse, granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma (3) feststellen. Die Erythrozyten (4) zeigen eine deutliche Bindung des Lektins an ihre Zellmembran. 2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 µm

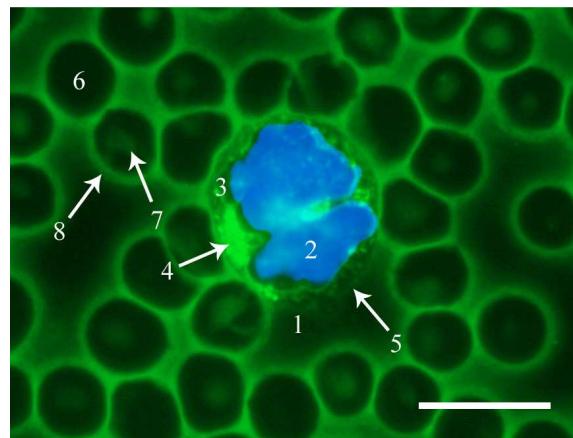


Abbildung IV-95: Monozyt, ConA-FITC (Schaf, w, 5 Jahre)

Dieser Monozyt (1) zeigt neben einer diffusen Fluoreszenz des Zytosplasmas (3) eine starke Reaktion seiner Granula (4) und eine schwache Reaktion der Membran (5). Bei den Erythrozyten (6) kann eine positive Reaktion sowohl im Zytoplasma (7) als auch an der Membran (8) erkannt werden. 2 = Zellkern, SB = 10 µm

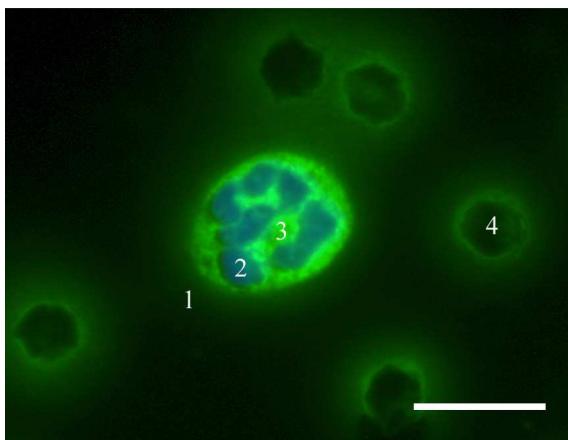


Abbildung IV-96: Neutrophiler Granulozyt, ConA-FITC (Schaf, m, 6 Jahre)

Die zytoplasmatischen Granula (3) des neutrophilen Granulozyten (1) reagieren stark positiv.
2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

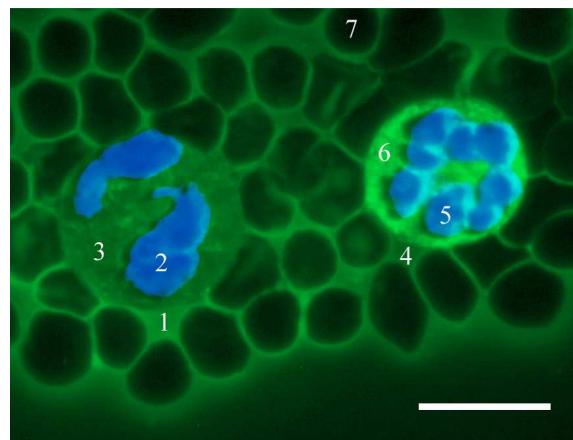


Abbildung IV-97: Eosinophiler und neutrophiler Granulozyt, ConA-FITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Das Zytoplasma (3) des eosinophilen Granulozyten (1) färbt sich nur schwach an. Bei dem neutrophilen Granulozyten (4) kann deutlich eine granuläre Reaktion (6) beobachtet werden.
2 = Zellkern eosinophiler Granulozyt,
5 = Zellkern neutrophiler Granulozyt,
7 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

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

In allen Präparaten kann eine positive Reaktion der Erythrozytenmembran mit LCA (vgl. Abb. IV-98, IV-99, IV-100, IV-101) festgestellt werden, das Zytoplasma hingegen reagiert bei mehr als der Hälfte der Zellen negativ. In einem Großteil der Ausstriche lässt sich eine starke Bindung von LCA an die Granula der Thrombozyten beobachten, Membran und Hyalomer reagieren stets negativ (vgl. Abb. IV-98, IV-101). Bei fast allen Tieren zeigt sich eine schwache bis starke Fluoreszenz der Membran und der Granula von Lymphozyten und Monozyten, das Zytoplasma reagiert jedoch nur in wenigen Fällen positiv (vgl. Abb. IV-98, IV-99). Bei den neutrophilen Granulozyten kann eine deutliche bis starke Bindung von LCA an die Granula nachgewiesen werden. Die Membran färbt sich nur in wenigen Fällen an und das Zytoplasma zeigt keine Reaktion (vgl. Abb. IV-100). Die Granula der eosinophilen Granulozyten sind stets negativ, die Membran und das Zytoplasma zeigen hingegen bei ca. zwei Dritteln der Ausstriche eine schwach bis deutlich positive Reaktion (vgl. Abb. IV-101). In der Tabelle IV.23 sind die Ergebnisse der LCA-Bindung zusammengefasst.

Tabelle IV.23: Einzelauswertung Lektine: LCA-FITC

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	0 %	0 %	23,1 %	76,9 %	100 %
- Zytoplasma	53,8 %	46,2 %	0 %	0 %	46,2 %
Thrombozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Hyalomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granulomer	0 %	0 %	38,5 %	61,5 %	100 %
Lymphozyten					
- Membran	0 %	61,5 %	30,8 %	7,7 %	100 %
- Zytoplasma	92,3 %	7,7 %	0 %	0 %	7,7 %
- Granula	7,7 %	0 %	38,5 %	53,8 %	92,3 %
Monozyten					
- Membran	7,7 %	61,5 %	30,8 %	0 %	92,3 %
- Zytoplasma	69,2 %	30,8 %	0 %	0 %	30,8 %
- Granula	0 %	0 %	38,5 %	61,5 %	100 %
Neutrophile Granulozyten					
- Membran	76,9 %	23,1 %	0 %	0 %	23,1 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	0 %	30,8 %	69,2 %	100 %
Eosinophile Granulozyten					
- Membran	23,1 %	61,5 %	15,4 %	0 %	76,9 %
- Zytoplasma	30,8 %	46,1 %	23,1 %	0 %	69,2 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Basophile Granulozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-

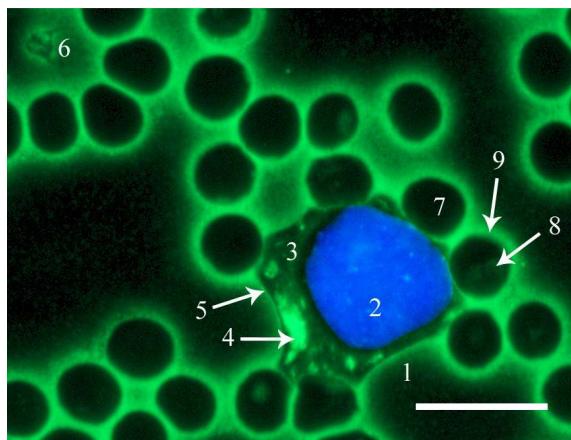


Abbildung IV-98: Lymphozyt und Thrombozyt, LCA-FITC (Schaf, w, 1 Jahr)

Bei dem Lymphozyten (1) ist sowohl eine Fluoreszenz der Granula (4) im Zytoplasma (3) als auch der Zellmembran (5) zu sehen. Die Thrombozyten (6) zeigen eine Bindung von LCA an das Granulomer. Bei manchen Erythrozyten (7) reagieren sowohl das Zytoplasma (8) als auch die Membran (9) positiv.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

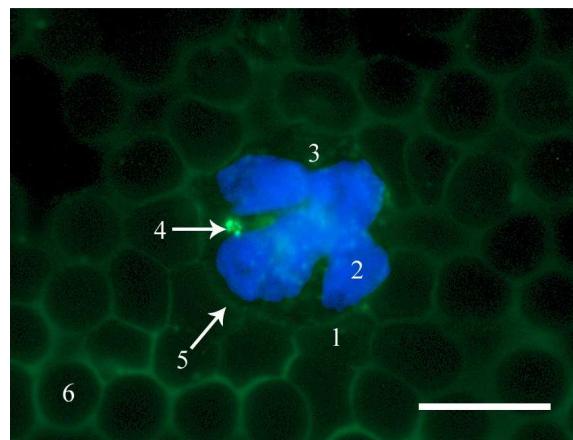


Abbildung IV-99: Monozyt, LCA-FITC (Schaf, w, 5 Jahre)

Der Monozyt (1) zeigt eine leichte, diffuse, körnige Fluoreszenz im Zytoplasma (3), die teilweise den Zellkern (2) bedeckt. Zusätzlich kann eine starke, fokale Reaktion (4) im Zytoplasma beobachtet werden. Die Membran (5) reagiert nur schwach positiv. Auch die Erythrozytenmembran (6) zeigt nur eine schwache Fluoreszenz.

SB = 10 µm

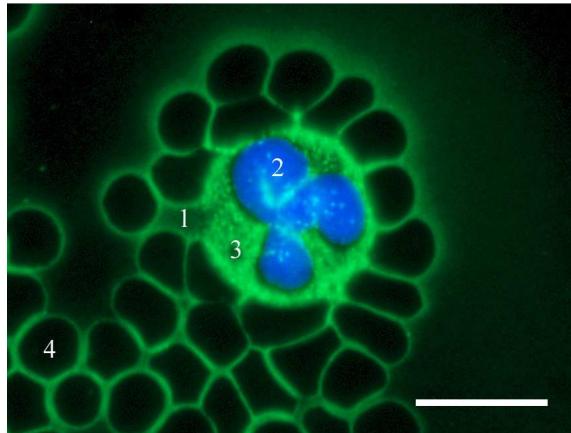


Abbildung IV-100: Neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC (Schaf, w, 1 Jahr)

Die zytoplasmatischen Granula (3) des neutrophilen Granulozyten (1) reagieren stark positiv und überlagern zum Teil den Zellkern (2). Erythrozyten (4) mit positiv reagierender Zellmembran.

SB = 10 µm

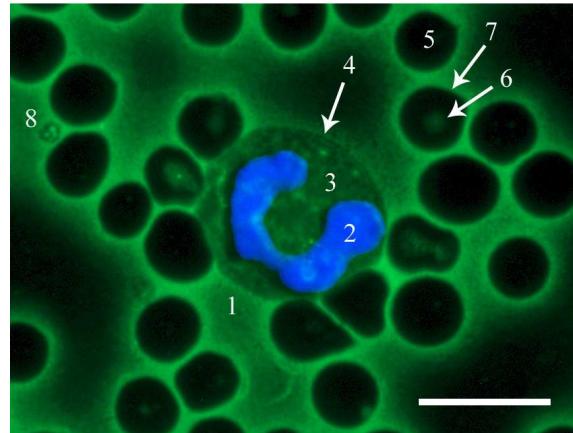


Abbildung IV-101: Eosinophiler Granulozyt, LCA-FITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Das Zytoplasma (3) und die Zellmembran (4) des eosinophilen Granulozyten (1) zeigen eine schwache Bindung von LCA. Erythrozyten (5) mit positivem Zytoplasma (6) und positiver Membran (7). Thrombozyt (8) mit positiven Granula.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

4.2.1.3 Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin (PSA-FITC)

Bei allen Ausstrichen kann eine Bindung von PSA an die Erythrozytenmembran (vgl. Abb. IV-102, IV-103, IV-104, IV-105) beobachtet werden, wobei der Großteil der Zellen stark positiv reagiert. Das Zytoplasma ist in den meisten Fällen negativ. Die Granula der Thrombozyten sind entweder schwach oder deutlich positiv, die Membran und das Hyalomer zeigen keine Reaktion (vgl. Abb. IV-104). Eine Anfärbung der Membran und des Zytoplasmas der Lymphozyten gelingt bei dem Großteil der Zellen nicht. Bei jedem Ausstrich kommen jedoch Zellen vor, deren Granula unterschiedlich stark, von schwach bis stark positiv, reagieren (vgl. Abb. IV-102). Die Monozyten lassen keine Bindung von PSA an Membran oder Granula erkennen, das Zytoplasma hingegen reagiert immer positiv (vgl. Abb. IV-103). Die neutrophilen Granulozyten zeigen stets eine deutlich bis stark positive Bindung des Lektins an ihre Granula. Membran und Zytoplasma hingegen scheinen stets negativ zu sein (vgl. Abb. IV-104). Die eosinophilen Granulozyten färben sich mit PSA nicht an (vgl. Abb. IV-105). In der Tabelle IV.24 sind die Ergebnisse der PSA-Bindung zusammengefasst.

Tabelle IV.24: Einzelauswertung Lektine: PSA-FITC

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	0 %	14,3 %	14,3 %	71,4 %	100 %
- Zytoplasma	78,6 %	21,4 %	0 %	0 %	21,4 %
Thrombozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Hyalomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granulomer	0 %	45,5 %	54,5 %	0 %	100 %
Lymphozyten					
- Membran	71,4 %	21,4 %	7,2 %	0 %	28,6 %
- Zytoplasma	92,9 %	7,1 %	0 %	0 %	7,1 %
- Granula	0 %	14,3 %	57,1 %	28,6 %	100 %
Monozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Zytoplasma	0 %	42,9 %	42,9 %	14,2 %	100 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Neutrophile Granulozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	0 %	50 %	50 %	100 %
Eosinophile Granulozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Basophile Granulozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-

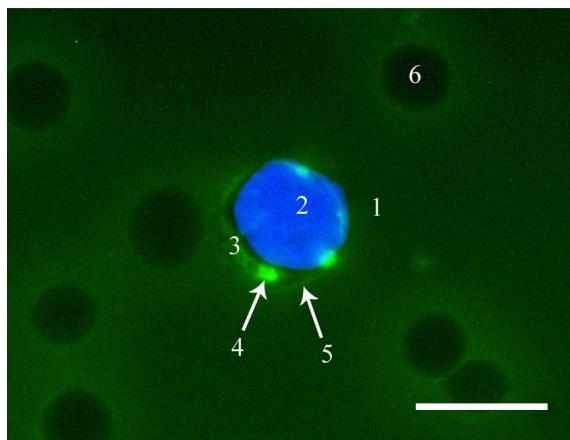


Abbildung IV-102: Lymphozyt, PSA-FITC (Schaf, m, 6 Jahre)

Bei dem Lymphozyten (1) ist sowohl eine starke fokale Fluoreszenz (4) im Zytoplasma (3) als auch eine leichte Reaktion der Zellmembran (5) zu erkennen. Bei den Erythrozyten (6) reagiert die Membran nur schwach positiv.

2 = Zellkern, SB = 10 μ m

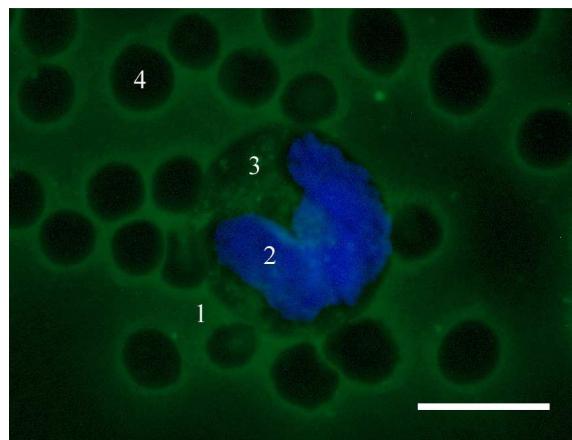


Abbildung IV-103: Monozyt, PSA-FITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Der Monozyt (1) zeigt eine leichte, diffuse, körnige Fluoreszenz im Zytoplasma (3), die teilweise den Zellkern bedeckt (2). Die Membran der Erythrozyten (4) reagiert deutlich positiv.

SB = 10 μ m

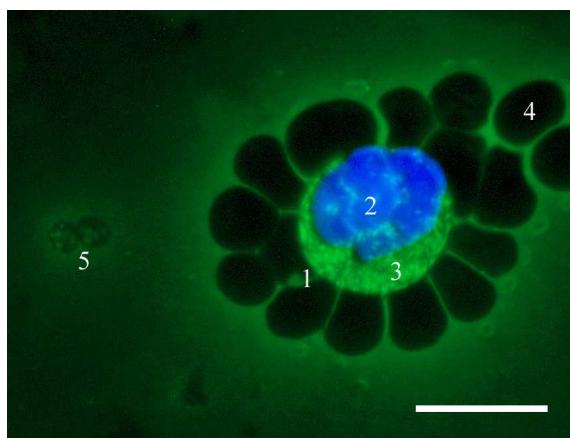


Abbildung IV-104: Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Die Granula (3) des neutrophilen Granulozyten (1) reagieren stark positiv und überlagern teilweise den Zellkern (2). Die Erythrozyten (4) zeigen eine stark positiv reagierende Zellmembran, die Thrombozyten (5) schwach positiv reagierende Granula. SB = 10 μ m

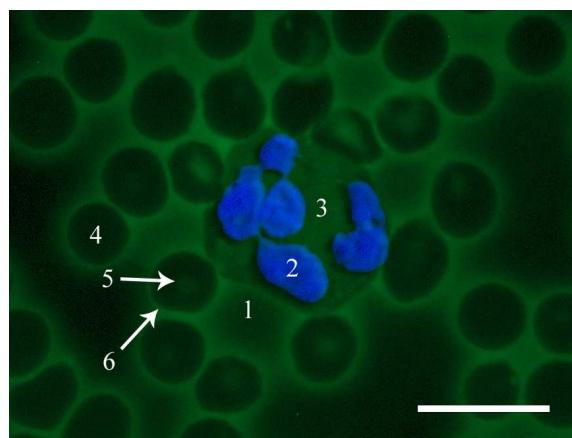


Abbildung IV-105: Eosinophiler Granulozyt, PSA-FITC (Schaf, w, 5 Jahre)

Der eosinophile Granulozyt (1) lässt keine Bindung von PSA im Zytoplasma (3) oder an der Membran erkennen. Erythrozyten (4) mit positivem Zytoplasma (5) und positiver Membran (6).

2 = Zellkern, SB = 10 μ m

4.2.2 Galaktose-spezifische Lektine

4.2.2.1 Bindung von Peanut Agglutinin (PNA-FITC)

Bei keinem der Blutausstriche ist eine Bindung von PNA an die ovinen Blutzellen zu erkennen.

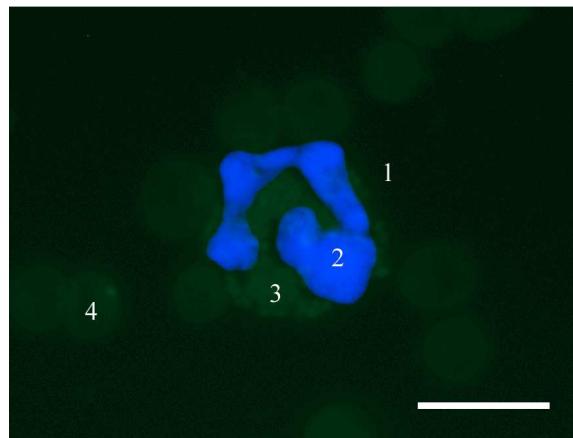


Abbildung IV-106: Eosinophiler Granulozyt, PNA-FITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Die Granula (3) des eosinophilen Granulozyten (1) lassen sich zwar erkennen, zeigen aber keine Fluoreszenz. Die Erythrozyten (4) reagieren ebenfalls negativ. 2 = Zellkern, SB = 10 μ m

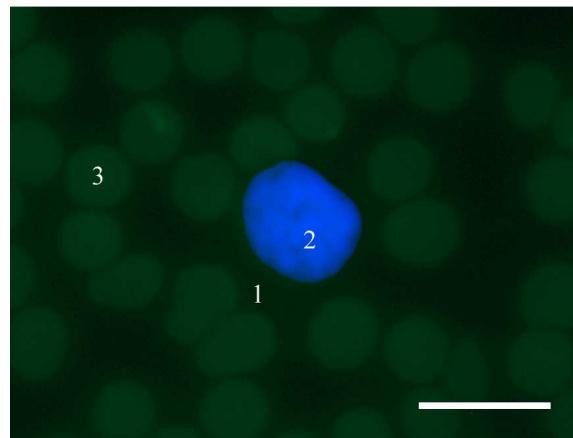


Abbildung IV-107: Lymphozyt, PNA-FITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Weder die Membran noch das Zytoplasma des Lymphozyten (1) binden PNA. Die Erythrozyten (3) sind deutlich zu erkennen, zeigen aber keine Fluoreszenz. 2 = Zellkern, SB = 10 μ m

4.2.2.2 Bindung von Ricinus communis Agglutinin (RCA-FITC)

Bei keinem der Blutausstriche lässt sich eine Bindung von RCA an die ovinen Blutzellen beobachten.

4.2.2.3 Bindung von Viscum album Agglutinin (VAA-Biotin)

Bei keinem der Blutausstriche kann eine Bindung von VAA an die ovinen Blutzellen festgestellt werden.

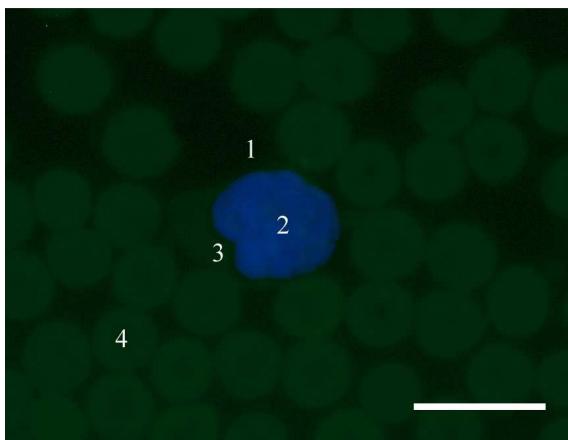


Abbildung IV-108: Lymphozyt, VAA-Biotin (Schaf, w, 6 Jahre)

Sowohl der Lymphozyt (1) als auch die Erythrozyten (4) reagieren negativ.
2 = Zellkern, 3 = Zytoplasma, SB = 10 μ m

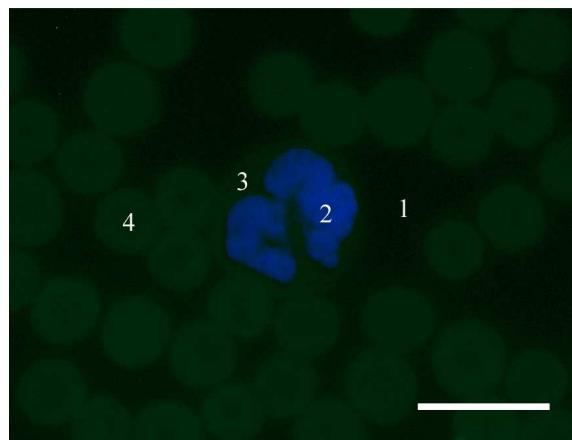


Abbildung IV-109: Neutrophiler Granulozyt, VAA-Biotin (Schaf, w, 6 Jahre)

Auch der neutrophile Granulozyt (1) zeigt keine Fluoreszenz im Zytoplasma (3).
2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 μ m

4.2.3 N-Acetyl-Glukosamin-spezifische Lektine

4.2.3.1 Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA-FITC)

Die Membran der Erythrozyten weist bei allen Ausstrichen eine positive Reaktion auf, die Intensität variiert jedoch von schwach bis zu stark positiv (vgl. Abb. IV-110, IV-111, IV-112, IV-113). Das Zytoplasma zeigt nur bei einem Viertel der roten Blutkörperchen eine schwache Fluoreszenz (vgl. Abb. IV-110). Die Granula der Thrombozyten lassen stets eine positive Reaktion erkennen, Membran und Hyalomer sind stets negativ (vgl. Abb. IV-110, IV-112, IV-113). Bei den Lymphozyten färben sich die Zellmembran und bei dem Großteil der Zellen die Granula an, das Zytoplasma scheint stets negativ zu sein (vgl. Abb. IV-110). Die Monozyten hingegen zeigen in allen Fällen eine diffuse, granuläre Reaktion im Zytoplasma und bei dem überwiegenden Anteil der Zellen eine Bindung von WGA an die Zellmembran (vgl. Abb. IV-111). Die Beurteilung einer Reaktion der gelegentlich vorkommenden, zytoplasmatischen Granula ist durch die meist intensive Anfärbung im Zytoplasma kaum möglich. Bei den neutrophilen Granulozyten lässt sich stets eine stark positive Reaktion der Granula feststellen, aber auch die Membran weist in über der Hälfte der Fälle eine leichte bis deutliche Fluoreszenz auf (vgl. Abb. IV-112). Das Zytoplasma hingegen ist stets negativ. Bei den eosinophilen Granulozyten kann eine leichte bis deutliche Bindung von WGA an die Membran und das Zytoplasma festgestellt werden, nicht aber an die Granula (vgl. Abb. IV-113). In der Tabelle IV.25 sind die Ergebnisse der WGA-Bindung zusammengefasst.

Tabelle IV.25: Einzelauswertung Lektine: WGA-FITC

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	0 %	16,7 %	58,3 %	25 %	100 %
- Zytoplasma	75 %	25 %	0 %	0 %	25 %
Thrombozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Hyalomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granulomer	0 %	16,7 %	33,3 %	50 %	100 %
Lymphozyten					
- Membran	0 %	16,7 %	66,6 %	16,7 %	100 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	25 %	25 %	33,3 %	16,7 %	75 %
Monozyten					
- Membran	16,7 %	50 %	33,3 %	0 %	83,3 %
- Zytoplasma	0 %	0 %	50 %	50 %	100 %
- Granula	-	-	-	-	-
Neutrophile Granulozyten					
- Membran	41,7 %	33,3 %	25 %	0 %	58,3 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Eosinophile Granulozyten					
- Membran	0 %	33,3 %	66,7 %	0 %	100 %
- Zytoplasma	0 %	58,3 %	41,7 %	0 %	100 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Basophile Granulozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-

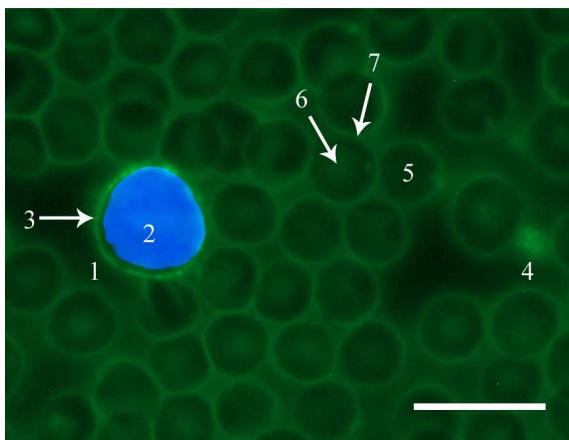


Abbildung IV-110: Lymphozyt und Thrombozyt, WGA-FITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Der Lymphozyt (1) zeigt eine positive Reaktion der Membran (3). Der Thrombozyt (4) weist eine Fluoreszenz im Granulomer auf. Bei den Erythrozyten (5) reagiert sowohl das Zytoplasma (6) als auch die Membran (7) positiv.

2 = Zellkern, SB = 10 μ m

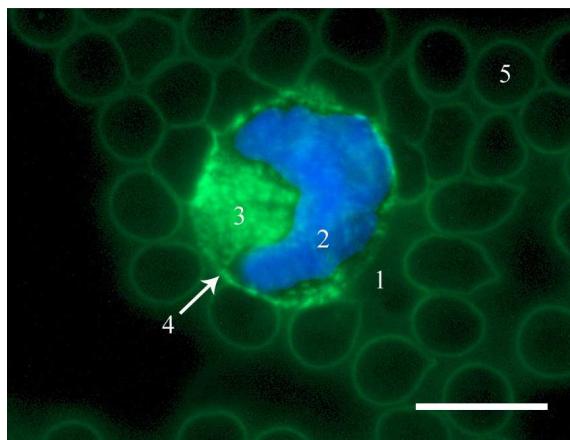


Abbildung IV-111: Monozyt, WGA-FITC (Schaf, w, 5 Jahre)

Bei dem Monozyten (1) lässt sich eine starke, diffuse, granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma (3) und eine Bindung von WGA an die Zellmembran (4) erkennen. Die Membran der Erythrozyten (5) reagiert deutlich positiv. 2 = Zellkern, SB = 10 μ m

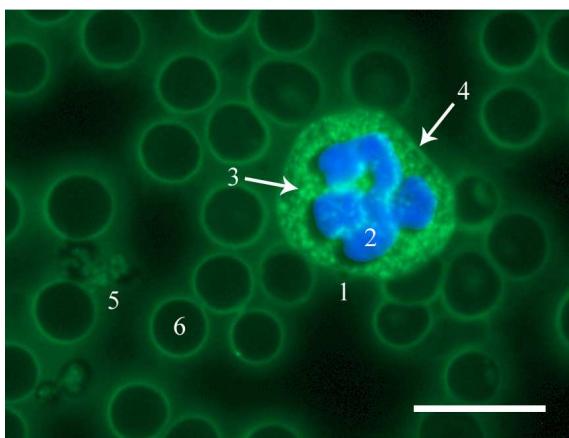


Abbildung IV-112: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten, WGA-FITC (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Die Granula (3) des neutrophilen Granulozyten (1) reagieren stark positiv und überlagern teilweise den Zellkern (2). Zudem zeigt die Membran (4) eine deutliche Fluoreszenz. Thrombozyten (5) mit schwach positiven Granula, Erythrozyten (6) mit positiver Membran.

2 = Zellkern, SB = 10 μ m

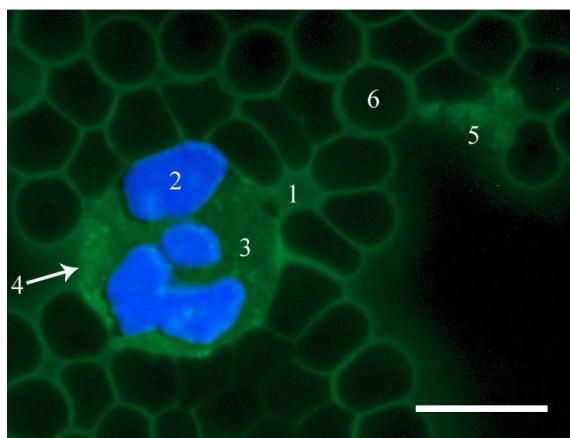


Abbildung IV-113: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, WGA-FITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Der eosinophile Granulozyt (1) zeigt neben einer diffusen Fluoreszenz im Zytoplasma (3) eine schwache Reaktion der Membran (4). Thrombozyten (5) mit positiven Granula, Erythrozyten (6) mit positiver Membran. 2 = Zellkern, SB = 10 μ m

4.2.3.2 Bindung von succinyliertem Wheat germ Agglutinin (WGAs-FITC)

WGAs zeigt bei fast allen Präparaten eine schwache bis starke Bindung an die Membran der Erythrozyten (vgl. Abb. IV-114, IV-115, IV-116, IV-117), das Zytoplasma hingegen färbt sich nur bei der Hälfte der Zellen schwach an (vgl. Abb. IV-114). Das Granulomer der Thrombozyten reagiert stets deutlich bis stark positiv, Membran und Hyalomer sind negativ (vgl. Abb. IV-114, IV-117). Bei den mononukleären Zellen, also den Lymphozyten und den Monozyten, kann zu 100 % eine Bindung von WGAs an die Membran festgestellt werden (vgl. Abb. IV-114, IV-115). Bei der Hälfte der Lymphozyten ist eine meist stark positive Reaktion der Granula zu sehen, das Zytoplasma färbt sich in den meisten Fällen nicht an (vgl. Abb. IV-114). Das Zytoplasma der Monozyten hingegen weist stets eine relativ starke, diffuse oder körnige Fluoreszenz auf, wodurch die Beurteilung einer Reaktion der zytoplasmatischen Granula kaum möglich ist (vgl. Abb. IV-115). Die neutrophilen Granulozyten zeigen zum Großteil eine Fluoreszenz der Membran und in allen Fällen eine stark positive Bindung von WGAs an die Granula (vgl. Abb. IV-116). Die Granula der eosinophilen Granulozyten reagieren jedoch augenscheinlich allesamt negativ, wogegen im Zytoplasma stets eine Fluoreszenz festgestellt werden kann. Zudem reagiert die Membran überwiegend positiv (vgl. Abb. IV-117). In der Tabelle IV.26 sind die Ergebnisse der WGAs-Bindung zusammengefasst.

Tabelle IV.26: Einzelauswertung Lektine: WGAs-FITC

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	10 %	20 %	40 %	30 %	90 %
- Zytoplasma	50 %	50 %	0 %	0 %	50 %
Thrombozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Hyalomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granulomer	0 %	0 %	60 %	40 %	100 %
Lymphozyten					
- Membran	0 %	10 %	60 %	30 %	100 %
- Zytoplasma	80 %	20 %	0 %	0 %	20 %
- Granula	50 %	0 %	10 %	40 %	50 %
Monozyten					
- Membran	0 %	57,1 %	42,9 %	0 %	100 %
- Zytoplasma	0 %	0 %	28,6 %	71,4 %	100 %
- Granula	-	-	-	-	-
Neutrophile Granulozyten					
- Membran	20 %	50 %	30 %	0 %	80 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Eosinophile Granulozyten					
- Membran	30 %	0 %	60 %	10 %	70 %
- Zytoplasma	0 %	40 %	30 %	30 %	100 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Basophile Granulozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-

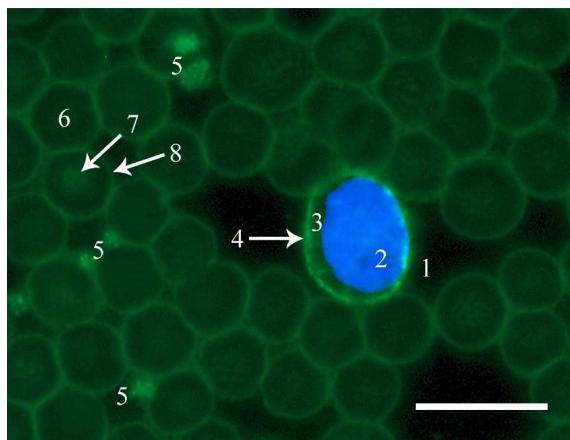


Abbildung IV-114: Lymphozyt und Thrombozyten, WGAs-FITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Die Membran (4) des Lymphozyten (1) reagiert stark positiv, das Zytosol (3) ist negativ. Die Thrombozyten (5) weisen eine Fluoreszenz im Granulomer auf. Bei den Erythrozyten (6) reagieren sowohl das Zytosol (7) als auch die Membran (8) positiv.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

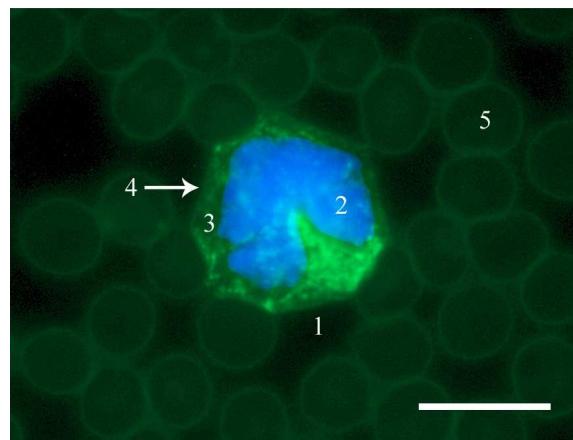


Abbildung IV-115: Monozyt, WGAs-FITC (Schaf, w, 5 Jahre)

Bei dem Monozyten (1) zeigt sich eine starke, diffuse, körnige Fluoreszenz im Zytosol (3), die im Bereich der Kerninvagination besonders ausgeprägt ist. Eine Bindung von WGAs an die Zellmembran (4) kann ebenfalls beobachtet werden. Die Membran der Erythrozyten (5) reagiert deutlich positiv. 2 = Zellkern, SB = 10 µm

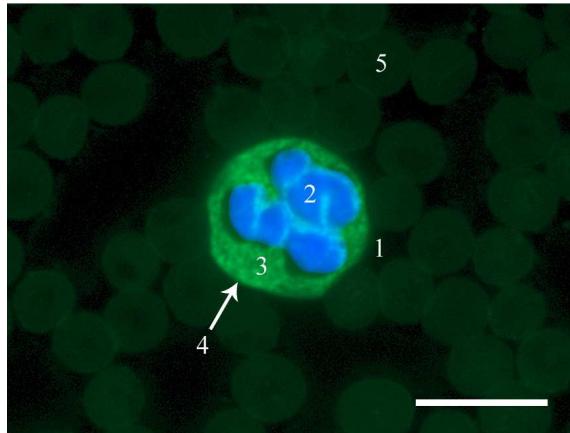


Abbildung IV-116: Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Die Granula (3) des neutrophilen Granulozyten (1) reagieren stark positiv, das Zytosol scheint negativ zu sein. Zudem lässt sich an der Membran (4) eine deutlich positive Reaktion erkennen. Die Erythrozyten (5) reagieren negativ.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

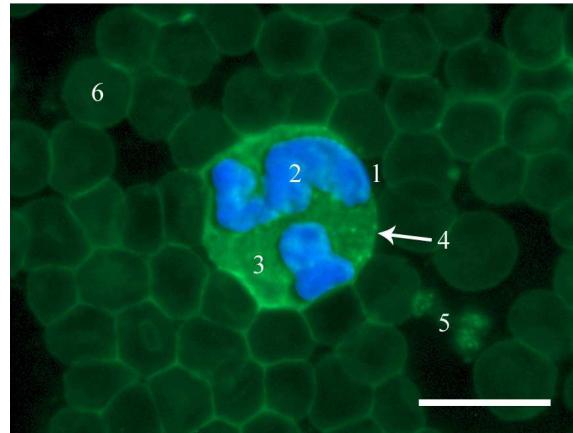


Abbildung IV-117: Eosinophiler Granulozyt, WGAs-FITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Der eosinophile Granulozyt (1) zeigt eine diffuse Fluoreszenz im Zytosol (3), eine Reaktion der Granula lässt sich nicht erkennen. Weiterhin ist eine Bindung von WGAs an die Membran (4) zu sehen.

2 = Zellkern, 5 = Thrombozyten,
6 = Erythrozyt, SB = 10 µm

4.2.4 N-Acetyl-Galaktosamin-spezifische Lektine

4.2.4.1 Bindung von *Griffonia simplicifolia* I Agglutinin (GSL-I-FITC)

Bei dem Großteil der Ausstriche kann eine Bindung von GSL-I weder an die Membran noch an das Zytoplasma der Erythrozyten festgestellt werden (vgl. Abb. IV-119, IV-120, IV-121). Eine schwach positive Reaktion der Erythrozytenmembran lässt sich jedoch selten beobachten (vgl. Abb. IV-118). Die Thrombozyten hingegen zeigen stets eine stark positive Reaktion im Granulomer, die Membran und das Hyalomer sind stets negativ (vgl. Abb. IV-118, IV-119, IV-121). Die Membran der Lymphozyten reagiert zu 100 % stark positiv und das Zytoplasma zeigt stets eine Fluoreszenz. Eine Reaktion der zytoplasmatischen Granula kann jedoch nicht beobachtet werden (vgl. Abb. IV-118). Auch die Monozyten lassen meist eine deutliche Bindung von GSL-I an die Membran erkennen. Im Zytoplasma ist stets eine schwache bis deutliche, diffuse oder körnige Fluoreszenz zu sehen, eine Reaktion der Granula kann jedoch nicht beobachtet werden (vgl. Abb. IV-119). Bei den neutrophilen Granulozyten ist immer eine starke Fluoreszenz der Granula festzustellen, an der Membran und im Zytoplasma ist keine Reaktion zu erkennen (vgl. Abb. IV-120). Die eosinophilen Granulozyten zeigen eine starke Fluoreszenz der Membran und eine meist deutlich positive Reaktion des Zytosplasmas. An die Granula wird offenbar kein GSL-I gebunden (vgl. Abb. IV-121). In der Tabelle IV.27 sind die Ergebnisse der GSL-I-Bindung zusammengefasst.

Tabelle IV.27: Einzelauswertung Lektine: GSL-I-FITC

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	88,9 %	11,1 %	0 %	0 %	11,1 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Thrombozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Hyalomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granulomer	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Lymphozyten					
- Membran	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
- Zytoplasma	0 %	0 %	77,8 %	22,2 %	100 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Monozyten					
- Membran	12,5 %	0 %	62,5 %	25 %	87,5 %
- Zytoplasma	0 %	37,5 %	62,5 %	0 %	100 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Neutrophile Granulozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Eosinophile Granulozyten					
- Membran	0 %	0 %	0 %	100 %	100 %
- Zytoplasma	0 %	37,5 %	62,5 %	0 %	100 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Basophile Granulozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-

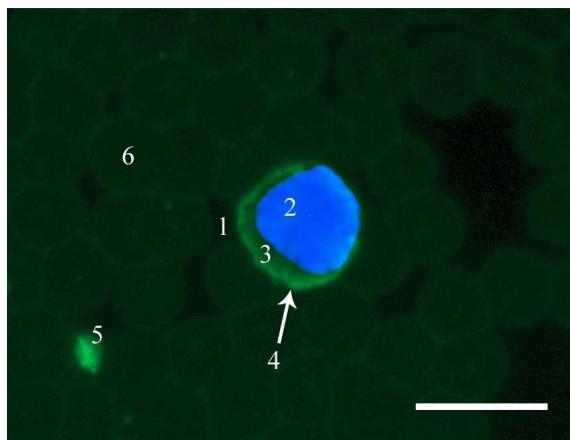


Abbildung IV-118: Lymphozyt und Thrombozyt, GSL-I-FITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Bei dem Lymphozyten (1) ist eine Fluoreszenz im Zytoplasma (3) und eine starke Reaktion der Membran (4) zu erkennen. Der Thrombozyt (5) zeigt eine starke Anfärbung im Granulomer. Bei den Erythrozyten (6) ist eine nur schwache Bindung von GSL-I an die Membran zu sehen.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

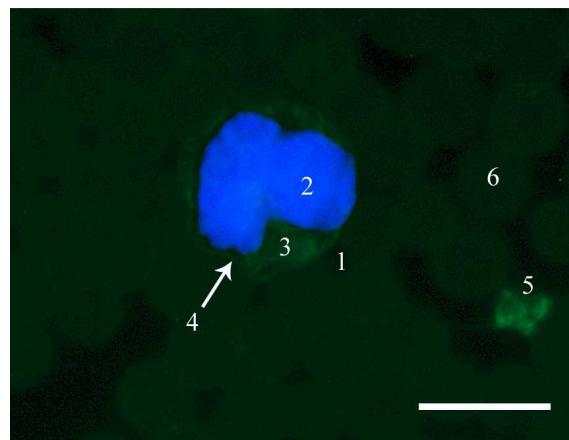


Abbildung IV-119: Monozyt und Thrombozyten, GSL-I-FITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Der Monozyt (1) zeigt eine diffuse, körnige Reaktion im Zytoplasma (3) und eine Anfärbung der Membran (4). Die Thrombozyten (5) lassen positiv reagierende Granula erkennen. Die Erythrozyten (6) reagieren negativ.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

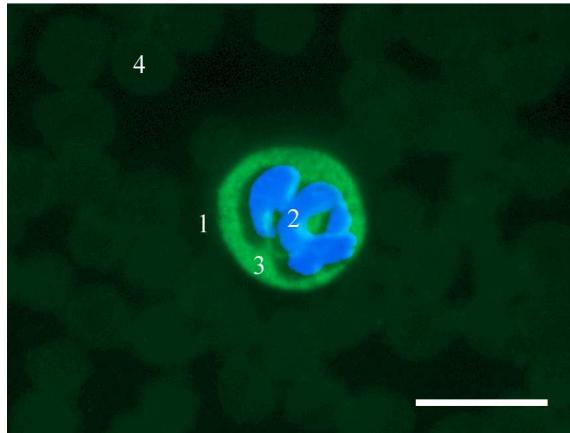


Abbildung IV-120: Neutrophiler Granulozyt, GSL-I-FITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Der neutrophile Granulozyt (1) zeigt eine starke Bindung von GSL-I an die zytoplasmatischen Granula (3). Membran und Zytoplasma scheinen sich nicht anzufärben. Die Erythrozyten (4) reagieren negativ.

2 = Zellkern, SB = 10 µm

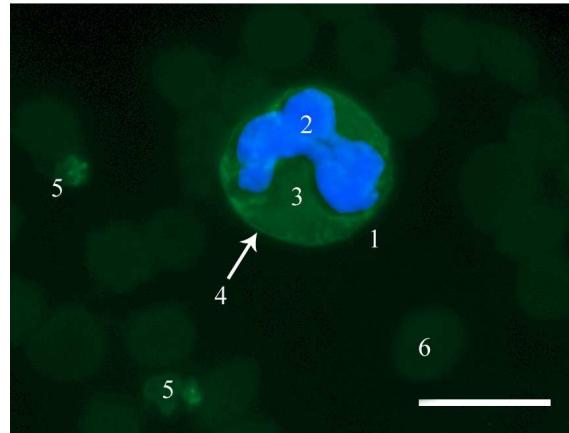


Abbildung IV-121: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, GSL-I-FITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Das Zytoplasma (3) und die Zellmembran (4) des eosinophilen Granulozyten (1) zeigen eine deutlich bzw. stark positive Reaktion. Die Thrombozyten (5) lassen eine Anfärbung der Granula erkennen.

2 = Zellkern, 6 = Erythrozyt, SB = 10 µm

4.2.4.2 Bindung von *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA-FITC)

Bei keinem der Blutausstriche kann eine Bindung von DBA an die ovinen Blutzellen festgestellt werden.

4.2.4.3 Bindung von *Sophora japonica* Agglutinin (SJA-FITC)

In keinem der Präparate kann eine Bindung von SJA an Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten (vgl. Abb. IV-123) oder neutrophile Granulozyten festgestellt werden. Bei 40 % der Ausstriche zeigen die Granula der eosinophilen Granulozyten eine leichte bis deutlich positive Reaktion (vgl. Abb. IV-122).

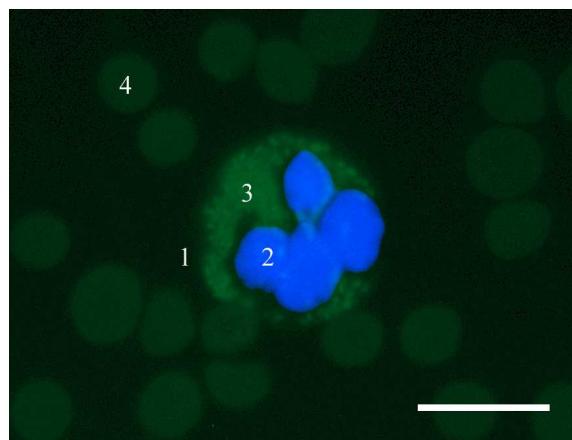


Abbildung IV-122: Eosinphiler Granulozyt, SJA-FITC (Schaf, w, 2 Jahre)

Die Granula (3) des eosinophilen Granulozyten (1) reagieren positiv. Die Erythrozyten (4) zeigen keine Reaktion.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

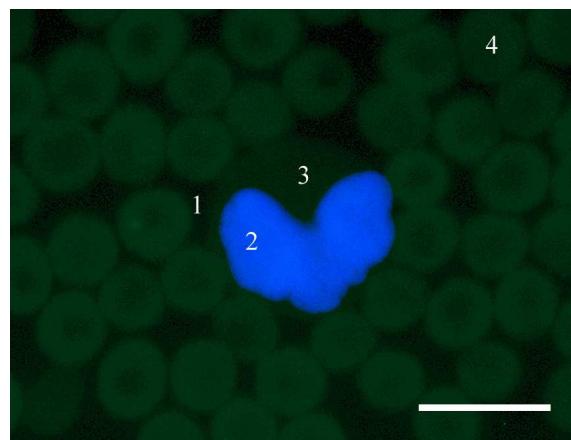


Abbildung IV-123: Monozyt, SJA-FITC (Schaf, w, 5 Jahre)

Weder das Zytoplasma (3) noch die Membran des Monozyten (1) reagieren positiv. Die Erythrozyten (4) lassen sich ebenfalls nicht anfärbigen.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

4.2.5 Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosamin- spezifische Lektine

4.2.5.1 Bindung von Soybean Agglutinin (SBA-FITC)

Bei keinem der Blutausstriche ist eine Bindung von SBA an die ovinen Blutzellen zu beobachten.

4.2.5.2 Bindung von *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA-Biotin)

Bei keinem der Ausstriche kann eine Bindung von SNA an die ovinen Blutzellen beobachtet werden.

4.2.6 L-Fukose-spezifische Lektine

4.2.6.1 Bindung von *Ulex europaeus* I Agglutinin (UEA-I-FITC)

Auch bei UEA-I kann bei keinem Blutausstrich eine Bindung an Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten oder neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Alle Präparate zeigen jedoch eine Reaktion der eosinophilen Granula (vgl. Abb. IV-124), die von leicht (70 %) bis deutlich (30 %) reicht.

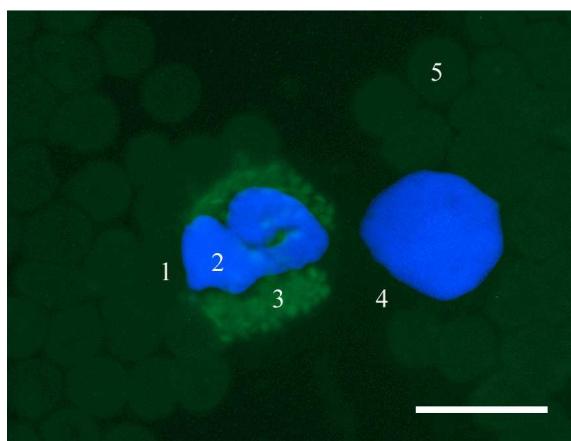


Abbildung IV-124: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, UEA-I-FITC (Schaf, w, 1 Jahr)

Die Granula (3) des eosinophilen Granulozyten (1) reagieren deutlich positiv. Der Lymphozyt (4) und die Erythrozyten (5) zeigen keine Reaktion.
2 = Zellkern, SB = 10 μ m

4.2.7 Für komplexe Kohlenhydratstrukturen spezifische Lektine

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

Eine Bindung von PHA-E kann nur an die Granula der neutrophilen Granulozyten (vgl. Abb. IV-125) festgestellt werden. Die Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten (vgl. Abb. IV-126) lassen sich nicht anfärben. Alle neutrophilen Granula reagieren positiv, wobei die Intensität von schwach (18,2 %) bis deutlich (81,8 %) positiv reicht.

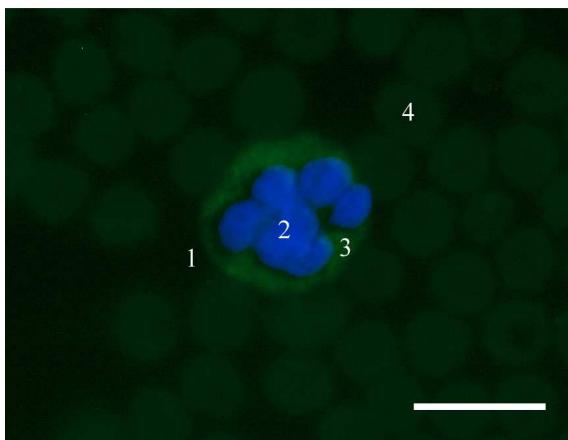


Abbildung IV-125: Neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC (Schaf, m, 7 Jahre)

Die Granula (3) des neutrophilen Granulozyten (1) zeigen eine deutlich positive Reaktion. Die Erythrozyten (4) reagieren negativ.
2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 µm

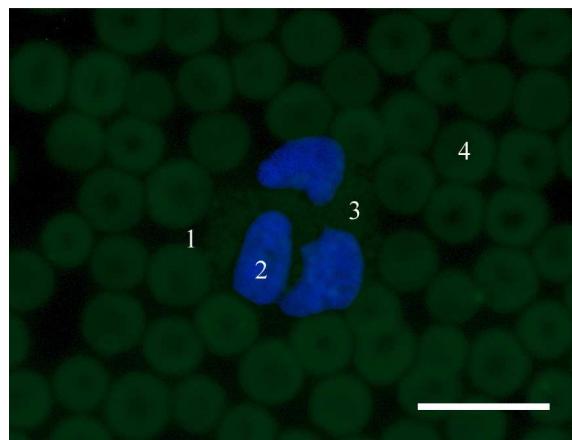


Abbildung IV-126: Eosinophiler Granulozyt, PHA-E-FITC (Schaf, w, 6 Jahre)

Der eosinophile Granulozyt (1) reagiert negativ. Die Granula im Zytoplasma (3) sind erkennbar, zeigen aber keine Fluoreszenz.
2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 µm

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

In keinem der Ausstriche kann eine Bindung von PHA-L an die Membran oder das Zytoplasma der Erythrozyten festgestellt werden (vgl. Abb. IV-127, IV-128). Die Thrombozyten hingegen zeigen meist eine deutlich positive Reaktion im Granulomer, die Membran und das Hyalomer sind stets negativ. Bei allen Lymphozyten (vgl. Abb. IV-127) und Monozyten ist eine Anfärbung der Zellmembran zu erkennen, die Intensität ist jedoch meist nur schwach. Sowohl bei den Lymphozyten als auch bei den Monozyten lässt sich bei einigen Zellen eine positive Reaktion des Zytoplasmas beobachten, wobei sich die zytoplasmatischen Granula offenbar nicht anfärben. Die neutrophilen Granulozyten weisen stets eine schwach bis deutlich positive Reaktion der Granula auf, aber auch die Membran lässt sich bei manchen Zellen schwach anfärben. Das Zytoplasma hingegen ist stets negativ. Bei den eosinophilen Granulozyten verhält sich das Bindungsverhalten von PHA-L genau umgekehrt. Die eosinophilen Granula sind stets negativ. Dafür weisen sowohl Membran als auch Zytoplasma in allen Fällen eine schwache bis deutliche Reaktion auf (vgl. Abb. IV-128). In der Tabelle IV.28 sind die Ergebnisse der PHA-L-Bindung zusammengefasst.

Tabelle IV.28: Einzelauswertung Lektine: PHA-L-FITC

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Thrombozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Hyalomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granulomer	0 %	25 %	75 %	0 %	100 %
Lymphozyten					
- Membran	0 %	75 %	25 %	0 %	100 %
- Zytoplasma	75 %	25 %	0 %	0 %	25 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Monozyten					
- Membran	0 %	100 %	0 %	0 %	100 %
- Zytoplasma	50 %	25 %	25 %	0 %	50 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Neutrophile Granulozyten					
- Membran	75 %	25 %	0 %	0 %	25 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	75 %	25 %	0 %	100 %
Eosinophile Granulozyten					
- Membran	0 %	50 %	50 %	0 %	100 %
- Zytoplasma	0 %	75 %	25 %	0 %	100 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Basophile Granulozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-

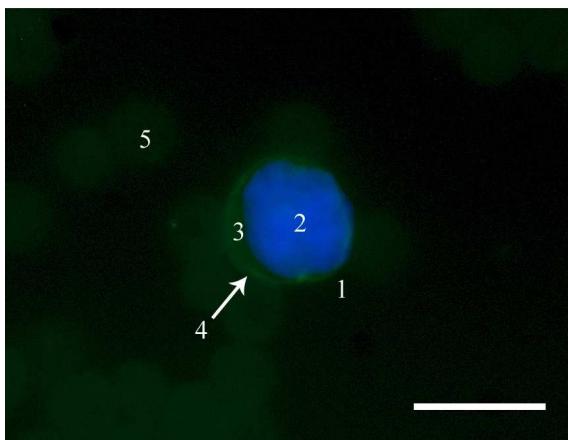


Abbildung IV-127: Lymphozyt, PHA-L-FITC (Schaf, m, 5 Jahre)

Die Membran (4) des Lymphozyten (1) reagiert positiv, das Zytoplasma (3) hingegen negativ. Die Erythrozyten (5) zeigen keine Reaktion.

2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

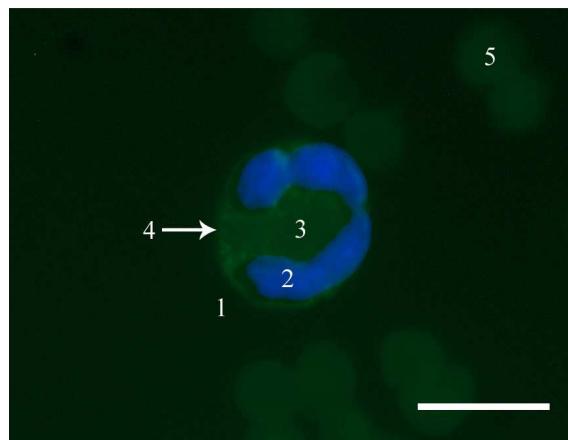


Abbildung IV-128: Eosinophiler Granulozyt, PHA-L-FITC (Schaf, m, 6 Jahre)

Bei dem eosinophilen Granulozyten (1) reagieren Zytoplasma (3) und Membran (4) positiv. Die Granula färben sich nicht an. 2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

4.2.7.3 Bindung von *Maackia amurensis* I Agglutinin (MAA-I-Biotin)

In keinem der untersuchten Präparate kann eine Bindung von MAA-I an die Membran oder das Zytoplasma der Erythrozyten beobachtet werden (vgl. Abb. IV-129, IV-130, IV-131, IV-132). Die Thrombozyten hingegen zeigen stets eine positive Reaktion, die ausschließlich die Membran betrifft. Hyalomer und Granulomer reagieren negativ (vgl. Abb. IV-132). Alle Lymphozyten und Monozyten zeigen eine schwache bis deutliche Fluoreszenz der Membran (vgl. Abb. IV-129, IV-130), das Zytoplasma lässt sich nur bei einem Teil der Monozyten anfärben (vgl. Abb. IV-130). Eine Fluoreszenz der zytoplasmatischen Granula ist in keinem der untersuchten Ausstriche bei den Lymphozyten und Monozyten zu beobachten. Bei den neutrophilen Granulozyten färben sich die Granula stets deutlich bis stark an (vgl. Abb. IV-131). Bei manchen Zellen ist auch eine Bindung des Lektins an die Membran zu sehen. Die eosinophilen Granulozyten hingegen zeigen eine positive Reaktion des Zytoplasmas und der Membran, die Granula scheinen stets negativ zu sein (vgl. Abb. IV-132). In der Tabelle IV.29 sind die Ergebnisse der MAA-I-Bindung zusammengefasst.

Tabelle IV.29: Einzelauswertung Lektine: MAA-I-Biotin

	Stärke der Reaktion				Anteil der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
Erythrozyten					
- Membran	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Thrombozyten					
- Membran	0 %	40 %	60 %	0 %	100 %
- Hyalomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granulomer	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Lymphozyten					
- Membran	0 %	20 %	80 %	0 %	100 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Monozyten					
- Membran	0 %	62,5 %	37,5 %	0 %	100 %
- Zytoplasma	75 %	25 %	0 %	0 %	25 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Neutrophile Granulozyten					
- Membran	80 %	20 %	0 %	0 %	20 %
- Zytoplasma	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
- Granula	0 %	0 %	40 %	60 %	100 %
Eosinophile Granulozyten					
- Membran	10 %	60 %	30 %	0 %	90 %
- Zytoplasma	70 %	30 %	0 %	0 %	30 %
- Granula	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Basophile Granulozyten					
- Membran	-	-	-	-	-
- Zytoplasma	-	-	-	-	-
- Granula	-	-	-	-	-

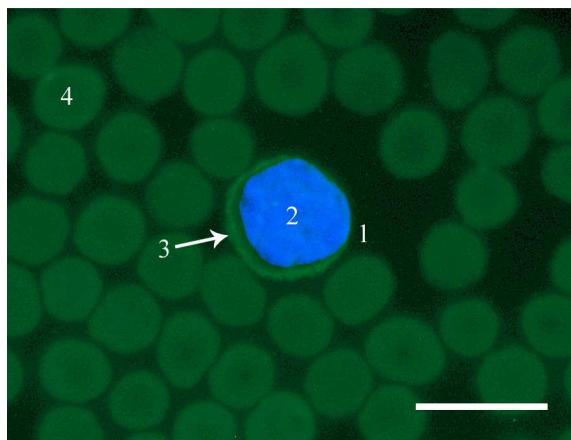


Abbildung IV-129: Lymphozyt, MAA-I-Biotin (Schaf, w, 5 Jahre)

Bei dem Lymphozyten (1) ist eine Fluoreszenz der Zellmembran (3) zu erkennen. Die Erythrozyten (4) reagieren negativ.
2 = Zellkern, SB = 10 µm

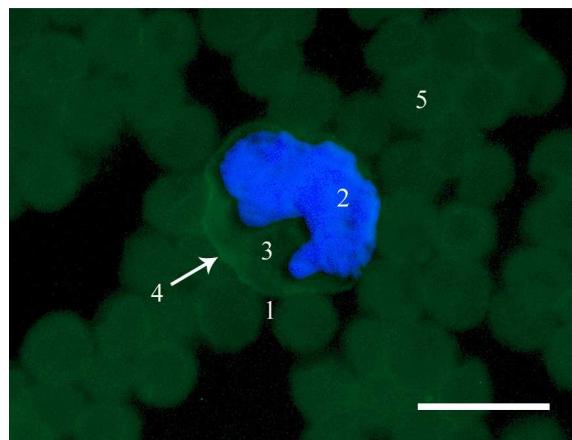


Abbildung IV-130: Monozyt, MAA-I-Biotin (Schaf, w, 2 Jahre)

Der Monozyt (1) zeigt eine positive Reaktion der Zellmembran (4). Das Zytoplasma (3) reagiert negativ.
2 = Zellkern, 5 = Erythrozyt, SB = 10 µm

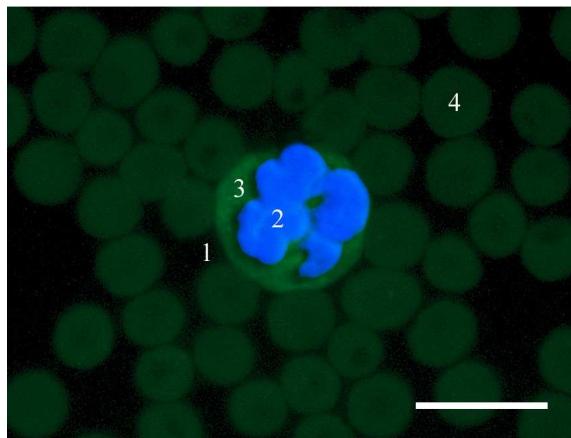


Abbildung IV-131: Neutrophiler Granulozyt, MAA-I-Biotin (Schaf, w, 1,5 Jahre)

Der neutrophile Granulozyt (1) reagiert deutlich positiv, wobei ein granuläres Muster im Zytoplasma (3) erkennbar ist.
2 = Zellkern, 4 = Erythrozyt, SB = 10 µm

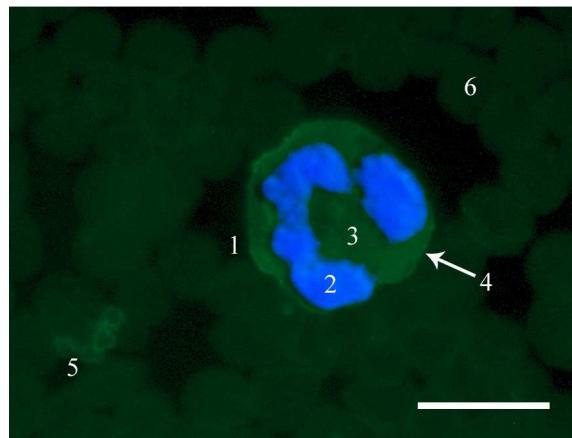


Abbildung IV-132: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, MAA-I-Biotin (Schaf, w, 2 Jahre)

Das Zytoplasma (3) und die Zellmembran (4) des eosinophilen Granulozyten (1) zeigen eine Bindung von MAA-I. Bei den Thrombozyten (5) ist eine Fluoreszenz der Zellmembran zu sehen.
2 = Zellkern, 6 = Erythrozyt, SB = 10 µm

4.2.8 Ergebnisse der Zuckerhemmung

Bei den FITC-markierten Pflanzen-Lektinen ConA, PSA, LCA, WGA und WGAs wurde die Bindungsfähigkeit nach Vorinkubation mit dem jeweiligen Hemmzucker erneut untersucht.

Bei allen Ausstrichen unterbleibt nach der Vorbehandlung eine Bindung der Lektine an die verschiedenen Strukturen der Zellen. Die beschriebenen Lektinbindungen können daher als spezifisch angesehen werden.

4.2.9 Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase

Bei den FITC-markierten Pflanzen-Lektinen wurden die negativen Lektine PNA, RCA, DBA und SBA sowie die nur schwach positiven Lektine SJA und UEA-I auf die Neuraminidase-Spezifität hin untersucht. Es sollte herausgefunden werden, ob die Bindungsstellen dieser Lektine durch Sialinsäuren maskiert werden und nach vorheriger Behandlung des Blutausstriches mit Neuraminidase zugänglich werden.

Bei einem Vergleich der vorbehandelten Präparate mit den nach dem normalen Protokoll gefärbten Blutausstrichen kann vor allem bei PNA (vgl. Abb. IV-133, IV-134, IV-135), aber auch bei RCA (vgl. Abb. IV-136) sowie SJA eine Veränderung der Bindungseigenschaften beobachtet werden. PNA zeigt nach Vorbehandlung mit Neuraminidase eine Bindung an die Membran der Erythrozyten (vgl. Abb. IV-134, IV-135), der Thrombozyten (vgl. Abb. IV-133), der Lymphozyten (vgl. Abb. IV-133), der Monozyten (vgl. Abb. IV-135), der neutrophilen Granulozyten (vgl. Abb. IV-134) und der eosinophilen Granulozyten. Die Lymphozyten und Monozyten lassen zum Teil auch eine Fluoreszenz im Zytoplasma erkennen (vgl. Abb. IV-133, IV-135). Die neutrophilen Granula reagieren bei allen Zellen nun positiv (vgl. Abb. IV-134). Bei den Erythrozyten und den Lymphozyten ist jedoch auffallend, dass sich nicht alle Zellen anfärben lassen. RCA lässt nach Abspaltung der endständigen Sialinsäuren eine positive Reaktion der Membran der Lymphozyten, der Monozyten, der neutrophilen Granulozyten und der eosinophilen Granulozyten erkennen. Bei den neutrophilen Granulozyten kommt es nun außerdem zu einer Anfärbung der Granula (vgl. Abb. IV-136). Bei SJA zeigt sich nach der Neuraminidase-Vorbehandlung eine sehr schwache Fluoreszenz der Lymphozytenmembran. Außerdem ist bei den neutrophilen Granulozyten nun eine Reaktion der Granula zu sehen. Die eosinophilen Granulozyten lassen keine verstärkte Bindung feststellen. Monozyten konnten nicht identifiziert werden.

DBA, SBA und UEA-I weisen auch nach der Vorbehandlung mit Neuraminidase keine Veränderungen der Bindungseigenschaften auf.

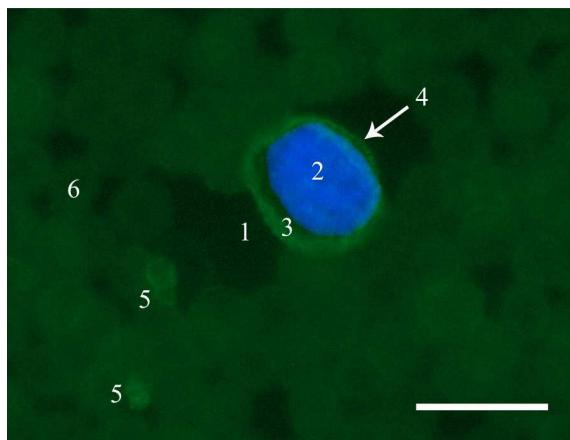


Abbildung IV-133: Lymphozyt und Thrombozyten, PNA-FITC nach Neuraminidase-Vorbehandlung (Schaf, w, 1 Jahr)

Der Lymphozyt (1) zeigt eine deutliche Bindung des Lektins an die Membran (4). Das Zytoplasma (3) scheint sich ebenfalls anzufärben. Bei den Thrombozyten (5) ist eine positive Reaktion der Membran zu sehen. Die Erythrozyten (6) reagieren negativ.

2 = Zellkern, SB = 10 μ m

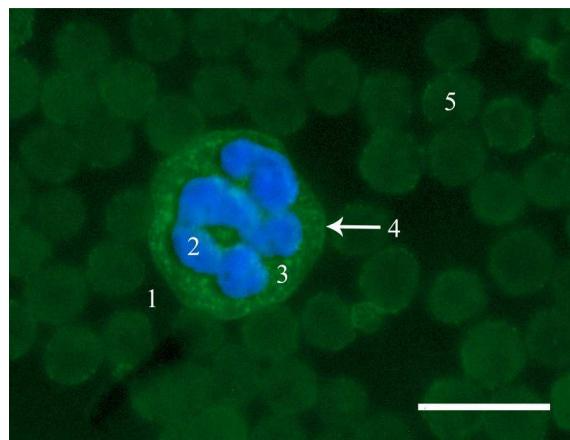


Abbildung IV-134: Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC nach Neuraminidase-Vorbehandlung (Schaf, w, 1 Jahr)

Bei dem neutrophilen Granulozyten (1) ist sowohl eine Reaktion der Granula (3) als auch der Membran (4) zu erkennen. Die Erythrozyten (5) zeigen nur eine sehr schwache Fluoreszenz der Membran.

2 = Zellkern, SB = 10 μ m

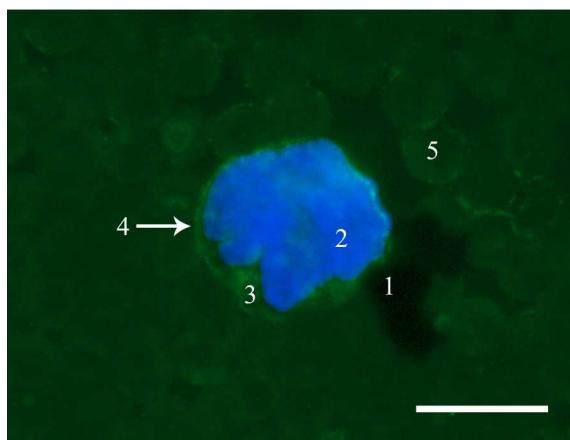


Abbildung IV-135: Monozyt, PNA-FITC nach Neuraminidase-Vorbehandlung (Schaf, w, 1 Jahr)

Das Zytoplasma (3) und die Membran (4) des Monozyten (1) lassen sich nach der Neuraminidase-Vorbehandlung mit PNA anfärbten. Die Membran der Erythrozyten (5) reagiert bei einzelnen Zellen positiv.

2 = Zellkern, SB = 10 μ m

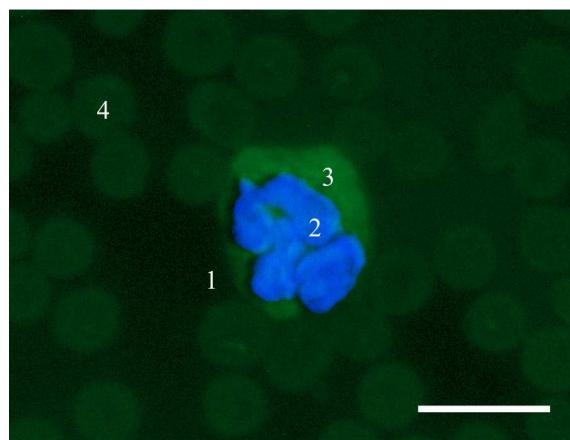


Abbildung IV-136: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC nach Neuraminidase-Vorbehandlung (Schaf, w, 3,5 Jahre)

Der neutrophile Granulozyt (1) reagiert positiv und lässt ein granuläres Muster im Zytoplasma (3) erkennen. Die Erythrozyten (4) lassen sich nicht anfärbten.

2 = Zellkern, SB = 10 μ m

V Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die zytologischen und histochemischen Eigenschaften der Blutzellen des Schafes mit modernen Techniken näher zu untersuchen. Die Ultrastruktur der Blutzellen wurde mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie im Detail analysiert. Weiterhin wurden durch substrathistochemische und enzymhistochemische Verfahren die Zellen genauer charakterisiert. Zytoskelettale Elemente der jeweiligen Zellen wurden mittels Phalloidin im Falle der Aktinfilamente und mit Antikörpern im Falle der Intermediärfilamente und der Mikrotubuli nachgewiesen. Außerdem diente die Lektinhistochemie mit dem Einsatz von Lektinen zur Charakterisierung der Zuckerstrukturen in und auf den ovinen Blutzellen.

1. Blutproben

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde das Blut von insgesamt vierzig Schafen verwendet. Zur Auswertung der Blutergebnisse wurde zum einen zwischen Tieren verschiedenen Alters und zum anderen zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden. Im Bezug auf das Alter wurden drei Gruppen erstellt: Tiere der 1. Gruppe waren jünger als 2 Jahre, Tiere der 2. Gruppe 2 - 4 und Tiere der 3. Gruppe 5 - 7 Jahre alt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Blutuntersuchung war auffallend, dass die Schafe unter 2 Jahren eine höhere Leukozytenzahl aufweisen als die älteren Tiere. Die Beobachtung, dass jüngere Tiere im Allgemeinen höhere Leukozytenwerte haben, deckt sich mit jener mehrerer Autoren (Jain, 1993); (Egbe-Nwiyi et al., 2000); (Taylor, 2000). Die erhöhten Werte dienen laut Egbe-Nwiyi et al. (2000) der Verstärkung der Immunabwehr bei jungen Tieren, können aber auch durch eine erhöhte Stressanfälligkeit beim Handling hervorgerufen werden (Egbe-Nwiyi et al., 2000). Zu dem Ergebnis, dass männliche Schafe im Allgemeinen höhere Werte des weißen und des roten Blutbildes als weibliche Tiere aufweisen, kamen auch Egbe-Nwiyi et al. (Egbe-Nwiyi et al., 2000). Das für Schafe charakteristische, lymphozytäre Blutbild (Lösch et al., 2000) konnte vor allem bei den Tieren der 1. und 2. Altersgruppe beobachtet werden. Hier zeigte sich, dass über 50 % der Gesamtleukozyten Lymphozyten darstellen. Die Zahl der Lymphozyten überstieg die der neutrophilen Granulozyten, was ein neutrophiles Granulozyten-Lymphozyten-Verhältnis von weniger als 1 ergab. Diese Beobachtung stimmt mit den Befunden von Jain (Jain, 1993) überein. Bei einem Vergleich des Anteils der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten der drei Altersgruppen war festzustellen, dass mit steigendem Alter die neutrophilen Granulozyten zunehmen und die Lymphozyten abnehmen. Auch Jain (1993) sowie Byers und Kramer (2010) sind der Ansicht, dass die Anzahl der Lymphozyten mit zunehmenden

Alter langsam absinkt (Jain, 1993); (Byers und Kramer, 2010). Jain (1993) gibt jedoch an, dass die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Wesentlichen unverändert bleibt. Das Verhältnis von neutrophilen Granulozyten zu Lymphozyten nimmt nach Jain (1993) mit steigendem Alter zu (Jain, 1993). Die Anzahl der Monozyten wurde bei den untersuchten Tieren nicht durch das Alter beeinflusst, was mit verschiedenen Angaben in der Literatur übereinstimmt (Jain, 1993); (Egbe-Nwiyi et al., 2000). Bei den eosinophilen Granulozyten war ein Anstieg ihrer relativen Zahl mit fortschreitendem Alter der Tiere zu beobachten. Der Befund, dass die Zahl der eosinophilen Granulozyten bei adulten Schafen höher ist als bei jungen Tieren, steht im Einklang mit den Beobachtungen von Greenwood (Greenwood, 1977) und ist laut Jain (1993) durch eine erhöhte immunologische Abwehrleistung im Zuge wiederholter Exposition gegenüber Parasiten zu erklären (Jain, 1993).

2. Lichtmikroskopie

2.1 Übersichtsfärbungen

Für eine exakte Differenzierung der einzelnen Zelltypen wurden die Blutausstriche der Diff-Quick-, der Giemsa-, der May-Grünwald-, der Pappenheim-, der Sirius-Red- und der Toluidinblau-Färbung unterzogen und unter dem Lichtmikroskop analysiert. Der Großteil der Färbelösungen enthält sowohl einen sauren als auch einen basischen Farbstoff. Eosin dient meist als saure Komponente, wohingegen Methylenblau, Azur A oder B als basische Bestandteile häufig Anwendung finden. Bei der Sirius-Red-Färbung kommt nur ein saurer Farbstoff (Sirius Red), bei der Toluidinblau-Färbung nur eine basische Komponente (Toluidinblau O) zum Einsatz. Saure Farbstoffe bilden in wässriger Umgebung negativ geladene Ionen, die wiederum zu einer rötlichen Färbung basischer (positiv geladener) Zellbestandteile führen. Die gefärbten Strukturen werden als azidophil bezeichnet. Umgekehrt verhält es sich bei den basischen Farbstoffen. Diese bilden Ionen mit positiver Ladung, wodurch es zu einer bläulichen Färbung von sauren (negativ geladenen) Zellteilen kommt. Die gefärbten Strukturen werden als basophil bezeichnet (Romeis, 2010).

Die Erythrozyten waren in jedem der untersuchten Ausstriche zahlreich vorhanden. Sie sind gemäß Literaturangaben die häufigsten Zellen im Blut der Schafe (Kramer, 2000). Unter dem Lichtmikroskop stellten sie sich als kleine, rundliche, kernlose Zellen mit einem homogenen Zellinhalt und einer glatten Zellmembran dar. Somit entsprechen sie den Angaben für die roten Blutkörperchen der Haussäuger in der Literatur (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004). Die Schafe weisen gemäß Hawkey und Dennet (1990) unter den Säugetieren mitunter die kleinsten

Erythrozyten auf (Hawkey und Dennet, 1990). Die Zellgröße variierte bei den untersuchten Tieren und lag zwischen 3,8 und 6,1 μm . Diese ungleichmäßige Größe einer bestimmten Zellart im Blut wird als Anisozytose bezeichnet (Hees und Tschudi, 1990); (Reagan et al., 2008) und ist auch laut Greenwood (1977) beim Schaf regelmäßig zu beobachten (Greenwood, 1977). Das Fehlen eines Kernes bei den roten Blutkörperchen wird auch in der Literatur beschrieben und ist charakteristisch für die Erythrozyten der Säuger (Hawkey und Dennet, 1990). Bei dem Großteil der ovinen Erythrozyten konnte in den Ausstrichen eine zentrale Aufhellung des Zytoplasmas beobachtet werden. An dieser Stelle befand sich laut Hees und Tschudi (1990) der zuvor ausgestoßene Kern (Hees und Tschudi, 1990), weshalb sich die rote Blutzelle gemäß Lösch et al. (2000) sowie Liebich (2004) im Allgemeinen als eine bikonkav Scheibe darstellt (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004). Die Aufhellung im Zellzentrum war aber bei den untersuchten Schafen nicht immer zu sehen. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass beim Schaf auch unikonkav Erythrozyten vorkommen können (Jain, 1993). Bei manchen Blutausstrichen konnte ich eine Variation der sonst runden Zellform beobachten, die als Poikilozytose bezeichnet wird (Reagan et al., 2008). Äußerst selten zeigten die Erythrozyten eine Stechpfeiform, die durch Ausbildung kleiner, gleichmäßiger, stacheliger Ausläufer der Zelloberfläche bedingt ist. Die roten Blutkörperchen werden dann als Echinozyten bezeichnet und stellen in den meisten Fällen Artefakte dar (Jain, 1993); (Reagan et al., 2008). Diese Stechpfeiform entsteht laut Literaturangaben entweder durch zu langsames Trocknen dicker Ausstriche (Kraft et al., 2005) oder wenn die Erythrozyten in hypertonen Lösungen durch Austritt von Flüssigkeit schrumpfen (Hees und Tschudi, 1990). Nur äußerst selten konnte ich in den Ausstrichen eine so genannte Geldrollenbildung der Erythrozyten beobachten, die gemäß Reagan et al. (Reagan et al., 2008) durch eine aufeinander gestapelte Anordnung der Zellen gekennzeichnet ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Befund von Kramer (2000), wonach diese Formation der roten Blutkörperchen beim Schaf nur in geringem Ausmaß vorkommt (Kramer, 2000). In keinem der ovinen Erythrozyten waren eine basophile Tüpfelung oder Howell-Jolly-Körperchen zu sehen. Da Retikulozyten im Blut adulter Tiere laut Jain (1993) gewöhnlich nicht vorkommen (Jain, 1993), konnten diese Vorstufen der Erythrozyten in den Blutausstrichen der Schafe nicht gefunden werden.

Die Thrombozyten kamen ebenfalls in jedem Blutausstrich zahlreich vor und lagen entweder in Gruppen zusammen gelagert vor oder waren einzeln verstreut. Manchmal waren auch ein oder zwei Thrombozyten mit einem neutrophilen Granulozyten assoziiert. Diese Formation wird der Literatur nach als „platelet satellitism“ bezeichnet (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993). Die Thrombozyten der Schafe traten unter dem Lichtmikroskop als kleine, kernlose Zellen mit einer unregelmäßigen Form in Erscheinung. Aufgrund dieser Morphologie werden sie von manchen Autoren auch oft als „Blutplättchen“ bezeichnet (Hawkey und Dennet, 1990); (Liebich, 2004).

Die Schafe weisen laut Hees und Tschudi (1990) unter den Haussäugetieren mitunter die kleinsten Thrombozyten auf (Hees und Tschudi, 1990). Der Durchmesser lag bei den untersuchten Tieren zwischen 1,4 und 3 μm . Bei den meisten Färbungen stellten sich die Thrombozyten homogen dar. Bei der Giemsa- und der Pappenheim-Färbung hingegen konnte deutlich eine dunkle, granuläre Zentralzone von einer hellen, durchsichtigen Randzone differenziert werden. Eine Unterscheidung des zentral gelegenen Granulomers und des peripher gelegenen Hyalomers wird auch mehrfach in der Literatur beschrieben und trifft auch auf die Thrombozyten der anderen Haussäuger zu (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004). Bei einzelnen Zellen waren an der Zelloberfläche fadenförmige Projektionen zu sehen, die laut Jain (1993) und Reagan et al. (2008) im Rahmen einer Aktivierung auftreten (Jain, 1993); (Reagan et al., 2008).

Die Lymphozyten konnten in jedem der angefertigten Ausstriche in großer Zahl gefunden werden. Dies liegt daran, dass das Schaf gemäß Literaturangaben ein lymphozytäres Blutbild aufweist, bei dem in der Regel über 50 % der Leukozyten Lymphozyten darstellen (Lösch et al., 2000). Die Lymphozyten der untersuchten Schafe wiesen unter dem Lichtmikroskop eine runde bis ovale Gestalt auf und besaßen eine glatte Oberfläche. Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1972b) berichten über eine gleiche äußere Form der ovinen Lymphozyten. Der Zellkern erschien in den Blautausstrichen dunkel und kompakt und ließ häufig ein fleckenförmiges Muster erkennen, was laut Yamada und Sonoda (1972) auf eine hohe Chromatinkondensation zurückzuführen ist (Yamada und Sonoda, 1972b). In den von mir untersuchten Ausstrichen lag der Kern entweder zentral oder exzentrisch in der Zelle. Norris und Cham-Berlin (1929) hingegen beschreiben eine stets exzentrische Lage des Zellkernes bei den Lymphozyten der Schafe (Norris und Cham-Berlin, 1929). Gemäß den Angaben von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1972b) hatte der Zellkern in der Regel eine runde bis ovale Form und zeichnete sich bei manchen Zellen durch eine Kerninvagination aus. Weiterhin war auffallend, dass bei den meisten Lymphozyten der große Kern die Zelle bis auf einen schmalen Zytoplasmasaum fast vollständig ausfüllt. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben in der Literatur überein, wonach sich die Lymphozyten im Allgemeinen durch ein relativ hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis auszeichnen (Banks, 1981); (Lösch et al., 2000). Es fiel jedoch auf, dass bei Zunahme der Lymphozytentgröße mehr Zytoplasma vorhanden ist und das Kern-Zytoplasma-Verhältnis somit kleiner wird. Diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden von Steffens (Steffens, 2000). Das Zytoplasma der ovinen Lymphozyten erschien unter dem Lichtmikroskop meist klar und homogen. Bei einigen Lymphozyten waren jedoch, entgegen ihrer Zuordnung zu den Agranulozyten, kleine, runde bis stabförmige Azurgranula im Zytoplasma zu sehen, die auch in früheren Untersuchungen anderer Autoren bereits beschrieben wurden (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Yamada und Sonoda, 1972b); (Greenwood, 1977); (Banks, 1981); (Kramer, 2000). Die Granula befanden sich entweder im Bereich der Kerninvagination oder waren über das ganze Zytoplasma verteilt. Vor allem bei

der Giemsa und der May-Grünwald-Färbung stellten sich diese Granula deutlich dar. Ihre genaue Bedeutung bleibt laut Kramer (2000) noch zu klären (Kramer, 2000). Das Zytoplasma stellte sich unter dem Lichtmikroskop meist in einem blauen Farbton dar. Diese Basophilie ist laut Angaben in der Literatur auf eine hohe Dichte an Ribosomen, Polyribosomen und rauem endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen (Jain, 1993); (Liebich, 2004) und variiert mit der Aktivität der Lymphozyten (Jain, 1993). Einzelne ovine Lymphozyten zeigten ein auffällig dunkelblaues Zytoplasma, das sie als reaktive Lymphozyten ausweist. Diese Immunozyten treten laut Reagan et al. (2008) sowohl physiologisch in geringer Zahl als auch nach antigener Stimulation im Blut der Säuger auf (Reagan et al., 2008). Gelegentlich konnten auch Lymphozyten mit einem tief dunkelblauen, von Vakuolen durchsetzten Zytoplasma und einem exzentrisch liegenden, runden Kern identifiziert werden. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um die von Reagan et al. (2008) beschriebenen plasmazytoiden Lymphozyten, die einer Transformation zur Plasmazelle unterliegen (Reagan et al., 2008). Die Größe der untersuchten Lymphozyten der Schafe variierte teilweise stark, wobei die Durchschnittsgröße aller gemessenen Zellen bei 10,8 μm lag. Die Lymphozyten können, je nach Autor, im Bezug auf ihre Größe in zwei bzw. drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Demnach kann zwischen kleinen ($\leq 10 \mu\text{m}$) und großen ($>10 \mu\text{m}$) (Hees und Tschudi, 1990) oder zwischen kleinen ($\leq 10 \mu\text{m}$), mittleren (10 - 18 μm) und großen ($\leq 25 \mu\text{m}$) Lymphozyten (Liebich, 2004) unterschieden werden. Wie Banks (Banks, 1981) bereits anmerkte, gestaltete sich beim Schaf die Einteilung der Lymphozyten anhand ihrer Größe jedoch nicht immer leicht. In den Blutausstrichen konnte ich vor allem kleine und mittelgroße Lymphozyten finden, was mit den Beobachtungen von Kramer (Kramer, 2000) und Steffens (Steffens, 2000) übereinstimmt. Die großen Lymphozyten befinden sich laut Steffens (2000) normalerweise nur in lymphatischen Geweben und sind im Blut nur in sehr geringer Zahl vorhanden (Steffens, 2000). Eine Unterteilung in B- und T-Lymphozyten war unter dem Lichtmikroskop nicht möglich. Dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur, dass erst enzymhistochemische (Ristau et al., 1985), lektinhistochemische (Outeridge, 1985); (Djilali und Parodi, 1987) oder immunhistochemische Untersuchungen (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a) deren Differenzierung erlauben.

Die Monozyten waren in den Blutausstrichen nicht so häufig zu finden wie die bisher beschriebenen Zellen. Sie stellten jedoch, in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur (Jain, 1993); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004) generell die größten Zellen im Blut der Schafe dar. Ihre Größe reichte bei den untersuchten Tieren von 11,6 bis 17,5 μm . Die äußere Gestalt der Monozyten war meist unregelmäßig, teilweise aber auch rundlich bis oval. Der Zellkern zeichnete sich durch eine starke Vielgestaltigkeit aus, von der auch andere Autoren berichten (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Jain, 1993). Häufig erschien er rund, oval, bohnenförmig, hufeisenförmig oder gelappt. Eine hufeisenförmige Gestalt oder eine Lappung des Zellkernes oviner Monozyten

wird auch von Norris und Cham-Berlin (Norris und Cham-Berlin, 1929) sowie Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1972b) beschrieben. Der Kern lag, in Übereinstimmung mit den Befunden von Norris und Cham-Berlin (Norris und Cham-Berlin, 1929) meist exzentrisch in der Zelle, manchmal war er aber auch zentral lokalisiert. Das Chromatin erschien, im Einklang mit den Ergebnissen von Norris und Cham-Berlin (Norris und Cham-Berlin, 1929), im Gegensatz zu dem der Lymphozyten heller und ließ, gemäß Bienzle (Bienzle, 2000), ein netzartiges Muster erkennen. Durch diese Charakteristika des Kernes war eine Differenzierung der Monozyten von den Lymphozyten für mich leicht möglich. Die Verwechslungsgefahr der Lymphozyten mit den Monozyten ist auch laut Kramer (2000) beim Schaf weniger gegeben als beim Rind (Kramer, 2000). Das Zytoplasma der untersuchten Monozyten war reichlich vorhanden. Dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur, wonach die Monozyten viel Zytoplasma aufweisen (Norris und Cham-Berlin, 1929) und sich somit im Allgemeinen ein relativ niedriges Kern-Zytoplasma-Verhältnis ergibt (Lösch et al., 2000). Weiterhin stellte sich das Zytoplasma, gemäß den Beobachtungen von Jain (Jain, 1993), basophil dar und erschien aufgrund einer teils wabigen Struktur nicht immer homogen. Bei einigen Monozyten der Schafe waren im Zytoplasma unterschiedlich große Vakuolen zu sehen, die sich meist in unmittelbarer Nähe zum Zellkern befanden und auch von anderen Autoren beschrieben werden (Jain, 1993); (Kramer, 2000). Bei keiner Färbung konnten bei den Monozyten der Schafe azurophile Granula im Zytoplasma identifiziert werden. Dies liegt vermutlich daran, dass diese nach Angaben in der Literatur beim Schaf nur sehr selten vorkommen (Greenwood, 1977); (Banks, 1981). Norris und Cham-Berlin (1929) konnten jedoch einige Granula in ovinen Monozyten mit der Giemsa-Färbung nach verlängerter Färbezeit identifizieren (Norris und Cham-Berlin, 1929).

Die neutrophilen Granulozyten waren in jedem Präparat zahlreich vorhanden. Beim Schaf machen sie laut Literaturangaben im Schnitt 30 % der Gesamtleukozyten aus (Greenwood, 1977); (Kramer, 2000). Unter dem Lichtmikroskop zeichneten sie sich durch eine runde bis ovale Gestalt aus und besaßen eine glatte Oberfläche. Auch Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970b) berichten über eine derartige Erscheinungsform der neutrophilen Granulozyten der Schafe. Die Größe der Zellen lag bei den untersuchten Tieren zwischen 10,9 und 14 μm . Bezuglich der Morphologie des Zellkernes konnten in den Ausstrichen stabkernige von segmentkernigen neutrophilen Granulozyten unterschieden werden. Die stabkernigen waren im Gegensatz zu den segmentkernigen Granulozyten in den Präparaten nur vereinzelt zu finden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Kramer (2000), wonach die stabkernigen Granulozyten im Blut der Schafe generell nur selten vorkommen (Kramer, 2000). Die Anzahl der stabkernigen Granulozyten ist zum Beispiel bei Entzündungen erhöht, wobei diese Veränderung im Differentialblutbild als Linksverschiebung bezeichnet wird (Smith, 2000). Gemäß den Beobachtungen von Jain (Jain, 1993) war der Kern des stabkernigen Granulozyten unsegmentiert, länglich und meist stark

gebogen. Der segmentkernige Granulozyt hingegen besaß einen aus mehreren Abschnitten bestehenden Kern. Die Anzahl der Kernsegmente variierte bei den untersuchten Zellen. Laut Hees und Tschudi (1990) nimmt die Segmentierung mit dem Alter der Zelle zu, wobei das Auftreten von mehr als fünf Segmenten als Hypersegmentierung bezeichnet wird und auf eine Überalterung der Zelle schließen lässt (Hees und Tschudi, 1990). Das Chromatin der neutrophilen Granulozyten erschien unter dem Lichtmikroskop meist verdichtet oder geklumpt. Diese dichten Heterochromatinbereiche führen laut Hees und Tschudi (1990) zu einer stark basophilen Anfärbung des Zellkernes (Hees und Tschudi, 1990), was ich auch in meinen Proben feststellen konnte. Zwischen den einzelnen Kensegmenten waren nicht selten dünne Chromatinfäden zu sehen, die auch von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970b) beobachtet wurden. Bei keinem der neutrophilen Granulozyten weiblicher Tiere konnte ich einen so genannten „drum-stick“ finden, der laut Angaben in der Literatur den verklumpten Teil des zweiten X-Chromosoms darstellt (Hees und Tschudi, 1990); (Smith, 2000). Gemäß den Beobachtungen von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970b) war das Zytoplasma bei den neutrophilen Granulozyten der Schafe reichlich vorhanden und enthielt zahlreiche Granula. Dabei war auffallend, dass sich diese sowohl durch saure als auch durch basische Farbstoffe meist nur schwach anfärben. Auch Hees und Tschudi (1990) berichten über eine gewisse färberische Neutralität der neutrophilen Granula (Hees und Tschudi, 1990). Mit der Diff-Quick-, der Pappenheim- und vor allem mit der May-Grünwald-Färbung gelang deren Darstellung am deutlichsten. Eine Differenzierung der verschiedenen Granula-Typen war jedoch ohne weiterführende Untersuchungen unter dem Lichtmikroskop nicht möglich. Enzymhistochemische Untersuchungen können deren Unterscheidung erlauben, da die Peroxidase beispielsweise nur in den primären Granula vorhanden ist (Smith, 2000).

Die eosinophilen Granulozyten waren in den Blutausstrichen wesentlich seltener vertreten als die neutrophilen Granulozyten. Sie machen laut Kramer (2000) im Schnitt nur 5 % der Leukozyten im Blut der Schafe aus (Kramer, 2000). Sie konnten aber in jedem Ausstrich gefunden werden. Sie zeigten, gemäß den Angaben von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970a), eine runde bis ovale Gestalt und besaßen eine glatte Oberfläche. Die Zellen waren bei den untersuchten Tieren 12 - 15 μm groß und somit, wie in der Literatur beschrieben (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Rudolph und Schnabl, 1981), in der Regel größer als die ovinen neutrophilen Granulozyten. Der Kern war meist gelappt, was mit den Beobachtungen von Norris und Cham-Berlin (Norris und Cham-Berlin, 1929) sowie Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970a) übereinstimmt. Nicht selten wies er die von Hees und Tschudi (Hees und Tschudi, 1990) beschriebene, charakteristische Brillen- oder Hantelform auf. Häufig war er aber auch segmentiert, was auch Norris und Cham-Berlin (Norris und Cham-Berlin, 1929) beim Schaf feststellten. Die Kernabschnitte der eosinophilen Granulozyten wirkten unter dem Lichtmikroskop

insgesamt kugeliger als diejenigen der neutrophilen Granulozyten. Das Chromatin erschien auch hier verdichtet und teilweise geklumpt. Dies liegt vermutlich daran, dass der Zellkern der eosinophilen Granulozyten laut Angaben in der Literatur im Allgemeinen reichlich Heterochromatin enthält (Hees und Tschudi, 1990). Das Zytoplasma beinhaltete große, runde bis ovale Granula, die auch von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970a) beim Schaf identifiziert wurden. Gemäß den Beobachtungen von Banks (Banks, 1981) füllten die eosinophilen Granula die Zelle fast vollständig aus und maskierten teilweise sogar den Kern. Mit sauren Farbstoffen zeigten sie eine orangerote bis rote Anfärbung. Diese charakteristische Färbung der eosinophilen Granula der Schafe ist auch bei den anderen Haussäugern zu beobachten (Hees und Tschudi, 1990) und ergibt sich laut Jain (1993) aus deren Gehalt an stark basischen Proteinen, wie dem MBP (major basic protein) oder dem ECP (eosinophil cationic protein) (Jain, 1993). Eine Differenzierung der eosinophilen Granulozyten von den neutrophilen Granulozyten war deshalb relativ leicht möglich. Manche granulafreien Randbereiche ließen eine basophile Färbung des Zytoplasmas erkennen, die auch von anderen Autoren beschrieben wird (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Kramer, 2000).

Die basophilen Granulozyten konnten nur in sehr wenigen Ausstrichen gefunden werden. Laut Kramer (2000) kommen sie mit einem Anteil von durchschnittlich 0,5 % an den Gesamtleukozyten nur selten im Blut der Schafe vor (Kramer, 2000). Nur bei der May-Grünwald- und der Toluidinblau-Färbung wurden einzelne Zellen identifiziert. In den Blautausstrichen erschienen sie als runde bis ovale Zellen. Die in der Literatur beschriebene, eckige Gestalt der Zellen (Greenwood, 1977) konnte in meinen Proben nicht beobachtet werden. Mit einer Größe von durchschnittlich 10,6 μm stellten sie die kleinsten Granulozyten dar, was mit den Befunden von Liebich (Liebich, 2004) im Einklang steht. Der Zellkern konnte bei den wenigen gefundenen Zellen nicht vom Zytoplasma differenziert werden. Laut Literatur besteht er meist aus zwei oder drei Segmenten (Yamada und Sonoda, 1972a); (Greenwood, 1977), die eine eckige Form aufweisen (Greenwood, 1977) und reich an Heterochromatin sind (Steffens, 2000). Aber auch Norris und Cham-Berlin (1929) hatten Schwierigkeiten bei der Charakterisierung des Zellkernes bei den ovinen basophilen Granulozyten (Norris und Cham-Berlin, 1929). In den basophilen Granulozyten der Schafe waren jedoch ungleichmäßig verteilte, intensiv gefärbte Granula zu sehen. Laut Angaben in der Literatur sind die basophilen Granula üblicherweise wasserlöslich (Yamada und Sonoda, 1972a); (Jain, 1993); (Steffens, 2000) und lösen sich daher oft in unfixierten Blautausstrichen auf (Jain, 1993). Die für die basophilen Granulozyten charakteristische Metachromasie (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Jain, 1993); (Costa et al., 1997) konnte ich vor allem bei der Toluidinblau-Färbung beobachten, wobei sich die Granula in einem intensiven Violett anfärbten. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Scott und Stockham (2000) sowie Raskin und Valenciano (2000) überein, wonach die Darstellung der

metachromatischen Färbung durch Toluidinblau bei niedrigem pH-Wert erfolgen kann (Raskin und Valenciano, 2000); (Scott und Stockham, 2000) und sich die metachromatischen Granula violett anfärben (Raskin und Valenciano, 2000). Die metachromatische Färbung bezeichnet laut Parwaresch und Lennert (1969) die Färbung einer Struktur in einen anderen Farbton als den der Farbstofflösung und ist im Allgemeinen durch eine irreversible Veränderung im Absorptionsspektrum eines organischen, basischen Farbstoffes unter Einfluss bestimmter Substanzen (Chromotrope) bedingt (Parwaresch und Lennert, 1969). Laut Romeis (2010) kommt zu einer Verschiebung des Maximums im Absorptionsspektrum zu kürzeren Wellenlängen, wodurch im Präparat eine Farbverschiebung zum langwelligen Spektrum hin beobachtet werden kann (Romeis, 2010). Die metachromatische Färbung der basophilen Granula kommt durch deren hohen Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen (Heparin, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat) zustande (Jain, 1993); (Scott und Stockham, 2000). Laut Freund (2008) entsteht sie vor allem durch die im Heparin veresterete Schwefelsäure (Freund, 2008).

Bei den lichtmikroskopischen Übersichtsfärbungen konnten keine Unterschiede in der Morphologie der Blutzellen in Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht festgestellt werden.

2.2 Substrathistochemische Färbungen

Die Blutausstriche wurden zur Untersuchung von Kohlenhydraten bzw. kohlenhydrathaltigen Strukturen sowohl der Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Reaktion als auch der Alcianblau-Färbung bei zwei verschiedenen pH-Werten unterzogen. Die PAS-Reaktion dient im Allgemeinen dem Nachweis von Polysacchariden (Glykogen) und Glykoproteinen. Die Alcianblau-Färbung wird zur selektiven Färbung von Mukosubstanzen eingesetzt, wobei zwischen sauren Mukopolysacchariden mit Carboxyl- oder Sulfatgruppen unterschieden werden kann. Carboxylierte Mukosubstanzen werden bei einem pH von 2,5 nachgewiesen. Die sauren Mucine sind bei diesem pH-Wert durch die Sulfatgruppen und/oder Carboxylgruppen der Uronsäuren negativ geladen und binden an den positiv geladenen (kationischen) Farbstoff Alcianblau 8 GX. Sulfatierte Mukosubstanzen hingegen werden bei einem pH von 1,0 nachgewiesen, da bei der Senkung des pH-Wertes die Dissoziation der Carboxylgruppen unterdrückt wird und nur noch die Sulfatgruppen negative Ladungen für die Färbung beisteuern (Romeis, 2010).

Die Erythrozyten der untersuchten Schafe zeigten bei der PAS-Reaktion keine Anfärbung und ließen sich weder bei einem pH-Wert von 1,0 noch bei einem pH-Wert von 2,5 mit Alcianblau anfärben. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Al Izzi et al. (2007), wonach die Erythrozyten der Schafe kein PAS-positives Material besitzen (Al Izzi et al., 2007). Das Ausbleiben einer Anfärbung mit Alcianblau bei beiden pH-Werten lässt vermuten, dass die

Erythrozyten der Schafe weder carboxylierte noch sulfatierte Mukosubstanzen in größerer Menge aufweisen.

Die Thrombozyten zeigten bei der PAS-Reaktion entweder keinen oder nur einen schwachen Reaktionsausfall. Nach Angaben in der Literatur ist jedoch in den Blutplättchen der Säuger im Allgemeinen Glykogen nachzuweisen (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (White, 2007). Der Befund von Romeis (1989), dass die PAS-Reaktion bei den Thrombozyten generell positiv verläuft (Romeis, 1989), konnte jedoch durch meine Untersuchungen nicht bestätigt werden. Bei der Alcianblau-Färbung ließen sich die Thrombozyten der Schafe sowohl bei einem pH-Wert von 1,0 als auch bei einem pH-Wert von 2,5 anfärbten. Die Intensität der Anfärbung war bei einem pH-Wert von 2,5 nur unwesentlich deutlicher. Daraus lässt sich schließen, dass die Thrombozyten der Schafe reich an carboxylierten und sulfatierten Mukosubstanzen sind. Bei den Thrombozyten der Menschen sind saure Mukopolysaccharide ein wesentlicher Bestandteil der Glykokalix (Nurden, 2007).

Die Lymphozyten der untersuchten Schafe reagierten bei der PAS-Reaktion überwiegend negativ. Nur bei einzelnen Zellen konnte eine positive Reaktion, die zu einer diffusen, rosafarbenen bis hellvioletten Anfärbung des Zytosplasmas führte, beobachtet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Jain (1970) und Al Izzi et al. (2007), nach denen die PAS-Reaktion bei den Lymphozyten der Schafe sowohl negativ als auch positiv ausfallen kann (Jain, 1970); (Al Izzi et al., 2007). Eine negative Reaktion kann laut Stobbe (1970) häufig bei Lymphozyten beobachtet werden, da nicht immer Glykogen in den Zellen enthalten ist (Stobbe, 1970). Auch Schnabl und Rudolph (1981) konnten anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen nur bei einzelnen Lymphozyten der Schafe Glykogen nachweisen (Rudolph und Schnabl, 1981). Nach Angaben von Hermansky et al. (1970) ist eine positive PAS-Reaktion bei weniger als 10 % der Lymphozyten des Schafes zu beobachten (Hermansky et al., 1970). Die Befunde von Jain (1970), dass sich eine positive Reaktion durch eine diffuse Anfärbung im Zytosplasma auszeichnet (Jain, 1970), stimmt mit meinem Ergebnis überein. Laut Hermansky et al. (1970) und Al Izzi et al. (2007) kann eine positive PAS-Reaktion aber auch zu einer Anfärbung der feinen Granula im Zytosplasma führen (Hermansky et al., 1970); (Al Izzi et al., 2007). Dies konnte anhand meiner Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden. Bei der Alcianblau-Färbung ließen sich die Lymphozyten weder bei einem pH-Wert von 1,0 noch bei einem pH-Wert von 2,5 anfärbten. Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Vorhandensein von sulfatierten und carboxylierten Muzinen in größeren Mengen in den Lymphozyten der Schafe als eher unwahrscheinlich zu betrachten.

Die Monozyten der Schafe zeigten eine negative PAS-Reaktion und ließen sich bei keinem der beiden pH-Werte mit Alcianblau anfärbten. Nach Angaben von Al Izzi et al. (2007) gelingt die PAS-Reaktion bei den ovinen Monozyten nur teilweise und zeigt sich im Falle einer positiven

Reaktion durch eine Anfärbung der Granula im Zytoplasma (Al Izzi et al., 2007). Wie bereits bei den Lymphozyten aufgeführt, kann die ausbleibende Anfärbung mit Alcianblau bei beiden pH-Werten zu der Annahme führen, dass die Monozyten der Schafe weder carboxylierte noch sulfatierte Mukosubstanzen in größerer Menge aufweisen.

Die neutrophilen Granulozyten der untersuchten Schafe zeigten allesamt eine positive PAS-Reaktion, was mit den Befunden von Schnabl (Schnabl, 1976) und Al Izzi et al. (Al Izzi et al., 2007) übereinstimmt. Im Zytoplasma vorhandenes Glykogen konnten auch Rudolph und Schnabl (1981) anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen bei den neutrophilen Granulozyten der Schafe nachweisen (Rudolph und Schnabl, 1981). Bei den meisten Zellen konnte ich im gesamten Zytoplasma eine diffuse, rosafarbige Anfärbung beobachten. Außerdem enthielt es mehrere, ungleichmäßig verteilte, grobe, rot-violette bis pinkfarbige Reaktionsprodukte verschiedener Größe. Zusätzlich war eine leichte granuläre Reaktion zu beobachten. Laut Steffens (2000) werden die primären Granula der neutrophilen Granulozyten insgesamt weniger stark angefärbt als die sekundären Granula (Steffens, 2000), was möglicherweise auf deren geringen Gehalt an Glykosaminoglykanen (Jain, 1993) zurückzuführen ist. Im Verlauf der Granulopoese nimmt laut Stobbe (1970) die Intensität der PAS-Reaktion vom Stadium des Promyelozyten bis zum reifen neutrophilen Granulozyten zu (Stobbe, 1970). Die Anfärbung der neutrophilen Granulozyten mit Alcianblau gelang bei den Schafen nur bei einem pH-Wert von 2,5, jedoch nicht bei einem pH-Wert von 1,0. Bei einem pH-Wert von 2,5 zeigte sich bei allen Zellen eine starke Anfärbung mit einem deutlich granulären Muster. Die neutrophilen Granula der Schafe sind demnach vermutlich reich an carboxylierten Mukosubstanzen. Sulfatierte Muzine scheinen nicht in größerer Menge vorhanden zu sein.

Bei den eosinophilen Granulozyten der untersuchten Schafe konnte ebenso PAS-positives Material gefunden werden. Auch Schnabl (Schnabl, 1976) und Al Izzi et al. (Al Izzi et al., 2007) kamen zu diesem Ergebnis. Darüber hinaus konnten Rudolph und Schnabl (1981) bei den ovinen eosinophilen Granulozyten mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen Glykogen im Zytoplasma darstellen (Rudolph und Schnabl, 1981). Die positive PAS-Reaktion der eosinophilen Granulozyten fiel in meinen Versuchen im Vergleich zu derjenigen der neutrophilen Granulozyten deutlich schwächer aus. Meine Beobachtung, dass sich das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten lediglich intergranulär in einem zarten Rosa anfärbte, deckt sich mit den Angaben von Wislocki et al. (Wislocki et al., 1949), Stobbe (Stobbe, 1970) und Schnabl (Schnabl, 1976). Die bei den neutrophilen Granulozyten im Zytoplasma beobachteten fokalen, kräftig pinkfarbigen Reaktionsprodukte stellten sich bei den eosinophilen Granulozyten deutlich schwächer dar. Entsprechend den Ergebnissen von Al Izzi et al. (Al Izzi et al., 2007) reagierten die eosinophilen Granula der Schafe negativ. Eine Anfärbung der eosinophilen Granulozyten mit

Alcianblau konnte in meinen Untersuchungen gewöhnlich nicht beobachtet werden, bei einem pH-Wert von 2,5 konnte eine positive Reaktion bei einzelnen Zellen durch eine intergranuläre, diffuse Anfärbung zwischen den ungefärbten, weißen Granula nur vermutet werden. Die eosinophilen Granulozyten der Schafe weisen dem zu Folge vermutlich keine sulfatierten Mukosubstanzen in größerer Menge auf. Das Vorkommen von carboxylierten Muzinen in größeren Mengen ist fraglich.

Bei den substrathistochemischen Untersuchungen konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht festgestellt werden.

2.3 Enzymhistochemische Färbungen

Für die Beurteilung der enzymatischen Ausstattung der einzelnen Blutzellen wurden die Ausstriche verschiedenen enzymhistochemischen Färbungen unterzogen. Es wurden die saure Phosphatase, die alkalische Phosphatase, die Peroxidase, die β -Glucuronidase, die α -Naphthyl-Azetat-Esterase, die Naphthol-AS-Azetat-Esterase und die Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase untersucht und die Blutausstriche unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Bei den meisten Enzymnachweisen wurden Azokupplungsreaktionen eingesetzt, bei denen auf die Umsetzung eines Substrats durch das entsprechende Enzym (primäre Reaktion) die Präzipitationsreaktion durch Zugabe eines Diazoniumsalzes oder hexazotierten Pararosanilins folgt. Diese Stoffe reagieren mit dem primären Reaktionsprodukt und es entsteht ein unlöslicher Azofarbstoff (sekundäre Reaktion). Bei dem Nachweis der Peroxidase hingegen wird das Substrat durch Oxidation in einen unlöslichen Farbstoff übergeführt (Lojda et al., 1979).

Die Erythrozyten wiesen in meinen Untersuchungen lediglich eine Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase auf. Eine Enzymaktivität zeigten nahezu alle Erythrozyten durch ungleichmäßig in der Zelle verteilte blaue, punktförmige Reaktionsprodukte. Auch Fey und Kunze (1970) konnten eine positive Reaktion der Naphthol-AS-Azetat-Esterase auf der Oberfläche von ovinen Erythrozyten nachweisen (Fey und Kuntze, 1970). Sie stellten jedoch auch eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase mittels Azokupplungsreaktion bei einem pH-Wert von 8,3 fest, die ich in meinen Untersuchungen nicht beobachten konnte. Die Erythrozyten der Schafe zeigten, wie in der Literatur beschrieben, keine Aktivität der der alkalischen Phosphatase (Gajanna und Nair, 1968); (Fey und Kuntze, 1970), der Peroxidase (Fey und Kuntze, 1970); (Al Izzi et al., 2007) und der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase (Fey und Kuntze, 1970). Diallo et al. (1975) konnten eine Aktivität der sauren Phosphatase in ovinen Erythrozyten mit verschiedenen Substraten bei pH 5,0 und pH 5,7 nachweisen, was auf die Anwesenheit von zwei Isoenzymen mit unterschiedlichen molekularen Eigenschaften schließen lässt (Diallo et al., 1975). Bei Fey und

Kunze (1970) verlief der Nachweis der sauren Erythrozyten-Phosphatase der Schafe mittels Azokupplungsreaktion bei einem pH-Wert von 6,5 negativ (Fey und Kuntze, 1970). Auch ich konnte histochemisch keine Aktivität der sauren Phosphatase nachweisen.

Auch die Thrombozyten der untersuchten Schafe zeigten lediglich eine schwache Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase. Fey und Kunze (1970) hingegen berichten zusätzlich von einer Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase bei ovinen Thrombozyten (Fey und Kuntze, 1970). Die Thrombozyten weisen laut Jain (1993) bei den Haustieren meist die saure Phosphatase, ein Thrombozyten-spezifisches Isoenzym der Peroxidase und die β -Glucuronidase auf (Jain, 1993). In meinen Untersuchungen ließ sich jedoch keine Aktivität dieser Enzyme in den ovinen Blutzellen nachweisen. Das Vorkommen der Thrombozyten-spezifischen Peroxidase variiert laut Daimon et al. (1985) bei den verschiedenen Spezies (Daimon et al., 1985). Sowohl Jain (1967) als auch Fey und Kunze (1970) sowie Daimon et al. (1985) konnten die Peroxidase in ovinen Thrombozyten nicht nachweisen (Jain, 1967); (Fey und Kuntze, 1970); (Daimon et al., 1985). Bei Daimon et al. (1985) verlief der Nachweis bei Affen und Hunden mit der gleichen Technik jedoch positiv (Daimon et al., 1985). Die Thrombozyten der Schafe zeigten in meinen Untersuchungen keine Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Fey und Kunze (Fey und Kunze, 1970).

Bei den Lymphozyten der untersuchten Schafe konnte eine Aktivität der sauren Phosphatase, der β -Glucuronidase, der α -Naphthyl-Azetat-Esterase und der Naphthol-AS-Azetat-Esterase beobachtet werden. Es reagierten jedoch nicht alle Lymphozyten positiv. Die Aktivität der sauren Phosphatase war durch kräftig rote Reaktionsprodukte im Zytoplasma gekennzeichnet, die sich entweder zusammen gelagert in einem bestimmten Bereich der Zelle befanden oder im gesamten Zytoplasmasaum verteilt waren. Sowohl Fey und Kunze (1970) als auch Jain (1970) sowie Schnabl (1976) berichten ebenso über eine Aktivität der sauren Phosphatase in ovinen Lymphozyten (Fey und Kuntze, 1970); (Jain, 1970); (Schnabl, 1976). Meine Ergebnisse decken sich mit den Befunden von Jain (1970), wonach es zu einer Anfärbung der zytoplasmatischen Granula kommt (Jain, 1970), und mit denjenigen von Raskin und Valenciano (2000), welche die Aktivität der sauren Phosphatase in den Lymphozyten im Allgemeinen als eine fokale oder punktförmige Reaktion beschreiben (Raskin und Valenciano, 2000). Die saure Phosphatase ist laut Literaturangaben nur in reifen T-Zellen, nicht aber in B-Zellen vorhanden (Banks, 1981); (Jain, 1993). Dies erklärt, warum sich nicht alle Zellen anfärbten. Der Großteil der Lymphozyten zeichnete sich durch eine meist starke Aktivität der β -Glucuronidase aus. Laut Healy (1982) ist bei Schafen die Enzymaktivität der β -Glucuronidase in den mononukleären Zellen sogar stärker als in den Granulozyten (Healy, 1982). Die Enzymaktivität war bei den untersuchten Schafen durch das Vorhandensein kräftig roter, punktförmiger Reaktionsprodukte im Zytoplasma

gekennzeichnet. Dabei konnte nicht selten eine Anfärbung der zytoplasmatischen Granula vermutet werden. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Raskin und Valenciano (2000), wonach die Lymphozyten bei einer Aktivität der β -Glucuronidase eine fokale oder deutlich granuläre Reaktion aufweisen (Raskin und Valenciano, 2000). Bei manchen Zellen war aber auch eine leicht diffuse Reaktion im Zytoplasma zu sehen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Machin et al. (1980), die in den Lymphozyten der Menschen neben einem granulären zusätzlich ein schwaches, agranuläres Reaktionsprodukt erkennen konnten (Machin et al., 1980). In den gefärbten Ausstrichen wurden aber auch Lymphozyten ohne β -Glucuronidase-Aktivität gefunden. Dies liegt vermutlich daran, dass laut Jain (1993) nur die reifen T-Zellen, nicht aber die B-Zellen eine Aktivität der β -Glucuronidase aufweisen (Jain, 1993). Die Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase zeigte sich in den ovinen Lymphozyten durch eine diffuse, körnige Anfärbung des Zytoplasmas. Bei manchen Zellen waren außerdem grobe, punktförmige Reaktionsprodukte erkennbar. Sowohl Fey und Kunze (1970) als auch Schnabl (1976) sowie Osbaliston und Sullivan (1978) konnten ebenso einen Nachweis der α -Naphthyl-Azetat-Esterase in den Lymphozyten der Schafe erbringen (Fey und Kunze, 1970); (Schnabl, 1976); (Osbaliston und Sullivan, 1978). Die α -Naphthyl-Azetat-Esterase der Lymphozyten lässt sich der Literatur nach, im Gegensatz zu den Monozyten, nicht durch Natrium-Fluorid hemmen. Dies liegt an einer unterschiedlichen Lokalisation der jeweiligen Enzyme in der Zelle. Diejenige der Lymphozyten befindet sich laut Raskin und Valenciano (2000) vorwiegend in intrazellulären Organellen, so dass sich eine Aktivität meist durch eine lokale Färbung innerhalb der Zelle präsentiert (Raskin und Valenciano, 2000). In den Blautausstrichen wurden jedoch auch Lymphozyten ohne Anfärbung gefunden. Auch Schnabl (1976) stellte nur bei 58 % der kleinen Lymphozyten eine Enzymaktivität fest (Schnabl, 1976). Dies liegt daran, dass die α -Naphthyl-Azetat-Esterase bei den Schafen nur in den T-Zellen, nicht aber in den B-Zellen vorkommt (Ristau et al., 1985); (Jain, 1993). Auch die Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase der Lymphozyten präsentierte sich entweder in Form einer Anfärbung des gesamten Zytoplasmas oder war durch mehrere ungleichmäßig im Zytoplasma verteilte Reaktionsprodukte gekennzeichnet. Fey und Kunze (1970) berichten gleichfalls über eine Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase bei den Lymphozyten der Schafe (Fey und Kunze, 1970). Jain (1970) hingegen konnte den histochemischen Nachweis von unspezifischen Esterasen in ovinen Lymphozyten nicht erbringen (Jain, 1970). Die Lymphozyten der untersuchten Schafe zeigten, wie in der Literatur beschrieben, keine Aktivität der alkalischen Phosphatase (Jain, 1968); (Fey und Kunze, 1970); (Jain, 1970); (Schnabl, 1976), der Peroxidase (Jain, 1967); (Fey und Kunze, 1970); (Jain, 1970); (Schnabl, 1976); (Al Izzi et al., 2007) oder der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase (Fey und Kunze, 1970); (Schnabl, 1976).

Die Monozyten der untersuchten Tiere zeigten eine Aktivität der sauren Phosphatase, der

Peroxidase, der β -Glucuronidase, der α -Naphthyl-Azetat-Esterase und der Naphthol-AS-Azetat-Esterase. Die Aktivität der sauren Phosphatase war im Vergleich zu den Lymphozyten bei den meisten Monozyten etwas schwächer. Es war jedoch bei allen Monozyten eine Enzymaktivität festzustellen, die sich durch eine diffuse Anfärbung im Bereich der Kerninvagination, teilweise in Verbindung mit einer leichten Granulation, zeigte. Dies stimmt sowohl mit den Befunden von Raskin und Valenciano (2000), wonach das Reaktionsprodukt der sauren Phosphatase ein diffuses Muster aufweist (Raskin und Valenciano, 2000), als auch mit denjenigen von Jain (1970 und 1993), nach dem die saure Phosphatase bei den Monozyten in den Granula lokalisiert ist, überein (Jain, 1970); (Jain, 1993). Eine Peroxidase-Aktivität konnte bei einzelnen Monozyten der untersuchten Tiere in Form eines sehr feinen Niederschlags in der Zelle beobachtet werden. Auch Schnabl (1976) sowie Al Izzi et al. (2007) stellten fest, dass die Peroxidase bei den ovinen Monozyten sowohl leicht positiv als auch negativ sein kann (Schnabl, 1976); (Al Izzi et al., 2007). Schnabl (1976) beobachtete bei 2 - 3 % der Monozyten äußerst feine („staubartige“), gefärbte Granula (Schnabl, 1976). Jain (1967 und 1970) konnte eine Aktivität der Peroxidase in ovinen Monozyten jedoch nicht nachweisen (Jain, 1967); (Jain, 1970), was sehr wahrscheinlich methodisch bedingt sein dürfte. Die Aktivität der β -Glucuronidase zeigte sich bei den Monozyten der untersuchten Tiere vorwiegend durch eine diffuse Anfärbung der Zelle. Nicht selten war jedoch auch eine granuläre Reaktion, vorwiegend im Bereich einer Kerninvagination, erkennbar. Nur sehr wenige Monozyten zeigten keine Anfärbung. Diese Beobachtungen widersprechen dem Befund von Bienzle (2000), wonach die β -Glucuronidase bei den Monozyten der Haussäuger meist negativ oder nur schwach positiv sein sollte (Bienzle, 2000). Machin et al. (1980) sowie Raskin und Valenciano (2000) geben jedoch gleichfalls an, dass eine Aktivität der β -Glucuronidase häufig zu einer diffusen, zytoplasmatischen Anfärbung führt (Machin et al., 1980); (Raskin und Valenciano, 2000). Das Vorkommen von unspezifischen Esterasen ist laut Literaturangaben für die Monozyten charakteristisch (Jain, 1993); (Bienzle, 2000); (Olivier et al., 2001). Eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase war bei fast allen Monozyten der Schafe zu beobachten. Auch Osbaldiston und Sullivan (1978) sowie Ristau et al. (1985) konnten eine Enzymaktivität bei ovinen Monozyten nachweisen (Osbaldiston und Sullivan, 1978); (Ristau et al., 1985). Die positive Reaktion reichte in meinen Untersuchungen von einer diffusen, körnigen Anfärbung des gesamten Zytoplasmas bis hin zu mehreren Farbniederschlägen an verschiedenen Stellen im Bereich der Plasmamembran. Auch die Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase zeigte sich in Form einer gleichmäßigen Anfärbung des Zytoplasmas, die sich jedoch häufig im Bereich der Plasmamembran zu einem dunkleren Kranz verdichtete. Diese Beobachtungen stimmen mit den Befunden von Jain (1993) und Bienzle (2000) überein, wonach die unspezifischen Esterasen diffus im Zytoplasma der Monozyten verteilt sind (Jain, 1993); (Bienzle, 2000). Außerdem geben Raskin und Valenciano (2000) gleichfalls an, dass sich eine Aktivität der

α -Naphthyl-Azetat-Esterase oft besonders gut an der Plasmamembran beobachten lässt. Die α -Naphthyl-Azetat-Esterase der Monozyten kann, wie bereits erwähnt, aufgrund dieser Lokalisation durch Natrium-Fluorid gehemmt werden (Raskin und Valenciano, 2000). Bei den von mir untersuchten Monozyten konnte ich histochemisch, wie in der Literatur beschrieben, keine Aktivität der alkalischen Phosphatase nachweisen (Jain, 1968); (Jain, 1970); (Schnabl, 1976). Auch der Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase verlief negativ. Die Befunde von Bienzle (2000) sowie Raskin und Valenciano (2000), nach denen bei Schafen gelegentlich eine leichte Chlorazetat-Esterase-Aktivität in den Monozyten zu beobachten ist (Bienzle, 2000); (Raskin und Valenciano, 2000), konnten in meinen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Bei Schnabl (1976) verlief der Nachweis mit der Methode nach Löffler (1966) ebenso negativ (Schnabl, 1976).

Bei den neutrophilen Granulozyten der Schafe konnte eine Aktivität der sauren Phosphatase, der alkalischen Phosphatase, der Peroxidase, der β -Glucuronidase, der Naphthol-AS-Azetat-Esterase und der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase nachgewiesen werden. Das Vorkommen der α -Naphthyl-Azetat-Esterase gilt als fraglich. Die Aktivität der sauren Phosphatase war bei den neutrophilen Granulozyten der untersuchten Tiere relativ schwach und durch eine granuläre Reaktion in der Zelle gekennzeichnet. Meist zeigte nur ein Teil der Granula eine Enzymaktivität. Diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden von Fey und Kunze (1970), wonach die Aktivität der sauren Phosphatase in den neutrophilen Granulozyten der Schafe nur schwach ist (Fey und Kunze, 1970) und mit denjenigen von Jain (1993) sowie Raskin und Valenciano (2000), nach denen die saure Phosphatase nur in den primären, nicht aber den sekundären Granula lokalisiert ist (Jain, 1993); (Raskin und Valenciano, 2000). In den Blutausstrichen waren auch neutrophile Granulozyten ohne saure Phosphatase-Aktivität zu finden, was auch Jain (Jain, 1970) bei den Schafen feststellte. Die alkalische Phosphatase dient als Marker für die neutrophilen Granulozyten (Romeis, 1989). Deren Enzymaktivität in ovinen Zellen wird in der Literatur häufig beschrieben (Atwal und McFarland, 1967); (Jain, 1968); (Fey und Kunze, 1970); (Jain, 1970); (Rausch und Moore, 1975). Bei den von mir untersuchten Zellen präsentierte sich die positive Reaktion als eine diffuse Färbung in der Zelle, die teilweise ein granuläres Muster erkennen ließ. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von einigen Autoren, nach denen die alkalische Phosphatase in der Regel in den sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert ist (Jain, 1993); (Raskin und Valenciano, 2000); (Smith, 2000); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004). Bei manchen neutrophilen Granulozyten wurden neben einer granulären Reaktion aber auch dunkle Farbinseln im Zytoplasma beobachtet, die vermutlich den von Jain (1968) beschriebenen, geklumpten Granula entsprechen (Jain, 1968). Die Intensität der Anfärbung variierte bei den untersuchten Zellen stark. Es konnte jedoch kein Einfluss des Reifegrades der Zelle, der sich aus der Segmentierung des Kernes folgern lässt, auf die Reaktionsstärke vermerkt werden. Weiterhin war

nicht bei allen neutrophilen Granulozyten eine Enzymaktivität zu sehen. Jain (Jain, 1968); (Jain, 1970) kam zu dem gleichen Ergebnis. Eine Aktivität der Myeloperoxidase führte bei den neutrophilen Granulozyten der Schafe zu einem granulären Muster, wobei sich aber nicht alle Granula anfärbten. Es reagierten jedoch alle Zellen positiv. Auch eine Peroxidase-Aktivität bei ovinen neutrophilen Granulozyten wird in der Literatur häufig beschrieben (Jain, 1967); (Fey und Kuntze, 1970); (Jain, 1970); (Rausch und Moore, 1975); (Schnabl, 1976); (Al Izzi et al., 2007). Die von mir beobachtete, granuläre Reaktion röhrt daher, dass sich die Peroxidase der neutrophilen Granulozyten laut Angaben in der Literatur in den primären Granula befindet (Rausch und Moore, 1975); (Jain, 1993); (Raskin und Valenciano, 2000); (Smith, 2000). Buchta (1990) erbrachte den Nachweis der Peroxidase in den primären Granula speziell beim Schaf (Buchta, 1990). Die Aktivität der β -Glucuronidase war bei den neutrophilen Granulozyten der untersuchten Tiere nur relativ schwach. In den meisten Fällen konnte lediglich eine diffuse Reaktion im Zytoplasma beobachtet werden, manchmal war jedoch zusätzlich eine granuläre Reaktion zu sehen. Diese Beobachtungen decken sich mit den Befunden in der Literatur, wonach die Granulozyten im Vergleich zu den mononukleären Zellen insgesamt eine niedrigere β -Glucuronidase-Aktivität aufweisen (Healy, 1982) und eine positive Reaktion zu einer relativ schwachen, diffusen, zytoplasmatischen Anfärbung führt (Lorbacher et al., 1967); (Machin et al., 1980); (Raskin und Valenciano, 2000). Die diffuse Anfärbung im Zytoplasma könnte laut Lorbacher et al. (1967) auf einer mikrosomalen Aktivität der β -Glucuronidase beruhen. De Devu (1963) konnte nämlich, zusätzlich zu einer lysosomalen Aktivität, eine geringe Enzymaktivität in den Mikrosomen der Leberzellen von Mäusen nachweisen (Lorbacher et al., 1967). Die von mir beobachtete, granuläre Reaktion lässt sich dadurch erklären, dass die β -Glucuronidase laut Literaturangaben in den primären Granula lokalisiert ist (Rausch und Moore, 1975); (Jain, 1993). Buchta (1990) stellte eine Aktivität der β -Glucuronidase in den primären Granula speziell beim Schaf fest (Buchta, 1990). Laut Bienzle (2000) weisen die neutrophilen Granulozyten der Schafe im Gegensatz zu den Monozyten keine unspezifischen Esterasen auf (Bienzle, 2000). In meinen Untersuchungen konnte ich jedoch eine Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase in Form eines granulären Reaktionsproduktes erkennen. Auch Fey und Kunze (1970) berichten über eine Enzymaktivität in ovinen neutrophilen Granulozyten (Fey und Kunze, 1970). Jain (1970) beobachtete bei dem Nachweis der unspezifischen Esterasen in den neutrophilen Granulozyten der Schafe ebenfalls eine granuläre Reaktion (Jain, 1970). Eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase in den neutrophilen Granulozyten der untersuchten Tiere ist als unsicher zu betrachten, da bei manchen Zellen ein feiner, granulärer Niederschlag nur vermutet werden konnte. Sowohl Schnabl (1976) als auch Osbaldiston und Sullivan (1978) sowie Ristau et al. (1985) konnten jedoch mit pH-Werten zwischen 5,8 und 7,0 eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase in ovinen neutrophilen Granulozyten nachweisen (Schnabl, 1976); (Osbaldiston und Sullivan, 1978);

(Ristau et al., 1985). Die Chlorazetat-Esterase dient als Marker für die neutrophilen Granulozyten und deren Vorläuferzellen (Romeis, 1989). In den von mir untersuchten Ausstrichen reagierten bei einem pH-Wert von 7,0 nahezu alle neutrophilen Granulozyten positiv. Die Enzymaktivität präsentierte sich als eine homogene Anfärbung des gesamten Zytoplasmas in Verbindung mit einem granulären Farbniederschlag. Die granuläre Reaktion führt daher, dass sich die primären und sekundären Granula laut Angaben in der Literatur durch eine mäßige bis starke Aktivität der Chlorazetat-Esterase auszeichnen (Raskin und Valenciano, 2000). Auch Fey und Kunze (1970) sowie Schnabl (1976) konnten eine Chlorazetat-Esterase-Aktivität in den neutrophilen Granulozyten der Schafe nachweisen (Fey und Kuntze, 1970); (Schnabl, 1976).

Bei den eosinophilen Granulozyten der Schafe konnte eine Aktivität der sauren Phosphatase, der Peroxidase und der β -Glucuronidase nachgewiesen werden. Das Vorkommen der unspezifischen Esterasen ist als fraglich zu betrachten. Die positive Reaktion der sauren Phosphatase zeigte sich durch eine granuläre Reaktion, die bei allen eosinophilen Granulozyten zu beobachten war und insgesamt stärker als bei den neutrophilen Granulozyten ausfiel. Auch Fey und Kunze (1970), Jain (1970) sowie Schnabl (1976) berichten über eine Aktivität der sauren Phosphatase in ovinen eosinophilen Granulozyten (Fey und Kuntze, 1970); (Jain, 1970); (Schnabl, 1976). Das von mir beobachtete, granuläre Muster der Enzymaktivität lässt sich durch die Lokalisation der sauren Phosphatase in den eosinophilen Granula erklären (Jain, 1993); (Young, 2000). Auch die Peroxidase-Aktivität war bei den eosinophilen Granulozyten stärker als bei den neutrophilen Granulozyten und präsentierte sich als granulärer Reaktionsausfall. Diese Beobachtung deckt sich sowohl mit dem Befund von Jain (1967 und 1970), wonach die Peroxidase der eosinophilen Granulozyten beim Schaf eine stärkere Aktivität als die Myeloperoxidase der neutrophilen Granulozyten aufweist (Jain, 1967); (Jain, 1970), als auch mit den Befunden von verschiedenen Autoren, nach denen die eosinophile Peroxidase im Allgemeinen in den Granula lokalisiert ist (Gleich et al., 1993); (Jain, 1993); (Costa et al., 1997); (Raskin und Valenciano, 2000); (Steffens, 2000); (Young, 2000); (Sinowitz, 2006a). Der Nachweis einer Peroxidase-Aktivität bei den eosinophilen Granulozyten der Schafe wurde weiterhin von Al Izzi et al. (Al Izzi et al., 2007) erbracht. Die positive Reaktion der β -Glucuronidase präsentierte sich in Form einer diffusen Reaktion im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten, die im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten meist stärker ausfiel. Auch Lorbacher et al. (1967) und Marshall et al. (1988) beobachteten bei humanen eosinophilen Granulozyten eine stärkere Intensität der Anfärbung verglichen mit den neutrophilen Granulozyten (Lorbacher et al., 1967); (Marshall et al., 1988). Bei einigen Zellen war zusätzlich eine Anfärbung mancher Granula zu sehen, die durch die Lokalisation der β -Glucuronidase in den eosinophilen Granula zu erklären ist (Young, 2000). Der histochemische Nachweis einer Aktivität der unspezifischen Esterasen konnte in meinen Untersuchungen nicht eindeutig erbracht werden. Es konnte lediglich vermutet werden, dass

manche Granula eine positive Reaktion aufweisen. Laut Raskin und Valenciano (2000) können bei Wiederkäuern jedoch unspezifische Esterasen in den eosinophilen Granulozyten vorkommen (Raskin und Valenciano, 2000). Sowohl Fey und Kunze (1970) als auch Schnabl (1976) stellten beim Schaf eine Aktivität der α -Naphthyl-Azetat-Esterase in den eosinophilen Granulozyten fest (Fey und Kunze, 1970); (Schnabl, 1976). Jain (1970) sowie Osbaliston und Sullivan (1978) konnten diese hingegen nicht nachweisen (Jain, 1970); (Osbaliston und Sullivan, 1978). Fey und Kunze (1970) berichten zudem über eine schwache Aktivität der Naphthol-AS-Azetat-Esterase beim Schaf (Fey und Kunze, 1970). Laut Raskin und Valenciano (2000) weisen die eosinophilen Granulozyten der Haussäuger im Zytoplasma die alkalische Phosphatase auf (Raskin und Valenciano, 2000). In meinen Untersuchungen konnte ich jedoch keine Aktivität der alkalischen Phosphatase in den eosinophilen Granulozyten der Schafe beobachten. Bei Atwal und McFarland (1967), mit einer Modifikation der Metallsalzmethode nach Gomori, bei Jain (1968 und 1970), mit der Technik nach Kaplow (1955), und bei Schnabl (1976), mit der Methode nach Löffler (1966), verlief der Nachweis der alkalischen Phosphatase der eosinophilen Granulozyten der Schafe ebenso negativ (Atwal und McFarland, 1967); (Jain, 1968); (Jain, 1970); (Schnabl, 1976). Die eosinophilen Granulozyten zeigten, wie in der Literatur beschrieben (Fey und Kunze, 1970); (Stobbe, 1970); (Schnabl, 1976); (Raskin und Valenciano, 2000), keine Aktivität der Chlorazetat-Esterase.

Bei den enzymhistochemischen Untersuchungen waren keinerlei Alters- oder Geschlechtsunterschiede zu vermerken.

3. Elektronenmikroskopie

Die Erythrozyten des Schafes stellten sich unter dem Elektronenmikroskop als unregelmäßig geformte, kernlose Zellen mit einer glatten Membran dar. Nur selten wiesen sie eine runde oder bikonkave Scheibenform auf und die Unterschiede in der Form waren wesentlich stärker ausgeprägt als bei anderen Haussäugetieren. Das Zytoplasma zeigte sich homogen und relativ elektronendicht und besaß weder Zellkern noch Zellorganellen, da diese am Ende der Erythropoese ausgestoßen werden (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991). Die allgemeine Morphologie der ovinen Erythrozyten entspricht somit den Angaben in der Literatur für die Erythrozyten der Haussäuger (Hawkey und Dennet, 1990); (Kolb, 1991); (Jain, 1993); (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004). Das Zytoplasma besteht laut Literaturangaben zum größten Teil aus Hämoglobin, das ca. 95 % der Trockensubstanz der Erythrozyten ausmacht (Jain, 1993); (Liebich, 2004). Die von mir unter dem Elektronenmikroskop beobachtete, relativ elektronendichte Struktur der roten Blutkörperchen ist durch den hohen Eisengehalt des Hämoglobins bedingt (Kolb, 1991).

Die Thrombozyten der untersuchten Schafe traten unter dem Elektronenmikroskop als rundliche, ovale oder stäbchenförmige Zellen mit einer glatten Zellmembran in Erscheinung. Seitlich betrachtet konnte eine scheibenförmige oder linsenförmige Gestalt erkannt werden. Ein Zellkern fehlte. Diese morphologischen Charakteristika gelten laut Jain (1993) und Liebich (2004) auch für andere Haussäuger (Jain, 1993); (Liebich, 2004). Die Größe der Thrombozyten beläuft sich laut Literaturangaben bei den Säugern auf ca. 2 - 4 μm (Banks, 1981); (Lösch et al., 2000); (Liebich, 2004), wobei bei den Schafen mitunter die kleinsten Thrombozyten auftreten (Hees und Tschudi, 1990). Der Durchmesser lag in meinen Untersuchungen in der Regel zwischen 1 und 2 μm . Innerhalb der Zelle konnte ich bei den ovinen Thrombozyten zwei Zonen unterscheiden. Das dichte, granulareiche Zellzentrum wurde mehr oder weniger deutlich von einer homogenen Zytoplasmazone ringartig umgeben. Diese beiden Zonen, nämlich das zentrale Granulomer und das periphere Hyalomer, wurden auch bei den anderen Haussäugern von einigen Autoren differenziert (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Liebich, 2004). Manche Granula lagen bei den ovinen Thrombozyten jedoch auch direkt neben der Plasmamembran. Morphologisch konnte ich zwei verschiedene Granula-Typen unterscheiden, die auch in früheren Untersuchungen anderer Autoren bereits beschrieben wurden (Lösch et al., 2000); (Reed, 2007); (White, 2007); (Cerecedo et al., 2010). Wie beim Menschen (White, 2007) besaßen die runden bis ovalen α -Granula auch beim Schaf einen relativ homogenen und elektronendichten Inhalt und wurden von einer Membran umgeben. Die α -Granula sind laut Liebich (2004) bei den Haussäugetieren im Allgemeinen 0,2 - 0,3 μm groß (Liebich, 2004). Der Durchmesser der α -Granula war in meinen Untersuchungen mit 0,3 - 0,4 μm etwas größer. Die so genannten „dense bodies“ waren, wie beim Menschen (Hartwig, 2007), kleiner als die α -Granula und kamen in einer geringeren Anzahl vor. Der Durchmesser der „dense bodies“ lag in den meisten Fällen zwischen 0,2 und 0,3 μm . Sie waren von einer klar definierten Membran umgeben und besaßen einen exzentrisch gelegenen, äußerst elektronendichten, runden Innenkörper, der von der Membran durch einen elektronendurchlässigen Zwischenraum getrennt wurde. Beim Menschen wird dieser Granula-Typ aufgrund dieser Ultrastruktur auch als „bulls eye“ bezeichnet (White, 2007). Im Zytoplasma waren weiterhin Vesikel, Mitochondrien und wenige Glykogenpartikel zu sehen, die auch von anderen Autoren beschrieben wurden (Banks, 1981); (Hees und Tschudi, 1990); (Sinowatz, 2006a).

Die Lymphozyten der untersuchten Schafe erschienen unter dem Elektronenmikroskop als runde bis ovale Zellen. Die Zellmembran war glatt und trug bei manchen Zellen unterschiedlich lange Zytoplasmatausläufer. Der Zellkern wies eine runde bis ovale Gestalt auf und lag entweder zentral oder exzentrisch in der Zelle. Innerhalb des Zellkernes konnte ich deutlich das zentral gelegene, locker gepackte, wenig elektronendichte Euchromatin von dem peripher gelegenen, dicht gepackten, elektronendichten Heterochromatin unterscheiden. Yamada und Sonoda (Yamada und

Sonoda, 1972b) kamen bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der ovinen Lymphozyten zu ähnlichen Ergebnissen. Im Zytoplasma der Lymphozyten waren, wie auch von Liebich (Liebich, 2004) beschrieben, nur wenige Organellen zu finden. Es waren aber einige Mitochondrien und kleine Vesikel zu sehen. Ein Golgi-Apparat zeigte sich in den Proben nur äußerst selten. Gleiche Beobachtungen bezüglich der Zellorganellen in ovinen Lymphozyten machten auch Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1972b). Gemäß den Angaben in der Literatur (Yamada und Sonoda, 1972b); (Greenwood, 1977); (Banks, 1981); (Kramer, 2000) konnte ich bei manchen Lymphozyten der untersuchten Schafe elektronendichte Granula im Zytoplasma beobachten. Diese hatten eine runde Gestalt und waren ca. 0,2 µm groß. Yamada und Sonoda (1972) geben einen Durchmesser von 0,2 - 0,5 µm an (Yamada und Sonoda, 1972b). Die Zellgröße der ovinen Lymphozyten variierte teilweise stark. Bei den Haussäugern wird, je nach Autor, zwischen kleinen und großen Lymphozyten (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991); (Lösch et al., 2000); (Kraft et al., 2005) bzw. zwischen kleinen, mittleren und großen Lymphozyten (Banks, 1981); (Jain, 1993); (Kramer, 2000); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004) unterschieden. Wie Banks (Banks, 1981) bereits anmerkte, gestaltete sich jedoch die Einteilung der ovinen Lymphozyten anhand ihrer Größe unter dem Elektronenmikroskop nicht immer leicht. Eine Differenzierung von B- und T-Lymphozyten war anhand der Ultrastruktur nicht möglich.

Die Monozyten der Schafe waren, wie auch bei den anderen Haussäugern (Jain, 1993); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004), die größten reifen Leukozyten im Blut und zeigten unter dem Elektronenmikroskop eine meist unregelmäßige Gestalt. Entgegen den Ergebnissen von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1972b) konnten von mir aber auch Monozyten mit einer annähernd runden bis ovalen Gestalt gefunden werden. Der Zellkern lag meist exzentrisch in der Zelle, wobei diese Lokalisation wohl charakteristisch für die Monozyten der Haussäuger ist (Hees und Tschudi, 1990); (Kolb, 1991); (Steffens, 2000) und auch schon beim Schaf beschrieben wurde (Norris und Cham-Berlin, 1929). Der große Kern zeichnete sich, wie auch von Jain (Jain, 1993) beschrieben, durch eine äußerst variable Gestalt aus. Oft war er hufeisenförmig gebogen, was mit den Befunden mehrerer Autoren (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Yamada und Sonoda, 1972b); (Greenwood, 1977) übereinstimmt. Wie bei den Lymphozyten konnte ich auch im Kern der Monozyten das hellere Euchromatin, das von dem dunkleren Heterochromatin umgeben wird, eindeutig identifizieren. Gelegentlich konnte ich im Zellkern, wie von Bienzle (Bienzle, 2000) beschrieben, Nukleoli finden. Das Zytoplasma war reichlich vorhanden, wobei auch Lösch et al. (2000) für die Monozyten der Haussäuger ein kleines Kern-Zytoplasma-Verhältnis angeben (Lösch et al., 2000). Das Zytoplasma enthielt mehr Organellen als das der Lymphozyten und ließ in den Proben einen Golgi-Apparat, Zisternen des endoplasmatischen Retikulums, Mitochondrien und viele kleine Vesikel erkennen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1972b) bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen oviner

Monozyten. Entgegen den Ergebnissen von einigen Autoren (Norris und Cham-Berlin, 1929); (Ullrey et al., 1965b); (Yamada und Sonoda, 1972b); (Jain, 1993); (Bienzle, 2000), die über das Vorkommen von zytoplasmatischen Granula bei den Monozyten berichten, konnte ich in keinem der Ultradünnsschnitte Granula im Zytoplasma der Monozyten finden. Auch Greenwood (1977) und Banks (1981) berichten von einem seltenen Auftreten dieser Granula beim Schaf (Greenwood, 1977); (Banks, 1981). Die Zellmembran trug bei dem Großteil der Zellen unterschiedlich große, fingerförmige Projektionen, die auch von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1972b) beschrieben wurden. Diese Pseudopodien sind laut Hees und Tschudi (1990) ein Zeichen für den aktivierte Zustand der Zelle (Hees und Tschudi, 1990).

Die neutrophilen Granulozyten der Schafe traten unter dem Elektronenmikroskop als runde bis ovale Zellen in Erscheinung. Die Zellmembran war in der Regel glatt und trug unterschiedlich stark ausgebildete Pseudopodien, die frei von Zellorganellen waren. Auch Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970b) sowie Rudolph und Schnabl (Rudolph und Schnabl, 1981) kamen bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der ovinen neutrophilen Granulozyten zu ähnlichen Ergebnissen. Die reifen neutrophilen Granulozyten besaßen, wie in der Literatur beschrieben (Smith, 2000); (Steffens, 2000); (Liebich, 2004), einen segmentierten Kern, der im elektronenmikroskopischen Bild in Form von mehreren getrennten Chromatinbereichen in Erscheinung trat. Dies ist durch die äußerst geringe Dicke des Ultradünnsschnitts bedingt. Gemäß den Befunden von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970b) waren die einzelnen Kernsegmente teilweise durch schmale Chromatinbrücken miteinander verbunden. Die übliche Einteilung des Zellkernes in das hellere Euchromatin, das von dem dunkleren Heterochromatin umgeben wird (Yamada und Sonoda, 1970b); (Steffens, 2000), war auch bei den neutrophilen Granulozyten der Schafe deutlich zu erkennen. Laut Steffens (2000) dominiert bei gesunden Tieren das elektronendichte Heterochromatin, wogegen bei manchen Infektionen eine Zunahme des zentralen Euchromatinbereiches zu sehen ist (Steffens, 2000). Auch in meinen Proben konnte in den meisten Fällen ein Überwiegen des Heterochromatins beobachtet werden. Im Zytoplasma waren, je nach Schnitt, zahlreiche Granula mit einer großen Variationsbreite, was Form, Größe und Elektronendichte betrifft, zu sehen. Diese Beobachtung stimmt mit den Befunden von Rudolph und Schnabl (Rudolph und Schnabl, 1981) überein. Eine Unterscheidung der Granula-Typen war elektronenmikroskopisch zwar möglich, für eine exakte Differenzierung wären jedoch enzymhistochemische Untersuchungen auf ultrastrukturellem Niveau sinnvoll, da die primären Granula, wie bereits beschrieben, im Gegensatz zu den sekundären Granula Peroxidase-positiv sind (Buchta, 1990); (Smith, 2000). Die primären Granula hatten in meinen Proben eine längliche Gestalt und waren ungefähr 0,4 - 0,5 μm groß. Die sekundären Granula hingegen hatten eine runde Gestalt. Außerdem erschienen sie elektronendichter als die primären Granula und waren mit einer Größe von 0,2 - 0,3 μm kleiner als diese. Im Bezug auf die Morphologie und die Größe der

Granula stimmen meine Beobachtungen mit den Befunden von Steffens (Steffens, 2000) weitgehend überein. Weiterhin konnte ich beobachten, dass die sekundären Granula häufiger auftreten als die primären Granula. Dies deckt sich mit den Befunden von Jain (1993), wonach bei den Haussäugern in reifen neutrophilen Granulozyten das Verhältnis von primären zu sekundären Granula etwa 1:2 beträgt (Jain, 1993). Die nach Literaturangaben bei den Wiederkäuern vorkommenden, „großen Granula“ (Baggiolini et al., 1985); (Styrt, 1989); (Kramer, 2000) konnte ich in keiner der untersuchten Proben identifizieren. Auch laut Buchta (1990) und Kramer (2000) sind diese beim Schaf nur sehr selten zu finden (Buchta, 1990); (Kramer, 2000). Neben den Granula waren im Zytoplasma, gemäß den Angaben von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970b), unterschiedlich große Vakuolen und Vesikel, wenige Mitochondrien, ein Golgi-Apparat sowie Zisternen des endoplasmatisches Retikulums zu sehen. Weiterhin konnten in manchen Zellen Glykogenpartikel identifiziert werden, über deren Vorkommen in der Literatur ebenfalls berichtet wird (Rudolph und Schnabl, 1981); (Steffens, 2000). Unreife (stabkernige) neutrophile Granulozyten konnten unter dem Elektronenmikroskop in meinen Proben nicht gefunden werden. Dies steht im Einklang mit dem Befund von Sinowitz (2006), wonach die Granulozyten in der Regel bis zu ihrer vollkommenen Ausreifung im Knochenmark verbleiben und somit unreife Granulozyten in der Zirkulation nur selten vorkommen (Sinowitz, 2006a).

Auch die eosinophilen Granulozyten stellten sich unter dem Elektronenmikroskop als runde bis ovale Zellen dar. Die Zellmembran war glatt und trug unterschiedlich große Pseudopodien. Der Zellkern war gelappt oder auch segmentiert. Je nach Chromatinkondensation konnte das zentrale, helle Euchromatin vom peripheren, dunklen Heterochromatin deutlich unterschieden werden. Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen elektronenmikroskopischer Untersuchungen von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970a), bei denen sie die Ultrastruktur von eosinophilen Granulozyten der Schafe genauer analysierten. Gemäß den Angaben in der Literatur (Yamada und Sonoda, 1970a); (Rudolph und Schnabl, 1981) kommen im Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten der Schafe zahlreiche Granula von unterschiedlicher Größe, Form und Struktur vor. Ihr Durchmesser lag in meinen Untersuchungen in den meisten Fällen zwischen 0,4 und 1,1 μm . Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970a) berichten über ähnliche Größenverhältnisse bei den eosinophilen Granula der Schafe. Rudolph und Schnabl (1981) hingegen beschreiben beim Schaf eine Größe von bis zu 1,5 μm (Rudolph und Schnabl, 1981). Die Form der Granula reichte, gemäß Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970a), von rund über oval bis spindelförmig. Yamada und Sonoda (1970) differenzieren bei den ovinen eosinophilen Granulozyten anhand der Innenstruktur sechs verschiedene Granula-Typen (Yamada und Sonoda, 1970a). Bei dem Großteil der von mir untersuchten Granula erschien der Inhalt kristallin, wobei ein bis zwei, äußerst elektronendichte, lamelläre Einschlüsse in einer homogenen Matrix lagen. Dieser Granula-Typ entspricht sehr wahrscheinlich dem von Yamada und Sonoda

(1970) beschriebenen Typ 2, der elektronendichte „Mittelplatten“ enthält und von ihnen am häufigsten gefunden wurde (Yamada und Sonoda, 1970a). Laut Kramer (2000) stellt diese kristalline Struktur, die teilweise schon unter dem Lichtmikroskop als dunkler Einschluss erkennbar wird, eine Besonderheit der eosinophilen Granula des Schafes dar (Kramer, 2000). Seltener konnte ich in meinen Proben Granula mit einem homogenen Inhalt finden. Dieser Granula-Typ repräsentiert vermutlich den von Yamada und Sonoda (1970) beschriebenen Typ 1, der homogenes Material enthält und nur selten vorkommt (Yamada und Sonoda, 1970a). Bei manchen Granula konnte ich eine deutliche Membran erkennen, die auch von Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970a) identifiziert wurde. Im Zytoplasma waren weiterhin ein Golgi-Apparat, Zisternen des endoplasmatischen Retikulums, Mitochondrien und zahlreiche Vesikel zu sehen. Sowohl Yamada und Sonoda (Yamada und Sonoda, 1970a) als auch Rudolph und Schnabl (Rudolph und Schnabl, 1981) berichten über ähnliche Zellorganellen in den eosinophilen Granulozyten der Schafe.

Obwohl eine große Zahl von Ultradünnschnitten in meiner Arbeit elektronenmikroskopisch untersucht wurde, konnte kein basophiler Granulozyt sicher identifiziert werden. Dies liegt daran, dass die basophilen Granulozyten beim Schaf nur durchschnittlich 0,5 % (0 - 3 %) der gesamten Leukozyten ausmachen (Jain, 1993); (Kramer, 2000).

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten keine Unterschiede in der Ultrastruktur der Blutzellen in Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht festgestellt werden.

4. Fluoreszenzmikroskopie

4.1 Untersuchungen des Zytoskeletts oviner Blutzellen

Das Zytoskelett der ovinen Blutzellen wurde mit zwei verschiedenen Techniken untersucht. Der Nachweis von F-Aktin erfolgte durch das Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-markierte Toxin Phalloidin. Myosin, Vimentin, Tubulin und Zytokeratin hingegen wurden durch indirekte immunhistochemische Methoden nachgewiesen, wobei die Sekundärantikörper mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiert waren. Zur besseren Identifizierung der einzelnen Blutzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt.

Die Erythrozyten der Schafe zeigten nur eine Bindung von Phalloidin-TRITC. Dabei war nur eine schwache, homogene Anfärbung der Zellen zu erkennen. Das Zytoskelett der Erythrozyten besteht laut Angaben in der Literatur aus Spektrin, Aktin und weiteren Proteinen (Calvert et al., 1979). Mehrere Spektrinmoleküle bilden mit kurzen Aktinfilamenten ein flaches Netzwerk (Bennett, 1990), das submembranös lokalisiert ist und über bestimmte Adaptorproteine mit der

Plasmamembran verknüpft ist (Jöns, 2001). Die eher schwache Fluoreszenz lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass die Aktinfilamente der Erythrozyten durchschnittlich aus nur 12 - 14 β -Aktinmonomeren bestehen und mit einer Länge von ungefähr 33 - 37 nm relativ kurz sind. Das Spektrinmolekül hingegen kann eine Länge von bis zu 200 nm erreichen (Bennett, 1990). Gov (2007) beschreibt die Aktinfilamente der Erythrozyten als „Aktin-Knoten“, wobei ungefähr sechs Spektrinfilamente mit ihren Enden an einen dieser Knoten binden (Gov, 2007). Reife Erythrozyten besitzen laut Moll (2006) keine Mikrotubuli (Moll, 2006). Intermediärfilamente kommen in reifen Erythrozyten ebenso nicht vor. Vimentin kann noch in Erythroblasten nachgewiesen werden, geht aber nach Ausstoßung des Kernes während der Erythropoese verloren (Georgatos und Marchesi, 1985).

Das Zytoskelett der Thrombozyten besteht der Literatur nach aus einem Membranskelett aus Spektrin- und Aktinfilamenten (Boyles et al., 1985), einem zytoplasmatischen Aktinnetzwerk und einer am Zellrand verlaufenden Mikrotubuliwendel (Fox, 2001); (Hartwig, 2007). Aber auch das Motorprotein Myosin ist Bestandteil des thrombozytären Zytoskeletts (Cerecedo et al., 2002); (Liebich, 2004). In meinen Untersuchungen war eine meist starke Bindung von Phalloidin-TRITC und den Myosin IIA-Antikörpern an die ovinen Thrombozyten zu beobachten. Immunreaktives Tubulin konnte ich hingegen nicht nachweisen. Bei der Bindung von Phalloidin-TRITC zeigte sich stets eine starke Reaktion im kortikalen Bereich sowie im Zellzentrum. Das Zytoplasma der ovinen Blutplättchen färbte sich ebenfalls stark an. Dies liegt sehr wahrscheinlich daran, dass der Großteil der Aktinfilamente bei den Thrombozyten laut White (2007) im Zytoplasma der Zelle vorkommt (White, 2007). Es konnte häufig ein retikuläres Muster beobachtet werden, was durch die zelluläre Architektur der Aktinfilamente bedingt ist: Bei ruhenden Thrombozyten sind die Aktinfilamente laut Literaturangaben an verschiedenen Stellen durch Aktin querverbindende Proteine verknüpft und bilden somit ein starres Netzwerk im Zytoplasma der Zelle (Fox, 2001); (Hartwig, 2007). Aktin stellt laut Boyles et al. (1985) bei den Blutplättchen das am häufigsten vorkommende Protein dar und liegt bei inaktiven Zellen zu 35 - 40 %, bei aktiven Zellen zu 60 - 80 % polymerisiert vor (Boyles et al., 1985). Dies erklärt die starke Anfärbung, da Phalloidin-TRITC nur an polymerisiertes bzw. filamentäres Aktin (F-Aktin), und nicht an die globulären Untereinheiten (G-Aktin) bindet (Richelme et al., 1996). Darüber hinaus sind die Aktinfilamente der Thrombozyten, laut Hartwig (2007), im Gegensatz zu den kurzen Aktinoligomeren der Erythrozyten relativ lang (Hartwig, 2007). Die Myosin IIA-Antikörper zeigten ebenfalls eine starke Immunfärbung in den ovinen Thrombozyten, wobei sich die Zellperipherie stärker anfärbte als das Zellzentrum. Die Thrombozyten weisen laut Angaben in der Literatur nicht-muskuläres Myosin IIA und IIB auf, wobei achtundzwanzig Myosinmoleküle in den Blutplättchen Filamente mit einer Länge von bis zu 300 nm bilden. Die Motorproteine interagieren mit den polarisierten Aktinfilamenten (Hartwig, 2007), weshalb häufig von einem „Aktomyosinnetzwerk“ gesprochen

wird (White, 2007). Durch dieses Zusammenspiel kann auf die Aktinfilamente eine kontraktile Kraft, die für eine Vielzahl von Funktionen der Thrombozyten bedeutend ist, ausgeübt werden (Hartwig, 2007).

Die Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) der untersuchten Schafe zeigten eine meist starke Bindung von Phalloidin-TRITC, den Myosin IIA-Antikörpern und den Vimentin-Antikörpern. Immunreaktives Tubulin konnte ich bei den ovinen Leukozyten nicht nachweisen. Die Leukozyten weisen laut Angaben in der Literatur ein Zytoskelett aus Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten, Mikrotubuli (Strukov et al., 1983); (Vicente-Manzanares et al., 2002) und Myosin auf (Strukov et al., 1983); (Richelme et al., 1996); (Vicente-Manzanares et al., 2002). Die Aktinfilamente der Leukozyten bilden, wie auch bei den Erythrozyten und Thrombozyten, das Membranzytoskelett und ermöglichen unter anderem die aktive Fortbewegung der Zelle. Das wichtigste Intermediärfilamentprotein der Leukozyten stellt Vimentin dar (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004); (Khismatullin, 2009), das für die Rigidität der Zellen verantwortlich ist (Brown et al., 2001); (Sumoza-Toledo und Santos-Argumedo, 2004); (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004). Die Leukozyten exprimieren mehrere Isoformen des Motorproteins Myosin (Richelme et al., 1996), darunter auch Myosin II (Richelme et al., 1996); (Vicente-Manzanares et al., 2002); (Vicente-Manzanares und Sanchez-Madrid, 2004). Bei den Lymphozyten und den Monozyten führte die Bindung von Phalloidin-TRITC zu einer Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma, wobei bei den Lymphozyten ein homogenes, bei den Monozyten hingegen ein wabenartiges Anfärbungsmuster zu sehen war. Im Bereich der Plasmamembran konnte vor allem bei den Lymphozyten eine ringartige Verdichtung in Verbindung mit einer stärkeren Fluoreszenz beobachtet werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Aktinfilamente bei den eukaryotischen Zellen im Allgemeinen ihre höchste Dichte in der Zellperipherie direkt unter der Plasmamembran erreichen (Alberts et al., 2004). Dem Aktinfilamentsystem der T-Lymphozyten wird laut Angaben in der Literatur eine bedeutende Rolle bei der Zellaktivierung zugeschrieben (Vicente-Manzanares et al., 2002); (Burkhardt et al., 2008). Immunreaktives Myosin IIA präsentierte sich in den mononukleären Zellen durch ein körniges Muster im Zytoplasma, wobei zahlreiche fluoreszierende Punkte gleichmäßig in der Zelle verteilt waren. Dieses Muster spricht für ein globuläres Auftreten von Myosin in den ovinen Lymphozyten und Monozyten. Bei immunreaktivem Vimentin hingegen konnte ich ein netzartiges Muster, das sich über die gesamte Zelle erstreckte und teilweise den Kern bedeckte, beobachten. Vor allem bei den Lymphozyten war ein deutlicher Verlauf der Filamente zu erkennen, die einen grobmaschigen Käfig im Zytoplasma entstehen ließen. Teilweise waren aber auch punktförmige Anfärbungen im Zytoplasma zu sehen, die vermutlich längs getroffenen Filamenten entsprachen. Die Verformbarkeit zirkulierender Lymphozyten wird laut Brown et al. (2001) erst durch den Abbau dieses Vimentinnetzwerkes während der Zellpolarisation ermöglicht

(Brown et al., 2001). Bei den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten führte die Bindung von Phalloidin-TRITC zu einer starken Fluoreszenz im Zytoplasma, die ebenfalls teilweise ein retikuläres Muster erkennen ließ und sich in der Zellperipherie verdichtete. Wie bei den Lymphozyten und den Monozyten bereits erwähnt, erreichen die Aktinfilamente trotz Verteilung in der gesamten Zelle ihre höchste Dichte direkt unter der Plasmamembran (Alberts et al., 2004), um dort das kortikale Zytoskelett zu bilden (Khismatullin, 2009). Bei den neutrophilen Granulozyten besteht laut Jog et al. (2000) eine Assoziation der Aktinfilamente mit den neutrophilen Granula, die ich in meinen Proben jedoch nicht beobachten konnte. Durch diese Verbindung wird der Transport der Granula zur Plasmamembran und somit deren Exozytose reguliert bzw. limitiert. Dies verhindert die Freisetzung der Enzyme bei unstimulierten Zellen (Jog et al., 2007). Wie bei den Lymphozyten und den Monozyten zeigte immunreaktives Myosin IIA auch bei den Granulozyten ein körniges Muster im Zytoplasma, wobei sich das granulare Zellzentrum deutlich schwächer anfärbte als die Zellperipherie. Myosin IIA scheint folglich auch in den Granulozyten globulär vorzuliegen. Immunreaktives Vimentin zeigte auch bei den Granulozyten, je nach Filamentverlauf, ein netzartiges oder körniges Muster im Zytoplasma. Ein grobmaschiges Netzwerk schien auch hier das Zytoplasma auszufüllen. Der Verlauf einzelner Filamente konnte teilweise von der Plasmamembran bis hin zum Kern verfolgt werden. Dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur, wonach die Intermediärfilamente sowohl mit der Kern- als auch mit der Plasmamembran verbunden sind (Fuchs und Weber, 1994); (Brown et al., 2001). In der perinukleären Region war häufig eine Verdichtung des Netzwerkes zu sehen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Befunden von Lehto et al. (1978) sowie Georgatos und Marchesi (1985), nach denen die Intermediärfilamente gehäuft in der perinukleären Region vorkommen (Lehto et al., 1978); (Georgatos und Marchesi, 1985) und für die Verankerung des Zellkernes im Zytoplasma sorgen (Lehto et al., 1978). Laut Lazarides (1980) ist vor allem Vimentin eng mit dem Zellkern assoziiert (Lazarides, 1980).

Keratinfilamente kommen laut Lazarides (1980) bevorzugt in epithelialen Zellen vor (Lazarides, 1980). In meinen Untersuchungen konnte ich keine Bindung der Pancytokeratin-Antikörper an die verschiedenen Blutzellen des Schafes nachweisen.

Bei keinem der untersuchten Blutausstriche war eine positive Reaktion beim immunhistochemischen Nachweis von Tubulin zu beobachten. Parallel angefertigte Positivkontrollen der Blutzellen von Strauß und Kaninchen zeigten jedoch bei diesen Spezies eine positive Reaktion der Thrombozyten und vereinzelt auch der Leukozyten. Laut Angaben in der Literatur finden sich die Mikrotubuli in nahezu allen Zellen vor (Moll, 2006). Sie unterliegen ausgeprägten dynamischen Veränderungen (Khismatullin, 2009) und stehen mit den im Zytoplasma vorliegenden, globulären Tubulin-Untereinheiten im Gleichgewicht (Welsch und

Sobotta, 2003). Sie entspringen dem Mikrotubuli organisierenden Zentrum (microtubule-organising center, MOC) (Frankel, 1976); (Osborn et al., 1978); (Weber und Osborn, 1981); (Alberts et al., 2004) und durchspannen das Zytoplasma oft über die gesamte Distanz zwischen Kern und Plasmamembran (Osborn et al., 1978); (Weber und Osborn, 1981). Wie die Intermediärfilamente kommen sie in der perinukleären Region vermehrt vor (Georgatos und Marchesi, 1985). Bei nicht aktivierten Thrombozyten liegt Tubulin vor allem in der polymerisierten Form vor (White, 2007). Die Mikrotubuli erscheinen hier in Form einer Wendel (Hartwig, 2007); (White, 2007), die im Zytoplasma entlang des größten Zellumfangs unterhalb der Zellmembran verläuft (White, 2007) und für die Aufrechterhaltung der diskoidalen Form der Blutplättchen sorgt (Nachmias, 1980); (Schwer et al., 2001); (Cerecedo et al., 2002); (Hartwig, 2007); (White, 2007). Möglicherweise ist der negative Nachweis von Tubulin bei den Blutzellen der Schafe methodisch bedingt. Der verwendete Antikörper ist nicht spezifisch für das Schaf und reagiert bevorzugt mit Zellen von Mensch, Maus und Ratte und, je nach Sequenzhomologie, mit Zellen von Huhn, Gerbil, Meerschweinchen, Rind und Schwein. Weiterhin könnte die fehlende Fixierung den negativen Nachweis der Mikrotubuli beeinflussen, da diese äußerst empfindliche Strukturen darstellen und schon bei geringen Änderungen des Zellmilieus in ihre Untereinheiten zerfallen (Sauermost, 1991). Bei den Thrombozyten kann eine Kälteeinwirkung zum Abbau der die Wendel bildenden Mikrotubuli führen (Hartwig, 2007); (White, 2007). Laut White (2007) könnte diese jedoch durch Taxol stabilisiert werden (White, 2007).

Bei den Untersuchungen des Zytoskeletts oviner Blutzellen konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht festgestellt werden.

4.2 Glykohistochemische Untersuchungen

Für die glykohistochemischen Untersuchungen der ovinen Blutzellen wurden siebzehn Pflanzen-Lektine verwendet. Die Lektine ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-I, DBA, SBA, SJA, UEA-I, PHA-L und PHA-E waren zur Darstellung der Lektinbindung an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt. Die Bindung der biotinylierten Lektine VAA, SNA und MAA-I wurde mittels der Streptavidin-Biotin-Methode nachgewiesen. Zur besseren Identifizierung der einzelnen Blutzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. In der Literatur existieren zum jetzigen Zeitpunkt kaum Angaben über das Bindungsverhalten von Lektinen an die verschiedenen Blutzellen der Schafe. Lediglich bei ovinen Erythrozyten und Lymphozyten wurden bisher lektinhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Über das Bindungsverhalten verschiedener Lektine an humane oder bovine Blutzellen sind unterschiedliche Angaben in der Literatur zu finden (Sumner und Howell, 1936); (Emerson und Kornfeld, 1976); (Newman und Uhlenbruck, 1977); (Pearson et al., 1979); (Reisner

et al., 1979); (Lee et al., 1987); (Eguchi et al., 1989). Ein Vergleich dieser Befunde mit den Ergebnissen der lektinhistochemischen Untersuchungen der ovinen Blutzellen gestaltet sich jedoch schwierig, da in der Verteilung der Lektinrezeptoren auf den Zelloberflächen der verschiedenen Spezies deutliche Unterschiede bestehen (Djilali et al., 1987). Obwohl Schafe, Rinder und Pferde beispielsweise qualitativ die gleichen Monosaccharide auf der Erythrozytenmembran aufweisen, ist der Anteil der einzelnen Zucker sehr unterschiedlich (Hudson et al., 1975).

Die Erythrozyten der untersuchten Schafe reagierten mit ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs positiv. Diese FITC-markierten Lektine zeigten sowohl eine Bindung an die Membran als auch an das Zytoplasma der roten Blutkörperchen. Die Reaktion mit der Membran war meist deutlich bis stark positiv, das Zytoplasma hingegen zeigte in der Regel nur eine schwache Anfärbung. GSL-I ließ nur bei wenigen Erythrozyten eine schwache Bindung an die Membran erkennen. PNA, RCA, VAA, SNA, DBA, SBA, SJA, UEA-I, PHA-E, PHA-L und MAA-I reagierten negativ. Die positive Reaktion von ConA mit der Erythrozytenmembran deckt sich mit dem Befund von Schmid und Cwik (1974), wonach die Membran der ovinen Erythrozyten genetisch determinierte ConA-Rezeptoren trägt (Schmid und Cwik, 1974). In der Literatur wird mehrfach von einer Reaktion von PHA mit der Erythrozytenmembran der Schafe berichtet (Hamaguchi und Cleve, 1972); (Schmid, 1973); (Leca et al., 1985), in meinen Untersuchungen zeigten die roten Blutkörperchen jedoch keine Anfärbung mit PHA-E oder PHA-L. Diese Divergenz könnte möglicherweise durch verschiedene Techniken der Fixierung und der Färbung bedingt sein. Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Glykokalix der ovinen Erythrozyten einen großen Anteil an Glukose-, Mannose- N-Acetyl-Glukosamin- und N-Acetyl-Neuraminsäure-haltigen Zuckerstrukturen enthält. Diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden von Hudson et al. (1975), die unter anderem über das Vorhandensein von Glukose, Mannose, N-Acetyl-Glukosamin und Sialinsäuren auf der Erythrozytenmembran der Schafe berichten (Hudson et al., 1975). Auch Hamaguchi und Cleve (1972) sowie Fletcher et al. (1978) konnten Sialinsäuren auf der Erythrozytenmembran von Schafen nachweisen (Hamaguchi und Cleve, 1972); (Fletcher et al., 1978). N-Acetyl-Galaktosamin-Reste scheinen auf den ovinen Erythrozyten kaum in größeren Mengen vorhanden zu sein. Galaktose- und Fukose-Reste sowie durch PHA-E, PHA-L und MAA-I nachzuweisende, komplexe Kohlenhydratstrukturen konnten in meinen Untersuchungen auf der Oberfläche der Erythrozyten nicht nachgewiesen werden. Damit konnten die von Hudson et al. (1975), Fletcher et al. (1978) sowie Kusui und Takasaki (1998) erhobenen Befunde, wonach die ovinen Erythrozyten Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin in großen Mengen besitzen (Hudson et al., 1975); (Fletcher et al., 1978); (Kusui und Takasaki, 1998), nur teilweise bestätigt werden. Kusui und Takasaki (1998) berichten jedoch von einer nur äußerst geringen Fukosekonzentration auf der

Erythrozytenmembran der Schafe (Kusui und Takasaki, 1998), was das Ausbleiben der Bindung von UEA-I in meinen Untersuchungen erklären könnte. Nach der Vorbehandlung mit Neuraminidase zeigten die ovinen Erythrozyten eine Bindung von PNA an die Plasmamembran. Dies lässt darauf schließen, dass bestimmte Galaktose-Reste auf der ovinen Erythrozytenmembran von Sialinsäuren (z.B. N-Acetyl-Neuraminsäure) maskiert werden. Zu dem Ergebnis, dass eine Reaktion von PNA mit den roten Blutkörperchen erst nach Abspaltung der Sialinsäuren möglich ist, kamen auch Newman und Uhlenbruck (1977) bei humanen Erythrozyten (Newman und Uhlenbruck, 1977).

Die Thrombozyten der Schafe zeigten vor allem im Bereich des Granulomers eine Bindung verschiedener Lektine. ConA, LCA, WGA, WGAs und GSL-I reagierten meist deutlich bis stark positiv. Bei PSA und PHA-L war die Bindung an das Granulomer etwas schwächer. MAA-I hingegen führte als einziges Lektin zu einer Anfärbung der Thrombozytenmembran. PNA, RCA, VAA, SNA, DBA, SBA, SJA, UEA-I und PHA-E reagierten negativ. Diese Ergebnisse deuten glykochemisch auf das Vorhandensein von Glukose-, Mannose-, N-Acetyl-Glukosamin-, N-Acetyl-Neuraminsäure- und N-Acetyl-Galaktosamin-Resten im Granulomer der ovinen Thrombozyten hin. Durch PHA-L nachzuweisende, komplexe Kohlenhydratstrukturen scheinen im Granulomer, durch MAA-I nachzuweisende, komplexe Kohlenhydratstrukturen auf der Membran der Thrombozyten vorzukommen. Galaktose- und Fukose-Reste ließen sich nicht nachweisen. Die Glykokalix der Thrombozyten ist mit einer Stärke von 150 - 200 nm (Jain, 1993) dicker als bei den anderen Blutzellen (White, 2007). Lanillo und Cabezas (1981) merken jedoch an, dass der Kohlenhydratanteil der ovinen Thrombozytenmembran im Vergleich zu Schwein und Mensch wohl insgesamt geringer sei. Der von Lanillo und Cabezas (1981) erhobene Befund, wonach die Thrombozytenmembran der Schafe reich an Sialinsäuren ist (Lanillo und Cabezas, 1981), konnte vorerst nicht bestätigt werden. Wie bei den Erythrozyten konnte jedoch auch bei den ovinen Thrombozyten nach der Vorbehandlung mit Neuraminidase eine Bindung des Galaktose-spezifischen Lektins PNA an die Membran beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Galaktose-Reste auf der ovinen Thrombozytenmembran von Sialinsäuren maskiert werden. Es scheint jedoch eine andere Sialinsäure als die durch WGA nachzuweisende N-Acetyl-Neuraminsäure die PNA-Bindungsstelle zu maskieren (z.B. N-Glykol-Neuraminsäure).

Bei den Lymphozyten der untersuchten Schafe konnte eine positive Reaktion mit ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs, GSL-I, PHA-L und MAA-I festgestellt werden, wobei stets eine Anfärbung der Membran zu beobachten war. Bei ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs färbten sich außerdem die zytoplasmatischen Granula an. Bei LCA, PSA, WGAs, GSL-I und PHA-L konnte ich bei manchen Zellen eine Reaktion im Zytoplasma beobachten. PNA, RCA, VAA, SNA, DBA, SBA, SJA, UEA-I und PHA-E zeigten keine Bindung. Die lektinhistochemischen Ergebnisse der

vorliegenden Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Membran der Lymphozyten neben Glukose-, Mannose- N-Acetyl-Glukosamin-, N-Acetyl-Neuraminsäure- und N-Acetyl-Galaktosamin-Resten auch durch PHA-L und MAA-I nachzuweisende, komplexe Kohlenhydratstrukturen besitzt. Galaktose- und Fukose-Reste konnten nicht nachgewiesen werden. Die zytoplasmatischen Granula scheinen reich an Glukose, Mannose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure zu sein. Die positive Reaktion von ConA mit der Membran der Lymphozyten steht im Einklang mit den Befunden von Schmid und Cwik (1974), wonach die ovine Lymphozytenmembran genetisch determinierte ConA-Rezeptoren trägt (Schmid und Cwik, 1974). In Bezug auf WGA, DBA und UEA-I decken sich meine Ergebnisse mit denjenigen von Djilali et al. (1987), da sie ebenfalls über eine Bindung von WGA an ovine B- und T-Zellen und über eine fehlende Bindung von DBA und UEA-I an die Lymphozyten der Schafe berichten (Djilali et al., 1987). Bezuglich PHA-L stimmen meine Beobachtungen mit dem Befund von Outeridge (1985) überein, wonach die Lymphozytenmembran der Schafe PHA bindet (Outeridge, 1985). Entgegen den Ergebnissen dieser Arbeit wird in der Literatur häufig über eine Bindung von PNA an die Lymphozyten der Schafe berichtet, wobei PNA einen Marker für die T-Zellen darstellt (Fahey, 1980); (Outeridge, 1985); (Ristau et al., 1985); (Djilali et al., 1987); (Djilali und Parodi, 1987). Djilali und Parodi (1987) fanden nämlich heraus, dass die peripheren Lymphozyten im Blut von Schafen, die PNA binden, keine Immunglobuline auf der Zelloberfläche besitzen und folglich die T-Zellen repräsentieren müssen (Djilali und Parodi, 1987). Ristau et al. (1985) beschreiben zudem SJA als einen Marker für die ovinen T-Zellen (Ristau et al., 1985). Nach einer Neuraminidase-Vorbehandlung zeigten sowohl PNA als auch RCA sowie SJA eine positive Reaktion der Lymphozytenmembran. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass bestimmte Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosamin-Reste bei den Lymphozyten der Schafe zumindest teilweise von Sialinsäuren (z.B. N-Acetyl-Neuraminsäure) maskiert werden. Bei PNA war jedoch auffallend, dass sich nicht alle Lymphozyten nach Abspaltung der Sialinsäuren anfärben lassen. Dies liegt vermutlich daran, dass, wie bereits erwähnt, nur die T-Zellen PNA binden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Reisner et al. (1979), die bei Untersuchungen an humanen T-Lymphozyten feststellten, dass unreife T-Lymphozyten mit PNA immer positiv reagieren, wohingegen reife T-Zellen nur sehr selten eine Bindung des Lektins zeigen. Erst nach einer Vorbehandlung mit Neuraminidase ließ sich bei den reifen T-Zellen eine positive Reaktion beobachten. Der Lektinrezeptor wird folglich beim Menschen im Laufe der Zelldifferenzierung von Sialinsäuren maskiert. Dieses Wissen kann bei der Unterscheidung der akuten Leukämie, bei der unreife T-Zellen vorherrschen, von der chronischen Leukämie, bei der vor allem reife T-Lymphozyten vorkommen, von Nutzen sein. Weiterhin könnte der PNA-Rezeptor als Zielstruktur bestimmter Medikamente bei der Behandlung der akuten Leukämie herangezogen werden. Die Arzneimittel würden nur auf den

Zielzellen wirken (Reisner et al., 1979).

Die Monozyten der untersuchten Schafe zeigten eine Bindung von ConA, LCA, WGA, WGAs, GSL-I, PHA-L und MAA-I an die Membran und das Zytoplasma. Bei ConA und LCA konnte zudem eine Reaktion der zytoplasmatischen Granula beobachtet werden. PSA führte lediglich zu einer Anfärbung im Zytoplasma. Die Lektine PNA, RCA, VAA, SNA, DBA, SBA, SJA, UEA-I und PHA-E reagierten negativ. Das Ergebnis der lektinhistochemischen Untersuchungen deutet auf das Vorkommen von Glukose-, Mannose-, N-Acetyl-Glukosamin-, N-Acetyl-Neuraminsäure- und N-Acetyl-Galaktosamin-Resten und bestimmter komplexer Kohlenhydratstrukturen sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma der Monozyten der Schafe hin. Die Granula scheinen reich an Glukose- und Mannose-Resten zu sein. Galaktose- und Fukose-Reste konnten nicht nachgewiesen werden. Die Galaktose-spezifischen Lektine PNA und RCA zeigten jedoch nach einer Vorbehandlung mit Neuraminidase eine Anfärbung von Membran und Zytoplasma. Daraus lässt sich folgern, dass einige Galaktose-Reste der ovinen Monozyten von Sialinsäuren (z.B. N-Acetyl-Neuraminsäure) maskiert werden.

Bei den neutrophilen Granulozyten reagierten die Lektine ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs, GSL-I, PHA-E, PHA-L und MAA-I positiv. Bei all diesen Lektinen war eine Bindung an die neutrophilen Granula festzustellen. ConA, LCA, WGA, WGAs, PHA-L und MAA-I führten zusätzlich zu einer Anfärbung der Membran. Die Lektine PNA, RCA, VAA, SNA, DBA, SBA, SJA und UEA-I reagierten negativ. Aufgrund dieses Bindungsverhaltens kann auf das Vorhandensein von Glukose-, Mannose-, N-Acetyl-Glukosamin-, N-Acetyl-Neuraminsäure-, N-Acetyl-Galaktosamin-Resten und bestimmten komplexen Kohlenhydratstrukturen in den neutrophilen Granula geschlossen werden. Die Membran der neutrophilen Granulozyten scheint reich an Glukose, Mannose, N-Acetyl-Glukosamin-, N-Acetyl-Neuraminsäure und bestimmten komplexen Kohlenhydratstrukturen zu sein. Galaktose- und Fukose-Reste konnten in den neutrophilen Granulozyten nicht nachgewiesen werden. Nach einer Neuraminidase-Vorbehandlung zeigte sich jedoch bei den Galaktose-spezifischen Lektinen PNA und RCA eine Anfärbung von Membran und Granula. Auch das N-Acetyl-Galaktosamin-spezifische Lektin SJA ließ nach Abspaltung der Sialinsäuren eine Bindung an die neutrophilen Granula erkennen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bestimmte Galaktose-Reste der Membran sowie einige Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosamin-Reste der neutrophilen Granula von Sialinsäuren (z.B. N-Acetyl-Neuraminsäure) maskiert werden. In der Literatur sind keine Angaben über lektinhistochemische Untersuchungen der neutrophilen Granulozyten vom Schaf zu finden. Beim Menschen weisen die primären Granula der neutrophilen Granulozyten Bindungsstellen für ConA auf (Eguchi et al., 1989).

Die eosinophilen Granulozyten der Schafe reagierten mit ConA, LCA, WGA, WGAs, GSL-I,

SJA, UEA-I, PHA-L und MAA-I positiv. Bei den meisten Lektinen war eine Fluoreszenz der Membran und des Zytosplasmas zu beobachten. Lediglich SJA und UEA-I zeigten eine schwache bis deutliche Bindung an die eosinophilen Granula. PSA, PNA, RCA, VAA, SNA, DBA, SBA und PHA-E reagierten negativ. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Glykokalix und das Zytosplasma der eosinophilen Granulozyten einen großen Anteil an Glukose-, Mannose-, N-Acetyl-Glukosamin-, N-Acetyl-Neuraminsäure- und N-Acetyl-Galaktosamin-haltigen Zuckerstrukturen sowie bestimmte komplexe Kohlenhydratstrukturen beinhaltet. Die eosinophilen Granula scheinen lediglich N-Acetyl-Galaktosamin- und Fukose-Reste in größeren Mengen zu besitzen. Galaktose konnte nicht nachgewiesen werden. Bei PNA und RCA konnte allerdings nach Vorbehandlung mit Neuraminidase eine Anfärbung der Membran der eosinophilen Granulozyten beobachtet werden, wodurch eine Maskierung bestimmter Galaktose-Reste durch Sialinsäuren (z.B. N-Acetyl-Neuraminsäure) vermutet werden kann. In der Literatur sind keine Angaben zum Bindungsverhalten von Lektinen bei den eosinophilen Granulozyten der Schafe zu finden. Beim Menschen wurde anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen durch Markierung der Lektine mit Goldpartikeln herausgefunden, dass SBA und DBA stark an die eosinophilen Granula binden. Dies lässt vermuten, dass die Granula der eosinophilen Granulozyten beim Menschen N-Acetyl-Galaktosamin-Reste in größeren Mengen aufweisen (Eguchi et al., 1989). Dieser Befund konnte bei den Schafen nicht erhoben werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der lektinhistochemischen Untersuchungen müssen einige Punkte berücksichtigt werden. Zuerst muss festgehalten werden, dass es sich bei den Ergebnissen bezüglich der Bindungsstärke um eine semiquantitative Beurteilung handelt. Weiterhin ist zu beachten, dass die Bindungseigenschaften der Lektine durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst werden können. Die Struktur der Lektine unterliegt physikochemischen Einflüssen. So kann eine Variation des pH-Wertes oder der Temperatur die Zuckerbindung maßgeblich beeinflussen. Eine Erhitzung der Lektin-Lösung kann beispielsweise zu einer Änderung der Tertiärstruktur und somit zu einer Modifikation des Bindungsverhaltens der Lektine führen. Aber auch die von der Isolierung und Aufreinigung abhängige Qualität der Lektine bleibt zu berücksichtigen. Bei einer fehlerhaften Charge können die Lektine bereits an Zuckerstrukturen gebunden sein mit der Folge einer mangelhaften Bindung des Lektins an das Präparat. Vor allem bei Lektinen, die für bestimmte Blutzellen charakteristisch sind, sollte dies in Betracht gezogen werden. Die Einteilung der Lektine anhand ihrer so genannten nominalen Zuckerspezifität in die verschiedenen Gruppen beruht auf den Ergebnissen von Agglutinationsversuchen mit dem Einsatz von Hemmzuckern (Monosacchariden) und gilt deshalb laut Roth (2011) als zu stark vereinfacht (Roth, 2011). Lektine aus einer Gruppe, wie z.B. die N-Acetyl-Galaktosamin-spezifischen Lektine GSL-I und DBA, können verschiedene Ergebnisse liefern, da bei der Gruppeneinteilung die Spezifität

bezüglich der anomeren Position nicht berücksichtigt wurde. Die Affinität der Lektine für Monosaccharide ist zudem im Gegensatz zu derjenigen für komplexe Kohlenhydrate viel geringer (Van Damme et al., 2008). Außerdem ist für viele Lektine die exakte Spezifität noch nicht genau bekannt. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass einige Lektine verschiedene Kohlenhydrate binden können, jedoch mit unterschiedlicher Affinität. Bei einer positiven Reaktion kann somit entweder der Zucker vorherrschend sein, an den das Lektin primär bindet, oder ein für das Lektin weniger spezifischer Zucker, der jedoch in großen Mengen vorkommt. Schließlich muss beachtet werden, dass die Lektine auch mit unpolaren Verbindungen, die keinen Zuckeranteil besitzen, mittels hydrophober Wechselwirkungen interagieren können. Außerdem ist eine Bindung an anionische Gruppen über elektrostatische Wechselwirkungen möglich (Roth, 2011). Die in dieser Dissertationsarbeit durchgeführten lektinhistochemischen Untersuchungen erfolgten unter standardisierten Bedingungen nach einem bestimmten Protokoll. Eine Divergenz in den von mir erhobenen Befunden und den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen können auf verschiedenen Fixierungs- und Färbemethoden beruhen.

Bei den glykohistochemischen Untersuchungen konnten keine Unterschiede in der Lektinbindung der Blutzellen in Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht festgestellt werden.

VI Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Morphologie der Blutzellen des Schafes mit lichtmikroskopischen Übersichtsfärbungen sowie modernen elektronenmikroskopischen und histochemischen Methoden untersucht. Dabei wurden besonders die Enzymausstattung und das Zytoskelett der ovinen Blutzellen näher charakterisiert und die Zuckerstrukturen der Blutzellen mit glykohistochemischen Techniken untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Blutproben von insgesamt vierzig Schafen unterschiedlichen Alters und Geschlechts verwendet.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden konventionelle Übersichtsfärbungen (Diff-Quick-, Giemsa-, May-Grünwald-, Pappenheim-, Sirius-Red- und Toluidinblau-Färbung) angewendet und ihre Eignung für die Darstellung der ovinen Blutzellen verglichen. Dabei wurde deutlich, dass die Giemsa- und die Pappenheim-Färbung besonders gut zur Darstellung der Thrombozyten geeignet ist, da bei diesen Färbungen eine klare Differenzierung von Granulomer und Hyalomer möglich war. Bei den Lymphozyten waren die zytoplasmatischen Granula vor allem bei der Giemsa- und der May-Grünwald-Färbung gut zu erkennen, wohingegen sich die feinen neutrophilen Granula nur bei der May-Grünwald-Färbung besonders deutlich zeigten. Die Identifizierung der basophilen Granulozyten gelang am besten mit der May-Grünwald- und der Toluidinblau-Färbung. Daraus ergibt sich, dass vor allem die Giemsa- und die May-Grünwald-Färbung für die Darstellung der ovinen Blutzellen geeignet sind.

Bei den substrathistochemischen Untersuchungen wurde die Periodic-Acid-Schiff-Reaktion zum Nachweis von Polysacchariden (Glykogen) und Glykoproteinen in den ovinen Blutzellen eingesetzt. Weiterhin wurden die Blautusstriche der Alcianblau-Färbung bei zwei verschiedenen pH-Werten unterzogen. Bei einem pH-Wert von 1,0 werden carboxylierte Muzine, bei einem pH-Wert von 2,5 hingegen sulfatierte Mukosubstanzen nachgewiesen. Eine deutlich positive Periodic-Acid-Schiff-Reaktion konnte nur bei den ovinen Granulozyten beobachtet werden. Die Thrombozyten und Lymphozyten reagierten nur schwach positiv. Eine Anfärbung der Blutzellen mit Alcianblau bei einem pH-Wert von 1,0 gelang nur bei den Thrombozyten. Bei einem pH-Wert von 2,5 ließen sich hingegen sowohl die Thrombozyten als auch die neutrophilen Granulozyten und selten auch die eosinophilen Granulozyten anfärbten.

In der Enzymhistochemie wurde die Aktivität der sauren Phosphatase, der alkalischen Phosphatase, der Peroxidase, der β -Glucuronidase, der α -Naphthyl-Azetat-Esterase, der Naphthol-AS-Azetat-Esterase und der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase bei den verschiedenen Blutzellen untersucht. Dabei waren die saure Phosphatase und die β -Glucuronidase sowohl in den Lymphozyten und den Monozyten als auch in den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten nachzuweisen. Eine Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-

Esterase konnte nur in den neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Die Peroxidase ließ sich in den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten nachweisen, einzelne Monozyten reagierten jedoch ebenso positiv. Die α -Naphthyl-Azetat-Esterase zeigte nur bei den Lymphozyten und den Monozyten eine eindeutig positive Reaktion, wogegen bei der Naphthol-AS-Azetat-Esterase in allen Blutzellen eine Aktivität erkennbar war.

Unter dem Elektronenmikroskop konnten charakteristische Besonderheiten der ovinen Blutzellen festgestellt werden. So waren bei den sehr kleinen (1 - 2 μm) Thrombozyten der Schafe deutlich die 0,2 - 0,3 μm großen „dense bodies“ von den 0,3 - 0,4 μm großen α -Granula, die bei allen Haussäugern vorkommen, zu unterscheiden. Bei einigen Lymphozyten konnten elektronendichte Granula mit einer Größe von etwa 0,2 μm im Zytoplasma identifiziert werden. Bei den Monozyten hingegen waren keine zytoplasmatischen Granula vorhanden. Im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten konnten die länglichen, primären Granula mit einer Größe von 0,4 - 0,5 μm von den häufiger vorkommenden, runden, sekundären Granula mit einer Größe von 0,2 - 0,3 μm differenziert werden. Die für die Wiederkäuer charakteristischen, so genannten „großen Granula“ konnten nicht identifiziert werden. Die Granula der eosinophilen Granulozyten waren mit einem Durchmesser von 0,4 - 1,1 μm in der Regel größer als die neutrophilen Granula. Es dominierten kristalline Granula, deren lamelläre Einschlüsse in eine homogene Matrix eingebettet waren. Nur selten wurden Granula mit einem homogenen Inhalt gefunden.

Zur Darstellung des Zytoskeletts oviner Blutzellen wurden Phalloidin zum Nachweis von F-Aktin sowie verschiedene Antikörper zum Nachweis von Myosin IIA, Vimentin, Tubulin und Zytokeratin eingesetzt. Dabei war F-Aktin als einziges zytoskelettale Element in allen ovinen Blutzellen nachzuweisen. Das mit den Aktinfilamenten interagierende Myosin IIA konnte in allen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten nachgewiesen werden und scheint in den Leukozyten vor allem in globulärer Form vorzuliegen. Eine Darstellung des aus Vimentin bestehenden Netzwerkes gelang bei allen Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten), wobei der Verlauf der einzelnen Intermediärfilamente besonders gut zu erkennen war. Weder Tubulin noch Zytokeratin konnten in den Blutzellen des Schafes immunhistochemisch nachgewiesen werden.

In der Glykohistochemie wurden die ovinen Blutzellen auf das Bindungsverhalten der FITC-markierten Pflanzen-Lektine ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-I, DBA, SBA, SJA, UEA-I, PHA-L und PHA-E sowie der biotinylierten Pflanzen-Lektine MAA-I, SNA und VAA untersucht. Die Verteilung der Lektinbindungsstellen sowie die Stärke der positiven Reaktion waren bei den einzelnen Blutzellen sehr unterschiedlich, wobei oft ein charakteristisches Bindungsmuster erkannt werden konnte. Dabei wurde deutlich, dass die neutrophilen und die eosinophilen Granulozyten die häufigsten positiven Reaktionen mit den verschiedenen Lektinen

aufweisen. Die stets positiven Bindungsreaktionen der ovinen Blutzellen bei Inkubation mit ConA, LCA, WGA, WGAs, und GSL-I lassen auf ein regelmäßiges Vorkommen von Mannose-, Glukose-, N-Acetyl-Glukosamin-, N-Acetyl-Neuraminsäure und N-Acetyl-Galaktosamin-Resten schließen. Nach einer Vorbehandlung der Blutausstriche mit Neuraminidase stellte sich heraus, dass vor allem die PNA-Bindungsstellen aller Blutzellen sowie die RCA-Bindungsstellen der Leukozyten von Sialinsäuren maskiert werden und möglicherweise deshalb der Nachweis von Galaktose-Resten negativ verlief.

Obwohl im Blutbild deutliche Unterschiede sowohl bei den Tieren der verschiedenen Altersgruppen als auch zwischen männlichen und weiblichen Tieren beobachtet wurden, waren bei allen lichtmikroskopischen, elektronenmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen keinerlei Unterschiede in der Morphologie und der Histochemie der Blutzellen zu erkennen.

VII Summary

Ultrastructural and histochemical studies of ovine blood cells

This thesis deals with morphology of ovine blood cells using conventional light microscopic staining techniques as well as advanced electron microscopic and histochemical techniques. In this study, the localization of marker enzymes and components of the cytoskeleton of ovine blood cells were thoroughly analyzed. Furthermore, carbohydrate residues of the blood cells were investigated using a panel of FITC- and biotin-labeled lectins. In order to obtain representative results, blood samples of forty sheep of different age and sex were analyzed within the course of this study. Light microscopic, electron microscopic and fluorescence microscopic studies showed no morphological or histochemical differences between young and adult or male and female animals.

For light microscopy, conventional stainings (Diff-Quick-, Giemsa-, May-Grünwald-, Pappenheim-, Sirius-Red- und Toluidineblue-staining) were used and the results of the different methods compared. Staining with Giemsa and Pappenheim appeared especially well suited for visualization of thrombocytes because they allowed a clear distinction between granulomer and hyalomer. Regarding the lymphocytes, cytoplasmatic granules could be best recognized using Giemsa- and May-Grünwald-staining. The small neutrophilic granules stained most clearly using May-Grünwald-staining. Demonstration of basophilic granulocytes was best achieved using May-Grünwald and Toluidineblue-staining. In conclusion Giemsa- and May-Grünwald-staining were particularly suitable for differential staining of ovine blood cells.

In substrate-histochemical studies, periodic-acid-schiff-reaction (PAS-reaction) was used for demonstration of polysaccharides and glycoproteins. Furthermore blood smears were stained with Alcianblue using two different pH-values. Carboxylated mucins are detected at pH 1,0 and sulphated mucosubstances at pH 2,5. A distinct PAS-reaction was only seen in granulocytes while thrombocytes and lymphocytes only showed weak reactions. At pH 1,0 the thrombocytes were exclusively stained with Alcianblue. At pH 2,5 thrombocytes as well as neutrophilic and eosinophilic granulocytes showed some staining.

In the enzyme-histochemical studies, activity of acid phosphatase, alkaline phosphatase, peroxidase, β -glucuronidase, α -naphthyl-acetate-esterase, naphthol-AS-acetate-esterase and naphthol-AS-D-chloracetate-esterase was examined. Acid phosphatase and β -glucuronidase were histochemically detected in lymphocytes, monocytes, neutrophilic and eosinophilic granulocytes. Activity of alkaline phosphatase and naphthol-AS-D-chloracetate-esterase was exclusively shown in neutrophilic granulocytes. Peroxidase showed strong activity in both neutrophilic and

eosinophilic granulocytes whereas single monocytes displayed low intensity of staining. α -naphthyl-acetate-esterase activity was demonstrated in lymphocytes and monocytes and naphthol-AS-acetate-esterase was the only enzyme that was found in all ovine blood cells.

At the ultrastructural level some special features of ovine blood cells could be determined. The ovine thrombocytes showed a small size of about 1 - 2 μm and displayed distinct dense bodies with a size of 0,2 - 0,3 μm , that could be easily distinguished from the α -granules with a size of 0,3 - 0,4 μm , that are found in the thrombocytes of all domestic mammals. Electrondense granules with a size of about 0,2 μm could be recognized within the cytoplasm of lymphocytes whereas monocytes showed no cytoplasmatic granules. Within the cytoplasm of neutrophilic granulocytes, elongated, primary granules with a size of 0,4 - 0,5 μm could be differentiated from more abundant, roundish, secondary granules with a size of 0,2 - 0,3 μm . The so called „large granules”, which seem to be characteristic for ruminants, were not detected in my electron microscopic examinations of ovine neutrophilic granulocytes. The granules of eosinophilic granulocytes were usually bigger than neutrophilic granules measuring about 0,4 - 1,1 μm . Granules showing a crystalline ultrastructure were dominant. Their lamellar inclusions seemed to be embedded in a homogenous matrix. Granules containing a homogenous content were rarely seen.

For evaluation of the cytoskeleton, phalloidin was applied for detection of actin and several antibodies were used for demonstration of myosin IIA, vimentin, tubulin and cytokeratin in ovine blood cells. Thereby actin was the only component of the cytoskeleton existing in all examined blood cells. Myosin IIA, that interacts with actin filaments, was detected in all cells except erythrocytes. Immuno-cytochemical demonstration of the vimentin network was achieved in all leukocytes and the orientation of filaments was clearly visible. Neither tubulin nor cytokeratin could be detected immuno-histochemically in ovine blood cells.

For glyco-histochemical studies, FITC-linked plant-lectins ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-I, DBA, SBA, SJA, UEA-I, PHA-L and PHA-E as well as biotinylated plant-lectins MAA-I, SNA und VAA were used. A distinct pattern of lectin binding sites was observed in the different blood cells: Neutrophilic and eosinophilic granulocytes displayed positive staining reactions with many different lectins. In fact ConA, LCA, WGA, WGAs and GSL-I invariably showed positive staining reactions indicating a regular occurrence of mannose, glucose, N-acetyl-glucosamine, N-acetyl-neuraminic acid und N-acetyl-galactosamine conjugates in ovine blood cells. After pretreatment with neuraminidase it could be clearly demonstrated that particular binding sites of PNA of all blood cells and some binding sites of RCA of leukocytes were masked by sialic acids.

VIII Verzeichnis der Gebrauchslösungen

1. Lichtmikroskopie

1.1 Übersichtsfärbungen

Giemsa-Färbelösung

Giemsa-Stammlösung ¹	1 ml
Aqua dest.	20 ml

Sirius Red-Färbung

Saures Hämalaun nach Mayer

Hämatoxylin ¹	1 g
Aqua dest.	1000 ml
Natriumiodat ¹	200 mg
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, Kalialaun ¹	50 g
Chloralhydrat ¹	50 g
Zitronensäure kristallin ¹	1 g

Nach Lösen von Hämatoxylin in Aqua dest. erfolgt unter Schütteln die Lösung von Natriumiodat und Kalialaun. Das blau-violette Gemisch schlägt nach Zugabe von Chloralhydrat und Zitronensäure zu einer rot-violetten Farbe um. Die Färbelösung ist über lange Zeit stabil und sollte vor Gebrauch filtriert werden.

1 %ige NaOH-Lösung

Natriumhydroxid (NaOH) ¹	1 g
Aqua dest.	100 ml

20 %ige NaCl-Lösung

Natriumchlorid (NaCl) ¹	1 g
Aqua dest.	100 ml

Sirius Red-Färbelösung

Sirius Red ⁶	500 mg
Aqua bidest.	45 ml
Ethanol absolut ¹	50 ml
1 %ige NaOH-Lösung	1 ml
20 %ige NaCl-Lösung	4 ml

Toluidinblau-Färbung**PBS-Puffer pH 7,4- 7,6**

Natriumchlorid (NaCl) ¹	42,5 g
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) ¹	6,35 g
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) ¹	1,95 g
Aqua demin.	ad 5 l

Die genaue Einstellung des pH-Wertes erfolgt mit 1 N NaOH⁷ und 0,1 N HCl⁷.

Toluidinblau-Färbelösung

Toluidinblau ⁷	1 g
Methanol ¹	100 ml

1.2 Substrathistochemische Färbungen**Periodic-Acid-Schiff-Reaktion****0,5 %ige wässrige Perjodsäure-Lösung** (immer frisch ansetzen)

Perjodsäure ¹	1 g
Aqua dest.	200 ml

10 %ige Natriumdisulfit-Lösung (immer frisch ansetzen)

Natriumdisulfit ¹	3 g
Aqua dest.	30 ml

Sulfit-Wasser (SO₂-Wasser) (immer frisch ansetzen)

1 N HCl ⁷	30 ml
10 %ige Natriumdisulfit-Lösung	30 ml
Aqua demin.	600 ml

Alcianblau-Färbung**3 %ige Essigsäure-Lösung**

Essigsäure 100 % ¹	15 ml
Aqua dest.	485 ml

Alcianblau-Lösung pH 2,5

Alcianblau 8 GX Certistain® ¹	5 g
3 %ige Essigsäure-Lösung	500 ml

Alcianblau-Lösung pH 1,0

Alcianblau 8 GX Certistain® ¹	5 g
0,1 N HCl ⁷	500 ml

Kernechtrot-Färbelösung

Kernechtrot Certistain® ¹	0,1 g
Aluminiumsulfat ¹	5 g
Aqua dest.	100 ml

Nach Lösen des Aluminiumsulfats in Aqua dest. erfolgt eine Erhitzung der Lösung und die Zugabe von Kernechtrot. Anschließend Lösung erkalten lassen und filtrieren.

1.3 Enzymhistochemische Färbungen**PBS-Puffer pH 7,4- 7,6** (siehe Toluidinblau-Färbung)**Saures Hämalaun nach Mayer** (siehe Sirius-Red-Färbung)**Saure Phosphatase-Färbelösung (Set¹)**

Naphthol AS-OL Phosphorsäure ¹	2 ml
Natriumazetat ¹	0,8 g
Aqua dest.	60 ml
Pararosanilin-HCl-Lösung (2N) ¹	5 Tropfen
Nitrit-Lösung ¹	5 Tropfen

Alkalische Phosphatase-Färbung (Set¹)**Lösung A**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ¹	1,1 g
Aqua dest.	100 ml

Lösung B

1-Naphthylphosphat-Natriumsalz ¹	15 ml
Lösung A	15 ml

Lösung C

Variamin®-Blausalz B ¹	68 mg
Lösung A	45 ml

Die Färbelösung entsteht, indem Lösung C in Lösung B filtriert wird.

Peroxidase-Färbelösung (Set¹)

4-Chlor-1-naphthol ¹	15 ml
Ethanol ¹	15 ml

Aqua dest.	45 ml
Tris(hydroxymethyl-aminomethan)-HCl-Puffer ¹	10 Tropfen
Wasserstoffperoxid-Lösung ¹	2 Tropfen

β-Glucuronidase Färbung

0,2 M Natriumazetat-Lösung

Natriumazetat, wasserfrei ¹	1,312 g
Aqua dest.	80 ml

Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung

Lösung A

Pararosanilin Chlorid Certistain® ¹	200 mg
Aqua dest.	4 ml
Salzsäure 37 % ⁷	1 ml

Die Salzsäure wird erst nach Lösen des Pararosanilins in Aqua dest. hinzu gegeben.

Lösung B (4 %ige Natriumnitrit-Lösung)

Natriumnitrit ¹	400 mg
Aqua dest.	10 ml

Lösung C (Gebrauchslösung)

Lösung A	2 ml
Lösung B	2 ml

Die Vermischung von Lösung A und B sollte unmittelbar vor der Verwendung stattfinden. Es stellt sich rasch eine gelbe Färbung der Gebrauchslösung ein.

Färbelösung

0,2 M Natriumazetat-Lösung	19 ml
Lösung C	1 ml
Naphthol AS-BI β-Glucuronid ⁴	4 mg
N,N-Dimethylformamid ¹	0,5 ml

Nach Vermischung der 0,2 M Natriumazetat-Lösung mit Lösung C erfolgt mit 1 N NaOH⁷ und 0,1 N HCl⁷ eine Einstellung auf einen pH-Wert von 5,0. Nach Lösen von Naphthol AS-BI β-Glucuronid in N,N-Dimethylformamid wird diese Lösung der Inkubationslösung beigefügt.

0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0)

Lösung A

Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O ¹	8,9 g
Aqua dest.	500 ml

Lösung B

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O ¹	6,9 g
Aqua dest.	500 ml

Es folgt eine Titration beider Lösungen bis ein pH-Wert von 7,0 erreicht ist.

α-Naphthyl-Azetat-Esterase-Färbelösung

2-Naphthyl-Azetat ⁴	20 mg
Aceton ¹	0,4 ml
0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0)	80 ml
Fast Blue BB Salt hemi (2 mg/ml) ⁴	100 mg

Naphthol-AS-Azetat-Esterase-Färbelösung

Naphthol-AS-Azetat ⁵	8 mg
Aceton ¹	1 ml
0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0)	80 ml
Fast Blue BB Salt hemi (2 mg/ml) ⁴	100 mg

Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase-Färbung**10 % iges Methanol-Formol**

Methanol ¹	90 ml
Formaldehyd 37 % ⁷	10 ml

Färbelösung

Naphthol-AS-D-Chlorazetat ⁵	24 mg
N,N-Dimethylformamid ¹	4 ml
0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0)	80 ml
Fast Blue BB Salt hemi (2 mg/ml) ⁴	100 mg

2. Elektronenmikroskopie**Natriumcacodylat-Puffer****Lösung A**

Natriumcacodylat ²	8,56 g
Aqua dest.	ad 200 ml

Lösung B 0,2 M HCl¹

0,2 M Natriumcacodylat-Puffer pH 7,2

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

Die Lösung B wird hinzu gegeben bis ein pH von 7,2 erreicht ist.

0,1 M Natriumcacodylat -Puffer pH 7,2

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

Fixierungslösung nach Karnovsky

10 %ige Paraformaldehyd-Lösung

Paraformaldehyd ⁹	10 g
Aqua dest.	ad 100 ml
0,1 M NaOH ⁷	max. 6 Tropfen

Nach der Lösung des Paraformaldehyds bei 60 - 70°C auf dem Magnetrührer erfolgt die Zugabe von 0,1 M NaOH. Die Lösung ist bei 4°C ungefähr 1 - 2 Monate haltbar.

Karnovsky-Stammlösung

10 %ige Paraformaldehyd-Lösung	20 ml
0,2 M Natriumcacodylat-Puffer	50 ml
Kalziumchlorid, wasserfrei ⁸	0,05 g

Karnovsky-Gebrauchslösung

Karnovsky-Stammlösung	10 ml
2,5 %iges Glutaraldehyd ⁹	1037 ml

Kontrastierungslösung

2 %ige Osmiumtetroxid-Stammlösung

4 %iges Osmiumtetroxid ²	2 ml
0,1 M Natriumcacodylat-Puffer	2 ml

3 %ige Kaliumferrocyanid-Stammlösung

Kaliumferrocyanid ³	0,3 g
0,1 M Natriumcacodylat-Puffer	10 ml

Die Lösung ist nach Herstellung erst am nächsten Tag brauchbar.

1 %iges Osmiumtetroxid und 1,5 %iges Kaliumferrocyanid in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer

2 %ige Osmiumtetroxid-Stammlösung	4 ml
3 %ige Kaliumferrocyanid-Stammlösung	4 ml

Polyembed

Poly/bed 812 ²	16 ml
DDSA ²	10 ml
NMA ²	9 ml
DMP-30 ²	0,3 - 0,5 ml

Färbung nach Richardson**1 %iges Methylenblau**

Methylenblau ¹	1 g
Aqua dest.	100 ml

1 %iges Borax

Dinatriumtetraborat-decahydrat ⁸	1 g
Aqua dest.	100 ml

1 %iges Methylenblau und 1 %iges Borax werden 1:1 gemischt und dieses Gemisch daraufhin 1:1 mit 1 %igem Azur II¹ vermischt.

Bleizitrat-Lösung nach Reynolds**Natriumzitrat Stock**

Natriumzitrat ³	35,7 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Bleinitrat Stock

Bleinitrat ³	33, 1 g
Aqua dest.	ad 100 ml

Bleizitrat-Lösung

Aqua dest.	16 ml
Natriumzitrat Stock	3 ml
Bleinitrat Stock	2 ml
1 M NaOH ⁷	4 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Die Lösung ist bei 4°C ungefähr 3 Monate haltbar.

3. Fluoreszenzmikroskopie

3.1 Immunhistochemie

PBS-Puffer pH 7,4 - 7,6 (siehe Toluidinblau-Färbung)

3.2 Glykohistochemie

PBS-Puffer pH 7,4 - 7,6 (siehe Toluidinblau-Färbung)

Vorbehandlung mit Neuraminidase

Puffer 1: Natriumazetat-Puffer pH 5,5

Natriumazetat, wasserfrei ¹	13,6 g
----------------------------------------	--------

Aqua demin.	1 l
-------------	-----

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt mit 10 %iger Essigsäure⁷.

Puffer 2: Natriumazetat-Kalziumchlorid-Puffer pH 5,0

Natriumazetat, wasserfrei ¹	8,2 g
----------------------------------------	-------

Aqua demin.	1 l
-------------	-----

Kalziumchlorid ¹	0,294 g
-----------------------------	---------

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt mit 1 M HCl⁷ bei 37 °C auf der Wärmeplatte.

Gebrauchsfertige Neuraminidase-Lösung

Neuraminidase-Lösung von Vibrio cholerae ⁴	3 µl
-------------------------------------------------------	------

Puffer 2	1 ml
----------	------

Die Temperatur muss immer über 37°C betragen, darf 40°C jedoch nicht überschreiten.

¹ Merck, Darmstadt

² Polysciences Inc, Warrington, USA

³ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁴ Sigma-Aldrich, Steinheim

⁵ Applichem, Darmstadt

⁶ Reactifs Ral, Martillac

⁷ Roth, Karlsruhe

⁸ Serva, Heidelberg

IX Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle II.1: Physiologische Blutwerte des adulten Schafes.....</i>	9
<i>Tabelle II.2: Enzymatische Ausstattung der Blutzellen des Schafes</i>	47
<i>Tabelle II.3: Leukozytenmoleküle des Schafes.....</i>	51
<i>Tabelle II.4: Einteilung ausgewählter Pflanzen-Lektine anhand ihrer Zuckerspezifität.....</i>	61
<i>Tabelle II.5: Blutgruppensysteme der Schafe</i>	68
<i>Tabelle III.1: Übersicht über die für die Doktorarbeit herangezogenen Schafe</i>	73
<i>Tabelle III.2: In dieser Arbeit untersuchte Zytoskelettproteine</i>	89
<i>Tabelle III.3: In dieser Arbeit verwendete FITC-markierte Pflanzen-Lektine.....</i>	92
<i>Tabelle III.4: In dieser Arbeit verwendete Hemmzucker</i>	93
<i>Tabelle III.5: In dieser Arbeit verwendete biotinylierte Pflanzen-Lektine.....</i>	95
<i>Tabelle IV.1: Kleines Blutbild der verwendeten Schafe.....</i>	98
<i>Tabelle IV.2: Differentialblutbild der verwendeten Schafe</i>	99
<i>Tabelle IV.3: Übersichtsfärbungen der Erythrozyten</i>	101
<i>Tabelle IV.4: Übersichtsfärbungen der Thrombozyten.....</i>	102
<i>Tabelle IV.5: Übersichtsfärbungen der Lymphozyten.....</i>	103
<i>Tabelle IV.6: Übersichtsfärbungen der Monozyten</i>	106
<i>Tabelle IV.7: Übersichtsfärbungen der neutrophilen Granulozyten</i>	108
<i>Tabelle IV.8: Übersichtsfärbungen der eosinophilen Granulozyten</i>	110
<i>Tabelle IV.9: Übersichtsfärbungen der basophilen Granulozyten</i>	112
<i>Tabelle IV.10: Periodic-Acid-Schiff-Reaktion</i>	114
<i>Tabelle IV.11: Alcianblau-Färbung pH 2,5</i>	116
<i>Tabelle IV.12: Nachweis der sauren Phosphatase.....</i>	118
<i>Tabelle IV.13: Nachweis der alkalischen Phosphatase</i>	120
<i>Tabelle IV.14: Nachweis der Peroxidase.....</i>	122
<i>Tabelle IV.15: Nachweis der β-Glucuronidase.....</i>	124
<i>Tabelle IV.16: Nachweis der α-Naphthyl-Azetat-Esterase</i>	126
<i>Tabelle IV.17: Nachweis der Naphthol-AS-Azetat-Esterase.....</i>	129
<i>Tabelle IV.18: Nachweis der Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase.....</i>	131
<i>Tabelle IV.19: Bindung von Phalloidin-TRITC</i>	148
<i>Tabelle IV.20: Bindung der Myosin IIA-Antikörper</i>	150
<i>Tabelle IV.21: Bindung der Vimentin-Antikörper.....</i>	153
<i>Tabelle IV.22: Einzelauswertung Lektine: ConA-FITC.....</i>	157
<i>Tabelle IV.23: Einzelauswertung Lektine: LCA-FITC.....</i>	160

<i>Tabelle IV.24: Einzelauswertung Lektine: PSA-FITC</i>	163
<i>Tabelle IV.25: Einzelauswertung Lektine: WGA-FITC</i>	167
<i>Tabelle IV.26: Einzelauswertung Lektine: WGAs-FITC</i>	170
<i>Tabelle IV.27: Einzelauswertung Lektine: GSL-I-FITC</i>	173
<i>Tabelle IV.28: Einzelauswertung Lektine: PHA-L-FITC</i>	178
<i>Tabelle IV.29: Einzelauswertung Lektine: MAA-I-Biotin</i>	180

X Abbildungsverzeichnis

Abbildung IV-1: Thrombozyten, Diff-Quick-Färbung	102
Abbildung IV-2: Thrombozyten, Giemsa-Färbung	102
Abbildung IV-3: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung	104
Abbildung IV-4: Lymphozyt, Giemsa-Färbung	104
Abbildung IV-5: Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung	104
Abbildung IV-6: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung	104
Abbildung IV-7: Reaktiver Lymphozyt, Giemsa-Färbung.....	105
Abbildung IV-8: Reaktiver Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung.....	105
Abbildung IV-9: Monozyt, Diff-Quick-Färbung.....	106
Abbildung IV-10: Monozyt und Lymphozyt, Giemsa-Färbung	106
Abbildung IV-11: Monozyt, Giemsa-Färbung	107
Abbildung IV-12: Monozyt, Pappenheim-Färbung.....	107
Abbildung IV-13: Neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung.....	108
Abbildung IV-14: Neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung.....	108
Abbildung IV-15: Neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.....	109
Abbildung IV-16: Neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.....	109
Abbildung IV-17: Neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung	109
Abbildung IV-18: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung	111
Abbildung IV-19: Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung	111
Abbildung IV-20: Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.....	111
Abbildung IV-21: Eosinophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung	111
Abbildung IV-22: Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung	112
Abbildung IV-23: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung	112
Abbildung IV-24: Lymphozyt, PAS-Reaktion	114
Abbildung IV-25: Neutrophiler Granulozyt, PAS-Reaktion.....	114
Abbildung IV-26: Neutrophiler Granulozyt, PAS-Reaktion.....	115
Abbildung IV-27: Eosinophiler Granulozyt, PAS-Reaktion.....	115
Abbildung IV-28: Thrombozyten und Lymphozyt, Alcianblau-Färbung pH 1,0.....	116
Abbildung IV-29: Thrombozyten und Lymphozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	116
Abbildung IV-30: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5 ..	117
Abbildung IV-31: Eosinophile Granulozyten, Alcianblau-Färbung pH 2,5	117
Abbildung IV-32: Lymphozyt, Saure Phosphatase.....	119
Abbildung IV-33: Monozyt, Saure Phosphatase	119

Abbildung IV-34: Neutrophiler Granulozyt, Saure Phosphatase	119
Abbildung IV-35: Eosinophiler Granulozyt, Saure Phosphatase	119
Abbildung IV-36: Neutrophiler Granulozyt, Alkalische Phosphatase	120
Abbildung IV-37: Neutrophiler Granulozyt, Alkalische Phosphatase	120
Abbildung IV-38: Eosinophiler Granulozyt, Alkalische Phosphatase	121
Abbildung IV-39: Monozyt, Alkalische Phosphatase	121
Abbildung IV-40: Neutrophiler Granulozyt, Peroxidase	122
Abbildung IV-41: Eosinophiler Granulozyt, Peroxidase	122
Abbildung IV-42: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, Peroxidase	123
Abbildung IV-43: Monozyt, Peroxidase	123
Abbildung IV-44: Lymphozyt, β -Glucuronidase	124
Abbildung IV-45: Monozyt, β -Glucuronidase	124
Abbildung IV-46: Neutrophiler Granulozyt, β -Glucuronidase	125
Abbildung IV-47: Neutrophiler Granulozyt, β -Glucuronidase	125
Abbildung IV-48: Eosinophiler Granulozyt, β -Glucuronidase	125
Abbildung IV-49: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, β -Glucuronidase	125
Abbildung IV-50: Lymphozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0	127
Abbildung IV-51: Lymphozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0	127
Abbildung IV-52: Monozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0	127
Abbildung IV-53: Neutrophiler Granulozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0	127
Abbildung IV-54: Neutrophiler Granulozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0	128
Abbildung IV-55: Eosinophiler Granulozyt, α -Naphthyl-Azetat-Esterase pH 7,0	128
Abbildung IV-56: Lymphozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0	129
Abbildung IV-57: Lymphozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0	129
Abbildung IV-58: Monozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0	130
Abbildung IV-59: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0	130
Abbildung IV-60: Neutrophiler Granulozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0	130
Abbildung IV-61: Eosinophiler Granulozyt, Naphthol-AS-Azetat-Esterase pH 7,0	130
Abbildung IV-62: Neutrophiler Granulozyt, Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase pH 7,0 ..	131
Abbildung IV-63: Neutrophiler Granulozyt, Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase pH 7,0 ..	131
Abbildung IV-64: Neutrophiler Granulozyt, Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase pH 5,5 ..	132
Abbildung IV-65: Ultrastruktur von Thrombozyten	134
Abbildung IV-66: Ultrastruktur von Lymphozyten und Erythrozyten	136
Abbildung IV-67: Ultrastruktur eines Lymphozyten, eines Thrombozyten und mehrerer	

<i>Erythrozyten</i>	137
<i>Abbildung IV-68: Ultrastruktur eines Monozyten, zweier Lymphozyten und mehrerer Erythrozyten</i>	139
<i>Abbildung IV-69: Ultrastruktur eines Monozyten, eines Lymphozyten und eines Erythrozyten</i>	140
<i>Abbildung IV-70: Ultrastruktur eines neutrophilen Granulozyten, eines Lymphozyten, eines Thrombozyten und mehrerer Erythrozyten</i>	142
<i>Abbildung IV-71: Ultrastruktur eines neutrophilen Granulozyten</i>	143
<i>Abbildung IV-72: Ultrastruktur eines eosinophilen Granulozyten und mehrerer Erythrozyten</i>	145
<i>Abbildung IV-73: Ultrastruktur eines eosinophilen Granulozyten und eines Erythrozyten</i> ..	146
<i>Abbildung IV-74: Lymphozyt und Thrombozyt, Phalloidin-TRITC</i>	148
<i>Abbildung IV-75: Monozyt, Phalloidin-TRITC</i>	148
<i>Abbildung IV-76: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten, Phalloidin-TRITC</i>	149
<i>Abbildung IV-77: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, Phalloidin-TRITC</i>	149
<i>Abbildung IV-78: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, Phalloidin-TRITC</i>	149
<i>Abbildung IV-79: Neutrophiler Granulozyt, eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, Phalloidin-TRITC</i>	149
<i>Abbildung IV-80: Thrombozyten, Myosin IIA-Antikörper</i>	151
<i>Abbildung IV-81: Lymphozyt, Myosin IIA-Antikörper</i>	151
<i>Abbildung IV-82: Monozyt, Myosin IIA-Antikörper</i>	151
<i>Abbildung IV-83: Neutrophiler Granulozyt, Myosin IIA-Antikörper</i>	151
<i>Abbildung IV-84: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, Myosin IIA-Antikörper</i>	152
<i>Abbildung IV-85: Eosinophile Granulozyten und Thrombozyten, Myosin IIA-Antikörper</i> ..	152
<i>Abbildung IV-86: Lymphozyt, Vimentin-Antikörper</i>	153
<i>Abbildung IV-87: Monozyt, Vimentin-Antikörper</i>	153
<i>Abbildung IV-88: Neutrophiler Granulozyt, Vimentin-Antikörper</i>	154
<i>Abbildung IV-89: Neutrophiler Granulozyt, Vimentin-Antikörper</i>	154
<i>Abbildung IV-90: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, Vimentin-Antikörper</i>	154
<i>Abbildung IV-91: Eosinophiler Granulozyt, Vimentin-Antikörper</i>	154
<i>Abbildung IV-92: Lymphozyt und Thrombozyten, ConA-FITC</i>	158
<i>Abbildung IV-93: Lymphozyt, ConA-FITC</i>	158
<i>Abbildung IV-94: Monozyt, ConA-FITC</i>	158
<i>Abbildung IV-95: Monozyt, ConA-FITC</i>	158
<i>Abbildung IV-96: Neutrophiler Granulozyt, ConA-FITC</i>	159

<i>Abbildung IV-97: Eosinophiler und neutrophiler Granulozyt, ConA-FITC</i>	159
<i>Abbildung IV-98: Lymphozyt und Thrombozyt, LCA-FITC</i>	161
<i>Abbildung IV-99: Monozyt, LCA-FITC</i>	161
<i>Abbildung IV-100: Neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC</i>	161
<i>Abbildung IV-101: Eosinophiler Granulozyt, LCA-FITC</i>	161
<i>Abbildung IV-102: Lymphozyt, PSA-FITC</i>	164
<i>Abbildung IV-103: Monozyt, PSA-FITC</i>	164
<i>Abbildung IV-104: Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC</i>	164
<i>Abbildung IV-105: Eosinophiler Granulozyt, PSA-FITC</i>	164
<i>Abbildung IV-106: Eosinophiler Granulozyt, PNA-FITC</i>	165
<i>Abbildung IV-107: Lymphozyt, PNA-FITC</i>	165
<i>Abbildung IV-108: Lymphozyt, VAA-Biotin</i>	166
<i>Abbildung IV-109: Neutrophiler Granulozyt, VAA-Biotin</i>	166
<i>Abbildung IV-110: Lymphozyt und Thrombozyt, WGA-FITC</i>	168
<i>Abbildung IV-111: Monozyt, WGA-FITC</i>	168
<i>Abbildung IV-112: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten, WGA-FITC</i>	168
<i>Abbildung IV-113: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, WGA-FITC</i>	168
<i>Abbildung IV-114: Lymphozyt und Thrombozyten, WGAs-FITC</i>	171
<i>Abbildung IV-115: Monozyt, WGAs-FITC</i>	171
<i>Abbildung IV-116: Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC</i>	171
<i>Abbildung IV-117: Eosinophiler Granulozyt, WGAs-FITC</i>	171
<i>Abbildung IV-118: Lymphozyt und Thrombozyt, GSL-I-FITC</i>	174
<i>Abbildung IV-119: Monozyt und Thrombozyten , GSL-I-FITC</i>	174
<i>Abbildung IV-120: Neutrophiler Granulozyt, GSL-I-FITC</i>	174
<i>Abbildung IV-121: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, GSL-I-FITC</i>	174
<i>Abbildung IV-122: Eosinophiler Granulozyt, SJA-FITC</i>	175
<i>Abbildung IV-123: Monozyt, SJA-FITC</i>	175
<i>Abbildung IV-124: Eosinophiler Granulozyt und Lymphozyt, UEA-I-FITC</i>	176
<i>Abbildung IV-125: Neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC</i>	177
<i>Abbildung IV-126: Eosinophiler Granulozyt, PHA-E-FITC</i>	177
<i>Abbildung IV-127: Lymphozyt, PHA-L-FITC</i>	179
<i>Abbildung IV-128: Eosinophiler Granulozyt, PHA-L-FITC</i>	179
<i>Abbildung IV-129: Lymphozyt, MAA-I-Biotin</i>	181
<i>Abbildung IV-130: Monozyt, MAA-I-Biotin</i>	181
<i>Abbildung IV-131: Neutrophiler Granulozyt, MAA-I-Biotin</i>	181

<i>Abbildung IV-132: Eosinophiler Granulozyt und Thrombozyten, MAA-I-Biotin</i>	181
<i>Abbildung IV-133: Lymphozyt und Thrombozyten, PNA-FITC nach Neuraminidase-Vorbehandlung</i>	183
<i>Abbildung IV-134: Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC nach Neuraminidase-Vorbehandlung</i>	183
<i>Abbildung IV-135: Monozyt, PNA-FITC nach Neuraminidase-Vorbehandlung</i>	183
<i>Abbildung IV-136: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC nach Neuraminidase-Vorbehandlung</i>	183

XI Literaturverzeichnis

Aebi, U.; Cohn, J.; Buhle, L.; Gerace, L.: *The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments.* Nature 323 (6088), 1986, S. 560-564.

Agar, N. S.; Gruca, M. A.; Harley, J. D.; Roberts, J.: *Red cell enzymes II. Enzyme activities in the red blood cells of high and low potassium sheep.* Comparative Biochemistry and Physiology B 51 (4), 1975a, S. 467-469.

Agar, N. S.; Gruca, M. A.; Harley, J. D.; Roberts, J.: *Red cell enzymes III. Enzyme activities in the red blood cells of different breeds of sheep.* Comparative Biochemistry and Physiology B 51 (4), 1975b, S. 471-473.

Al Izzi, S. A. L.; Gawas, M. M.; Belhaj, K. M.: *Cytochemistry of sheep bone marrow cells.* Veterinarski Arhiv 77 (5), 2007, S. 387-396.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Molekularbiologie der Zelle.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004.

Alroy, J.; Orgad, U.; Ucci, A. A.; Pereira, M. E.: *Identification of glycoprotein storage diseases by lectins: a new diagnostic method.* The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 32 (12), 1984, S. 1280-1284.

Atwal, O. S.; McFarland, L. Z.: *Histochemical Study of the distribution of alkaline phosphatase in leukocytes of the horse, cow, sheep, dog and cat.* American Journal of Veterinary Research 28 (125), 1967, S. 971-974.

Aub, J. C.; Lankester, A.; Tieslau, C.: *Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 50 (4), 1963, S. 613-619.

Aub, J. C.; Sanford, B. H.; Cote, M. N.: *Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2), 1965, S. 396-399.

Baggiolini, M.; Horisberger, U.; Gennaro, R.; Dewald, B.: *Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants - ultrastructure of circulating and maturing cells.* Laboratory Investigation 52 (2), 1985, S. 151-158.

Banks, W. J.: *Applied veterinary histology.* Williams & Wilkins, Baltimore, 1981.

Barker, J. E.; Pierce, J. E.; Nienhuis, A. W.: *Hemoglobin switching in sheep: a comparison of the erythropoietin-induced switch to HbC and the fetal to adult hemoglobin switch.* Blood 56 (3), 1980, S. 488-494.

Bennett, V.: *Spectrin-based membrane skeleton - a multipotential adapter between plasma-membrane and cytoplasm.* Physiological Reviews 70 (4), 1990, S. 1029-1065.

Bennett, V.; Stenbuck, P. J.: *The membrane attachment protein for spectrin is associated with band-3 in human erythrocyte membranes.* Nature 280 (5722), 1979, S. 468-473.

Biendl, D.: *Monocytes and macrophages.* In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Bouw, J.: *Present status of animal blood group research.* Veterinary Science Communications 1 (2), 1977, S. 105-110.

Boyd, W. C.; Shapleigh, E.: *Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins).* Science 119 (3091), 1954, S. 419.

Boyles, J.; Fox, J. E. B.; Phillips, D. R.; Stenberg, P. E.: *Organisation of the cytoskeleton in resting, discoid platelets - preservation of actin filaments by modified fixation that prevents osmium damage.* Journal of Cell Biology 101 (4), 1985, S. 1463-1472.

Brinkley, B. R.; Fuller, G. M.; Highfield, D. P.: *Cytoplasmatic microtubules in normal and transformed cells in culture: analysis by tubulin antibody immunofluorescence.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 72 (12), 1975, S. 4981-4985.

Brooks, S. A.; Leathem, A. J. C.; Schumacher, U.: *Microscopy handbooks. 36. Lectin histochemistry: a concise practical handbook.* BIOS Scientific in association with the Royal Microscopical Society, Oxford, 1997.

Brown, M. J.; Hallam, J. A.; Colucci-Guyon, E.; Shaw, S.: *Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments.* Journal of Immunology 166 (11), 2001, S. 6640-6646.

Buchta, R.: *Functional and biochemical properties of ovine neutrophils.* Veterinary Immunology and Immunopathology 24 (2), 1990, S. 97-112.

Burkhardt, J. K.; Carrizosa, E.; Shaffer, M. H.: *The actin cytoskeleton in T cell activation.* Annual Review of Immunology 26, 2008, S. 233-259.

Byers, S. R.; Kramer, J. W.: *Normal hematatology of sheep and goats.* In: Weiss, D. J.; Wardrop, K. J. (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology. Blackwell, Iowa, 2010.

Calvert, R.; Ungewickell, E.; Gratzer, W. B.: *Interaction between red blood cell cytoskeletal proteins.* Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie 360 (10), 1979, S. 1368-1368.

Cerecedo, D.; Cisneros, B.; Mondragon, R.; Gonzalez, S.; Galvan, I. J.: *Actin filaments and microtubule dual-granule transport in human adhered platelets: the role of alpha-dystrobrevins.* British Journal of Haematology 149 (1), 2010, S. 124-136.

Cerecedo, D.; Stock, R.; Gonzalez, S.; Reyes, E.; Mondragon, R.: *Modification of actin, myosin and tubulin distribution during cytoplasmic granule movements associated with platelet adhesion.* Haematologica 87 (11), 2002, S. 1165-1176.

Costa, J. J.; Weller, P. F.; Galli, S. J.: *The cells of the allergic response - mast cells, basophils, and eosinophils.* Journal of the American Medical Association 278 (22), 1997, S. 1815-1822.

da Silva, R. G.; da Costa, M. J.; Sobrinho, A. G.: *Influence of hot environments on some blood variables of sheep.* International Journal of Biometeorology 36 (4), 1992, S. 223-225.

Daimon, T.; Gotoh, Y.; Kawai, K.; Uchida, K.: *Ultrastructural distribution of peroxidase in thrombocytes of mammals and submammals.* Histochemistry 82 (4), 1985, S. 345-350.

Davis, W. C.; Hamilton, M. J.: *Comparison of the unique characteristics of the immune system in different species of mammals.* Veterinary Immunology and Immunopathology 63 (1-2), 1998, S. 7-13.

Denk, H.: *Immunhistochemische Färbemethoden.* In: Böck, P. (Hrsg.): *Mikroskopische Technik/Romeis.* Urban & Schwarzenberg Verlag, München, 1989.

Diallo, A. M.; Kolb, E.; Korber, R.: *Studies on the properties of acid erythrocyte phosphatase in sheep and the isoenzymes of sheep and goat acid erythrocyte phosphatase.* Archiv für experimentelle Veterinärmedizin 29 (5), 1975, S. 789-800.

Djilali, S.; Boulouis, H. J.; Montagutelli, X.: *Lymphocyte markers in domestic animals 1. Mitogenic lectins and non-mitogenic lectins.* Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 10 (3-4), 1987, S. 187-204.

Djilali, S.; Parodi, A. L.: *T and B peripheral blood lymphocytes in normal and lymphocytotic sheep.* Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 10 (2), 1987, S. 141-147.

Egbe-Nwiyi, T. N.; Nwaosu, S. C.; Salami, H. A.: *Haematological values of apparently healthy sheep and goats as influenced by age and sex in arid zone of nigeria.* African Journal of Biomedical Research 3 (2), 2000, S. 109-115.

Eguchi, M.; Ozawa, T.; Suda, J.; Sugita, K.; Furukawa, T.: *Lectins for electron microscopic distinction of eosinophils from other blood cells.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry 37 (5), 1989, S. 743-749.

Emerson, W. A.; Kornfeld, S.: *Characterization of oligosaccharide units of bovine erythrocyte membrane glycoprotein.* Biochemistry 15 (8), 1976, S. 1697-1703.

Evans, C. W.; Lund, B. T.; McConnell, I.; Bujdoso, R.: *Antigen recognition and activation of ovine gamma delta T cells.* Immunology 82 (2), 1994, S. 229-237.

Ey, P. L.: *Immunoglobulins on the surface of sheep lymphocytes 1. Class and cellular distribution.* European Journal of Immunology 3 (1), 1973a, S. 37-43.

Ey, P. L.: *Immunoglobulins on the surface of sheep lymphocytes 2. Class, size and fate during incubation of lymphocytes at 37°C.* European Journal of Immunology 3 (7), 1973b, S. 402-409.

Fahey, K. J.: *The binding of lectins to sheep tissues and circulating cells - peanut agglutinin, a marker for presumptive T lymphocytes.* Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 58 (6), 1980, S. 557-569.

Farinacci, M.; Colitti, M.; Sgorlon, S.; Stefanon, B.: *Immunomodulatory activity of plant residues on ovine neutrophils.* Veterinary Immunology and Immunopathology 126 (1-2), 2008, S. 54-63.

Fey, F.; Kuntze, A.: *Zytochemische Untersuchungen an Blutzellen in der vergleichenden Hämatologie.* Folia Haematologica 93 (3), 1970, S. 241-248.

Flaumenhaft, R.; Dilks, J. R.; Rozenvayn, N.; Monahan-Earley, R. A.; Feng, D.; Dvorak, A. M.: *The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion.* Blood 105 (10), 2005, S. 3879-3887.

Fletcher, M. A.; Claflin, A. J.; McKinney, E. C.; Lo, T. M.: *Glycoprotein from sheep erythrocyte membrane which inhibits e-rosette formation.* Federation Proceedings 37 (6), 1978, S. 1438-1438.

- Fowler, V. M.:** *Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle.* Current Opinion in Cell Biology 8 (1), 1996, S. 86-96.
- Fox, J. E. B.:** *Cytoskeletal proteins and platelet signaling.* Thrombosis and Haemostasis 86 (1), 2001, S. 198-213.
- Frankel, F. R.:** *Organisation and energy-dependent growth of microtubules in cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 73 (8), 1976, S. 2798-2802.
- Franz, H.:** *100 Jahre Lektinforschung - eine Bilanz.* Naturwissenschaften 77 (3), 1990, S. 103-109.
- Freund, M.:** *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie.* Elsevier Urban & Fischer Verlag, München, 2008.
- Fuchs, E.; Weber, K.:** *Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease.* Annual Review of Biochemistry 63, 1994, S. 345-382.
- Gabius, H. J.:** *Glycans: bioactive signals decoded by lectins.* Biochemical Society Transactions 36 (6), 2008, S. 1491-1496.
- Gabius, H. J.:** *Glycobiomarkers by glycoproteomics and glycan profiling (glycomics): emergence of functionality.* Biochemical Society Transactions 39 (1), 2011, S. 399-405.
- Gabius, H. J.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Romero, A.; Solis, D.:** *From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code.* Trends in Biochemical Sciences 36 (6), 2011, S. 298-313.
- Gabius, H. J.; Siebert, H. C.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Rudiger, H.:** *Chemical biology of the sugar code.* ChemBioChem 5 (6), 2004, S. 740-764.
- Gajanna, A.; Nair, K. P. C.:** *Alkaline phosphatase activity of neutrophils of domestic animals.* Indian Journal of Experimental Biology 6 (2), 1968, S. 131-132.
- Gattinoni, L.; Samaja, M.:** *Acid-base equilibrium in the blood of sheep.* Experientia 35 (10), 1979, S. 1347-1348.
- Georgatos, S. D.; Marchesi, V. T.:** *The binding of vimentin to human erythrocyte membranes: a model system for the study of intermediate filament-membrane interactions.* Journal of Cell Biology 100 (6), 1985, S. 1955-1961.
- Gleich, G. J.; Adolphson, C. R.; Leiferman, K. M.:** *The biology of the eosinophilic leukocyte.* Annual Review of Medicine 44, 1993, S. 85-101.
- Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N.:** *What should be called a lectin?* Nature 285, 1980, S. 66.
- Goldstein, I. J.; Poretz, R. D.:** *Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins.* In: Liener, I. E.; Sharon, N.; Goldstein, I. J. (Hrsg.): *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine.* Elsevier Academic Press, Orlando, 1986.
- Gov, N. S.:** *Active elastic network: cytoskeleton of the red blood cell.* Physical Review E. Statistical, Nonlinear And Soft Matter Physics 75 (1 Pt 1), 2007, S. 0119211-0119216.

Greenwood, B.: *Haematology of the sheep and goat.* In: Archer, R. K.; Jeffcott, L. B. (Hrsg.): Comparative clinical haematology. Blackwell, Oxford, 1977.

Gresele, P.; Falcinelli, E.: *Beta 1-tubulin in human platelets: not simply a structural cell frame.* Blood 106 (7), 2005, S. 2229-2230.

Habermann, F. A.; Andre, S.; Kaltner, H.; Kuebler, D.; Sinowitz, F.; Gabius, H.-J.: *Galectins as tools for glycan mapping in histology: comparison of their binding profiles to the bovine zona pellucida by confocal laser scanning microscopy.* Histochemistry and Cell Biology 135 (6), 2011, S. 539-552.

Hamaguchi, H.; Cleve, H.: *Solubilization and comparative analysis of mammalian erythrocyte membrane glycoproteins.* Biochemical and Biophysical Research Communications 47 (2), 1972, S. 459-464.

Hartwig, J. H.: *The platelet cytoskeleton.* In: Michelson, A. D. (Hrsg.): Platelets. Elsevier Academic Press, Burlington, 2007.

Hawkey, C. M.; Dennet, T. B.: *Farbatlas der Hämatologie: Säugetiere, Vögel und Reptilien.* Schlütersche Verlag, Hannover, 1990.

Healy, P. J.: *Lysosomal hydrolase activity in leukocytes from cattle, sheep, goats, horses and pigs.* Research in Veterinary Science 33 (3), 1982, S. 275-279.

Hees, H.; Tschudi, P.: *Blut und Knochenmark.* In: Mosimann, W.; Kohler, T. (Hrsg.): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Paul Parey Verlag, Berlin, 1990.

Hein, W. R.; Mackay, C. R.: *Prominence of gamma-delta T-cells in the ruminant immune-system.* Immunology Today 12 (1), 1991, S. 30-34.

Hermansky, F.; Lodrova, V.; Possnerova, V.: *Zytochemische Untersuchungen an Leukozyten bei einigen Laboratoriums- und Haustieren.* Folia Haematologica 93 (3), 1970, S. 249-258.

Hopkins, J.; Ross, A.; Dutia, B. M.: *Summary of workshop findings of leukocyte antigens in sheep.* Veterinary Immunology and Immunopathology 39 (1-3), 1993, S. 49-59.

Hudson, B. G.; Wegener, L. J.; Wingate, J. M.; Carraway, K. L.: *Chemical studies of erythrocyte membrane glycoproteins from several species.* Comparative Biochemistry and Physiology B 51 (1), 1975, S. 127-135.

Jain, N. C.: *Alkaline phosphatase activity in leukocytes of some animal species.* Acta Haematologica 39 (1), 1968, S. 51-59.

Jain, N. C.: *A comparative cytochemical study of leukocytes of some animal species.* Folia Haematologica 94 (1), 1970, S. 49-63.

Jain, N. C.: *Essentials of veterinary hematology.* Lea & Febinger, Philadelphia, 1993.

Jain, N. C.: *Peroxidase activity in leukocytes of some animal species.* Folia Haematologica 88 (4), 1967, S. 297-304.

Jog, N. R.; Rane, M. J.; Lominadze, G.; Luerman, G. C.; Ward, R. A.; McLeish, K. R.: *The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets.* American Journal of Physiology - Cell Physiology 292 (5), 2007, S. C1690-C1700.

- Johnson, E. H.; Al-Habsi, K.; Al-Busaidy, R.:** Comparative chemiluminescence of neonatal and adult ovine polymorphonuclear leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134 (3-4), 2010 S. 265-268.
- Jöns, T.:** Zur Bedeutung von Zytoskelett-Membran-Verbindungen für die gerichtete HCl-Sekretion von Parietalzellen. *Habilitation*, Berlin, 2001.
- Khan, F.; Khan, R. H.; Sherwani, A.; Mahmood, S.; Azfer, M. A.:** Lectins as markers for blood grouping. *Medical Science Monitor* 8 (12), 2002, S. RA293-300.
- Khismatullin, D. B.:** The cytoskeleton and deformability of white blood cells. In: Ley, K. (Hrsg.): *Leukocyte adhesion* 64. Elsevier Academic Press, 2009, S. 47-111.
- Kocourek, J.; Horejsi, V.:** Defining a lectin. *Nature* 290, 1981, S. 188.
- Kolb, G. M. H.:** *Vergleichende Histologie: Cytologie und Mirkoanatomie der Tiere*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 1991.
- Kraft, W.; Dürr, U. M.; Fürll, M.; Bostedt, H.; Heinritzi, K.:** *Hämatologie*. In: Kraft, W.; Dürr, U. (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 2005.
- Kramer, J. W.:** Normal hematology of cattle, sheep and goats. In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): *Schalm's veterinary hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Kusui, K.; Takasaki, S.:** Structural study of N-linked sugar chains of sheep erythrocyte membrane glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* 15 (1), 1998, S. 3-10.
- Lanillo, M.; Cabezas, J. A.:** Isolation, characterisation and chemical composition of the membrane of sheep platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* 649 (2), 1981, S. 229-238.
- Lazarides, E.:** Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283 (5744), 1980, S. 249-256.
- Leca, G.; Boumsell, L.; Fabbi, M.; Reinherz, E. L.; Kanellopoulos, J. M.:** The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* (PHA) binds to human T lymphocyte antigen receptor (Ti) and sheep erythrocyte receptor (CD2). *Federation Proceedings* 44 (3), 1985, S. 563-563.
- Lee, M. C.; Turcinov, D.; Damjanov, I.:** Lectins as markers for eosinophilic leukocytes. *Histochemistry* 86 (3), 1987, S. 269-273.
- Lehto, V. P.; Virtanen, I.; Kurki, P.:** Intermediate filaments anchor the nuclei in nuclear monolayers of cultured human fibroblasts. *Nature* 272, 1978, S. 175-177.
- Leven, R. M.:** Megakaryocytes. In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): *Schalm's veterinary hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Li, X. L.; Bennett, V.:** Identification of the spectrin subunit and domains required for formation of spectrin/adducin/actin complexes. *Journal of Biological Chemistry* 271 (26), 1996, S. 15695-15702.
- Liebich, H.-G.:** *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 2004.

Lindhorst, T. K.: *Wenn Zucker-Attrappen Bakterien zum Narren halten*. Spektrum der Wissenschaft, März 2000, S. 16-21.

Lis, H.; Sharon, N.: *Lectins as molecules and as tools*. Annual Review of Biochemistry 55, 1986, S. 35-67.

Lohr, M.; Kaltner, H.; Schwartz-Albiez, R.; Sinowitz, F.; Gabius, H. J.: *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*. Anatomia Histologia Embryologia 39 (6), 2010, S. 481-493.

Lojda, Z.; Gossrau, R.; Schiebler, T. H.: *Enzyme histochemistry: a laboratory manual*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 1979.

Lorbacher, P.; Yam, L. T.; Mitus, W. J.: *Cytochemical demonstration of beta-glucuronidase activity in blood and bone marrow cells*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 15 (11), 1967, S. 680-687.

Lösch, U.; Cihak, J.; Erhard, M. H.; Kaspers, B.: *Blut und Abwehr*. In: Engelhardt, W.; Breves, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart, 2000.

Machin, G. A.; Halper, J. P.; Knowles, D. M.: *Cytochemically demonstrable beta-glucuronidase activity in normal and neoplastic human lymphoid cells*. Blood 56 (6), 1980, S. 1111-1119.

Mackay, C.: *Sheep leukocyte molecules: a review of their distribution, structure and possible function*. Veterinary Immunology and Immunopathology 19 (1), 1988, S. 1-20.

Marai, I. F. M.; Gebriel, G. M.; Aboufandoud, E. I.: *Relationships between blood groups and some wool characteristics in egyptian coarse-wool fat-tailed sheep*. Animal Production 55, 1992, S. 123-127.

Marone, G.; Casolaro, V.; Patella, V.; Florio, G.; Triggiani, M.: *Molecular and cellular biology of mast cells and basophils*. International Archives of Allergy and Immunology. 114 (3), 1997, S. 207-217.

Marshall, T.; Shult, P.; Busse, W. W.: *Release of lysosomal enzyme beta-glucuronidase from isolated human eosinophils*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 82 (4), 1988, S. 550-555.

McManus, C.; Paludo, G. R.; Louvandini, H.; Gugel, R.; Sasaki, L. C.; Paiva, S. R.: *Heat tolerance in brazilian sheep: physiological and blood parameters*. Tropical Animal Health Production 41 (1), 2009, S. 95-101.

Miller, W. J.: *Blood groups - why do they exist?* Bioscience 26 (9), 1976, S. 557-562.

Moll, K. J.: *Anatomie*. Elsevier Urban & Fischer Verlag, München, 2006.

Monsigny, M.; Roche, A. C.; Sene, C.; Magetdana, R.; Delmotte, F.: *Sugar-lectin interactions: how does wheat germ agglutinin bind sialoglycoconjugates*. European Journal of Biochemistry 104 (1), 1980, S. 147-153.

- Moraga, F.; Monge, C.; Riquelme, R.; Llanos, A. J.:** *Fetal and maternal blood oxygen affinity: a comparative study in llamas and sheep.* Comparative Biochemistry and Physiology A 115 (2), 1996, S. 111-115.
- Murdock, L. L.; Huesing, J. E.; Nielsen, S. S.; Pratt, R. C.; Shade, R. E.:** *Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil.* Phytochemistry 29 (1), 1990, S. 85-89.
- Nachmias, V. T.:** *Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading.* Journal of Cell Biology 86 (3), 1980, S. 795-802.
- Naessens, J.:** *Surface Ig on B lymphocytes from cattle and sheep.* International Immunology 9 (3), 1997, S. 349-354.
- Newman, R. A.; Uhlenbrück, G. G.:** *Investigation into the occurrence and structure of lectin receptors on human and bovine erythrocyte, milk-fat globule and lymphocyte plasma membrane glycoproteins.* European Journal of Biochemistry 76 (1), 1977, S. 149-155.
- Nguyen, T. C.:** *Evaluation of the linkage between the R-O-i and C blood group systems in sheep.* Animal Blood Groups and Biochemical Genetics 16 (1), 1985, S. 13-17.
- Nguyen, T. C.:** *Les groupes sanguins des ovins I. Relations entre les groupes sanguins des ovins et des bovins.* Annales de génétique et de sélection animale 4 (3), 1972, S. 363-374.
- Nguyen, T. C.; Ruffet, G.:** *Les groupes sanguins des ovins II. Facteurs antigéniques supplémentaires dans les systèmes A, B, C et M; estimation des fréquences « alléliques » aux systèmes A, B, C, D, M et R dans les races françaises: berrichon-du-cher, ile-de-france et texel.* Annales de génétique et de sélection animale 7 (2) 1975, S. 145-157.
- Norris, J. H.; Cham-Berlin, W. E.:** *A chemical and histological investigation in Victoria (Australia) of the blood of cattle and sheep.* Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 6 (4), 1929, S. 285-299.
- Nurden, A. T.:** *Platelet membrane glycoproteins: a look back into the past and a view to the future.* Thrombosis and Haemostasis 98 (1), 2007, S. 49-54.
- Olivier, M.; Berthon, P.; Chastang, J.; Cordier, G.; Lantier, F.:** *Establishment and characterisation of ovine blood monocyte-derived cell lines.* Veterinary Immunology and Immunopathology 82 (3-4), 2001, S. 139-151.
- Osbaldiston, G. W.; Sullivan, R. J.:** *Cytochemical determination of esterases in peripheral blood leukocytes.* American Journal of Veterinary Research 39 (4), 1978, S. 683-685.
- Osborn, M.; Born, T.; Koitsch, H. J.; Weber, K.:** *Stereo immunofluorescence microscopy: I. Three-dimensional arrangement of microfilaments, microtubules and tonofilaments.* Cell 14 (3), 1978, S. 477-488.
- Oshima, R. G.:** *Intermediate filaments: a historical perspective.* Experimental Cell Research 313 (10), 2007, S. 1981-1994.
- Outeridge, P. M.:** *Veterinary immunology.* Elsevier Academic Press, London, 1985.
- Parwaresch, M. R.; Lennert, K.:** *Zur Differenzierung der Blutbasophilen und Gewebsmastzellen nach dem Reifegrad ihrer Granula - eine neue Modifikation der Toluidinblau-pH-Reihe.* Histochemistry 19 (3), 1969, S. 262-271.

Pearson, T. W.; Roelants, G. E.; Lundin, L. B.; Mayorwithey, K. S.: *Bovine lymphoid system-binding and stimulation of peripheral blood lymphocytes by lectins.* Journal of Immunological Methods 26 (3), 1979, S. 271-282.

Penedo, M. C. T.: *Red blood cell antigens and blood groups in the cow, pig, sheep, goat and llama.* In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Pillai, M. R.; Lefevre, E. A.; Carr, B. V.; Charleston, B.; O'Grady, P.: *Workshop cluster I, a gamma delta T cell specific receptor is phosphorylated and down regulated by activation induced Src family kinase activity.* Molecular Immunology 44 (7), 2007, S. 1691-1703.

Pruss, R. M.; Mirsky, R.; Raff, M. C.; Thorpe, R.; Dowding, A. J.; Anderton, B. H.: *All classes of intermediate filaments share a common antigenetic determinant defined by a monoclonal antibody.* Cell 27 (3), 1981, S. 419-428.

Pschyrembel: *Klinisches Wörterbuch.* de Gruyter Verlag, Berlin, 2002.

Raskin, R. E.; Valenciano, A.: *Cytochemistry of normal leukocytes.* In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Rasmussen, B. A.: *Blood groups in sheep.* Annals of the New York Academy of Sciences 97 (1), 1962, S. 306-319.

Rausch, P. G.; Moore, T. G.: *Granule enzymes of polymorphnuclear neutrophils - a phylogenetic comparison.* Blood 46 (6), 1975, S. 913-919.

Reagan, W. J.; Iriizarry Rovira, A. R.; DeNicola, D. B.: *Veterinary hematology: atlas of common domestic and non-domestic species.* Blackwell, Iowa, 2008.

Reed, G. L.: *Platelet secretion.* In: Michelson, A. D. (Hrsg.): Platelets. Elsevier Academic Press, Burlington, 2007.

Reisner, Y.; Biniaminov, M.; Rosenthal, E.; Sharon, N.; Ramot, B.: *Interaction of peanut agglutinin with normal human lymphocytes and with leukemic-cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76 (1), 1979, S. 447-451.

Rendel, J.; Freedland, R. A.; Moller, F.; Aalund, O.: *The relationship between the alkaline phosphatase polymorphism and blood group o in sheep.* Genetics 50 (5), 1964, S. 973-986.

Rendel, J.; Sorensen, A. N.; Irwin, M. R.: *Evidence for epistatic action of genes for antigenetic substances in sheep.* Genetics 39 (3), 1954, S. 396-408.

Reynolds, E. S.: *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.* Journal of Cell Biology 17 (1), 1963, S. 208-212.

Richelme, F.; Benoliel, A. M.; Bongrand, P.: *The leukocyte actin cytoskeleton.* Bulletin De L'Institut Pasteur 94 (4), 1996, S. 257-284.

Ristau, E.; Klima, F.; Beier, D.; Wittmann, W.: *Saure Alpha-Naphthyl-Azetat-Esterase in Blutlymphozyten von Rindern und Schafen - ein Marker für T-Zellen.* Archiv für experimentelle Veterinärmedizin 39 (5), 1985, S. 766-769.

Romeis, B.: *Mikroskopische Technik.* Hrsg.: Mulisch, M.; Welsch, U., Spektrum Akademischer

Verlag, Heidelberg, 2010.

Romeis, B.: *Mikroskopische Technik.* Hrsg.: Böck, P., Urban & Schwarzenberg Verlag, München, 1989.

Roth, J.: *Lectins for histochemical demonstration of glycans.* Histochemistry and Cell Biology 136 (2), 2011, S. 117-130.

Rothwell, T. L. W.; Horsburgh, B. A.; France, M. P.: *Basophil leukocytes in responses to parasitic infection and some other stimuli in sheep.* Research in Veterinary Science 56 (3), 1994, S. 319-324.

Rüdiger, H.: *Lektine: Vorkommen, Anwendung und Funktion.* Chemie in unserer Zeit 15 (5), 1981, S. 155-162.

Rüdiger, H.: *Phythemagglutinins.* Planta Medica 46 (1), 1982, S. 3-9.

Rüdiger, H.: *Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins.* Acta Anatomica 161 (1-4), 1998, S. 130-152.

Rüdiger, H.; Gabius, H. J.: *Plant lectins.* In: Gabius, H. J. (Hrsg.): *The sugar code - fundamentals of glycosciences.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2009.

Rüdiger, H.; Gabius, H. J.: *Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications.* Glycoconjugate Journal 18 (8), 2001, S. 589-613.

Rudolph, R.; Schnabl, W.: *Feinstruktur von Blutleukozyten sowie elektronenmikroskopischer Nachweis von Peroxidase und saurer Phosphatase in Granulozyten des Schafes.* Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A 28 (4), 1981, S. 282-295.

Rüsse, I.: *Herz- und Kreislaufsystem.* In: Rüsse, I.; Sinowatz, F. (Hrsg.): *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* Paul Parey Verlag, Berlin, 2008.

Ryder, M. I.; Niederman, R.; Taggart, E. J.: *The cytoskeleton of human polymorphonuclear leukocytes: phagocytosis and degranulation.* Anatomical Record 203 (3), 1982, S. 317-327.

Sanchez-Madrid, F.; del Pozo, M. A.: *Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions.* Embo Journal 18 (3), 1999, S. 501-511.

Sansome, G. M.; Young, A. R.; Meeusen, E. N.; Bischof, R. J.: *Production of monoclonal antibodies reactive with ovine eosinophils.* BMC Immunology 8 (23), 2007, S. 23.

Sauermost, R.: *Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie.* Herder Verlag, Freiburg, 1991.

Schmid, D. O.: *Der Phaseolus vulgaris Rezeptor, ein weiteres erbliches, quantitatives Blutgruppenmerkmal beim Schaf.* Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B 20 (3), 1973, S. 173-176.

Schmid, D. O.: *Über Blutgruppen bei Schafen.* Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B 18 (6), 1971, S. 430-440.

Schmid, D. O.; Buschmann, H. G.: *Blutgruppen bei Tieren.* Enke Verlag, Stuttgart, 1985.

- Schmid, D. O.; Cwik, S.:** *Concanavalin A receptor on blood cells of sheep, goat and pig.* Journal of Immunogenetics 1 (6), 1974, S. 429-431.
- Schmid, D. O.; Cwik, S.:** *R-receptors on lymphocytes of sheep.* Animal Blood Groups and Biochemical Genetics 6 (1), 1975, S. 61-62.
- Schnabl, W.:** *Untersuchung zur Charakterisierung der Blutleukozyten klinisch gesunder Schafe.* Dissertation, Gießen, 1976.
- Schwer, H. D.; Lecine, P.; Tiwari, S.; Italiano, J. E.; Hartwig, J. H.; Shviddasani, R. A.:** *A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets.* Current Biology 11 (8), 2001, S. 579-586.
- Scott, M. A.; Stockham, S. L.:** *Basophils and mast cells.* In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Sharon, N.; Lis, H.:** *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.* Glycobiology 14 (11), 2004, S. 53R-62R.
- Shaw, R.; Pfeffer, A.; Bischof, R.:** *Ovine IgE and its role in immunological protection and disease.* Veterinary Immunology and Immunopathology 132 (1), 2009, S. 31-40.
- Shen, B. W.; Josephs, R.; Steck, T. L.:** *Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane.* Journal of Cell Biology 102 (3), 1986, S. 997-1006.
- Silbernagl, S.; Despopoulos, A.:** *Taschenatlas der Physiologie.* Thieme Verlag, Stuttgart, 2001.
- Sinard, J. H.; Stewart, G. W.; Argent, A. C.; Morrow, J. S.:** *Stomatin binding to adducin: a novel link between transmembrane ion transport and the cytoskeleton.* Molecular Biology of the Cell 5 (SUPPL.), 1994, S. 421a.
- Sinowatz, F.:** *Blut, Knochenmark und lymphatisches System.* In: Hees, H.; Sinowatz, F. (Hrsg.): Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 2006a.
- Sinowatz, F.:** *Histologische Technik und Mikroskopie.* In: Hees, H.; Sinowatz, F. (Hrsg.): Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 2006b.
- Slifkin, M.; Doyle, R. J.:** *Lectins and their application to clinical microbiology.* Clinical Microbiology Reviews 3 (3), 1990, S. 197-218.
- Smith, G. S.:** *Neutrophils.* In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Stansfield, W. D.; Blackwell, R. L.; Bradford, G. E.; Stormont, C.:** *Blood groups and their associations with production and reproduction in sheep.* Genetics 50 (6), 1964, S. 1357-1367.
- Steffens, W.:** *Ultrastructural features of leukocytes.* In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Stobbe, H.:** *Hämatologischer Atlas.* Akademie Verlag, Berlin, 1970.

- Stormont, C.:** *An example of a recessive blood group in sheep.* Genetics 36 (5), 1951, S. 577-578.
- Stormont, C.; Weir, W. C.; Lane, L. L.:** *Erythrocyte mosaicism in a pair of sheep twins.* Science 118 (3075), 1953, S. 695-696.
- Stormont, C. J.:** *Blood groups in animals.* Journal of the American Veterinary Medical Association 181 (10), 1982, S. 1120-1124.
- Strukov, A. I.; Paukov, V. S.; Kaufman, O. Y.:** *Leukocyte cellular skeleton under normal and pathological conditions.* Arkhiv Patologii 45 (6), 1983, S. 81-87.
- Syrt, B.:** *Species variation in neutrophil biochemistry and function.* Journal of Leukocyte Biology 46 (1), 1989, S. 63-74.
- Sumner, J. B.; Howell, S. F.:** *The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A.* Journal of Bacteriology 32 (2), 1936, S. 227-237.
- Sumoza-Toledo, A.; Santos-Argumedo, L.:** *The spreading of B lymphocytes induced by CD44 crosslinking requires actin, tubulin, and vimentin rearrangements.* Journal of Leukocyte Biology 75 (2), 2004, S. 233-239.
- Suzuki, T.; Agar, N. S.:** *Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase in the red blood cells of GSH-normal and GSH-deficient sheep.* Experientia 39 (1), 1983, S. 103-104.
- Tateno, H.; Kuno, A.; Hirabayashi, J.:** *How to determine specificity: from lectin profiling to glycan mapping arrays.* In: Gabius, H. J. (Hrsg.): *The sugar code - fundamentals of glycosciences.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2009.
- Taylor, J. A.:** *Leukocyte responses in ruminants.* In: Feldmann, B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): *Schalm's veterinary hematology.* Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Thelen, M.; Dewald, B.; Baggolini, M.:** *Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst.* Physiological Reviews 73 (4), 1993, S. 797-821.
- Thrall, M. A.; Weiser, G.:** *Introduction to leukocytes and the leukogramm.* In: Troy, D. B. (Hrsg.): *Veterinary hematology and clinical chemistry.* Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- Tizard, I. R.:** *Veterinary immunology: an introduction.* Saunders Company, Philadelphia, 2000.
- Tucker, E. M.:** *Genetic variation in the sheep red blood cell.* Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 46 (3), 1971, S. 341-386.
- Tucker, E. M.; Evans, N. R. S.; Kilgour, L.:** *Close linkage between the C blood group locus and the locus controlling amino acid transport in sheep erythrocytes.* Animal Blood Groups and Biochemical Genetics 11 (2), 1980, S. 119-125.
- Tung, J. P.; Fraser, J. F.; Wood, P.; Fung, Y. L.:** *Respiratory burst function of ovine neutrophils.* BMC Immunology 10 (1), 2009.
- Ullrey, D. E.; Miller, E. R.; Long, C. H.; Vincent, B. H.:** *Sheep hematology from birth to maturity 1. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration.* Journal of Animal Science 24 (1), 1965a, S. 135-140.

- Ullrey, D. E.; Miller, E. R.; Long, C. H.; Vincent, B. H.:** *Sheep hematolgy from birth to maturity 2. Leukocyte concentration and differential distribution.* Journal of Animal Science 24 (1), 1965b, S. 141-144.
- Van Damme, E. J. M.; Lannoo, N.; Peumans, W. J.:** *Plant lectins.* In: Kader, J.-C.; Delseny, M. (Hrsg.): *Advances in botanical research*, Vol 48. Elsevier Academic Press Ltd, London, 2008.
- Varki, A.:** *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.* Glycobiology 3 (2), 1993, S. 97-130.
- Vicente-Manzanares, M.; Sanchez-Madrid, F.:** *Role of the cytoskeleton during leukocyte responses.* Nature Reviews Immunology 4 (2), 2004, S. 110-122.
- Vicente-Manzanares, M.; Sancho, D.; Yanez-Mo, M.; Sanchez-Madrid, F.:** *The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions.* In: Jeon, K. W. (Hrsg.): *International review of cytology - a survey of cell biology*, Vol 216. Elsevier Academic Press, San Diego, 2002.
- Walker, R.:** The use of lectins in histopathology. Histopathology 9 (10), 1985, S. 1121-1124.
- Weber, K.; Osborn, M.:** *Microtubules and intermediate filament networks in cells viewed by immunofluorescence microscopy.* Cell Surface Reviews 7, 1981, S. 1-53.
- Welsch, U.; Sobotta, J.:** *Lehrbuch Histologie.* Elsevier Urban & Fischer Verlag, München, 2003.
- Whist, S. K.; Storset, A. K.; Larsen, H. J.:** *Functions of neutrophils in sheep experimentally infected with *Ehrlichia phagocytophila*.* Veterinary Immunology and Immunopathology 86 (3-4), 2002, S. 183-193.
- White, J. G.:** *Platelet structure.* In: Michelson, A. D. (Hrsg.): *Platelets.* Elsevier Academic Press, Burlington, 2007.
- Wislocki, G. B.; Rheingold, J. J.; Dempsey, E. W.:** *The occurrence of the periodic-acid-schiff-reaction in various normal cells of blood and connective tissue.* Blood 4 (5), 1949, S. 562-568.
- Woldehiwet, Z.; Scaife, H.; Hart, C. A.; Edwards, S. W.:** *Purification of ovine neutrophils and eosinophils: *Anaplasma phagocytophilum* affects neutrophil density.* Journal of Comparative Pathology 128 (4), 2003, S. 277-282.
- Wu, A. M.; Lisowska, E.; Duk, M.; Yang, Z.:** *Lectins as tools in glycoconjugate research.* Glycoconjugate Journal 26 (8), 2008, S. 899-913.
- Xu, P.; Crawford, M.; Way, M.; Godovac-Zimmermann, J.; Segal, A. W.; Radulovic, M.:** *Subproteome analysis of the neutrophil cytoskeleton.* Proteomics 9 (7), 2009, S. 2037-2049.
- Yamada, Y.; Sonoda, M.:** *Basophils of ovine peripheral blood in electron microscopy.* Japanese Journal of Veterinary Science 34 (1), 1972a, S. 29-32.
- Yamada, Y.; Sonoda, M.:** *Electron microscopy of agranulocytes in peripheral blood of normal sheep.* Japanese Journal of Veterinary Science 34 (5), 1972b, S. 235-241.
- Yamada, Y.; Sonoda, M.:** *Eosinophils of ovine peripheral blood in electron microscopy.* Japanese Journal of Veterinary Research 18 (3), 1970a, S. 117-123.

Yamada, Y.; Sonoda, M.: *Neutrophils of ovine peripheral blood in electron microscopy*. Japanese Journal of Veterinary Research 18 (2), 1970b, S. 83-89.

Young, K. M.: *Eosinophils*. In: Feldmann B. F.; Zinkl, J. G.; Jain, N. C. (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Zhu-Salzman, K.; Shade, R. E.; Koiwa, H.; Salzman, R. A.; Narasimhan, M.; Bressan, I. A.; Hasegawa, P. M.; Murdock, L. L.: *Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of Griffonia simplicifolia lectin II*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (25), 1998, S. 15123-15128.

Zhu, K. Y.; Huesing, J. E.; Shade, R. E.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M.; Murdock, L. L.: *An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from Griffonia simplicifolia (Leguminosae)*. Plant Physiology 110 (1), 1996, S. 195-202.

XII Anhang

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Fred Sinowatz für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und die äußerst freundliche Beratung und tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Christine Neumüller und Frau Wiebke Scholz für die liebenswürdige Unterstützung bei der Anfertigung der Proben für die Elektronenmikroskopie.

Weiterhin möchte ich Frau Katja Ebach, Herrn Yilmaz Gök, Herrn Dr. Felix Habermann, Frau Monika Settles und Frau Daniela Rodler für die stets freundliche Hilfe bei Problemen aller Art danken. Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie möchte ich mich herzlich bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Katja Voigt, Frau Anja Hanczaruk und Herrn Josef Altmann für die Bereitstellung der Schafe und die allzeit engagierte Hilfestellung bei der Blutentnahme.

Für das Korrekturlesen danke ich von ganzem Herzen meinem Onkel Helmuth Jehle und Herrn Wolfram Menzl.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich weiterhin bei den Doktorandinnen Julia Scholz, Caroline Zauter-Preißinger und Katharina Merten für die gute Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und die tatkräftige Hilfeleistung bei der Blutentnahme.

Ein besonders liebevoller Dank geht an meine Mama, Violanta Riegler, und meinen Papa, Franz Riegler, für die uneingeschränkte Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg, dass sie mir stets helfen, meine Ziele zu verwirklichen und immer für mich da sind.