

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

**ULTRASTRUKTURELLE, IMMUNZYTOCHEMISCHE UND
GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DES BLUTES
VON FOHLEN DER ISLANDPFERDE**

von Desiree Susanna Hoffmann

aus Rosenheim

München 2018

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

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Priv.-Doz. Dr. Daniela Rodler

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Daniela Rodler

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Meinen Eltern Ingrid und Dr. Frank Hoffmann, meinem Bruder Dr. Holger Hoffmann, meinem Partner Johannes Tack und den Menschen, die an mich glauben

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	2
1. Das Blut des Pferdes	3
1.1 Zusammensetzung des Blutes	3
1.2 Besonderheiten des Pferdeblutes	6
1.3 Besonderheiten des Fohlenblutes	10
1.4. Die Blutgruppen der Pferde	12
1.4.1. Die neonatale Isoerythrolyse beim Fohlen	15
2. Die Blutzellen	17
2.1. Bildung der Blutzellen	17
2.2. Faktoren der Blutzellbildung	19
2.3. Morphologie der Blutzellen	21
2.3.2. Thrombozyten	23
2.3.3. Leukozyten	24
2.3.3.1. Neutrophile Granulozyten	25
2.3.3.2. Eosinophile Granulozyten	27
2.3.3.3. Basophile Granulozyten	28
2.3.3.4. Lymphozyten	30
2.3.3.5. Monozyten	31
2.4. Funktion der Blutzellen	32
2.4.1. Erythrozyten	32
2.4.2. Thrombozyten	33
2.4.3. Leukozyten	33
2.4.3.1. Neutrophile Granulozyten	34
2.4.3.2. Eosinophile Granulozyten	35
2.4.3.3. Basophile Granulozyten	36
2.4.3.4. Lymphozyten	36
2.4.3.4.1. B-Lymphozyten	38
2.4.3.4.2. T-Lymphozyten	38
2.4.3.5. Monozyten	40
3. Glykohistochemie	41
3.1. Eigenschaften und Funktionen der Lektine als glykohistochemische Marker	41
3.2. Bisherige glykohistochemische Untersuchungen an Blutzellen des Pferdes	43
4. Immunzytochemie	44

4.1.	Definiton und Anwendung	44
4.2.	Technik	44
4.3.	Immunzytochemische Differenzierung von Lymphozyten	45
III.	Material und Methoden	47
1.	Untersuchungsmaterial	47
2.	Lichtmikroskopie	50
2.1.	Diff Quick Färbung	50
2.2.	Giemsa Färbung (nach Romeis, 1989)	51
2.3.	May Grünwald Färbung (nach Romeis, 1989)	52
2.4.	Panoptische Färbung nach Pappenheim (nach Romeis, 1989)	52
2.5.	Hämalaun Eosin Färbung (HE-Färbung)	53
2.6.	Sirius Red Färbung	53
2.7.	Alcianblau Färbung	54
2.8.	Toluidinblau Färbung	55
2.9.	„Periodic Acid Schiff“-Reaktion (PAS-Färbung)	55
3.	Elektronenmikroskopie	57
4.	Glykohistochemie	58
4.1.	FITC markierte Lektine	58
5.	Immunzytochemie	60
6.	Art der Auswertung	61
IV.	Ergebnisse	63
1.	Blut der untersuchten Pferde	63
2.	Lichtmikroskopische Übersichtsfärbungen	70
2.1.	Erythrozyten	71
2.2.	Thrombozyten	72
2.3.	Neutrophile Granulozyten	72
2.4.	Eosinophile Granulozyten	73
2.5.	Basophile Granulozyten	76
2.6.	Lymphozyten	76
2.7.	Monozyten	77
3.	Elektronenmikroskopie	79
3.1.	Erythrozyten	79
3.2.	Thrombozyten	79
3.3.	Neutrophile Granulozyten	80
3.4.	Eosinophile Granulozyten	82

3.5. Basophile Granulozyten	83
3.6. Lymphozyten	84
3.7. Monozyten	86
4. Glykohistochemie	88
4.1. Bindung von Glukose/Mannose spezifischen Lektinen	88
4.1.1. Bindung von Concanavalia Agglutinin	88
4.1.2. Bindung von Lens culinaris Agglutinin	91
4.1.3. Bindung von Pisum sativum Agglutinin	92
4.2. Bindung von Galaktose spezifischen Lektinen	95
4.2.1. Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin	95
4.2.2. Bindung von Peanut Agglutinin	96
4.2.3. Bindung von Ricinus communis Agglutinin	99
4.3. Bindung von N-Acetylglukosamin spezifischen Lektinen	101
4.3.1. Bindung von Wheat germ Agglutinin	101
4.3.2. Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert	105
4.4. Bindung von N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektinen	107
4.4.1. Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin	107
4.4.2. Bindung von Soybean Agglutinin	110
4.4.3. Bindung von Sophora japonica Agglutinin	111
4.5. Bindung von Fukose spezifischen Lektinen	112
4.5.1. Bindung von Ulex europaeus Agglutinin	112
4.6. Bindung komplexer Kohlenhydratstrukturen spezifischer Lektine	114
4.6.1. Bindung von Phaseolus vulgaris E Agglutinin	114
4.6.2. Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin	116
5. Immunzytochemische Untersuchungen	117
5.1. T-Lymphozyten spezifische monoklonale Antikörper	117
5.2. B-Lymphozyten spezifische monoklonale Antikörper	118
V. Diskussion	125
1. Differentialblutbild	125
2. Lichtmikroskopie	126
3. Elektronenmikroskopie	129
4. Glykohistochemie	130
5. Immunzytochemie	133
VI. Zusammenfassung	135
VII. Summary	137

VIII. Literaturverzeichnis	139
IX. Anhang	155
X. Danksagung	159

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AG	Antigen
APAAP-Komplex	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex
APC	Antigen-presenting-cells
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of differentiation
C-Myb	Myeloblastosis family of transcriptions factors (C-protein)
CpGs	Nukleobasen Cytosin & Guanin als Abschnitt doppelsträngiger DNA
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
ConA	Concanavalia-Agglutinin
CVID	Common variable immunodeficiency disease
C5a bzw. C3b	Complement component 5a bzw 3b (protein of immune system)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
DC	Dendritic cells
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
ECP	Eosinophil cationic protein
EDN	Eosinophil derived neurotoxin
ELA-A	Equine Leucocyte Alloantigen A
EPO	Erythropoetin
EPX	Eosinophil protein X

Abkürzungsverzeichnis

EqCD	Equine Cluster of differentiation
EqMHC	Equine Major histocompatibility complex
E2A	Transcription factor during embryogenesis (muscle or early b-cell differentiation)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Gal/GaINAC	Galactose- β -1,3 N-acetylgalactosamin
HEPF	High endothelial binding factor
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IVIg	Intravenous IgG
mAK	Monoklonaler Antikörper
MBL	Mannose bindendes Lektin
MBP	Major basic protein
MCV	Mean corpuscular volume
MHC	Major histocompatibility complex
MN-Blutgruppen	Antigen M & Antigen N-Blutgruppen
MoDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PAF	Platelet activating factor
PAP-Komplex	Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex
PAX4/EBF1	Paired box protein 4/early B-cell factor 1
PCV	Packed cell volume
PHA	Phaseolus vulgaris Agglutinin

Abkürzungsverzeichnis

PNA	Peanut agglutinin
PSA	Pisum sativum agglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
RAO	Recurrent airway obstruction
RBC	Red blood cell
RCA	Ricinus communis Agglutinin
SBA	Soybean agglutin
SPT	Standard penetration test
TGF- β 1	Transforming growth factor β 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF-A	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A
WGA	Wheat germ agglutinin

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Zusammensetzung des Blutes.....</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2: Graphik der Morphologie der Pferderythrozyten</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 3: Graphik der Morphologie der Pferdethrombozyten</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 4: Graphik der Morphologie des neutrophilen Pferdegranulozyten.....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 5: Graphik der Morphologie des eosinophilen Pferdegranulozyten</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 6: Graphik der Morphologie des basophilen Pferdegranulozyten</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 7: Graphik der Morphologie der Pferdelymphozyten</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 8: Graphik der Morphologie des Pferdemonozyten.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 9 : Übersicht der Differentialblutbilder Islandpferde Gruppe 1</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 10: Übersicht der Differentialblutbilder Islandpferde Gruppe 2</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 11: Übersicht Differentialblutbilder Islandpferde Gruppe 3</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 12: Gruppenvergleich neutrophile segmentkernige Granulozyten.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 13: Gruppenvergleich Lymphozyten</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 14: Gruppenvergleich eosinophile Granulozyten.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 15: Gruppenvergleich basophile Granulozyten.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 16: Gruppenvergleich Monozyten</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 17: Zellübersicht Gruppe 1 Stute "Idunn vom Törring"</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 18: Zellübersicht Gruppe 1 Stute "Hjördis vom Burghauserhof"</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 19: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 1 Stute "Hjördis vom Burghauserhof".....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 20: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 2 Wallach NN (M:Oda-Fló/V:ïðir).....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 21: Zellübersicht Gruppe 1 Hengst NN (M:Draumsun/V:Hrólfur).....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 22: Basophiler Granulozyt Gruppe 3 Stute "Hekla vom Burghauserhof"</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 23: Zellübersicht Gruppe 1 Hengst NN (M:Skettla/V:Hrólfur)</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 24: Zellübersicht Gruppe 1 Stute "Hjördis vom Burghauserhof"</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 25: Monozyt Gruppe 1 Hengst NN (M:Draumsun/V:Hrólfur).....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 26: Erythrozyten & Thrombozyten Gruppe 2 Stute „Sól vom Burghauserhof“</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 27: Segmentierter neutrophiler Granulozyt Gruppe 3 Stute „Fiorina vom Burghauserhof“</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 28: Kleiner stabkerniger neutrophiler Granulozyt Gruppe 3 Wallach „Thor“</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 29: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 2 Hengst „Leiknir vom Törring“</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 30: Basophiler Granulozyt Gruppe 2 Stute „Sól vom Burghauserhof“</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 31: Kleiner Lymphozyt Gruppe 1 Stute "Idunn vom Törring"</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 32: Großer Lymphozyt Gruppe 2 Hengst „Leiknir vom Törring“</i>	<i>86</i>

Abbildung 33: Monozyt Gruppe 1 Hengst „Hrimnir vom Burghauserhof“	87
Abbildung 34: Bindungsintensität von ConA an die spezifischen Blutzellen	88
Abbildung 35: Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt & Erythrozyten Gruppe 1 Hengst NN (M:Skettla/V:Hrólfur)	89
Abbildung 36: Lymphozyt & Erythrozyten Gruppe 3 Stute "Hara di Napoli"	90
Abbildung 37: Basophiler Granulozyt & Erythrozyten Gruppe 1 Stute „Hjördis vom Burghauserhof“	91
Abbildung 38: Bindungsintensität von PSA an die spezifischen Blutzellen	92
Abbildung 39: Eosinophiler Granulozyt & Erythrozyten Gruppe 1 Stute NN (M:Oda- Fló/V:Hrólfur)	93
Abbildung 40: Basophiler & Neutrophiler Granulozyt Gruppe 1 Hengst NN (M:Draumsun/V: Hrólfur)	94
Abbildung 41: Lymphozyt & Neutrophiler Granulozyt Gruppe 2 Hengst "Gáski vom Törring".	95
Abbildung 42: Bindungsintensität von PNA an die spezifischen Blutzellen.....	96
Abbildung 43: Großer und kleiner Lymphozyt Gruppe 1 Hengst NN (M: Draumsun/V: Hrólfur)	97
Abbildung 44: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 2 Wallach NN (M: Hroyrn/ V: Íðir)	98
Abbildung 45: Bindungsintensität von RCA an die spezifischen Blutzellen.....	99
Abbildung 46: Neutrophiler Granulozyt Gruppe 3 Stute "Liv vom Burghauserhof"	100
Abbildung 47: Bindungsintensität von WGA an die spezifischen Blutzellen	101
Abbildung 48: Kleine Lymphozyten Gruppe 1 Hengst "Hrimnir vom Burghauserhof"	102
Abbildung 49: Neutrophiler Granulozyt Gruppe 1 Hengst NN (M:Skettla/V:Hrólfur).....	103
Abbildung 50: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 3 Wallach "Thor"	104
Abbildung 51: Bindungsintensität von WGAs an die spezifischen Blutzellen.....	105
Abbildung 52: Kleiner Lymphozyt und neutrophiler Granulozyt Gruppe 2 Hengst "Kjammi vom Törring"	106
Abbildung 53: Bindungsintensität von DBA an die spezifischen Blutzellen.....	107
Abbildung 54: Diverse nicht angefärbte Blutzellen und eosinophiler Granulozyt Gruppe 1 Stute "Hjördis vom Burghauserhof"	108
Abbildung 55: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 1 Hengst NN (M:Skettla/V:Hrólfur)	109
Abbildung 56: Bindungsintensität von SBA an die spezifischen Blutzellen	110
Abbildung 57: Neutrophile Granulozyten Gruppe 3 Stute "Gjöf von der Hainbuche"	111
Abbildung 58: Bindungsintensität von UEA an die spezifischen Blutzellen.....	112
Abbildung 59: Erythrozyten und Thrombozyt Gruppe 2 Hengst „Gáski vom Törring“	113

I. EINLEITUNG

Pferde sind seit Jahrtausenden Begleiter des Menschen gewesen: Sie trugen ihn von Ort zu Ort, halfen ihm bei der Arbeit vor dem Pflug oder auch dabei, so manche Schlacht zu bestreiten. Sie waren alltäglich und allgegenwärtig: Deshalb hatten und haben sie bei den verschiedensten Völkern einen hohen Stellenwert.

Auch in Island nimmt das Pferd eine ganz besondere Rolle der Landesgeschichte ein. Im 9. Jahrhundert mussten norwegische Bauern ihre Höfe verlassen und machten sich mit Drachenbooten auf die Suche nach neuem Land. Unter Ingolfur Arnason landete eine kleine Gruppe mit Vieh, Hausrat und Reitpferden auf Island. Die Pferde waren nicht nur Abkommen des Germanenponys des europäischen Kontinents, sondern auch des Keltenponys in Nordschottland. Mit den Pferden kamen auch die alten Überlieferungen nach Island: Das Pferd galt als heiliges Tier. Man trug Talismane mit seinem Abbild. Das Pferd war Fruchtbarkeitssymbol und Sinnbild der Dichtkunst (Schwörer-Haag, 1998).

Sleipnir, das Wunder-Reittier von Odin trabe auf acht Beinen über die Meere und den Himmelsbogen. Loki, Odins Blutsbruder und bekannt für seine ungewöhnlichen Auftritte, soll sich in eine Stute verwandelt haben, um den mit übernatürlichen Fähigkeiten begabten Hengst Svadilfari zu verführen. Das Resultat des Seitensprungs auf vier Hufen war das Pferd Sleipnir - wie gesagt, ungemein geländegängig, auch zu Wasser wie in der Luft (Straaß und Lieckfeld, 2004).

Die Zuchtselektion spielt beim Rasseideal des Islandpferdes eine große Rolle: Voraussetzung dafür ist, dass sämtliche Vorfahren lückenlos auf in Island geborene Vorfahren zurückverfolgt werden können. Da Islandpferde zu den drei Grundgangarten Schritt, Trab und Galopp auch die Spezialgangarten Tölt und Rennpass beherrschen können, werden sie zu den Gangpferderassen gezählt.

Auch bei den Fohlenbeurteilungen, bei denen im Herbst jedes Jahres von speziell ausgebildeten Materialrichtern der in dieser Saison geborene Nachwuchs benotet und dementsprechend eine orientierende Wertung gegeben wird, werden Gebäude-, Wesens- und Gangmerkmale in den Blickpunkt gerückt. Keine Zuchtveranstaltung kann ohne die Anwesenheit eines Tierarztes abgehalten werden. Dies hat auch seine berechtigten Gründe: Fitness und Vitalität der Tiere müssen unter fachkundigen Augen teilweise in Minutenschnelle richtig eingeschätzt werden.

Ein Blutbild anzufertigen gehört zwar nicht zum Standard der

Teilnahmevoraussetzungen, gibt jedoch wichtige Hinweise über den Gesundheitszustand des Pferdes. Einflüsse von Giftstoffen, Virusinfektionen oder durch Blutarmut können durch Interpretation der Werte des Blutbildes festgestellt werden. Daher ist es von großer Bedeutung, die Zusammensetzung der Blutzellen des Fohlenblutes zu kennen, um Interpretationsansätze weiter verbessern zu können.

Das Islandpferd gehört zu den Robustpferderassen. Diese Tatsache suggeriert erhöhte Widerstandskraft gegenüber Witterungseinflüssen und Stressfaktoren (Schwörer-Haag 1998). Das Blut trägt mit einem Anteil von 6-8% des Gesamtkörpervolumens vielseitige Aufgaben: Es vermittelt unter anderem den Transport von Atemgasen, Nährstoffen, Stoffwechselprodukten, Hormonen, Vitaminen, Mineralstoffen, Wasser usw.. Zudem dient es der Regulation des Ionenhaushaltes und damit der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts im Körper. An den Abwehrprozessen des Körpers ist es durch Abwehrstoffe und durch Blutzellen, welche auf die verschiedenen Aufgaben spezialisiert sind, entscheidend beteiligt. Seine Fähigkeit, bei Verletzungen der Gefäße zu gerinnen dient als Schutz gegen Verblutung. Weiterführend spielt Blut bei der Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur eine wichtige Rolle (Liebich, 2010).

Vielleicht war Sleipnir ein Ausnahmepferd, vielleicht hatte sein Blut aber auch bemerkenswerte morphologische Merkmale, welche er seiner gesamten Nachkommenschaft mit auf den Weg gegeben hat. Dies wird man allerdings niemals erfahren.

Weg vom Mythos, hin zur wissenschaftlichen Forschung: Ziel meiner Arbeit war es, die zellulären Bestandteile von Fohlen der Islandpferde erstmals mit modernen morphologischen Methoden zu untersuchen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Blut des Pferdes

1.1 Zusammensetzung des Blutes

Blut als der wichtigste Funktionsträger des Kreislaufsystems und des gesamten Organismus ist weitgehend gleichmäßig verteilt. Es hält das biologische Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Teilen des Körpers aufrecht, dessen Konstanz lebensnotwendige Bedingung für die Stabilität des inneren Milieus ist (Welsch, 2006).

Aufgrund der vielfältigen Funktionen gestaltet sich die Zusammensetzung des Blutes komplex. Blut besteht aus flüssigen und zellulären Bestandteilen. Die Blutflüssigkeit, das Blutplasma, erfüllt dabei grundlegende Aufgaben. Prinzipiell können drei Hauptfunktionen des Blutes unterschieden werden: Blut übernimmt eine Transport- oder Vehikelfunktion z.B. für Sauerstoff und Kohlendioxid, für Nährstoffe, Stoffwechselzwischen- und -endprodukte. Blut dient der Wärmeübertragung und als Träger von Hormonen, Enzymen und Vitaminen. Außerdem hält Blut das physikochemische Gleichgewicht im Körper aufrecht. Blut reguliert in Geweben den Wasserhaushalt, den osmotischen Druck und die Ionen- sowie H⁺-Ionen-Konzentration (pH-Wert). In diese Regelkreise sind zusätzlich andere Organe, wie z.B. Leber, Niere und Lunge, mit eingeschaltet. Blut steht aber auch im Dienst der unspezifischen und spezifischen Körperabwehr, wobei weiße Blutzellen (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) hierbei aktive Aufgaben übernehmen. Deren spezifische Zellprodukte (z.B. Komplemente, Leukotriene, Lymphokine, Antikörper) zirkulieren im Blut und erreichen jedes Gewebe im Körper über das Blutgefäßsystem (Liebich, 2010).

Zusätzliche Reaktionsketten ermöglichen ein Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Lysis zu gewährleisten. Das Blutplasma beinhaltet das für die Blutgerinnung erforderliche Protein Fibrinogen. Wenn das Blut durch Schädigungen der Gefäßwand oder durch intravaskuläre Zirkulationsstörungen gerinnt, wandelt sich Fibrinogen in Fibrin um. Es entsteht ein Blutkuchen, von dem sich klare gelbliche Flüssigkeit abscheidet, welche als Blutserum bezeichnet wird (Welsch, 2006).

Die gesamte Blutmenge beträgt bei Säugetieren etwa 7 bis 9% der Körpermasse (Gäbel und Löffler, 2008, Liebich, 2010). Besondere Aufgaben übernehmen die Blutzellen,

deren Anteil bei Haussäugetieren zwischen 32 und 45% des Blutvolumens liegt. Die Zellen des Blutes lassen sich in rote Blutkörperchen (Erythrozyten), weiße Blutkörperchen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) einteilen (Liebich, 2010).

Blut ist dichter und dicker als Wasser und enthält sowohl zelluläre als auch flüssige Bestandteile (Abb.1). Zellen und Zellfragmente schweben im Plasma. Faserstrukturen, wie man sie vom Bindegewebe kennt, können in ihrer typischen Form im Plasma nicht gefunden werden: Trotzdem bilden sich während des Gerinnungsprozesses Faserstränge, indem sich gelöste Proteine miteinander verbinden. Nach einer Zentrifugation zeigt sich die Zusammensetzung des Blutes deutlich in drei voneinander getrennten Schichten: Zelluläre Elemente wandern auf den Boden des Röhrchens, während sich das Plasma als Überstand zeigt. Über dem Blutkuchen, der sich aus Erythrozyten zusammensetzt, wird eine dünne, helle Schicht sichtbar: Dieser sogenannte „buffy coat“ enthält Leukozyten und Thrombozyten (Akers und Denbow, 2008).

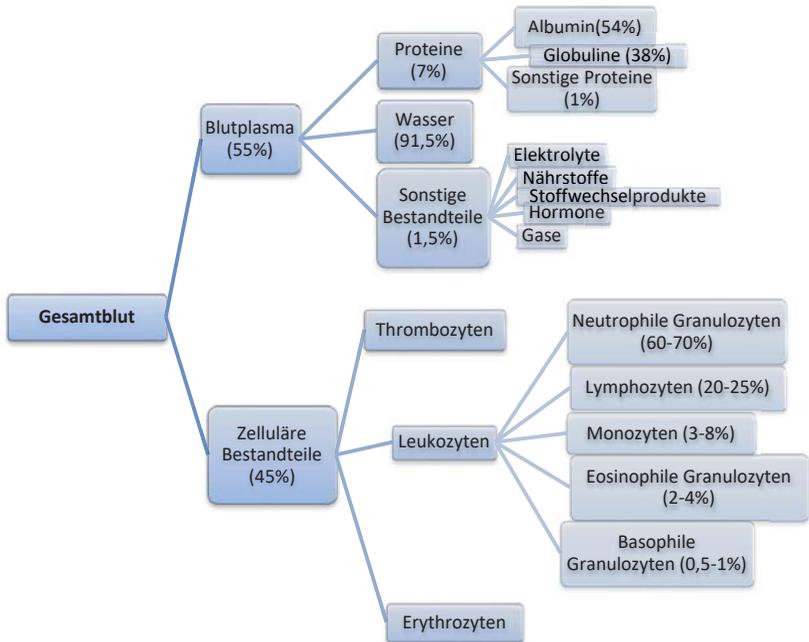


Abbildung 1: Zusammensetzung des Blutes (Akers und Denbow, 2008)

Der Anteil zellulärer Bestandteile einer Blutprobe wird als Hämatokrit bezeichnet. Erythrozyten machen ca. 96% davon aus. Fällt dieser höher als normal aus, wird dieses Phänomen als Polyzythämie bezeichnet und es kann davon ausgegangen werden, dass zu viele Erythrozyten pro Milliliter Blut zu finden sind. Derartiges Blut ist in der Lage, große Mengen an Sauerstoff zu transportieren. Gleichzeitig wird aber dadurch die Viskosität des Blutes erhöht, so dass das Herz eine höhere Pumpleistung vollbringen muss. Auch Dehydratation kann zu einer Polyzythämie führen, indem sich der flüssige Anteil verringert und somit mehr Erythrozyten auf einen Milliliter Blut kommen (Ross und Pawlina, 2011). Die oben beschriebene Polyzythämie muss von der tumorösen Polycythämia vera abgegrenzt werden.

In umgekehrter Art und Weise kommt es zu einer Anämie, wenn der Anteil der Erythrozyten sinkt. Um trotzdem den Sauerstoffbedarf der Gewebe zu decken, ist eine erhöhte Auswurfleistung des Herzens notwendig. Bei Hunden und Pferden ist die Milz in der Lage, bis zu 50% der Erythrozyten zu speichern. Darum kann der Hämatokrit in Folge von Anstrengung des Tieres, bei der dieser Vorrat an roten Blutkörperchen in den Kreislauf gepumpt wird, bis zu 25% ansteigen (Akers und Denbow, 2008).

Plasma ist der flüssige Teil des Blutes, in dem nicht-zelluläre Blutbestandteile gelöst oder emulgiert sind. Der Großteil der Plasmaproteine kann entsprechend seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften in drei größere Gruppen eingeteilt werden: Albumin, Globuline und Fibrinogen, welches sich an der Blutstillung beteiligt. Mengenmäßig repräsentiert Albumin, welches in der Leber synthetisiert wird, mit Abstand die größte dieser drei Gruppen. Außer den organischen Bestandteilen - Proteine, Nährsubstrate, Abbauprodukte - enthält das Plasma verschiedene Elektrolyte. Obwohl die Plasmaelektrolyte ein geringes Gewicht besitzen, üben sie aber vielfältige Funktionen aus: Natrium und Chlorid spielen unter anderem eine große Rolle bezüglich der Aufrechterhaltung der Osmolarität im Plasma. Kommt es zu Störungen in der Osmolarität des Plasmas, sind Wasserverschiebungen zwischen Gewebe und Plasma die Folge. Neben den Mengenelementen finden sich noch unterschiedliche Spurenelemente, die als Cofaktoren von Enzymen und Hormonen Bedeutung haben (Ross und Pawlina, 2011). Für die Bildung des roten Blutfarbstoffs spielt das Eisen eine entscheidende Rolle: Durch die puffernden Bestandteile im Plasma - vor allem Hydrogencarbonat und Hydrogenphosphat - wird der pH-Wert des Blutes im leicht alkalischen Bereich (7,3-7,5) gehalten. Die Konzentrationen der Vitamine im Plasma sind weitgehend vom Angebot in der Nahrung und der Resorption im Darm abhängig. Fettlösliche Vitamine wie A, D, E und K werden im Plasma an Eiweiße gebunden,

wohingegen die wasserlöslichen Vitamine wie z.B. Vitamin C frei gelöst sind (Gäbel und Löffler, 2008). Um eine konstante Zusammensetzung des Blutes zu gewährleisten, werden die Konzentrationen der Blutinhaltsstoffe ständig kontrolliert und eingestellt. Die Atemtätigkeit hält die Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid in einem engen Rahmen. Vor allem Niere und Leber regeln die Einstellung konstanter Konzentrationen für die Elektrolyte und andere gelöste Substrate (Gäbel und Löffler, 2008).

1.2 Besonderheiten des Pferdeblutes

Die meisten klinischen Labore benutzen für die Auswertung von Blutproben automatische Zellzähler. Mit ihnen können die Anzahl der roten Blutkörperchen (RBC), Hämoglobin, PCV (packed cell volume) und verschiedene Erythrozyten-Indices bestimmt werden. Vorgegebene Werte, wie in den folgenden Tabellen 1 und 2 aufgezeigt, dienen zur Festlegung von Referenzwerten. Die Anzahl der roten Blutkörperchen, Hämoglobin und PCV sind die am häufigsten benutzten Parameter, um die Quantität von Erythrozyten im Blutkreislauf zu bestimmen. Bei Warmblutpferden bemisst der Hämoglobin-Wert beinahe ein Drittel des PCV. Dieser Wert steigt bei Pferden mit intravaskulärer Hämolyse und Hämoglobinämie an. Die Auswertung der RBC-Werte kann dabei hilfreich sein, Anämien zu charakterisieren (Reed et al., 2010).

Eine Blutuntersuchung ist ohne eine sorgfältige mikroskopische Untersuchung eines Blutausstriches nicht vollständig. Unter physiologischen Bedingungen ist der Pferderythrozyt eine bikonkave Scheibe, jedoch fehlen den meisten equinen Erythrozyten, im Vergleich zu anderen Spezies, die zentralen Aufhellungsbereiche. Equine Erythrozyten weisen unter dem Mikroskop eine starke Tendenz zur Geldrollenbildung auf: Sie formieren sich gerne zu aneinanderhängenden Reihen. Sieht man im Zytoplasma eines Erythrozyten basophil angefärbte Kernreste, werden diese als Howell-Jolly-Körperchen bezeichnet. Diese Howell-Jolly-Körperchen sind pathologische Zellkernfragmente und treten beispielsweise dann auf, wenn die Zahl fehlerhaft gebildeter Erythrozyten die Clearance-Funktion der Milz überschreitet (Nemes, 2017). Schätzungsweise 10 von 10000 Erythrozyten des Pferdes beinhalten Howell-Jolly-Körperchen (Reed et al., 2010).

PARAMETER	EINHEIT	VOLLBLUT	KALTBLUT	MINIATURPFERD	ESEL
ANZAHL ROTER BLUTKÖRPERCHEN	$10^6/\mu\text{l}$	6.0-10.0	5.5-9.5	4.3-10.3	4.7- 9.0
HÄMOGLOBIN	G/DL	12.0-17.0	8.0-14.0	9.0-16.0	9.5- 16.5
PCV	%	32-50	24-44	24-42	28- 47
MCV	FL	42-58	-	38-61	46- 67
MCH	MG	15-20	-	14-23	16- 23
MCHC	G/DL	32-38	-	33-40	32- 36

Tabelle 1: Referenzwerte für equine Blutparameter (Reed et al., 2010)

BREED	RBC ($\times 10^6/\text{ML}$)	HGB (G/DL)	PCV (%)	MCV (GÄBEL UND LÖFFLER)	MCH (PG)	MCHC (%)
VOLLBLUT	9.35±1.05	14.8±1.03	41.7±3.8	44.7±3.4	15.9±1.4	35.8±1.4
WARMBLUT	8.37±1.02	13.6±1.6	38.3±3.5	46.1±4.0	16.3±1.4	35.5±1.6
QUARTER HORSE	8.26±1.02	13.3±1.6	38.0±4.0	46.2±3.9	16.1±1.7	34.9±1.6
APPALOOSA	8.60±1.11	13.3±1.6	38.4±4.7	44.8±4.4	15.5±1.3	34.5±0.8
ARABER	8.41±1.21	13.8±2.1	39.3±5.0	46.9±1.9	16.4±0.9	34.9±1.0
CLYDESDALE	7.30±0.78	12.4±1.1	33.0±3.0	44.6	-	38.1
PERCHERON	7.39±1.08	11.7±1.4	-	-	-	-
VERSCHIEDENE KALTBLUTRASSEN	7.76±1.23	-	33.0±7.0	42.3	-	-

Tabelle 2: Der Einfluß der Zucht auf physiologische Erythrozytenwerte des adulten Pferdes (Reed et al., 2010)

- *RBC: red blood cells (Erythrozyten)*
- *HGB: Hämoglobin*
- *PCV: packed cell volume (Hämatokrit)*
- *MCV: mean corpuscular volume (Volumeninhalt des einzelnen Erythrozyten)*
- *MCH: mean corpuscular hemoglobin (durchschnittliche Hämoglobinmenge pro Erythrozyt)*
- *MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration (Anteil des Hämoglobins am Volumen der Erythrozyten)*

Bei Betrachtung der Tabellenwerte stellt man fest, dass Pferdetyp und Rassestandard die Parameter, welche sich von den roten Blutkörperchen ableiten, durchaus beeinflussen. Schon an der Anzahl der Erythrozyten kann eine Vermutung hinsichtlich der Temperamentsausprägung angestellt werden: Das Vollblut hat mit $\approx 9,35 \times 10^6$ Erythrozyten/ μl höhere Referenzwerte als das Kaltblut mit $\approx 7,76 \times 10^6$ Erythrozyten/ μl .

Da Vollblüter dagegen hinsichtlich der Anzahl der Erythrozyten nur geringe Unterschiede zum Miniaturpferd aufweisen, kann man davon ausgehen, dass dieser Wert nicht von der Körpergröße abhängig ist. Bei der Beurteilung der Erythrozyten-Parameter des erwachsenen Pferdes ist es von großer Bedeutung, sich den Einfluss einiger physiologischer Faktoren bewusst zu machen: Rasse, Trainingszustand und Aktivität bzw. Aufregung zum Zeitpunkt der Probengewinnung spielen eine Rolle. Höher im Blut stehende Pferde wie leichte Pferde, Araber und Vollblüter haben einen höheren Hämatokritwert, eine größere Anzahl an Erythrozyten und eine höhere Hämoglobinkonzentration als Kaltblutrassen und Ponys. Warmblüter liegen mit ihren Werten dazwischen (Taylor und Hillyer, 2001).

Eine Studie, welche 2009 in Polen an Rennpferden angefertigt wurde (Kedzierski et al., 2009), kommt zu dem Schluss, dass kontinuierliches Training über vier Monate hinweg zu einer Erhöhung des Hämoglobingehaltes führt und gleichzeitig die Rückkehr zu physiologischen Hämoglobinwerten in der Konvaleszenzphase nach der Rennbelastung beschleunigt. Die Autoren sind der Meinung, dass die jungen Pferden unter Betrachtung metabolischer Gesichtspunkte und unter anderem auch unter Berücksichtigung der schnellen Anpassung des Hämoglobingehalts die Rennbelastung gut verkraften

(Kedzierski et al., 2009). Beim Pferd spielt im Gegensatz zu Mensch oder Rind der Kohlenstoffdioxid-Druck des Blutes in Bezug auf die Sauerstoffbindungskapazität des Hämoglobins eine untergeordnete Rolle (Cambier et al., 2005).

Trainierte Pferde zeigen höhere Werte bei Hämatokrit, Hämoglobin und Erythrozytenzahl als ruhende oder untrainierte Tiere. Daher sind bei trainierten Vollblutpferden die höchsten Parameter festzustellen. Liegt bei einem regelmäßig trainierten Pferd einer der Werte im unteren Level des Referenzbereiches, kann dies als auffällig bewertet werden. Durch die Milzkontraktion als Folge von Aufregung oder kürzlich beendeten Trainings zeigen sich die Werte von Hämoglobin, Hämatokrit und Erythrozytenzahl deutlich erhöht. Beobachtet man über den Tag verteilt Schwankungen innerhalb des Referenzbereiches, können diese beim gesunden Pferd als physiologisch bewertet werden.

Als Besonderheit des Pferdeblutes bezüglich der Erythrozyten-Parameter bleibt auch zu erwähnen, dass das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV = mean corpuscular volume) nicht wie bei anderen Tierarten wie z.B. Hund und Katze als Hilfe zur Einschätzung regenerativer und nicht-regenerativer Arten der Anämie dienen kann. Denn die Erythrozyten reifen beim Pferd selbst in Phasen intensiver Erythropoese nur im Knochenmark und nicht im Blutkreislauf. Folglich ist bei dem MCV im Lauf der Zeit ein kontinuierlicher Anstieg oder Abfall zu beobachten, der sich aber gewöhnlich im Normalbereich bewegt. Der beste Indikator beim Pferd, um zwischen regenerativer und nicht-regenerativer Anämie unterscheiden zu können, ist ein Aspirat oder eine Biopsie des Knochenmarks (Taylor und Hillyer, 2001).

An der Veterinärfakultät von Ljubljana wurde eine Studie an Lipizzanern durchgeführt, bei der die Leukozyten-Parameter sowohl für Hengste und Stuten als auch für die verschiedenen Altersgruppen bestimmt wurden. Es fiel auf, dass zwischen Hengsten und Stuten kein Unterschied festzustellen war und sich mit zunehmendem Alter die Gesamtzahl der Lymphozyten, Monozyten und der basophilen Granulozyten verringerte, während die Zahl der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten weitgehend gleich blieb (Cebulj-Kadunc et al., 2003).

Auch die Leukozyten-Parameter unterliegen dem Einfluss verschiedener physiologischer Zustände: Furcht, Stress oder vorausgegangenes Training können eine Leukozytose induzieren. Beim gesunden adulten Pferd liegt die Leukozytenzahl gewöhnlich zwischen 6 und $12,0 \times 10^9/l$. In Ruhe beträgt das Verhältnis von Granulozyten zu Lymphozyten etwa 60:40. Die kleine Anzahl von Monozyten und Eosinophilen beträgt normaler Weise

nicht mehr als 5% der Gesamtzahl der Leukozyten (Taylor und Hillyer, 2001).

1.3 Besonderheiten des Fohlenblutes

Im Gegensatz zu den meisten anderen Haussäugetieren befinden sich beim neugeborenen Fohlen keine signifikanten Mengen an fetalem Hämoglobin in den Erythrozyten. Das Hämoglobin adulter und neugeborener Pferde ist strukturell identisch (Knottenbelt et al., 2007).

Für Fohlen bis zum 7. Lebenstag sind Referenzwerte bekannt, welche in Tabelle 3 aufgelistet sind.

Hämatologie	Einheit	Geburt	24 Stunden	7 Tage+
Hämoglobin	g/dl	12-18 ²	13-15,5	11,5-17,5
Hämatokrit	%	40-52	34-46	31-40
Erythrozyten	10 ¹² /l	9,0-13,0	8,0-11,0	7,5-10,5
Mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH)	pg		14-15	
Mittleres Erythrozytenvolumen (MCV)	fl		37-49	
Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC)	g/dl		33-36	
Leukozyten	10 ⁹ /l	5,5-11,5		7,0-12,0
Neutrophile Granulozyten	10 ⁹ /l	3,5-10,0	3,0-9,6	7,0-10,0
Stabkernige Granulozyten	10 ⁹ /l		<0,5	
Eosinophile Granulozyten	10 ⁹ /l		0,0-0,1	

Basophile Granulozyten	10 ⁹ /l		0,1	
Monozyten	10 ⁹ /l		0,2	
Lymphozyten	10 ⁹ /l		1,8-3,0	2,0-4,0
Thrombozyten	10 ⁹ /l	100-250	125-300	100-400

Tabelle 3: Referenzwerte für Hämatologie beim Fohlen (Knottenbelt, Holdstock, & Madigan, 2007)

Neutrophile Granulozyten von Fohlen lassen sich bereits zum Zeitpunkt der Geburt durch pathogen-assoziierte molekulare Muster (CpGs der Coley Pharmaceutical Group) und durch das Bakterium *Rhodococcus equi* stimulieren: In vitro kann das „B-Klasse CpG“ die Funktion der neutrophilen Granulozyten sogar verbessern (Liu et al., 2009). CpG-Oligos der B-Klasse induzieren nur geringe Mengen an IFN-alpha, bewirken dafür aber eine sehr starke B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion (CHEMIE.DE Information Service GmbH, 2002).

Untersuchungen in den USA haben gezeigt, dass Lymphozyten von Fohlen, welche oral mit einem virulenten Stamm von *Rhodococcus equi* infiziert wurden, eine beschleunigte Entwicklung von *R. equi* spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) mit deutlicher Lyse von *R. equi* infizierten, ELA-A übereinstimmenden Zellen im Alter von 3 Wochen aufweisen (Harris et al., 2011).

Eine Studie in Polen befasste sich mit dem möglichen Einfluss von Hyperlipidämie und Hyperleptinämie der Mutterstuten nach tierärztlichen Eingriffen auf das Blutbild der Fohlen (Kedzierski et al., 2011). 17 polnische Kaltblutstuten wurden mitsamt ihren Fohlen in zwei Gruppen geteilt: Es wurden Leptin- und Triglyzerid- Gehalt von Stuten mit einer normal verlaufenden Geburt mit denjenigen Werten von Stuten mit Geburtskomplikationen und damit verbundener tierärztlicher Behandlung verglichen (Kedzierski et al., 2011).

Die Leptine und Triglyzeride im Plasma waren signifikant höher bei Stuten, die tierärztliche Eingriffe während der Geburt erfahren haben, wenn man die Ergebnisse aus dem Plasma von Stuten nach einer physiologischen Geburt vergleicht. Die Ergebnisse der Fohlen zeigten keine statistischen Unterschiede. Zusammenfassend haben die durchgeführten Versuche gezeigt, dass Hyperlipidämie post-partum und Hyperleptinämie zum Zeitpunkt der Geburt bei Stuten keinen Einfluss auf den Lipid-

Status und die Plasma-Leptin-Gehalte der neugeborenen Fohlen haben (Kedzierski et al., 2011).

Die Blutglukosekonzentration gesunder Fohlen liegt bei durchschnittlich 3-3,5mmol/l, wobei sie in den ersten 24 Lebensstunden auf über 4,5-6mmol/l steigt. Primär sollten dann Blutzuckerspiegel-regulierende Hormone wie Insulin und Glukagon aktiviert werden. Bei Frühgeburten liegt die Blutglukosekonzentration deutlich niedriger (2,3-2,7mmol/l), da diese Fohlen den Spiegel nicht in ausreichendem Maß aufrechterhalten können und es somit zu einem stetigen Abfall innerhalb der ersten 2-4 Lebensstunden kommt (Knottenbelt et al., 2007).

Bei klinisch stark auffälligen Fohlen stellt die Störung des Blutglukosespiegels eine Gemeinsamkeit dar: Tritt eine Hypoglykämie in Verbindung mit Sepsis, einer positiven Blutkultur und SIRS (Systemisch inflammatorisches Response-Syndrom) von unter 50mg/dl oder eine Hyperglykämie von über 180mg/dl auf, haben die betroffenen Fohlen eine deutlich geringere Überlebenswahrscheinlichkeit (Hollis et al., 2008). Septikämische Fohlen haben niedrigere Glukose-Konzentrationen als gesunde Fohlen (Barsnick et al., 2011).

Im Nabelschnurblut neugeborener Fohlen lassen sich adulte Stammzellen identifizieren, welche zur Gewebereparatur und -regeneration fähig sind und somit auch zur Behandlung von Sportpferden mit Sehnen-, Bänder- oder Knochenschäden herangezogen werden können (Reed und Johnson, 2008).

Mithilfe eines linearen Mixed-Effekt-Modells konnte festgestellt werden, dass innerhalb der ersten 4 Lebensmonate Interleukin 1α , Interferon γ und Transforming growth factor signifikant steigen (Boyd et al., 2003).

1.4. Die Blutgruppen der Pferde

Der Mediziner und Bakteriologe Karl Landsteiner gilt als der Entdecker des humanen A-, B-, 0-Blutgruppensystems (Schwarz et al., 2013). Seine grundlegenden Ergebnisse dazu publizierte er im Mai des Jahres 1901 in der "Wiener Klinischen Wochenschrift" unter dem Titel "Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes": Er stellte fest, dass nach Mischung von Blut verschiedener Menschen eine Verklumpungsreaktion roter Blutkörperchen auftritt (Landsteiner, 1901). Für diese wissenschaftliche Leistung

bekam er 1930 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen (Schwarz et al., 2013).

1923 fanden Hirsfeld und Przesmycki als erste Wissenschaftler heraus, dass es beim Pferd zwei verschiedene Blutgruppen gibt: Sie suchten bei der Untersuchung von 45 Pferdeblutproben nach den benannten Merkmalen A und B. 70% der untersuchten Tiere wiesen das Merkmal A auf, 15% dagegen das Merkmal B. Bei 9% der Pferde konnte weder A noch B nachgewiesen werden. Zudem stießen sie auf eine equine Besonderheit: Beim Menschen lassen sich entsprechend ihrer Blutgruppe A oder B regelmäßig Isoagglutinine Anti-B oder Anti-A nachweisen. Allerdings war bei den Pferdeblutproben der Blutgruppe A nur in 10% der Fälle das Agglutinin Anti-B nachweisbar. In 60% der Fälle trat das Agglutinin bei Pferden der Blutgruppe B in Erscheinung. In der Gruppe O fand man anti-A zu 100%, anti-B zu 50%. Hirsfeld und Przesmycki bestätigten ihre Ergebnisse durch Absorptionsuntersuchungen (Hirsfeld und Przesmycki, 1923).

Schermer und seine Mitarbeiter trugen in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts an der Universität Göttingen anhand vieler Publikationen wesentlich zum heutigen Kenntnisstand der Pferdeblutgruppen bei. Den Nachweis der Blutgruppenfaktoren erbrachten sie anhand von Normalantikörpern, die physiologisch im Pferdeblutserum enthalten sind (Schermer, 1934/35; Schermer, 1928; Schermer, 1934; Schermer und Kaempffer, 1936; Schermer und Kaempffer 1933; Schermer et al., 1932). Sie gingen von der Existenz der zwei Hauptfaktoren A und B aus, wobei diese durch Sekundärfaktoren X, Y, Z und V mit ihnen entgegen gerichteten Serumeigenschaften x, y, z und v ergänzt werden. Da diese Eigenschaften nicht selten vorkommen, beweist ihr Auftreten unter 100 untersuchten Pferden: Schermer und Mitarbeiter fanden X darunter 20mal, Y 17mal, Z 32mal und V 30mal. Daher ergibt sich für jedes Pferd eine individuelle Blutstruktur, die ihnen Anlass zu weiteren genetischen Forschungsarbeiten gab (Schermer, 1934).

Zum Nachweis von Blutgruppen werden Agglutinationsreaktionen bzw. Konglutination und Hämolyse benutzt: Polyvalente Antigene werden durch bivalente Antikörper und Agglutinine zu einem Netzwerk verflochten (Fudenberg et al., 1962). Entscheidend für die Agglutinationsreaktion sind die Größe des Antikörpermoleküls und die Tiefe der Antigenlokalisation im Erythrozyten. Laut der Marrackschen Theorie muss das Antikörpermolekül so groß wie die minimale Entfernung zwischen den Rezeptoren zweier Blutkörperchen sein (De Kromme und Vervaat, 1953). Verantwortlich für die Stabilität spezifischer Agglutinate sind Menge und Art der beteiligten Antikörper sowie die Rezeptorenaffinität inklusive der Stabilität des Antigen-Antikörperkomplexes:

Erythrozyten in Systemen mit großem Rezeptorengelhalt und Antikörpersättigung agglutinieren stärker als Systeme mit wenigen Rezeptoren (Schmid, 1966).

Als Eyquem und seine Kollegen 1956 weiter die Blutgruppen von Equiden und deren antigenen Beziehungen untereinander untersuchten, erwies sich die Bestimmung von Pferdeblutgruppen anhand von Isoimmunseren als schwierig. Allerdings fanden sie bei Esel- und Maultierserum 5 Hauptantigene: Das Maultier besitzt 5 Antigene A, C, D, E und F, welche vom Pferd stammen. Daraus konnte man schließen, dass das Antigen B auch dem Esel eigen ist. Nach Untersuchung von 412 Pferdeblutproben, trat folgende prozentuale Verteilung der 5 Blutgruppenantigene zu Tage: A kam zu 72,3%, C zu 84%, D zu 15,8%, E zu 30,6% und F als häufigstes Antigen zu 78% vor. Es ergeben sich daher 32 mögliche Genkombinationen: 2% der Pferde gehören laut dem französischen Wissenschaftlerteam der Blutgruppe 0 an (Eyquem et al., 1956). Mit Hilfe von Isoagglutininen, die im Normalserum von Pferd und Maultier enthalten sind, in Kombination mit bestimmten Heteroagglutininen, die im Normalserum des Esels festgestellt wurden, wiesen Podilachouk und Wroblewski im Hämagglutinationsverfahren 10 verschiedene Erythrozytenantigene nach (Podilachouk und Wroblewski, 1958).

In Kalifornien gelang es in den 60er Jahren Stormont und seinen Kollegen, 16 unterschiedliche Blutgruppenantigene beim Pferd nachzuweisen (Stormont und Suzuki, 1963, 1964; Stormont et al., 1963, 1964). Nach Vergleich der Seren mit denen von Podilachouk (Podilachouk und Hesselholt, 1962) ergab sich die Übereinstimmung innerhalb von 6 Seren bezüglich ihres Reaktionsspektrums. Zudem ergaben sich 10 pferdespezifische Erythrozytenantigene, die bisher weder in Asien noch in Europa bekannt waren: A2, A', P1, P2, P', Q, R, S, T und U. In einer Studie über die Blutgruppeneigenschaften von Shetland Ponys und Warmblütern legten Stormont und Suzuki 16 Blutgruppenfaktoren fest (Stormont und Suzuki, 1963, 1964; Stormont et al., 1963, 1964), die u.a. die Grundlage des heutigen equinen Blutgruppensystems bilden (Bowling und Ruvinsky, 2000).

1980 stellte sich der Stand der Forschung auf dem Gebiet der Blutgruppen bei Pferden folgendermaßen dar: Etwa 30 Testseren waren zum serologischen Nachweis von Blutgruppenfaktoren an Pferdeerythrozyten verfügbar. Diese Blutgruppenfaktoren werden durch sieben genetische Blutgruppensysteme kontrolliert. Dieses D-System mit seinen 12 Allelen kann jedoch in seiner Komplexität mit den Blutgruppensystemen B und C des Rindes, die eine viel größere Variabilität aufweisen, bei weitem nicht verglichen werden. Polymorphismen im Pferdeblutplasma oder deren Erythrozyten wurden an 13

unterschiedlichen Proteinen nachgewiesen. Mehrere der korrelativen Loci, beispielsweise der Transferrin-Locus, sind pluralial. Für die Identifizierung von Pferden und bei der Kontrolle der Elternschaft erwies sich die Blutgruppenbestimmung zu jener Zeit von praktisch großer Bedeutung (Grosclaude, 1980).

Heute geht man davon aus, dass es über 30 verschiedene Blutgruppen beim Pferd gibt: 7 von den 8 wichtigsten Systemen sind international anerkannt (A, C, D, K, P, Q und U) (French et al., 2010). Die 7 Blutgruppen des Pferdes lauten EAA, EAC, EAD, EAK, EAP, EAQ und EAU (Bowling und Ruvinsky 2000). Das T-System ist vorrangig für Forschungszwecke von Interesse. Es existieren natürliche Antikörper, wie beispielsweise gegen Ca-Antigene, welche in der Kreuzprobe schwache Agglutination und hämolytische Reaktionen erzeugen, jedoch in vivo keine signifikante Hämolyse verursachen (French et al., 2010).

Eine an Przewalski-Pferden (*Equus przewalskii*) durchgeführte Blutgruppentypisierungsstudie zeigte, dass die 6 Blutgruppensysteme A, C, D, P, Q, U in denselben Mustern vererbt werden, wie es von domestizierten Pferden (*Equus caballus*) bekannt ist. Trotz der engen genetischen Basis und dem hohen Inzuchtkoeffizienten der 96 in Gefangenschaft gehaltenen Przewalski-Pferde, wurde von 18 Loci eine durchschnittlichen Heterozygotie von $0,320 \pm 0,05$ errechnet, die der Heterozygotie (Köhler und Milstein, 1975) domestizierter Pferde ähnlich ist (Bowling und Ryder, 1987).

1.4.1. Die neonatale Isoerythrolyse beim Fohlen

Die Entdeckung des hämolytischen Ikterus bei neugeborenen Pferde- und Maultierfohlen stand schon von Beginn der Blutgruppenforschung des Pferdes im Fokus des Interesses (Schmid, 1966). Hinzu kam, dass die Entdeckung des Rh-Blutgruppensystems beim Menschen durch Wiener im Jahr 1940 die Hypothese bestätigte, dass Rh-Antigene für das Auftreten der foetalen Erythroblastose neugeborener Menschen verantwortlich sind (Huth, 1948). Auch beim Pferd stellte man ein Krankheitsbild fest, welches sich durch einen hämolytischen Ikterus auszeichnet und mit der Rh-Unverträglichkeit des Menschen vergleichbar ist (Bruner et al., 1948; Caroli und Bessis, 1947; Coombs et al., 1948; Hosoda et al., 1959).

Eine transplazentäre Isoimmunisation der Mutter durch dem Foetus eigene Antigene ist die Ursache dieser schweren Erkrankung bei Mensch und Pferd. Diese Antigene auf den Erythrozyten des Foetus werden durch das väterliche Erbgut kodiert (Schmid, 1966). Eine entscheidende Voraussetzung ist, dass das Fohlen die Blutgruppe des Vaters geerbt hat. Somit exprimiert es ein Blutgruppenantigen, welches die Mutterstute nicht besitzt. Die Alloantigene Aa und Qa sind in schweren Krankheitsfällen beteiligt, so dass bei Stuten, die negativ für Aa und/oder Qa sind, die Gefahr der Antikörperbildung besonders groß ist (Bailey, 1982). Bei der epitheliochorialen Plazenta des Pferdes trennen Mutterstute und Foetus 6 Gewebsschichten. Zudem ist die Plazentaschranke, im Gegensatz zu der menschlichen Plazenta, für Antikörper nicht passierbar. Daher kommen die neugeborenen Fohlen isoimmunisierter Stuten zunächst völlig gesund auf die Welt. Erst nach Aufnahme der Kolostralmilch, welche einen hohen Antikörpertiter aufweist, treten die charakteristischen Krankheitssymptome auf, da die Darmschleimhaut des Pferdes 20-30 Stunden nach Geburt für Antikörper permeabel bleibt. Über die Darmschleimhaut werden die Antikörper aufgenommen und gelangen in den Blutkreislauf: Dort werden die Erythrozyten rascher zerstört als sie neu gebildet werden können. Eine sichere Diagnose kann nur anhand des serologischen Nachweises von Isoimmunantikörpern im Serum und im Kolostrum der Stute erfolgen (Schmid, 1966). Sowohl Franks als auch Schmid haben die Beobachtung gemacht, dass der Antikörpertiter kurze Zeit nach Geburt des Fohlens und Aufnahme der Kolostralmilch stark absinkt: Darum sollten bei Verdacht auf hämolytischen Ikterus Blutentnahmen zum Antikörpernachweis unmittelbar nach der Geburt des Fohlens erfolgen (Franks, 1962; Schmid, 1966). Von spezialisierten Labors wird eine Kreuzprobe mit Serum und gewaschenen Erythrozyten der Mutter und des Fohlens und einer exogenen Komplementquelle angeboten (Becht und Semrad, 1985).

Allerdings können unter gewissen Umständen auch während der Trächtigkeit fetale Erythrozyten in den mütterlichen Blutkreislauf übertreten: Beispielsweise kann dies bei entzündeter oder geschädigter Plazenta in einem frühen oder späten Stadium der Trächtigkeit oder einer Plazentitis bei Geburt erfolgen. In letzterem Fall führt dieser Umstand zu einem schwerwiegenden Problem in der nächsten Trächtigkeit (Morris, 1998).

Charakteristische Symptome für die neonatale Isoerythrolyse bzw. den hämolytischen Ikterus sind Gelbsucht, Apathie, Hämoglobinämie und

Hämoglobinurie in Verbindung mit fortschreitendem körperlichen Verfall: Der Tod tritt zwischen 48 Stunden und 6 Tagen post partum ein (Schmid, 1966). In Florida wertete man 72 Fälle neonataler Isoerythrolyse aus und stellte eine Überlebensrate von 75% fest: Alle Fälle wurden u.a. anhand von Bluttransfusionen behandelt. Leberversagen, Kernikterus und Komplikationen im Zusammenhang mit bakterieller Sepsis waren die drei häufigsten Gründe für den Tod oder eine Euthanasie der Vollblutfohlen (Polkes et al., 2008).

Amerikanische Traber und Vollblüter sind die am häufigsten betroffenen Pferderassen: Etwa 18% der Stuten sind genetisch empfänglich. Durchschnittlich wird ein Vollblutfohlen mit einer Wahrscheinlichkeit von 1% an neonataler Isoerythrolyse erkranken (Knottenbelt et al., 2007).

2. Die Blutzellen

2.1. Bildung der Blutzellen

Um eine Vorstellung der Entstehung der Zellen des hämatopoetischen Systems zu erhalten, kann man grob drei Entwicklungsstufen unterscheiden: Am Anfang steht die pluripotente hämatopoetische Stammzelle, aus der verschiedene oligo-, bi- oder unipotente Progenitorzellen hervorgehen. Diese Vorläuferzellen sind nur sehr begrenzt in der Lage, sich selbst zu erneuern: Dafür sind sie bezüglich ihrer Differenzierung auf eine bestimmte Richtung der Hämoese (z.B. Erythropoese) festgelegt. Letztendlich wird die Zelle auf ihrem Weg der Differenzierung zu einer Effektorzelle; man kann sie nun als reif bezeichnen, da ihre Aufgaben jetzt klar definiert sind (Erythrozyten, neutrophile-, eosinophile- und basophile Granulozyten, Thrombozyten). Dieses gilt nicht für alle Zellen des hämatopoetischen Systems, so sind Monozyten und naive Lymphozyten zu weiterer Differenzierung befähigt (Jungi, 2000).

Die pränatale Phase der Blutbildung lässt sich wie folgt in drei Abschnitte unterteilen, und zwar in die megaloblastische, die hepatolienale und die medulläre Periode. Schon zwei Wochen nach der Befruchtung kann man extraembryonal im Mesenchym des Dottersacks erste Anzeichen der Blutbildung bemerken. In definierten Bereichen entwickeln sich Zellen zu Angioblasten für spätere Blutgefäße und zu Hämozytoblasten, welche als Blutstammzellen fungieren. Ende der dritten Woche gewinnen diese

extraembryonalen Blutgefäße nun Anschluss an den Embryo. Zu diesem Zeitpunkt sind die Erythrozyten groß (15-18 μm) und besitzen einen Kern. Diese Vorstufen der Erythrozyten werden Megaloblasten genannt. Diese megaloblastische Periode dauert bis zum 3. Fetalmonat (Kressin und Schnorr, 2006). Auffällig ist, dass in dieser ersten Phase die Bildung von Granulozyten und Lymphozyten unterbleibt (Kressin und Schnorr, 2006).

In der hepatolienalen Phase übernehmen Leber (ab dem 2. Entwicklungsmonat), Milz (ab dem 4. Entwicklungsmonat) und ein wenig später auch im geringen Umfang Lymphknoten und Thymus die Blutzellbildung (Kressin und Schnorr, 2006; Hytell et al., 2010). Erythrozyten erreichen jetzt ihre normale Größe und sind bereits kernlos (Kressin und Schnorr, 2006). Erythroblasten und verschiedene Vorläuferzellen von Granulozyten, Megakaryozyten und einige Lymphozyten sind in den Sinusoiden der Leber zu finden: Die Leber hat ihre Hochphase der Blutbildung bis zum 5. Fetalmonat, dann produziert sie zwar noch weiter Blutzellen, aber nicht in demselben Umfang. Ein paar Wochen nach der Geburt stellt sie diese Funktion ganz ein. Dagegen spielt die Lymphopoese der Milz während des ganzen Lebens eine Rolle: Unmittelbar vor der Geburt erreicht die Blutbildung der Milz ihren Höhepunkt. Zellen der roten Blutzellreihe und in geringerem Umfang Granulozyten und Blutplättchen werden bis zum Ende des 7. Fetalmonats in der Milz gebildet (Kressin und Schnorr, 2006; Liebich, 2010). Wie schon erwähnt, reduziert sich die Blutzellbildung in Leber und Milz mit der Zeit: Im Falle einer Erkrankung des Knochenmarks kann sie jedoch jeder Zeit wieder aktiviert werden (Liebich, 2010). In Thymus und Lymphknoten bilden sich ab dem 6. Entwicklungsmonat aus Stammzellen, welche aus dem Knochenmark einwandern, ausschließlich Lymphozyten. Lymphozyten wandern allerdings auch nach der Geburt noch aus dem Knochenmark in lymphatische Organe ein (Hytell et al., 2010).

Forscher der Cornell University in Ithaca fanden heraus, dass in der Lymphopoese speziell die Expression der mRNA von PAX5/EBF1 eine Rolle bei der Entwicklung eines gesunden Abwehrsystems spielt: Pferde mit CVID (common variable immunodeficiency disease) wiesen kein PAX5/EBF1 in ihrem Knochenmark auf (Tallmadge et al., 2012).

Mit der Ausbildung des knöchernen Skeletts beginnt zeitgleich die Bildung von Erythrozyten und kernhaltigen Blutzellen im Knochenmark. Diese medulläre Phase besteht zeitlebens. Mit Abschluss des Längenwachstums in den Diaphysen der langen Knochen hört die Hämatopoese dort auf und läuft dann nur noch im Mark der kurzen und platten Knochen sowie der Epiphysen der Röhrenknochen weiter (Kressin und Schnorr, 2006).

2.2. Faktoren der Blutzellbildung

Von zahlreichen hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen werden Zytokine gebildet, welche als Botenstoffe eine entscheidende Rolle bei der Blutzellbildung spielen. Zytokine besitzen schon in geringen Konzentrationen eine hohe biologische Wirksamkeit, welche über Oberflächenrezeptoren der Zielzelle vermittelt wird. Durch ihre auto-, para- und endokrine Wirkung regulieren die Zytokine als interzelluläre Vermittler die Proliferation, Differenzierung, Mobilität und Aktivität der hämatopoetischen Zellen. Die unterschiedlichen Zytokine werden in viele Gruppen untergliedert, welche teilweise nicht voneinander abgrenzbar sind. Neben Chemokinen und Virokinen sind insbesondere Wachstumsfaktoren (Hämopoetine) und transformierende Wachstumsfaktoren (wie c-Myb und E2A) für die Blutzellbildung bedeutend: Hierbei sind koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Interleukine (IL) besonders wichtig. IL-3, IL-5, IL-15 und Erythropoetin (EPO) fördern die Proliferation und Differenzierung entscheidend. Interferone, Tumornekrosefaktoren und Makrophagenproteine haben bezüglich der Hämatopoese dagegen eine hemmende Wirkung (Liebich, 2010).

Ärzte der Rutgers State Universität in New Jersey (USA) führten anhand von Blutproben und Muskelbiopsien von vier Standardbred-Stuten Untersuchungen durch, welche das Verhalten von Interferon- γ , Interleukin-1, Interleukin-6 und dem Tumornekrosefaktor- α sowohl unter Belastung als auch 24 Stunden danach beleuchten sollten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass eine hohe Belastung durch körperliche Anstrengung der Muskeln diese Entzündungsmarker vorübergehend im Blut erhöht. 24 Stunden nach der Belastung waren jedoch alle Werte wieder auf das Normalniveau abgesunken (Liburt et al., 2010). Daraus kann geschlossen werden, dass Erholungszeiten zwischen Trainingsintervallen zur Blutneubildung förderlich sind.

Die Studie von Capomaccio und Kollegen (2011) beschäftigte sich mit dem Vergleich der Interleukin-6 Expression und seines Rezeptors in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) zwischen trainierten und untrainierten Menschen und Pferden: In beiden Spezies spielt Interleukin-6 (IL-6) als Teil eines integrierten metabolischen Regulationsnetzwerks unter Belastung eine wesentliche Rolle bei der Regulierung einer Entzündung. Beim Menschen fiel der, durch quantitative Reverse Transkription-

Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ermittelte, IL-6-mRNA-Spiegel in PBMCs bei trainierten Sportlern signifikant höher aus, während bei der IL-6R Expression kein signifikanter Unterschied zwischen Sportler und Nichtsportler zu erkennen war. Bei den Pferden waren allerdings die Transkripte sowohl von IL-6 und IL-6R in der trainierten Gruppe signifikant höher. Somit lässt sich aus dieser Studie folgern, dass das entzündungshemmende System des Pferdes besser ausgebildet ist als das des Menschen (Capomaccio et al., 2011): IL-6 aktiviert nämlich Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten und hat damit auf lange Sicht gesehen schützenden, anti-inflammatorischen Effekte. Tatsächlich stimuliert IL-6 die Produktion von Zytokinen (IL-1ra) und entzündungshemmenden Zytokinen (z. B. IL-10) in diesen Immunozyten (Petersen und Pedersen, 2006).

2.3. Morphologie der Blutzellen

2.3.1. Erythrozyten

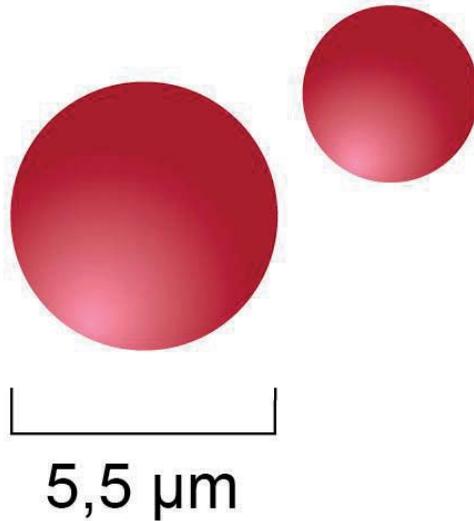


Abbildung 2: Graphik der Morphologie der Pferderythrozyten (modifiziert nach Liebich, 2010)

Erythrozyten haben bei einer bikonkaven Diskusform einen Durchmesser von meist 5,5-8 µm (Akers und Denbow, 2008). Bei jeder Spezies bewegt sich ihre Größe in sehr ähnlichem Rahmen: Nur bei Rind und Schaf ist eine Größenvariation der Erythrozyten untereinander nicht ungewöhnlich (Aughey und Frye, 2001). Beim Pferd beträgt der durchschnittliche Durchmesser 5,5 µm (Liebich, 2010). Damit ihre Kapillarengängigkeit gewährleistet ist, ist ihre Zellmembran verformbar. Die roten Blutkörperchen der Säugetiere weisen - ganz im Gegensatz zu den kernhaltigen Erythrozyten der Vögel - keinen Zellkern und nur noch ganz wenige Zellorganellen auf. Sie müssen ATP auf anaerobem Wege produzieren, da sie keine Mitochondrien enthalten. Glykolipide, welche sich auf der Plasmamembran finden, sind ausschlaggebend für die

verschiedenen Blutgruppen. Erythrozyten enthalten Hämoglobin. Jedes Hämoglobinmolekül besteht aus vier Polypeptidketten, von welchen jede ein Nichtprotein-Häm-Teil anhaftet. Im Zentrum eines jeden Moleküls befindet sich ein Eisen²⁺- Ion, welches reversibel jeweils ein Sauerstoffmolekül binden kann. Simultan kann Hämoglobin Stickoxid freisetzen, welches die Kapillaren erweitert und somit, durch die erhöhte transportable Blutmenge, den Sauerstofftransport erhöht (Akers und Denbow, 2008).

Ebenso wie das Höhenklima beeinflussen Muskularbeit, Training und Kondition beim Pferd die Anzahl der zirkulierenden Erythrozyten. Auch das Geschlecht kann einen Einfluss darauf haben: Beim Hengst und Wallach ist die Menge der roten Blutkörperchen im Vergleich zur Stute höher (Liebich, 2010). Die weit verbreitete Annahme, dass Doping nur durch die Erhöhung des arteriellen O₂-Gehaltes anhand von Erythropoetin oder Bluttransfusion aufgrund des steigenden Hämatokritwertes wirksam wird, ist noch nicht vollständig abgeklärt. Pferde und Hunde betreiben eine Art natürliches Doping, indem sie durch die Freigabe gespeicherter Erythrozyten aus der Milz sowohl Hämatokrit als auch das zirkulierende Blutvolumen während des Trainings erhöhen (Boning et al., 2011).

2.3.2. Thrombozyten

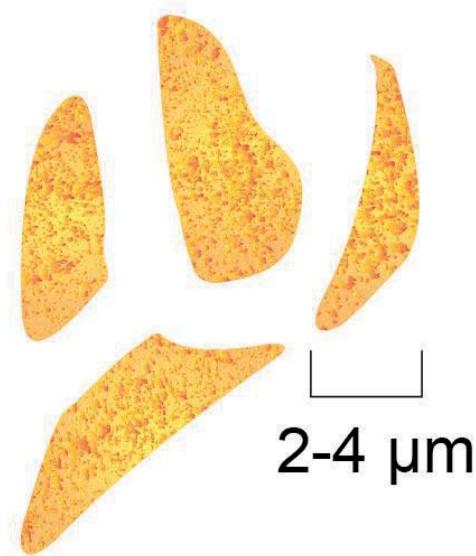


Abbildung 3: Graphik der Morphologie der Pferdethrombozyten (modifiziert nach Liebich, 2010)

Blutplättchen sind kernlose Zellfragmente, die durch Abschnürung aus polyploiden Megakaryozyten des Knochenmarks gebildet werden (Liebich, 2010). Mit einem Durchmesser von bis zu 100 µm zählen reife Megakaryozyten zu den größten Körperzellen: Da die Entwicklung der azurophilen Granula und die Ausbildung der Mikrotubuli bei dieser Zellgröße abgeschlossen sind, findet anschließend die Abschnürung und Fragmentierung des Zytoplasmas mit seinen Anteilen statt, so dass Thrombozyten entstehen (Liebich, 2010).

Ein einzelner Thrombozyt ist 2-5 µm groß und neigt zur Agglutination, so dass auf Blutausstrichen zumeist Gruppen von Thrombozyten vorkommen (Junqueira und Carneiro, 1996).

Blutplättchen weisen zwei Zonen auf: Eine durchsichtige Randzone (Hyalomer) umgibt

eine dichte Zentralzone (Granulomer). Das Granulomer umfasst große azurophile α -Granula und Lysosomen. Unregelmäßig gewundene Tubuli gewährleisten im Granulomer die Sekretion aller beinhalteten Faktoren wie u.a. Endoglykosidase und heparinspaltende Enzyme. Um Agglutination betreiben zu können und um eine Anheftung der Blutplättchen an das geschädigte Endothel der Gefäßwand geschehen zu lassen, befinden sich auf der Oberflächenmembran des Hyalomers in der Glykokalix Plättchenglykoproteine, Fibrinogen und Thromboplastin. Aktin- und Myosinfilamentbündel können die Oberfläche des Thrombozyten zur Kontraktion bewegen (Liebich, 2010).

2.3.3. Leukozyten

Leukozyten werden in zwei Gruppen unterteilt, die Granulozyten und die Agranulozyten. Leukozyten sind am Abwehrsystems und der Immunantwort des Körpers entscheidend beteiligt. Von den weißen Blutkörperchen kommen polymorphkernige Leukozyten (PMLs), mit einem Durchmesser von 10-12 μm und mehrfach gelapptem Zellkern, im Blut des Pferdes am häufigsten vor. Da die Färbung der Granula recht unterschiedlich ausfällt, sind die einzelnen kleinen Granula schwer zu differenzieren.

Die eosinophilen Granulozyten des Pferdes haben, verglichen mit anderen Tierarten, auffällig große Granula. Mit ihrem zweigelappten Zellkern machen sie 5% der Leukozytenpopulation aus. Bei Parasitenbefall und Allergien treten sie vermehrt auf.

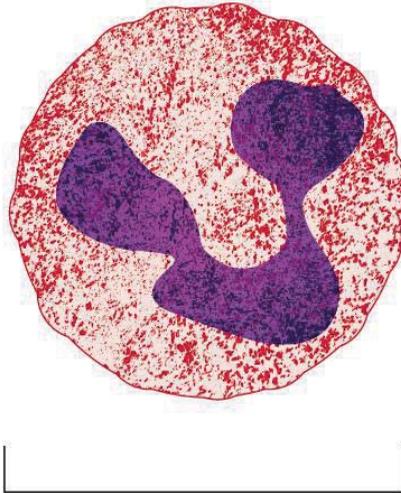
Basophile Granulozyten sind dagegen nur selten zu beobachten. Sie machen nur 0,5% der weißen Zellpopulation aus. Charakteristische große basophil angefärbte Granula maskieren oftmals den Zellkern, der sich gerne in unterschiedlicher Form repräsentiert: Man findet sowohl mehrfach gelappte, zweigelappte oder ungelappte Zellkerne.

Unter den Agranulozyten finden sich kleine Lymphozyten am häufigsten: Sie machen in etwa 30% der weißen Blutkörperchen aus. Im Durchschnitt haben sie einen Durchmesser von 7-8 μm und besitzen einen dunkelblauen Zellkern der von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben wird. Mittlere und große Vertreter unter den Lymphozyten haben einen Durchmesser von bis zu 10 μm , wobei in der panoptischen Färbung der dunkelblaue Zellkern in blass bläulichem Zytoplasma zu liegen kommt.

Die größte Zelle unter den Agranulozyten repräsentiert der Monozyt mit seinen 12-20 μm Durchmesser und einem hufeisenförmigen Zellkern, der von blau-grauem

Zytoplasma umgeben ist. Er verlässt das Blut als Makrophage, um im mononukleären Phagozytensystem des Körpers als Effektorzelle zu wirken (Aughey und Frye, 2001; Liebich, 2010).

2.3.3.1. Neutrophile Granulozyten



10-14 μm

Abbildung 4: Graphik der Morphologie des neutrophilen Pferdegranulozyten (modifiziert nach Liebich, 2010)

Bei Pferd, Hund und Katze bilden neutrophile Granulozyten mit ihrem polymorphen Kern und einem durchschnittlichen Durchmesser von 10-14 μm mit 55-70% den größten Anteil des weißen Blutbildes. Bei anderen Tierarten herrschen Lymphozyten vor. Mit zunehmendem Alter zeigt der neutrophile Granulozyt einen segmentkernigen Zellkern: Dies rührt daher, dass der ursprüngliche stabförmige Zellkern mit zunehmendem Alter in Segmente unterteilt wird, die durch dünne Chromatinbrücken verbunden sind.

Als man Pferde eines CEI 3 * 162 km Distanzrittes unmittelbar nach Belastung auf Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut untersuchte, zeigte sich eine manifeste neutrophile Leukozytose, also eine Linksverschiebung aufgrund vermehrt im Blut vorkommender stabkerniger Neutrophiler (Cywinska et al., 2010). Dabei war auch das Phänomen des *Oxidativen Burst* neutrophiler Granulozyten zu beachten: Bei Phagozytosevorgängen steigt ihr Sauerstoffverbrauch auf den 50- bis 100-fachen Wert an, wobei es zur Entstehung von Sauerstoffradikalen kommt (Baldrige und Gerhard, 1933).

Der Großteil der Neutrophilen ist im Knochenmark lokalisiert, nur 10% finden sich in Geweben oder im zirkulierenden Blut.

Im Zytoplasma befinden sich, neben den spezifischen Granula, in geringerer Menge azurophile (primäre) Granula. Unter biochemischen Gesichtspunkten lassen sich diese weitergehend typisieren. Bestandteil der Granula (primäre Lysosomen) sind unter anderem saure Phosphatasen, 5-Nukleotidase, D-Aminosäureoxidase und Peroxidase (Liebich, 2010). Auch Polypeptide leisten ihren Beitrag: Ihre antimikrobielle Aktivität hat eine schützende Komponente gegenüber Bakterien, Pilzen und bestimmten behüllten Viren.

Spezifische (sekundäre) Granula enthalten als zahlenmäßig dominierender Granulatyp Laktoferrin, alkalische Phosphatase, NADPH-Oxidase, Histaminase und Lysozym. Neutrophile Granulozyten wandern mittels Diapedese aktiv zwischen den Endothelzellen der Kapillaren in das darunter gelegene Bindegewebe ein. Angelockt durch chemische oder physikalische Reize, verlassen sie die Blutbahn, um extravaskulär ihre Aufgabe, die Zerstörung von Mikroorganismen, zu erfüllen. Nachdem sie Zelltrümmer und körperfremde Stoffe phagozytiert (Mikrophagen) haben, gehen sie nach einigen Tagen zugrunde (Liebich, 2010).

Im Vergleich zu den azurophilen, primären Granula, welche erstmals in den Promyelozyten auftreten und deren Zahl mit jeder folgenden Zellteilung abnimmt, treten die spezifischen Granula zum ersten Mal in den neutrophilen Myelozyten auf: Sie liegen mit einem Durchmesser von 0,3-0,5 μm nahe an der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops und sind somit kleiner als die azurophilen Granula. Allerdings fehlen jegliche Granula in den Pseudopodien, welche die neutrophilen Granulozyten zur Fremdkörperphagozytose bilden (Junqueira und Carneiro, 1996).

2.3.3.2. Eosinophile Granulozyten

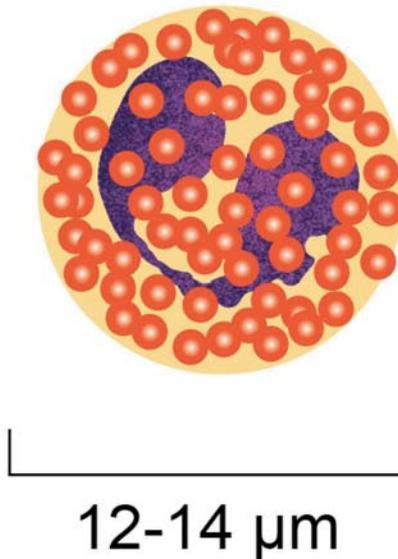


Abbildung 5: Graphik der Morphologie des eosinophilen Pferdegranulozyten (modifiziert nach Liebich, 2010)

Das auffälligste morphologische Merkmal eosinophiler Granulozyten sind ihre intensiv azido- bzw. eosinophilen Granula, die beim Pferd außerordentlich groß sind. 2-10% aller zirkulierenden Granulozyten bei den Haustieren sind eosinophile Granulozyten. Beim Pferd werden im weißen Blutbild 3-5% eosinophile Granulozyten als physiologisch angesehen.

Sie sind durchschnittlich 12-14 µm groß. Ihr Kern ist gelappt (Liu et al., 2009).

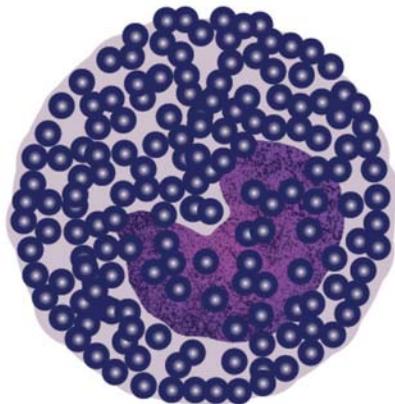
Die Größe der eosinophilen Granulozyten ist von ihrem Reifegrad abhängig: Junge Eosinophile sind relativ klein und haben eine große Kern-Plasma-Relation, wohingegen die intermediären und vor allem die reifen oder späten Eosinophilen erheblich größer erscheinen und ein kleineres Kern-Plasma-Verhältnis aufweisen. Freie Ribosomen und granuläres endoplasmatisches Retikulum fehlen fast vollständig. Der Golgi-Apparat und

die Anzahl der Mitochondrien sind im Vergleich zu den frühen eosinophilen Granulozyten stark reduziert. Die Granulazahl der Eosinophilen des Pferdes beläuft sich auf durchschnittlich 35 pro Zelle (Archer, 1968).

Tauchen in ihrer Nähe antibakterielle Antikörper auf, sind eosinophile Granulozyten sogar zu amöboiden Eigenbewegungen und zur Phagozytose befähigt (Liu et al., 2009).

Inhaltstoffe der Granula sind u.a. Peroxidase, Arylsulfatase, Kathepsin und Ribonuclease, jedoch kein Lysozym. Zudem beinhalten sie basische arginin- bzw. lysinreiche Proteine (major basic protein=MBP, eosinophil cationic protein=ECP, eosinophil derived Neurotoxin=EDN, eosinophil protein X=EPX): Sie sind für die Eosinophilie verantwortlich (Junqueira und Carneiro, 1996).

2.3.3.3. Basophile Granulozyten



9-12 μm

Abbildung 6: Graphik der Morphologie des basophilen Pferdegranulozyten (modifiziert nach Liebich, 2010)

Basophile Granulozyten entsprechen bezüglich der Anfärbbarkeit ihrer Granula und der Funktion weitgehend den Mastzellen des lockeren Bindegewebes. Ihr Anteil an der Gesamtleukozytenzahl beträgt durchschnittlich 0,5-1% (Smollich und Michel, 1992).

Die Größe der basophilen Granulozyten beträgt 9-12 μm . Ihr Kern ist häufig von bohnenähnlicher Form. Meist überdecken die großen basophilen Granula, welche sich mit basischen und metachromatischen Farbstoffen anfärben lassen, den Kern zumindest teilweise. Die Granula sind wasserlöslich und enthalten Histamin, Leukotriene und Heparin. Dieses Heparin trägt wesentlich zu ihrer Hauptfunktion bei, der Hemmung der Blutgerinnung. Mastzellen enthalten ebenso Histamin und Heparin - jedoch verläuft ihre Entwicklung und Granulagestaltung unterschiedlich (Liebich, 2010).

Zusätzlich sind Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Serotonin und verschiedene chemotaktische Faktoren in den Granula enthalten. Basophile Granulozyten besitzen Rezeptoren für die Immunglobuline E und G (Hees und Tschudi, 1990).

2.3.3.4. Lymphozyten

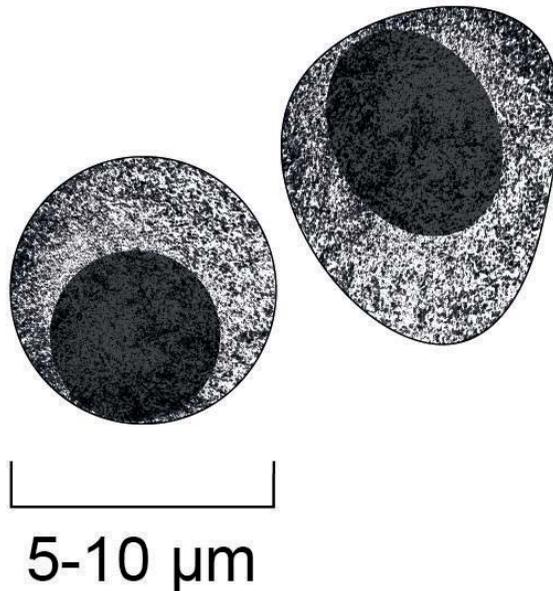


Abbildung 7: Graphik der Morphologie der Pferdelymphozyten (modifiziert nach Liebich, 2010)

Im Gegensatz zu Wiederkäuern, Kaninchen und Geflügel weist das Pferd kein lymphozytäres Blutbild auf (Smollich und Michel, 1992): Auch beim Pferd unterscheidet man im Blutausstrich zwischen großen (bis 25 μm), mittelgroßen (10-18 μm) und kleinen (5-10 μm) Lymphozyten (Liebich, 2010). Ihre Oberfläche verändert sich je nach Funktionszustand von glatt bis zu einer unregelmäßig geformten Fläche, welche mit plumpen kurzen Fortsätzen bestückt ist. Der Zellkern ist sehr heterochromatinreich, so dass der Nucleolus oft nur noch unter dem Elektronenmikroskop sichtbar ist: Er besitzt eine oft tiefe Einkerbung, in der sich hin und wieder kleine Granula sammeln. Bei den großen Lymphozyten erscheint der Zellkern weniger dicht, wobei unter elektronenmikroskopischer Betrachtung zwei Zentriolen mit umgebenden Golgi-Komplex erkennbar sind (Hees und Tschudi, 1990).

Ihren Namen *basophile Rundzelle* verdanken die Lymphozyten der Ausprägung ihres

runden Zellkerns und der hohen Dichte an Polyribosomen, rauem ER und Ribosomen, wodurch sich das Zytoplasma leicht basophil anfärbt (Liebich, 2010).

Nur immunologische Techniken erlauben die weitere Differenzierung zwischen B- und T-Lymphozyten. Die Lebenszeit der Lymphozyten variiert von Stunden bis hin zu Jahren: Gedächtniszellen *memory cells* haben ein besonders langes Leben (Hees und Tschudi, 1990; Liebich, 2010).

2.3.3.5. Monozyten

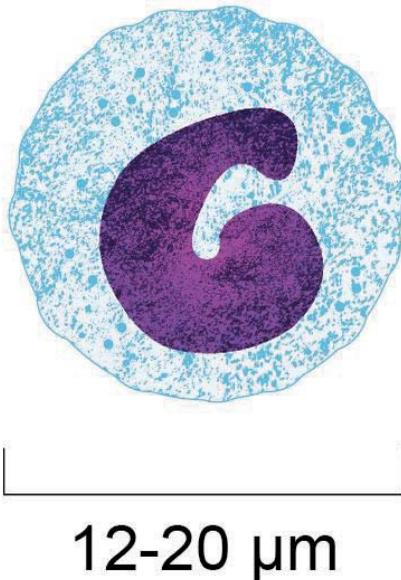


Abbildung 8: Graphik der Morphologie des Pferdemonozyten (modifiziert nach Liebich, 2010)

Als reife Zellen sind Monozyten, die zu den Agranulozyten gezählt werden, die größten

aller im Blut zirkulierenden Leukozyten und erreichen eine Größe von bis zu 20 µm. Jedoch machen sie nur 2-10% der Gesamtpopulation zirkulierender weißer Blutzellen aus. Charakteristisch ist neben dem nierenförmig eingezogenen Kern das Auftreten azurophiler Granula, bei denen es sich um Lysosomen handelt (Liebich, 2010). An der Bildung der Lysosomen ist ein gut entwickelter Golgi-Apparat beteiligt. An der Oberfläche der Monozyten kommen Mikrovilli vor. Unter der Zellmembran finden sich zahlreiche pinozytotische Bläschen (Junqueira und Carneiro, 1996).

2.4. Funktion der Blutzellen

2.4.1. Erythrozyten

Der Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid mittels Hämoglobin stellt eine der Hauptaufgaben der Erythrozyten dar. Die roten Blutkörperchen enthalten in hoher Konzentration den roten Farbstoff Hämoglobin. Rund 95% der Trockensubstanz sind Hämoglobin. Aufgrund der hohen reversiblen Bindungskapazität des Hämoglobinmoleküls sind die Erythrozyten in der Lage, molekularen Sauerstoff in der Lunge zu binden und in periphere Gewebe zu transportieren. Auch der Rücktransport von Kohlendioxid gehört zu ihren Aufgaben. Das arterielle Blut verdankt seine hellrote Farbe daher dem Gehalt an Oxyhämoglobin, während die dunkelrote Farbe des venösen Blutes aufgrund des reduzierten Hämoglobins zustande kommt (Liebich, 2010). Da Erythrozyten weder Zellkern noch Zellorganellen besitzen, haben sie auch keine Möglichkeit zur Proteinsynthese: Ihr Hämoglobin wird in den Vorstufen der Erythrozyten synthetisiert (Junqueira und Carneiro, 1996). Methämoglobin, das keinen Sauerstoff binden kann, steht als Radikalfänger immer wieder im Forschungsinteresse des Pferdesports: Nach längerem Training von 20 Hengsten wurde ein Anstieg der Methämoglobinkonzentration nachgewiesen. Es wurde herausgefunden, dass sich trotz angemessener Ernährung der Gehalt an alpha-Tocopherol und die Glutathionperoxidaseaktivität in Erythrozyten mit fortschreitendem Training verringern und somit die Erythrozyten ein geringeres Radikalfängerpotential aufweisen (Avellini et al., 1995).

Glukose stellt die alleinige Energiequelle für Erythrozyten dar. 90% davon werden im Erythrozyten unter Bereitstellung von ATP zu Lactat und die restlichen 10% werden ohne

Energiegewinn über den Hexosemonophosphatweg abgebaut (Junqueira und Carneiro, 1996).

2.4.2. Thrombozyten

Um Störungen der Hämodynamik entgegen zu wirken und um die Transportfunktion des Blutes gewährleisten zu können, halten unter anderen Thrombozyten das diffuse biologische Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Fibrinolyse aufrecht. Neben den Blutplättchen als zelluläre Komponente führen Plasmafaktoren wie Fibrinogen (Faktor 1), Prothrombin (Faktor 2), Gewebethromboplastin (Faktor 3) und Kalzium (Faktor 4) nach Läsion der Gefäßwand zur reflektorischen Vasokonstriktion, zur Auslösung des Gerinnungsvorgangs und zur Aktivierung der Blutgerinnungskaskade. Wird eine Gefäßwand verletzt, werden spontan aus den Granula der Thrombozyten vasokonstriktorische Substanzen wie Serotonin und Katecholamine freigesetzt, wodurch das Gefäßlumen verengt und der Blutstrom verlangsamt wird. Thrombozyten, welche aufgrund physiologischer elektrostatischer Abstoßung nicht am Endothel anhaften, binden sich nach mechanischem Verlust des Endothels an freiliegende Kollagenfasern. Durch Aggregation mit anderen Thrombozyten und Ausbildung von Pseudopodien formen die Blutplättchen einen Gefäßpfropf. Dieser Thrombus wird durch plasmatische Faktoren stabilisiert. Ein Phospholipid, welches als Faktor 3 bezeichnet wird und in den Granula enthalten ist, wird nun freigesetzt und aktiviert Thromboplastin. Dieses wandelt bei Anwesenheit von Kalziumionen enzymatisch Prothrombin zu Thrombin um. Thrombin wandelt Fibrinogen in Fibrin um, welches kurzfristig ein fädiges, noch lösliches Netzwerk entwickelt, das anschließend zu einem festen Fibrinpolymer verknüpft wird. In diesem Fasernetz bleiben Thrombozyten und andere Blutzellen hängen, welche gemeinsam einen stabilen Thrombus aufbauen (Liebich, 2010).

2.4.3. Leukozyten

Im Gegensatz zu Erythrozyten und Thrombozyten besitzen Leukozyten immer einen Kern und Organellen. Die Blutbahn benutzen sie als Transitstrecke zur schnelleren Fortbewegung: Sie verlassen sowohl unter physiologischen als auch unter entzündlichen Bedingungen den Blutstrom, indem sie via Leukodiapedese die Kapillarwand

durchwandern. In der extrazellulären Matrix des Bindegewebes bewegen sie sich dann amöboid vorwärts und üben dort ihre Funktion aus (Hees und Tschudi, 1990).

Leukozyten sind an der humoralen und zellulären Abwehr des Körpers maßgeblich beteiligt: Da sie die Fähigkeit zur Phagozytose innehaben, werden sie auch als Mikrophagen bezeichnet. Insgesamt befinden sich deutlich mehr Leukozyten im Gewebe als im Blutstrom. Im Gewebe bewegen sie sich amöboid fort: Neutrophile Leukozyten haben beispielsweise eine Fortbewegungsgeschwindigkeit von 19-36 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Junqueira und Carneiro, 1996).

2.4.3.1. Neutrophile Granulozyten

Der weitaus größte Teil der neutrophilen Granulozyten befindet sich im Knochenmark. Nur 1/10 aller neutrophilen Granulozyten sind im Blutstrom oder in Geweben zu finden. Liegt eine akute Entzündung vor, treten nach kompletter Entleerung des Speicherpools im Knochenmark vermehrt unreife stabkernige Neutrophile aus dem Knochenmark in das Blut über. In diesem Fall spricht man von einer Linksverschiebung des granulozytären Differentialblutbildes. Neutrophile Granulozyten werden durch Chemotaxis aufgrund chemischer Reize angezogen, verlassen die Blutbahn und setzen den Inhalt ihrer Granula frei. Die folgende unspezifische Kaskade zellulärer Abwehrreaktionen führt unter anderem zur Leukotaxis, bei der weitere neutrophile Granulozyten angelockt werden (Liebich, 2010).

Die Aktivität neutrophiler Granulozyten im Vergleich zwischen 19 trainierten und untrainierten Hengsten zeigte laut der Pearson Analyse eine Korrelation zwischen der zirkulierenden Adrenalinkonzentration und dem oxidativen Stoffwechsel neutrophiler Granulozyten: Direkt nach dem Training stiegen die Werte beider an (Escribano et al., 2005). Raidal und Kollegen beobachteten zudem, dass moderate Bewegung die neutrophile Phagozytosefähigkeit und die oxidative Stoffwechselaktivität bei Pferden Stunden nach dem Training, jedoch nicht unmittelbar nach dem Training, verbesserte (Raidal et al., 2001).

Auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten stieg laut einer Studie von Donovan und Kollegen 6 bis 24 Stunden nach Training signifikant an. 24 Stunden nach dem Training lag eine offensichtliche Leukozytose vor: Eine Neutrophilie war nach Belastung 6 Stunden lang messbar. Die Apoptoserate

neutrophiler Granulozyten war bis zu 3 Tagen nach dem Training verringert. Daraus kann geschlossen werden, dass kontinuierliches Training die Aktivität equiner neutrophiler Granulozyten und Funktionen des Immunsystems bis zu 3 Tage nach Belastung verändern kann (Donovan et al., 2007).

2.4.3.2. Eosinophile Granulozyten

Die Granula equiner eosinophiler Granulozyten sind besonders groß. Sie weisen keine kristalloide Innenstruktur auf, wie es u.a. bei Hund und Katze der Fall ist. Eosinophile sind zur amöboiden Eigenbewegung und zur Phagozytose befähigt. Zu einer Vermehrung der eosinophilen Granulozyten im Blut (Eosinophilie) kommt es bei IgE abhängigen Allergien und Parasitosen (Liebich, 2010). Durch Mediatorstoffe wie Leukotriene aus Mastzellen kommt es zu einer vermehrten Ansammlung der Eosinophilen im Gewebe. Die aktivierten eosinophilen Granulozyten schütten Prostaglandine aus, welche aufgrund einer lokalen Entzündungshemmung oben erwähnte Wirkstoffe blockieren (Liu et al., 2009). Ihre Anzahl kann durch ACTH (adrenokortikotropes Hormon) und Kortikosteroide vermindert werden (Jungi, 2000; Liebich, 2010).

In einer Studie wurde gezeigt, dass equine eosinophile Granulozyten *in vitro* durch Tachykinin (Substanz P) aktiviert werden können und in Folge Superoxidanionen produzieren. Diese Tatsache wird dann interessant, wenn man an durch Substanz P hervorgerufene organische Effekte, wie zum Beispiel Bronchokonstriktion bei allergischem Asthma, denkt. Neutrophile Granulozyten reagieren nicht auf Substanz P (Foster und Cunningham, 2003).

Bei Allergien und Parasitosen treten sogenannte *hypodense* eosinophile Granulozyten aus, die eine verminderte optische Dichte aufweisen. In einer Studie mit „platelet activating factor“ konnte gezeigt werden, dass ein einziger Mediator in der Lage ist, diesen Zustand der Eosinophilen auszulösen (Yukawa et al., 1989).

Helminthen beispielsweise sind in der Lage, das Komplementsystem auf alternativem Wege zu aktivieren, indem sich das Komplementfragment C3b an ihre Oberfläche heftet. Eosinophile besitzen C3b-Rezeptoren, so dass es zu einer Bindung an diese kommt. In der Folge schütten diese den Inhalt ihrer Granula aus und es kommt zur Bildung toxischer Sauerstoffradikale, was zur Abtötung der Helminthen führt (Saloga et al.,

2006).

Das Verhalten eosinophiler Granulozyten spricht zudem als Indikator für die Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Korrelation. Als übergeordnetes Organ steuert die Hypophyse durch ACTH (adrenocorticotropes Hormon) die Nebennierenrinde, welche aufgrund von ACTH Stimulation Kortikosteroide abgibt und dadurch einen Eosinophilenabfall bewirkt. Beim Pferd besteht eine starke Korrelation zwischen der Tageszeit und den eosinophilen Granulozyten im Blut: Bis 14.00 Uhr fällt die Anzahl der Eosinophilen ab, steigt dann wieder langsam bis 18.00 Uhr und nimmt über Nacht stetig zu, so dass am frühen Morgen um 6.00 Uhr der höchste Wert gemessen werden kann (Kottmann-Jütter, 1973).

2.4.3.3. Basophile Granulozyten

Wie auch andere Granulozyten sind die basophilen Granulozyten amöboid beweglich. Allerdings phagozytieren sie kaum. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Bereitstellung von Leukotrienen, welche schon in kleinsten Mengen als Mediatorstoffe von Entzündungen und allergischen Reaktionen wirken, sowie von Histamin und proteolytischen Enzymen (Junqueira und Carneiro, 1996).

Eine weitere wesentliche Funktion ist die Synthese von Heparin zur Verhinderung der Blutgerinnung. Basophile Granulozyten beinhalten in ihren Granula Histamin und Heparin (Liebich, 2010). Darum werden sie auch als Blutmastzellen bezeichnet (Hees und Tschudi, 1990).

Bei der Tumorentwicklung spielen Mastzellen und auch basophile Granulozyten eine große Rolle: Seit Virchow 1863 berichtete, dass Tumore Entzündungszellen enthalten, hat die Forschung große Fortschritte gemacht, so dass die Beteiligung von Mastzellen und basophilen Granulozyten an der tumorassoziierten Angiogenese und der Gewebeumgestaltung gezeigt werden konnte (Heneberg, 2011).

2.4.3.4. Lymphozyten

Neben den lymphatischen Organen wie Thymus, Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Tonsillen, umfasst das Immunsystem ferner alle Lymphfollikel in nicht lymphatischen

Organen und die Gesamtheit der Lymphozyten und Plasmazellen, die sich in der Zirkulation oder temporär im Binde- oder Epithelgewebe aufhalten. Schematisch lässt sich das Immunsystem in zwei Teile aufgliedern (Hees und Tschudi, 1990): Der unspezifische Anteil besteht aus dem Mikrophagensystem und dem Mononukleären-Phagozytosesystem (MPS), in welchem Granulozyten des Blutes und Makrophagen Phagozytose betreiben. Der zweite, spezifische Anteil umfasst die eingangs erwähnten lymphatischen Einrichtungen und die zahlreichen unterschiedlichen Effektorfunktionen (Storey und Jordan, 2008).

Das wichtigste Merkmal des Immunsystems ist die Immunkompetenz: Dies ist die Fähigkeit von Lymphozyten, bestimmte fremde Moleküle (vor allem Proteine) als Antigene zu erkennen und direkt oder mit Unterstützung von Antigen-Presenting-Cells (APC) darauf eine spezifische Immunantwort zu geben. Die erst während der Ontogenese kompetent werdenden Lymphozyten werden bei ihrer Immunantwort durch Makrophagen unterstützt.

Es gibt zwei Hauptklassen der Lymphozyten des adaptiven Immunsystems: T-(Thymus)-Lymphozyten und B-(Bone marrow)-Lymphozyten. Durch das B-Zellsystem wird eine humorale Immunantwort ausgelöst, da aus ihm antikörperbildende Plasmazellen entstehen. T-Lymphozyten sind dagegen von antigenpräsentierenden Zellen abhängig. Antigene können von T-Lymphozyten nur erkannt werden, wenn sie in Verbindung mit Klasse I MHC Molekülen auf Zellen präsentiert werden (Dudek, 2012).

Die humorale Antwort erfolgt über sezernierte Antikörper, welche durch die Bindung an das spezifische Antigen Abwehrprozesse in Gang setzen. Dadurch ist die humorale Immunität durch Serum passiv auch auf andere Individuen übertragbar (Friess und Schlüns, 1990).

Unter der zellulären Antwort versteht man sensibilisierte Lymphozyten, welche mit spezifischen Rezeptoren ausgestattet sind, so dass sie direkt an das Antigen binden und es eliminieren können (Dudek, 2012).

T- und B-Lymphozyten wandern in die Peripherie aus und wandern zwischen den lymphatischen Organen, anderen Geweben und dem Blut hin und her. Ermöglicht wird ihnen das durch den HEPF (high endothelial binding factor) (Woodruff et al., 1987).

Die Anzahl an Lymphozyten des peripheren Blutes spielt beim Pferd bezüglich der Ausprägung des gesunden Immunsystems eine erhebliche Rolle: Jungen Pferde mit schwerer kombinierter Immundefizienz fehlen fast alle Lymphozyten. Sie weisen aber

eine normale Anzahl von Monozyten und neutrophilen Granulozyten auf. Nur 0-3% der weißen Blutkörperchen sind bei immundefizienten Pferden Lymphozyten, wobei die gesunde Vergleichsgruppe 20-50% Lymphozyten aufweist. Obwohl die Vorläuferzellen der Lymphozyten von Pferden mit kombinierter Immunschwäche defekt zu sein scheinen, war kein Mangel anderer zellulärer Produkte des Knochenmarks auffällig (Banks und McGuire, 1975).

2.4.3.4.1. B-Lymphozyten

B-Lymphozyten wandeln sich nach Kontakt mit einem Antigen unter Mitwirkung von T-Helferzellen über das Zwischenstadium der Immunoblasten in Plasmazellen und Gedächtniszellen um. Die Plasmazellen bilden und sondern spezifische Antikörper ab, die in Gewebe und Blut Antigen-Antikörper-Komplexe formen. Diese können dann von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden (Junqueira und Carneiro, 1996). Spezifische Immunglobuline (IgG-Antikörper) werden von den Plasmazellen synthetisiert. Ein Teil der neu gebildeten B-Lymphozyten wird zu B-Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt viel schneller reagieren (Liebich, 2010).

Cluster of Differentiation (CDs) stellen immunphänotypische Oberflächenmerkmale dar: Diese Glykoproteine befinden sich auf der Oberfläche von Immunzellen (<http://www.vetmed.wsu.edu/tkp/search.aspx>, 2009). Für den B-Zellbereich sollen hier beispielhaft Befunde über die Rolle von CD5 und CD38 erwähnt werden. CD38 ist nicht nur ein Marker für bestimmte Untergruppen der Lymphozyten, sondern CD38 hat eine apoptotische Wirkung auf unreife B-Zellen und ist in die B-Lymphozyten-Aktivierung und Regulation der Plasmazellen involviert (Vences-Catalán und Santos-Argumendo, 2011). CD5 hat einen negativen Einfluß auf die Ausbildung von CD4 und spielt damit eine Rolle bei der Thymozytenselektion (Berland und Wortis, 2002).

2.4.3.4.2. T-Lymphozyten

Innerhalb des Thymus erhalten die T-Lymphozyten ihre Immunkompetenz. Nach Auswanderung aus dem Thymus sind sie für die zelluläre Immunität verantwortlich.

Nach dem ersten Antigenkontakt verändern sie sich zu Effektor- oder Gedächtniszellen. Funktionell unterscheidet man zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, T-Gedächtniszellen und sogenannte T-Killerzellen (Liebich, 2010).

Zytotoxische Zellen erkennen Fremdantigene auf infizierten Zellen und töten diese ab. Nach direktem Kontakt von 10 bis 15 Minuten mit der Zielzelle hat die zytotoxische Zelle die Zielzelle zerstört (Jungi, 2000). T-Helferzellen produzieren Mediatoren in Form von Proliferation stimulierenden Lymphokinen (z.B. IL-2 und Macrophage Inhibiting Factor MIF) und regen somit auch nicht-lymphatische Zellen wie Makrophagen an. T-Unterdrücker- oder T-Suppressorzellen verhindern überschießende Immunantworten von B- und T-Zellen. Natürliche Killerzellen können im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen MHC-unabhängig töten (Friess und Schlüns, 1990). Diese Zellen haben zwei unterschiedliche Funktionen: Sie besitzen eine immunaktivierende und eine immunsuppressive Komponente. Typ I und Typ II NKT-Zellen weisen diese immunregulatorischer Funktionen auf. In Zukunft wird ein Steuerelement für die Zellfunktion dieser Zellen notwendig sein, um eine effektive Immuntherapie gegen chronische Virusinfektion, Krebs und Autoimmunerkrankungen entwickeln zu können (Ito und Seishima, 2009).

T-Zellen erkennen fremde Antigene nur in Verbindung mit eigenen MHC (major histocompatibility complex)-Molekülen: Zytotoxische T-Zellen reagieren nur in Zusammenhang mit Klasse-I-MHC-Molekülen, T-Helfer-Zellen dagegen nur mit Klasse-II-MHC-Molekülen (Friess und Schlüns, 1990).

Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie etwa dendritische Zellen (DCs), haben die Funktion, Antigene aufzunehmen und zu verarbeiten, bis sie diese dann CD4+ und CD8+ T-Zellen mithilfe von MHC-Klasse-II- und MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren (Ahmed et al., 2012).

Die Funktion zytotoxischer T-Zellen wird durch Interaktionen zwischen Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen gewährleistet. Jedoch sind die entsprechenden spezifischen Signale an die DC-CD4+ T-Zell-, DC-CD8+ T-Zell- und CD4+ CD8+ T-Zell-Schnittstellen im Detail noch nicht bekannt. Ahmed und Kollegen (2012) sind der Ansicht, dass dendritische Zellen (DCs) zunächst mit CD4+ T-Zellen interagieren. Danach können CD8+ T-Zellen stimulierende Signale von DC-CD4+ T-Zellcluster empfangen (Ahmed et al., 2012).

Nicht aktivierte CD4+ T-Zellen sondern große Mengen von L-Selektin ab, damit T-Lymphozyten den Weg zurück in den Lymphknoten finden. Im Unterschied zu den nicht

aktivierten CD4+ T-Zellen beinhalten CD4+ Gedächtniszellen wenig L-Selektin, dafür zahlreiche Adhäsionsmoleküle, welche eine Rolle bei der transendothelialen Einwanderung und bei Entzündungsvorgängen spielen. Während nicht aktivierte naive CD4+ T-Zellen zwischen Blut und lymphatischen Organen zirkulieren, wandern die CD4+ Gedächtniszellen nur durch nicht-lymphatische Gewebe (Davis et al., 1999).

Das CD2-Molekül auf den T-Zellen stellt bei Kontakt zwischen Erythrozyten und T-Lymphozyten die Grundlage für die Bildung von Rosetten dar: Studien bezüglich der Rosettenbildung können dazu beitragen, auf der Zelloberfläche das spezifische Antigen zu dem entsprechenden monoklonalen Antikörper unter labortechnischen Bedingungen zu isolieren (http://www.immbio.hu/de/edu/lymphozyten_isolation.doc, 2010). Als 1981 die optimalen Bedingungen der Rosettenbildung mit Pferdeblut untersucht wurden, kombinierte man das Blut von 36 Pferden mit den Erythrozyten verschiedener Spezies. T-Lymphozyten waren darunter die stärksten Rosetten-bildenden Zellen und bildeten zu 44,4% der Rosettenformationen mit Meerschweinchen-Erythrozyten. Wurden Fohlen Rhinopneumonitis-Viren injiziert, zeigten sie eine Erhöhung des Anteils der rosettenbildenden T-Lymphozyten (Amirbekov, 1981).

2.4.3.5. Monozyten

Nach Verlassen des Knochenmarks zirkulieren die Monozyten 1 bis 2 Tage im peripheren Kreislauf und wandern dann in das Bindegewebe aus. Nach Verlassen der Blutbahn differenzieren sie zu Makrophagen aus. Trotz ihrer potentiell großen Bewegungsfähigkeit werden sie zu verschiedenen ortsfesten Makrophagen, z.B. im Knochenmark, in den Lebersinusoiden, den Lungenalveolen und den lymphatischen Organen. Sie zeichnen sich durch eine große Phagozytosefähigkeit aus (Hees und Tschudi, 1990). Diese Funktion macht Monozyten zu einem wichtigen Bestandteil des mononukleären Phagozytensystems (MPS) (van Furth et al., 1972). Zum MPS gehören alle Makrophagen des Organismus, ihre Vorläufer im Blut, die Monozyten und ihre Vorstufen im Knochenmark (Friess und Schlüns, 1990).

Die Peroxidase als wichtiges Markerenzym der Monozyten kann im Golgi-Apparat und in ihren Granula nachgewiesen werden (Friess und Schlüns, 1990).

Monozyten spielen bei der Rezidivierenden Atemwegsobstruktion (RAO), welche eine häufige entzündliche Erkrankung von auf Heustaub empfindlichen Pferden darstellt und

in Folge zu Leistungseinbußen führt, eine große Rolle: Der Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) wird als wichtiger Regulator der Energiehomöostase und der zellulären hypoxischen Anpassung angesehen. In jüngerer Zeit wird der HIF jedoch als wesentlicher Regulator der angeborenen Immunantwort angesehen. HIF1- α wurde bei Pferden mit rezidivierenden Atemwegobstruktionen in equinen myeloischen Zellen, wofür als Modell equine Monozyten verwendet wurden, nachgewiesen. HIF wird in equinen myeloischen Zellen nach einer Stimulierung mit Heustaub exprimiert und reguliert u.a. den Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α), Interleukin-8 (IL-8) und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (VEGF -A) (Toussaint et al., 2012).

Da neugeborene Fohlen anfälliger auf Infektionen opportunistischer Erreger wie *Rhodococcus equi* reagieren als adulte Pferde, wurden die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDC) von Fohlen und erwachsenen Pferden verglichen. Die Konzentrationen von TNF- α , IL-10, MCP-1 und TGF- β waren in den Fohlen-Zellen niedriger. Man vermutet, dass das Fehlen von IFN- γ bei Fohlen nicht aufgrund der verringerten Spiegel von IL-12, IL-15 oder IL-18, sondern mit der geringen Konzentration von TNF- α zusammenhängt. Somit wäre die stärkere Empfänglichkeit der Fohlen für Infektionskrankheiten zu erklären (Mérant et al., 2009).

Auch bei durch *Streptococcus equi* hervorgerufenen Erkrankungen der Pferde haben Monozyten/Makrophagen eine Transportfunktion inne. Sie dienen als Vehikel für den Transport der Antigene von Tonsillen zu lokalen Lymphknoten (Mérant et al., 2011).

3. Glykohistochemie

3.1. Eigenschaften und Funktionen der Lektine als glykohistochemische Marker

Lektine als zuckerbindende Proteine sind in der Lage, Zellen zu agglutinieren und Glykokonjugate zu präzipitieren (Sengbusch, 2004).

Seit 1954 gilt eine neue Definition des Begriffs Lektin: W.C. Boyd gab den blutgruppenspezifischen Proteinen die Grundlage für eine neue Ausformulierung. Ihn störte die Tatsache, dass jede Substanz, die als Antwort auf ein Antigen erzeugt wird als Antikörper bezeichnet wurde, selbst wenn ein Protein, das kein Antikörper ist, eine spezifische Kombination mit einem bestimmten Antigen eingeht (Boyd, 1954). Schließlich ist die Lektinsynthese im Vergleich zur Antikörpersynthese nicht induzierbar und Antikörper können gegen jegliche Determinante gerichtet sein, wogegen Lektine nur auf ein

bestimmtes, relativ eng begrenztes Zuckermolekülsortiment reagieren (Sengbusch, 2004). Darum führte Boyd den Begriff *Lectin* ein, abgeleitet vom lateinischen Verb *legere*, welches so viel bedeutet wie wählen oder heraussuchen (Boyd, 1954).

Pflanzliche Lektine haben die Eigenschaft, ganz spezifische Zucker zu binden. Aufgrund der darauffolgenden Agglutination, hat es sich eingebürgert, ein A für Agglutination in die Namensgebung pflanzlicher Lektine anzugeben. Oft binden sie mit abgestufter Selektivität bestimmte Oligosaccharide, abgesehen von ihrer Monosaccharid-Spezifität, die im basalen Bereich der Ligandenstruktur interagiert (Harold und Gabius, 2009). Lektine müssen wenigstens zwei Zuckerbindungsstellen besitzen, da anderenfalls ihr Agglutinations- bzw. Präzipitationsvermögen nicht gegeben wäre: Sie bestehen zumeist aus zwei, vier oder mehr gleichartigen Untereinheiten. Das Mono- oder Oligosaccharid, welches kompetitiv inhibierend auf das Agglutinationsvermögen wirkt, bestimmt die jeweilige Spezifität des Lektins (Sengbusch, 2004).

Bemerkenswert ist, dass die Affinität eines Lektins zu Makromolekülen oder Zellen weitaus größer ist als zu den einzelnen Zuckern. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass es bei der Ligandenbindung nicht nur auf Kohlenhydratanteile ankommt, sondern auch zusätzliche unspezifische Wechselwirkungen den Komplex stabilisieren. Eine Reihe von Lektinen wie z.B. RCA, PNA und SBA haben beispielsweise eine Affinität zu *beta*-D-Galactosylresten, wobei sie allerdings auffällige Unterschiede in ihrem Bindungsvermögen zu bestimmten Glykoproteinen oder Zellen aufweisen. Kohlenhydrate an der Molekül- oder Zelloberfläche in sterischer Lage müssen für das Lektin zugänglich sein, um eine Bindung zu ermöglichen: Diese lektinbindenden Moleküle werden aufgrund dieser strukturellen Komplexität der Liganden als Lektinrezeptoren bezeichnet (Sengbusch, 2004).

In der medizinischen Grundlagenforschung spielen Lektine mittlerweile eine wichtige Rolle. Durch den Einsatz markierter Lektine können bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente charakterisiert, verschiedene Phasen des Zellzyklus markiert und die unterschiedlichen Zelltypen affinitätschromatographisch voneinander getrennt werden (Sengbusch 2004). C-Typ Lektine sind beispielsweise in der humanen adaptiven Immunantwort von Bedeutung: Unter anderem wird HIV-1 vom C-Typ Lektin DC-SIGN erfasst und auf die T-Zellen übertragen (Geijtenbeek, 2011). Auch bei der Übertragung wichtiger menschlicher Krankheitserreger wie *Streptococcus pneumoniae*, der Lungenentzündung, Sepsis und Meningitis verursacht, spielen Lektine wie das Mannose bindende Lektin MBL eine Rolle (Ali, et al., 2012). Lektine wie PHA, Con A und PWM interagieren mit IVIg, wobei IVIg einen direkten Effekt auf aktivierte T- oder B- Zellen in

Bezug auf Hemmung der Proliferation, der Zytokinsekretion und -expression von Aktivierungsmarkern wie CD25 oder CD69 oder Immunglobulinsekretion hat (Padet et al., 2011).

3.2. Bisherige glykohochemische Untersuchungen an Blutzellen des Pferdes

Vor allem in der Forschung, aber auch zur Hilfe bei Diagnostik verschiedenster Krankheitsbilder, werden Lektine in der Pferdemedizin erfolgreich und zum Teil schon routinemäßig eingesetzt.

Das Forschungsteam von Duk verglich die Bindungsfähigkeit des radioaktiv markierten *Vicia graminea* Lektins an humanen und an equinen Erythrozyten, unter Einfluß unterschiedlicher pH Werte (pH 6-10). Die Bindung des Lektins an unbehandelte menschliche Erythrozyten verstärkte sich mit Erhöhung des pH Wertes von 6 auf 8. Bei den desialysierten Pferderothrozyten dagegen sank die Bindungsfähigkeit mit dem *Vicia graminea* Lektin in Abhängigkeit von der pH-Wert-Erhöhung (pH 6-9,5). Die Unterschiede der pH-Wert-Abhängigkeit der *Vicia graminea* Lektin-Bindung an humane und equine Erythrozyten gründet laut Duks Forschungsergebnissen auf der Anwesenheit von Aminogruppen in Rezeptoren von humanen Erythrozyten und ihrer Abwesenheit von Rezeptoren in Pferdeerythrozyten (Duk und Lisowska, 1984).

Das *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA), welches aus der Pferdebohne gewonnen wird und als Futtermittelbestandteil in asiatischen Ländern und in ländlichen Gebieten Indiens verwendet wird, wurde als erstes Futtermittellektin auf seine Wirkung hinsichtlich der Degranulierung von Mastzellen und Basophilen atopischer Pferdepatienten untersucht. Mittels Haut-Prick-Test (SPT) wurde die Reaktion der Testpferde auf DBA festgestellt und deren DBA-spezifische IgE Ausschüttung wurde mittels ELISA und Dot-Blot gemessen. Unter Verwendung der Leukozyten wurde zusätzlich ein Histaminfreisetzung (HR)-Assay angefertigt. In der atopischen Pferdegruppe waren 10 der 48 Patienten positiv auf DBA, wobei in der nicht-atopischen Gruppe (n=20) keines der Pferde eine Reaktion auf DBA zeigte. Somit ist das DBA mit einer Allergiehäufigkeit von 21% das erste identifizierte Allergen des Krankheitsbildes Futtermittelallergie beim Pferd (Pramod et al., 2006).

In den Achtziger Jahren fand man heraus, dass pflanzliche Lektine in Verbindung mit bakteriellen Infektionen bzw. vorausgegangenem Erregerkontakt zur Immunreaktion führen können: Blutproben gesunder Pferde und Ponys wurden in Verbindung mit

Phytohämagglutinin und dem M-Protein eines typischen *Streptococcus equi* Stamms auf ihre Lymphozytenreaktion getestet. Man fand heraus, dass bei älteren Pferden nach 72-96 Stunden Inkubationszeit eine höhere Lymphozytenstimulation stattfindet als bei Fohlen oder jüngeren Tieren. Auffällig hohe Stimulationsstufen bei erwachsenen Pferden führte man entweder auf die Reaktion unspezifischer M-Protein-Stimulation im Vorfeld oder auf vorherige *Streptococcus equi*-Exposition dieser Tiere zurück (Srivastava und Bamum, 1982).

4. Immunzytochemie

4.1. Definiton und Anwendung

Die Darstellung antigener Strukturen in Zellen von Zellausstrichen mittels markierter Antikörper wird als Immunzytochemie bezeichnet (Pschyrembel, 2014).

4.2. Technik

Bei der Immunzytochemie werden direkte und indirekte Methoden unterschieden: Wird ein markierter Antikörper auf die histologischen Proben aufgetragen und bindet dort das zugehörige Antigen, spricht man von der direkten Methode. Bei der indirekten Methode wird die Empfindlichkeit des Nachweises erhöht: Im ersten Schritt wird ein gegen das nachzuweisende Antigen gerichteter Antikörper aufgetragen. Im zweiten Schritt wird der Schnitt mit einem zweiten, markierten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, inkubiert (Hees und Sinowatz, 2000).

Als Immunfluoreszenz bezeichnet man den Vorgang, wenn die Markierung der Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff (beispielsweise Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder Rhodamin) geschieht: Dieser fluoresziert bei einer definierten Wellenlänge des Lichts (Denk, 1989).

Erfolgt die Markierung mit Enzymen, nennt man dies immunenzymatische Methode. Häufig werden hierfür die alkalische Phosphatase aus *E.coli*, die Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* oder die Meerettich-Peroxidase verwendet: Während diese Enzyme ihr spezifisches Substrat, beispielsweise Wasserstoffperoxid bei der Peroxidase, umsetzen, entsteht aus dem Chromogen, beispielsweise Diaminobenzidintetrahydrochlorid, ein sichtbarer, farbiger Komplex (Pearson, 1980). Bei dem Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (PAP-Komplex) oder dem Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex (APAAP-Komplex) liegt ein etwas anderes System zugrunde: Ein Enzym wird an

einen entsprechenden Antikörper gebunden, darauf wird der primäre Antikörper durch einen Brücken-Antikörper mit dem Enzym-Antikörper verbunden. Man spricht von der Enzym-Antienzym-Komplex-Methode (Denk, 1989).

Eine weitere Markierungsmöglichkeit stellt kolloidales Gold dar. Lange Zeit ausschließlich in der Elektronenmikroskopie eingesetzt, da das Gold dort eine sehr genaue und leicht detektierbare Lokalisierung des Antigens erlaubt, erzeugt die alleinige Immungoldmarkierung in der Lichtmikroskopie nur eine schwache Rotfärbung im Gewebe. Diese Färbung ist dann nur bei hohen Antigen- oder Antikörperkonzentrationen erkennbar. Eine entscheidende Verbesserung der Empfindlichkeit erreicht man durch Silberverstärkungstechniken: Das Silber vergrößert durch Anlagerung die Größe Goldpartikel und verursacht eine schwarzbraune Färbung, die sich im herkömmlichen Durchlicht-Hellverfahren deutlich sichtbar macht (Mulisch und Welsch, 2010).

Im Vergleich zu einer „herkömmlichen“ Immunmarkierung erhält man über die (Strept)Avidin-Biotin-(ABC)-Technik ein deutlich verstärktes Signal: Avidin (Protein aus Hühnereiweiß) und Streptavidin (Protein aus *Streptomyces avidinii*) haben beide eine hohe Affinität für Biotin. Für die Immunmarkierung kann ein biotinylierter Primärantikörper im Rahmen der direkten Methode oder ein biotinylierter Sekundärantikörper (indirekte Methode) verwendet werden. Der Komplex besteht aus sehr vielen markierten Biotinmolekülen: Nach Antikörperinkubation wird er auf das Präparat gegeben und bindet an den biotinylierten Antikörper. Avidin dient dann als Brücke zwischen dem Antikörper und einer Peroxidase (Mulisch und Welsch, 2010).

4.3. Immunzytochemische Differenzierung von Lymphozyten

Hauptträger humoraler Abwehr sind die B-Lymphozyten anhand ihrer Fähigkeit, Antigene zu erkennen und Antikörper zu produzieren. T-Lymphozyten agieren je nach Struktur ihres T-Zellrezeptor unterschiedlich: $\gamma\delta$ -T-Zellen reagieren auf Hitzeschock- und Stressproteine. Die $\alpha\beta$ -T-Zellen lassen sich in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen einteilen. Gedächtniszellen gibt es sowohl bei B- als auch bei T-Lymphozyten, die bei wiederholtem Antigenkontakt eine schnellere und spezifischere Immunantwort ermöglichen (Tizard, 2000).

Im Grunde gibt es abgesehen von minimalen Differenzen keine eindeutigen Unterscheidungsmerkmale morphologischer Art zwischen B- und T-Lymphozyten. In höherer Zahl sind lange Mikrovilli an der Oberfläche der B-Lymphozyten zu sehen, wobei T-Lymphozyten eine anscheinend glattere Oberfläche mit nur kurzen Mikrovilli

aufweisen (Bier et al., 1979). Eine sichere Differenzierung ist aber erst mit Hilfe spezifischer CD-Antikörper möglich. Eine wichtige Erweiterung des Wissens auf diesem Gebiet lieferte 1991 der „First Equine Leucocyte Antigen Workshop“ in Cambridge, England. Hier wurde den Antigenen EqCD2, EqCD4, EqCD5, EqCD8, EqCD11a/CD18 (LFA-1), EqCD13, EqCD44, EqMHC Klasse 1 und EqMHC Klasse 2 Antikörper zugeordnet. „CD“ steht für die beim Menschen üblich angewendete Einteilung „cluster of differentiation“ und „eq“ definiert Pferd als Tierart. Außerdem schafften sie es, Marker für die bisher unbekanntes T-Zell-Subpopulationen, B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen zu definieren (Kydd et al., 1994).

Vier Jahre später wurden auf dem „Second Equine Leucocyte Antigen Workshop“ (ELAW II) in Kalifornien 113 Antikörper definiert, die von WS1 bis WS113 durchnummeriert wurden (Lunn et al., 1998). 2001 befasste sich die „Equine Immunology“ - Konferenz in New Mexiko mit der Zytokin-Klassifizierung des Pferdes, der Klonierung von Zytokinen, der Etablierung von Antikörpern gegen Zytokine und dem PCR-Verfahren zum Nachweis equiner mRNA (Marti et al., 2003).

Christian Umlauf stellte im Jahre 2004 im Rahmen seiner Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München insgesamt 78 monoklonale Maus-anti-Pferd-Antikörper her, wovon 12 spezifische Bindungen an Leukozyten und deren Subpopulationen eingingen. Zudem etablierte er Marker für Granulozyten und spezifisch an T- und B-Lymphozyten bindende Antikörper. Anhand von Durchflusszytometrie charakterisierte er die Antikörper, ermittelte das Molekulargewicht der Liganden durch Immunpräzipitation und bestimmte die Subklassen der monoklonalen Antikörper mittels ELISA. Umlauf kam in seiner Arbeit zu dem Ergebnis, dass die mAK 4-13, 4-58 und 5-50 als T-Zell-Marker in Betracht kommen und mAK 1-19, 2-52, 4-36, 4-55 und 6-39 an B-Lymphozyten binden (Umlauf, 2004).

Im Ergebnisteil dieser Forschungsarbeit kamen Umlaufs hergestellte monoklonale Antikörper in der Immunzytochemie zum Einsatz.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen wurden Blutproben von 29 Islandpferden verwendet. Davon waren 10 dieser Pferde Fohlen zum Zeitpunkt der Probennahme im Alter von 1-6 Monaten, weitere 10 Tiere 7-12 Monate alt und die restlichen 9 Islandpferde waren adult und älter als 5 Jahre. Insgesamt wurden aus 4 Gestüten mit Schwerpunkt Islandpferdezucht in Oberbayern, Niederbayern, Baden-Württemberg und Salzburg Blutproben genommen.

Die Blutprobennahme erfolgte nach Desinfektion aus der *Vena jugularis* mit einer Kanüle (1,2 x 40mm) und EDTA-Röhrchen des Labors Laboklin in Bad Kissingen. Dieses Labor fertigte auch die Differentialblutbilder der Tiere an.

Von jedem Pferd wurden 60 Blutausrichtriche auf SuperFrost® Objektträgern angefertigt, die nach Trocknung bei Raumtemperatur entweder zur Hälfte unfixiert in den dafür vorgesehenen Aufbewahrungsboxen gelagert wurden oder nach einer 10minütigen Fixierung in absolutem Methanol als dementsprechend fixierte Proben ebenso in diesen Behältnissen aufbewahrt wurden.

In Tabelle 4 sind die verwendeten Proben mit Nummer, Beschreibung und Alter des entsprechenden Islandpferdes zur Übersicht aufgeführt.

Nummer	Geschlecht	Farbe	Abstammung oder Name	Geburt
Islandpferdefohlen Gruppe 1 (1.-6.Monat)				
1/1	Hengst	Brauner	"Hrimnir vom Burghauserhof"	Mai 2011
1/2	Stute	Rappe	"Hjördis vom Burghauserhof"	April 2011
1/3	Hengst	Fuchs	M:Skettla vom Burghauserhof V:Hrólfur frá Fjallaborg	Mai 2011

1/4	Hengst	Fuchs	M:Draumsun vom Burghauserhof V:Hrólfur frá Fjallaborg	Mai 2011
1/5	Stute	Rappe	M:Oda-Fló vom Burghauserhof V:Hrólfur frá Fjallaborg	Mai 2011
1/6	Stute	Fuchs	M:Snejla vom Burghauserhof V:Hrólfur frá Fjallaborg	Juni 2011
1/7	Hengst	Graufalbe	M:Hnott vom Burghauserhof V:Hrólfur frá Fjallaborg	Juli 2011
1/8	Stute	Rappe	"Idunn vom Törring"	Juli 2011
1/9	Stute	Fuchs	"Kátina vom Törring"	Juli 2011
1/10	Hengst	Falbe	"Salomon vom Burrishof"	April 2011

Islandpferdefohlen Gruppe 2 (7.-12.Monat)

2/1	Wallach	Fuchs	M:Hroyn vom Burghauserhof V:Íðir frá Vatnsleysu	Juli 2010
2/2	Wallach	Fuchs	M:Oda-Fló vom Burghauserhof V:Íðir frá	Juli 2010

			Vatnsleysu		
2/3	Wallach	Rappe	M:Skettla vom Burghauserhof V:Íðir frá Vatnsleysu	vom	Juli 2010
2/4	Stute	Rappe	"Sól Burghauserhof"	vom	Juli 2010
2/5	Hengst	Fuchs	"Leiknir Törring"	vom	September 2010
2/6	Hengst	Fuchs	"Gáski Törring"	vom	August 2010
2/7	Hengst	Fuchs	"Kjammi Törring"	vom	August 2010
2/8	Hengst	Rappe	"Potti Burrishof"	vom	Juni 2010
2/9	Stute	Brauner	"Signy Arbakka"	frá	Juli 2010
2/10	Stute	Brauner	"Lettlynd Burrishof"	vom	Juni 2010
Adulte Islandpferde Gruppe 3 (ab dem 5.Lebensjahr)					
3/1	Stute	Brauner	"Liv Burghauserhof"	vom	Juni 2000
3/2	Stute	Brauner	"Hara di Napoli"		Juni 2000
3/3	Stute	Rappe	"Hekla Burghauserhof"	vom	Mai 2006
3/4	Stute	Fuchs	"Sola Burghauserhof"	vom	Juni 2006
3/5	Stute	Fuchs	"Fiorina Burghauserhof"	vom	Juni 2000

3/6	Stute	Rappe	"Vaka frá Horni"	April 2000
3/7	Wallach	Windfarben	"Thor"	Mai 2002
3/8	Stute	Fuchs	"Gjöf von der Hainbuche"	Mai 1995
3/9	Stute	Schimmel	"Freyja"	Juni 1988

Tabelle 4: Übersicht der beprobten Islandpferde

2. Lichtmikroskopie

Um die verschiedenen Blutzellen besser darstellen zu können, wurden die Blutausstriche 12 verschiedenen Färbungen unterzogen. Jeder einzelne Blutausstrich wurde hierfür nach dem spezifischen Färbvorgang anhand eines Tropfens Eukitt®-Kunststoff eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Aristoplan® Lichtmikroskop der Firma Leitz (Wetzlar), wobei Fotos mit einer Canon-Powershot A 95-Digitalkamera gemacht wurden.

2.1. Diff Quick Färbung

Drei Reagenzien, welche gebrauchsfertig von „Labor + Technik, Berlin“ geliefert werden, sind Hauptbestandteil der Diff Quick® Färbung: Die Fixierlösung, der Xanthen-Farbstoff (Färbelösung 1) und der Thiazin-Farbstoff (Färbelösung 2) färben in diesem Schnellfärbverfahren Zellkerne dunkelblau, die Granula der basophilen Granulozyten violett bis schwarz, die der eosinophilen Granulozyten rot bis orange und die der neutrophilen Granulozyten pink bis violett. Monozyten bekommen durch den Färbvorgang ein hellblaues Zytoplasma und einen violetten Kern. Auch Thrombozyten werden violett gefärbt, so dass das Diff Quick® Verfahren vor allem der Differenzierung einzelner Leukozyten dient.

Folgendes Protokoll ist der Diff Quick® Färbung zugeordnet:

1. *Fixierlösung: Objektträger 5x je 1 Sekunde lang eintauchen und abtropfen lassen*
2. *Färbelösung 1: Objektträger 5x je 1 Sekunde lang eintauchen und abtropfen lassen*
3. *Färbelösung 2: Objektträger 5x je 1 Sekunde lang eintauchen und abtropfen lassen*
4. *Spülen der Objektträger mit destilliertem Wasser*

5. Nach Lufttrocknung der Objektträger Auswertung dieser unter dem Lichtmikroskop

2.2. Giemsa Färbung (nach Romeis, 1989)

Die Giemsa-Lösung der Firma Merck aus Darmstadt enthält Eosin, Methylenblau, -azur und -violett. Methanol und Glycerin werden als Lösungsmittel verwendet. Je 3ml dieser fertig gemischten Stammlösung werden zu 10ml gepuffertem Aqua dest. hinzugefügt, um die richtige Verdünnung für das anschließende Färbegeschehen herzustellen. Ein Charakteristikum der Giemsa-Färbung stellt die Rotfärbung der Zellkerne dar, welche als Romanowsky-Effekt bezeichnet wird. Die Granula der eosinophilen Granulozyten stellen sich braun-rötlich dar, die der Basophilen färben sich blau und die der Neutrophilen haben einen rötlichen Violetttön. Das Plasma von Monozyten und Lymphozyten färbt sich blau. Erythrozyten differenzieren sich durch ihre blassrote Färbung, Thrombozyten sind dagegen blau-violett (Riedelsheimer und Welsch, 2010).

Die Romanowsky-Giemsa-Farbstoffe färben Zytoplasma und Zellkerne der Blutzellen bezüglich ihrer Farbintensität und -ausprägung je nach pH-Milieu: Die rötlich-violette Farbgebung des Kernchromatins nach erfolgreicher Giemsa Färbung kann anhand der einzelnen Eigenschaften von Eosin, Methylenblau und Azur nicht erklärt werden und tritt bei einer aneinandergereihten Applikation nicht auf. Der Effekt ist wahrscheinlich auf die Bindung kationischer Dimere von Azur B an die DNA und die damit verbundene Ladungsneutralisation zurückzuführen. Nur dadurch können Eosin-Anionen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an das bereits gebundene Azur B binden. So kombinieren sich die beiden π -Elektronensysteme der Farbstoffe und es tritt die charakteristische Absorption bei 550nm zu Tage, die man Romanowsky-Giemsa-Effekt oder Polychromasie nennt. Das pH-Milieu ist maßgeblich für das Färberegebnis: Niedrigerer pH ergibt selektiveres Anfärben des Chromatins und eine geringere Basophilie des Zytoplasmas, während ein höherer pH dichtere Kerne anfärbt und eine deutlichere Zytoplasma-Basophilie zeigt (Friedrich et al., 1990).

Folgendes Protokoll beschreibt die Färbung:

- 1. 10 minütige Fixierung der luftgetrockneten Ausstriche in Methanol*
- 2. Nach Lufttrocknung die verdünnte Giemsa-Lösung auftropfen*
- 3. 30 bis 45minütige Färbezeit*
- 4. Färbelösung abgießen und mit gepuffertem Aqua dest. (pH 7,4) spülen*
- 5. Nach Lufttrocknung unter dem Lichtmikroskop auswerten (Riedelsheimer und Welsch, 2010)*

2.3. May Grünwald Färbung (nach Romeis, 1989)

May Grünwald beschreibt die Färbung mit eosinsaurem Methylenblau. Eosin reichert sich in den sauren Granula der eosinophilen Granulozyten an, so dass diese Granula leuchtend rot erscheinen. Da sich das Methylenblau in den basophilen Granula anreichert, erscheinen diese tiefblau bis violett. Es kam eine kommerziell gefertigte Gebrauchslösung zum Einsatz, um eine Standardisierung der Ergebnisse zu erreichen: Alle Zellkerne färben sich hiernach blau, wie beschrieben die Granula der eosinophilen Granulozyten leuchtend rot, die der Neutrophilen hellrot und die der Basophilen dunkelblau. Thrombozyten sind als hellblaue Blutplättchen zu erkennen. Die roten Blutkörperchen erscheinen hellrot (Dörner, 2009).

Die May Grünwald Färbung wird als eine einfache Differentialfärbung für fixierte Blut- und Knochenmarkausstriche verwendet. Die Lösung enthält die Farbstoffe Eosin und Methylenblau, wobei der basische Teerfarbstoff Methylenblau in der Farbstofflösung mit Eosin ein Salz bildet, welches Methyleneosinat genannt wird. Jedoch sind Methylenblau und Methyleneosinat schlecht in Wasser löslich, sodass zur Herstellung der Farbstofflösung Methanol verwendet wird. Um Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, verwendet man am besten kommerziell erhältliche Färbelösungen. Zellkerne färben sich nach erfolgreicher Durchführung blau-violett bis rötlich. Das Zytoplasma kann rötlich-orange, grau-blau oder blau erscheinen (Riedelsheimer und Welsch, 2010).

Methode:

1. *Luftgetrocknete, unfixierte Blutastriche für 3-5 Minuten in May-Grünwald-Stammlösung tauchen*
2. *Etwa 1ml Puffer für 5-10 Minuten auf die Objektträger geben*
3. *Farblösung abkippen*
4. *Objektträger 2x1 min gründlich mit Puffer (pH 7,4) spülen*
5. *Lufttrocknen lassen und eindecken*

2.4. Panoptische Färbung nach Pappenheim (nach Romeis, 1989)

Die panoptische Färbung nach Pappenheim enthält als basischen Anteil Methylenblau und als sauren Anteil Eosin. Somit stellt diese Art der Färbung eine Kombination aus Giemsa- und May-Grünwald-Färbung dar. Das basische Methylenblau bildet in wässriger Lösung Ionen mit positiver Ladung, so dass sich Zellbereiche negativer Ladung bläulich färben. Gegensätzlich zerfällt das Eosin in Ionen negativer Ladung, wodurch positive Zellbestandteile rötlich gefärbt werden. Zellkerne werden somit violett-rötlich

dargestellt. Erythrozyten erscheinen hellrosa und das Zytoplasma von Mono- und Lymphozyten wird bläulich. Eosinophile Granula färben sich leuchtend rot, neutrophile Granula werden rosa und Basophile dunkelviolet.

Die Färbung wurde laut folgendem Protokoll durchgeführt:

1. *Unfixierte, luftgetrocknete Ausstriche werden für ca. 3 Minuten mit May Grünwald-Färbelösung beträufelt*
2. *Hiernach wird dieselbe Menge an Aqua dest. (pH 7,0) hinzugefügt, der Färbevorgang verlängert sich um 1 Minute*
3. *Abgießen der Färbelösung*
4. *Überschichtung der Ausstriche mit verdünnter Giemsa-Lösung 0,3ml Stammlösung auf 10ml Aqua dest. pH 7,0) für 15 bis 20 Minuten*
5. *Abspülen mit Aqua dest.*
6. *Kurz abpressen mit Filterpapier und nach Lufttrocknung unter dem Lichtmikroskop auswerten*

2.5. Hämalaun Eosin Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung ist eine der ältesten Doppelfärbungsmethoden. Zellkerne werden anhand einer Hämatoxylin-Zubereitung progressiv und stabil angefärbt, bis die Gegenfärbung mittels eines Plasmafärbestoffes erfolgt. Diese Färbung zählt aufgrund ihrer Einfachheit und Modifikationsfähigkeit bezüglich der Färbungsintensität zu den Routinefärbungen: Das Hämatoxylin färbt Kerne und saure Schleims-substanzen blau, wogegen das Zytoplasma und proteinhaltige Substanzen nuanciert rot erscheinen (Wehrend et al., 2004; Merck, 2017).

Der Grund für dieses Verhalten bei der Sukzedanfärbung basiert auf dem Prinzip der Durchtränkung und elektrostatischen Absorption: Hämalaun ist positiv geladen und bindet an die sauren Bestandteile der DNA, Eosin ist negativ geladen und bindet an die positiven Gewebsbestandteile (Klare et al., 2008).

Der Färbungsvorgang der fixierten Blutausrüche erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. *Kernfärbung mit Hämalaun für 20 Minuten*
2. *1-2mal Eintauchen in Aqua dest.*
3. *20 Minuten unter fließendem Leitungswasser zum Bläuen*
4. *10 Minuten in Eosin belassen*
5. *Kurz in Aqua dest. durchschwenken*
6. *Lufttrocknen lassen*

2.6. Sirius Red Färbung

Die Färbungsmethode anhand von Sirius Red ermöglicht die gezielte Darstellung

eosinophiler Granulozyten im Blut und Gewebe: Die Granula färben sich leuchtend rot an (Wehrend et al., 2004; Ovchinnikov, 2009).

Man benötigt saures Hämalaun nach Mayer und eine Sirius-Red Färbelösung, welche folgende Bestandteile enthält: 500mg Sirius Red, 45ml Aqua bidest, 50ml Ethanol absol. (MERCK, Darmstadt), 1ml NaOH 1%, 4ml NaCl 20%

Durchführung der Färbung:

1. *Einstellen der fixierten Blutausrichungen für 10 Minuten in saures Hämalaun nach Mayer*
2. *15 Minuten spülen der Ausstriche zum Bläuen in Leitungswasser*
3. *60 Minuten lang färben in Sirius Red Lösung*
4. *Kurze Spülung mit Aqua dest. und lufttrocknen lassen*

2.7. Alcianblau Färbung

Mit der Anfärbung mit Alcianblau bei verschiedenen pH-Werten (pH 1 und pH 2,5) kann man zwischen carboxylierten und sulfatierten Proteoglykanen unterscheiden. Bei pH 1 sind die carboxylierten Proteoglykane nicht mehr negativ geladen, so dass selektiv die sulfatierten Proteoglykane angefärbt werden. Bei pH 2,5 färben sich bevorzugt die karboxylierten Proteoglykane an (Ovchinnikov, 2009).

Färbungsdurchführung:

1. *Fixierte Blutausrichungen für 5 Min. in Alcianblau-Lösung einstellen*
2. *3 Min. in fließendem Leitungswasser spülen*
3. *Danach kurze Spülung mit Aqua dest.*
4. *10 Min. einstellen in Kernechtrot-Färbung*
5. *3 Min. in fließendem Leitungswasser spülen*
6. *Kurze Spülung mit Aqua dest.*
7. *Lufttrocknen lassen*

Die Färbung wurde sowohl mit Alcianblau Färbelösung pH 1,0 und als auch mit Alcianblau Färbelösung pH 2,5 gesondert durchgeführt.

Für die Herstellung der Alcianblau Färbelösung pH 1 werden in 500ml 0,1 N Salzsäure 5 g Alcianblau 8 GX Certistain (MERCK, Darmstadt) gelöst. Dieselbe Lösung mit pH 2,5 erhält man, wenn in einer 3%igen Essigsäurelösung, aus 485 ml Aqua dest. und 15 ml Essigsäure 100%, 5 g Alcianblau 8 GX Certistain (MERCK, Darmstadt) unter Rühren gelöst werden.

2.8. Toluidinblau Färbung

Mit dem planaren, monovalenten Farbstoff Toluidinblau können sulfatierte und carboxylierte Muzine metachromatische Effekte aufweisen. Diese Eigenschaften verändern sich aber in Abhängigkeit zum pH-Wert der Lösung, sodass es die Identifikation mittels Metachromasie differenziert zu betrachten gilt. Toluidinblau wird 0,05-0,5%ig in 1%iger Essigsäurelösung verbracht und 5 Min. inkubiert. Anschließend werden die Ausstriche mit Aqua dest. gespült und entwässert (Lang, 2006).

Die basophilen Granulozyten können aufgrund der charakteristischen metachromatischen Anfärbung der Granula bei der Toulidinblau Färbung selektiv dargestellt werden. Diese rotviolette Anfärbung entsteht durch im Heparin veresterte anorganische Schwefelsäure (Freund, 1977).

Die Granula basophiler Granulozyten zeigen in der Toulidinblau Färbung eine leuchtend rotviolette Färbung, wobei sich andere Zellen graublau färben. Zeigen neutrophile Granulozyten und Thrombozyten ebenso eine Metachromasie, ist dieses Phänomen auf toxische Ereignisse zurückzuführen und kann von der Metachromasie der basophilen Granulozyten unterschieden werden (Stobbe, 1959).

Ablauf der Färbung:

1. *Lufttrocknen der Blutaustiche*
2. *Blutaustrieche mit Färbelösung bedecken und 5 Min. inkubieren*
3. *Abgießen der Färbelösung und mit Aqua dest. spülen*
4. *Lufttrocknen der Blutaustrieche und Eindecken mit Eukitt (Riedelsheimer & Welsch, 2010)*

2.9. „Periodic Acid Schiff“-Reaktion (PAS-Färbung)

Mit der „Periodic Acid Schiff“- Reaktion können verschiedene Kohlenhydrate, darunter das oft in hämatopoetischen Zellen vorliegende Glykogen, dargestellt werden (Hagmann, 2009). Früher hatte diese Reaktion besondere Bedeutung bei der Charakterisierung von Lymphoblasten bei der akuten Leukämie (Hayhoe et al., 1960).

Auch bei der Anfärbung erythropoetischer Zellen unter pathologischen Bedingungen wie Erythroleukämie oder diversen Anämieformen kommt die PAS-Reaktion zum Einsatz. Ansonsten hat diese Färbung in Bezug auf die physiologischen Blutzellen keine größere Bedeutung, da eine regelmäßige charakteristische Anfärbung einzelner Zelltypen nicht gegeben ist (Hagmann, 2009).

Glykogen, neutrale Mukosubstanzen, Basalmembranen, Kollagenfasern, Glyko- und Phospholipide färben sich durch diese Färbung in verschiedenen Farbtönen, von pink über rot bis zu violett an (Thonton et al., 1996). Die PAS-Reaktion kann eine Färbung mit Kernechtrot ersetzen, da sie Mukosubstanzen gleichzeitig purpurrot färbt (Lang, 2006).

Die PAS-Reaktion wurde im Rahmen dieser Studie sowohl mit Amylasevorbehandlung, als auch nach Methylierung und Acetylierung durchgeführt. Um sicher zu sein, dass bei der PAS-Färbung Glykogen in den Blutaussstrichen nachgewiesen wird, werden Kontrollausstriche mit α -Amylase vorinkubiert. Dieses Enzym baut eventuell vorhandenes Glykogen ab und die anschließende PAS-Reaktion wird folglich negativ ausfallen. Durch die Acetylierung werden positive Ladungen von Proteinen oder Poly-L-Lysin an Molekülen neutralisiert (Riedelsheimer und Welsch, 2010).

Ablauf der PAS-Reaktion mit Amylasevorbehandlung:

1. *Fixierte Objektträger in feuchte Kammer legen, je 100 μ l 0,5% Amylase-Lösung auf OT geben und 10 Minuten bei 37 Grad Celsius in den Brutschrank stellen*
2. *Kurz mit Aqua dest. abspülen und für 5 Minuten in 0,5% wässrige Perjodsäure-Lösung stellen*
3. *Kurz mit Aqua dest. spülen und für 15 Minuten in Schiffisches Reagenz (Fuchsinschweflige Säure) einstellen*
4. *Hierauf dreimal für jeweils 2 Minuten in 3 separaten Küvetten in SO_2 -Wasser tauchen*
5. *5 Minuten unter fließendes Leitungswasser*
6. *Für 3-5 Minuten in Hämalau einstellen, danach 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen*
7. *Lufttrocknen und Eindeckeln* (Romeis und Böck, 1989)

Ablauf der PAS-Reaktion mit vorhergehender Acetylierung:

1. *Fixierte Objektträger für ca. 12 h in Säureanhydrid-Pyridin-Lösung stellen*
2. *Hierauf zweimal 2 Minuten mit Aqua dest. spülen*
3. *Für 5 Minuten in 0,5% wässrige Perjodsäure-Lösung stellen*
4. *Kurz mit Aqua dest. spülen und für 15 Minuten in Schiffisches Reagenz (Fuchsinschweflige Säure) einstellen*
5. *Hierauf dreimal für jeweils 2 Minuten in 3 separaten Küvetten in SO_2 -Wasser tauchen*
6. *5 Minuten unter fließendes Leitungswasser*
7. *Für 3-5 Minuten in Hämalau einstellen, danach 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen*
8. *Lufttrocknen und Eindeckeln* (Romeis und Böck, 1989)

Ablauf der PAS-Reaktion mit vorhergehender Methylierung:

1. *Fixierte Objektträger für ca. 96h bei 37 Grad Celsius in 0,1n-Salzsäure-Methanol-Lösung stellen*
2. *Dann zweimal 2 Minuten mit Aqua dest. spülen*

3. Für 5 Minuten in 0,5% wässrige Perjodsäure-Lösung stellen
4. Kurz mit Aqua dest. spülen und für 15 Minuten in Schiffsches Reagenz (Fuchsinchweflige Säure) einstellen
5. Hierauf dreimal für jeweils 2 Minuten in 3 separaten Küvetten in SO_2 -Wasser tauchen
6. 5 Minuten unter fließendes Leitungswasser
7. Für 3-5 Minuten in Hämalau einstellen, danach 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen
8. Lufttrocknen und Eindeckeln (Romeis und Böck, 1989)

3. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden 6 Blutproben verwendet: Zwei Proben der Altersgruppe 0-6 Monate, zwei Proben der Altersgruppe 6-12 Monate und zwei Proben adulter Pferde.

Diese Proben wurden gleich nach Gewinnung wie folgt behandelt: Vorerst erfolgte eine Zentrifugation des EDTA-Blutes bei 2000 Umdrehungen/Min. Nachdem das überstehende Plasma abpipettiert war, wurde zum Fixieren des Probenmaterials dasselbe Volumen an Karnovsky-Fixierungslösung auf den Leukozytensaum aufgetragen. Die Proben wurden bei 4°C für eine Stunde gekühlt. Anschließend wurden die entstandenen Zellpellets in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,7) gewaschen. Über Nacht wurden die Pellets ein zweites Mal in Karnovsky-Lösung eingebracht.

Am Tag darauf wurden Blöcke (1mm Seitenlänge) mit einer Rasierklinge geschnitten und in Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7,2) dreimal gewaschen. Anschließend erfolgte eine 2stündige Kontrastierung in 1%igem Osmiumtetroxid und 1,5%igem Kaliumferrozyanid bei 4°C. Hiernach erfolgte nochmals ein dreimaliges Waschen mit Natrium-Cacodylat-Puffer für je 20 Minuten. Anschließend erfolgte eine Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%iges, 70%iges und 90%iges Ethanol für je 30 Minuten und weitere 30 Minuten in absolutem Ethanol) und die Einbettung in Epon, einem Propylenoxid-Kunstharz (Merck, Darmstadt). Diese Einbettung erfolgte in mehreren Schritten: Zweimal je 15 Minuten in Propylenoxid, dann für 1 Stunde in das 2:1 Propylenoxid-Epon-Gemisch, über Nacht in ein 1:1 Propylenoxid-Epon-Gemisch und letztendlich in reines Epon für eine Stunde.

Darauf wurden die Blöcke in Gelatine kapseln der Firma Plannet (Wetzlar) für 24 Stunden bei 60°C polymerisiert. Für die erste Übersicht wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt und nach Richardson gefärbt. Hierauf wurden von ausgewählten Blöcken Ultradünnschnitte von 60nm Dicke gefertigt, die dann auf Kupfer-Grids (200 Mesh) aufgezogen und mit

gesättigtem Uranylacetat und einer Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (1963) nachkontrastiert wurden.

4. Glykohochemie

Für die glykohochemischen Untersuchungen wurden folgende FITC markierte bzw. biotinylierte Lektine verwendet (siehe Tabelle).

4.1. FITC markierte Lektine

Pro Tier wurden 50 Blutausschläge auf die Bindung 14 verschiedener FITC markierter Lektine (LINARIS, Wertheim) hin untersucht, welche unter Aufzählung von Herkunft und Zuckerspezifität in folgender Tabelle 5 aufgelistet sind.

Name	Abkürzung	Herkunft	Zuckerspezifität
Concanavalia Agglutinin	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)	Glukose, Mannose
Lens culinaris Agglutinin	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)	Glukose, Mannose
Pisum sativum Agglutinin	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	Glukose, Mannose
Griffonia simplicifolia Agglutinin	GSL	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)	Galaktose
Peanut Agglutinin	PNA	<i>Arachis hypogea</i> (Erdnuss)	Galaktose
Ricinus communis Agglutinin	RCA	<i>Ricinus communis</i> (Kastorbohne)	Galaktose
Wheat germ Agglutinin	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	N-Acetyl-Glukosamin

Wheat	germ	WGAs	<i>Triticum vulgare</i>	N-Acetyl-Glukosamin
Agglutinin			(Weizen)	
succinyliert				
Dolichos biflorus		DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	N-Acetyl-Galaktosamin
Agglutinin			(Afrikanische Pferdebohne)	
Soybean		SBA	<i>Glycine max</i>	N-Acetyl-Galaktosamin
Agglutinin			(Sojabohne)	
Saphora japonica		SJA	<i>Saphora japonica</i>	N-Acetyl-Galaktosamin
Agglutinin			(Chinesischer Schnurbaum)	
Ulex europaeus		UEA	<i>Ulex europaeus</i>	α-L-Fukose
Agglutinin			(Stechginster)	
Phaseolus vulgaris		PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Komplexe
Agglutinin-Leuco			(Gartenbohne)	Kohlenhydratstrukturen
Phaseolus vulgaris		PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Komplexe
Agglutinin-			(Gartenbohne)	Kohlenhydratstrukturen
Erythro				

Tabelle 5: Übersicht verwendeter pflanzlicher Lektine

Nach einer 10-minütigen Fixierung der Blutausrüche mit absolutem Methanol (MERCK, Darmstadt) folgte für jeweils fünf Minuten ein dreimaliges Waschen der Objektträger in PBS-Puffer (pH 7,4-7,6).

In einer Konzentration von 10 µg/ml wurden pro Blutausruch jeweils 300 µl des FITC gekoppelten Lektins mit einer Pipette auf die Objektträger aufgetragen. Danach fand eine 60minütige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Dabei befanden sich die Proben in einer mit Aluminiumfolie abgedunkelten Kammer, um das lichtempfindliche FITC nicht zu beeinträchtigen. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Objektträger ein zweites Mal dreimal für 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen.

Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mittels DAPI-Lösung (4'6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (ROCHE, Mannheim). Die DAPI-Stammlösung (Konzentration

1mg/ml) wurde dafür 1:7500 verdünnt. In dieser verdünnten Lösung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur 10 Minuten in abgedunkelten Küvetten inkubiert. Hierauf wurden die Objektträger zweimal für fünf Minuten in PBS-Puffer und zweimal für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Mit selbst hergestelltem Polyvinyl Alcohol Mounting Medium, welches mit DABCO (DAKO, Hamburg) versehen wurde um ein Ausbleichen vorzubeugen, wurden die Lektin-Blutausstriche anschließend eingedeckelt. Ihre Aufbewahrung erfolgte in Aluminiumfolie verpackt (um sie vor Lichteinwirkung zu schützen) im Kühlschrank bei 6°C.

5. Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden von jeder der drei Altersgruppen jeweils von fünf Pferden Blutproben verwendet. Die equinen monoklonalen Antikörper mAK 4-13, mAK 4-58, mAK 5-50, mAK 1-19, mAK 2-25, mAK 4-36, mAK 4-55 und mAK 6-39 wurden dankenswerter Weise von Herrn Professor Göbel, Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um monoklonale Maus-anti-Pferd-Antikörper (Umlauf, 2004).

Nach Untersuchungen im Jahre 2004 von Umlauf, binden die monoklonalen Antikörper mAK 4-13, mAK 4-58 und mAK 5-50 spezifisch an equine T-Zellen. Als B-Zell-spezifisch können laut seiner Forschungsarbeit die Antikörper mAK 1-19, mAK 2-25, mAK 4-36, mAK 4-55 und mAK 6-39 bezeichnet werden (Umlauf, 2004).

Folgendes Arbeitsprotokoll wurde für die immunzytochemischen Untersuchungen verwendet:

4. *10minütiges Fixieren der Objektträger in Methanol (MERCK, Darmstadt)*
4. *3mal für je 5 Minuten in PBS-Puffer waschen*
4. *Dako Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg) auf die Objektträger auftragen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.*
4. *200µl Antikörperlösung (in Antikörper-Diluent von DAKO, Hamburg) pro Blutaussstrich aufpipettieren*
4. *Bei 4°C über Nacht in feuchter Kammer inkubieren*
4. *Morgens 3mal für je 5 Minuten in PBS-Puffer waschen*
4. *Pro Objektträger 200µl verdünnte Sekundär-Antikörperlösung (Anti-Maus-FITC vom Kaninchen, DAKO, Hamburg) auftragen*
4. *Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren*
4. *3mal für je 5 Minuten in PBS-Puffer waschen*

4. *Kernfärbung DAPI (siehe Punkt 4.1.) auftragen*

6. Art der Auswertung

Lichtmikroskopisch auszuwertende Blutaussstriche wurden mit dem Lichtmikroskop Aristoplan der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar) untersucht.

Inkubierte Objektträger mit FITC markierten Lektinen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Dialux 20 der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar) ausgewertet.

Zum Fotografieren diente eine Digitalkamera (Progress®CF cool, Jenoptik).

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 der Firma Zeiss (Zeiss, Oberkochen) fand die Beurteilung und fotografische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Präparate statt.

IV. ERGEBNISSE

1. Blut der untersuchten Pferde

Von jedem der 29 Islandpferde wurde vom Labor (Laboklin, Bad Kissingen) ein Differentialblutbild angefertigt. Es wurde nach geltendem Referenzbereich ausgewertet: Segmentkernige neutrophile Granulozyten 45-70%, stabkernige neutrophile Granulozyten 0-6%, Lymphozyten 20-45%, Monozyten 0-5%, eosinophile Granulozyten 0-4%, basophile Granulozyten 0-2%.

Die Gruppe der jüngsten Probanden (Abb. 9) lässt Schwankungen im Bereich der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten erkennen. Umso mehr Lymphozyten ein Fohlen aufweist, desto weniger segmentkernige neutrophile Granulozyten treten auf.

Monozyten, eosinophile, basophile und stabkernige neutrophile Granulozyten liegen im Referenzbereich.

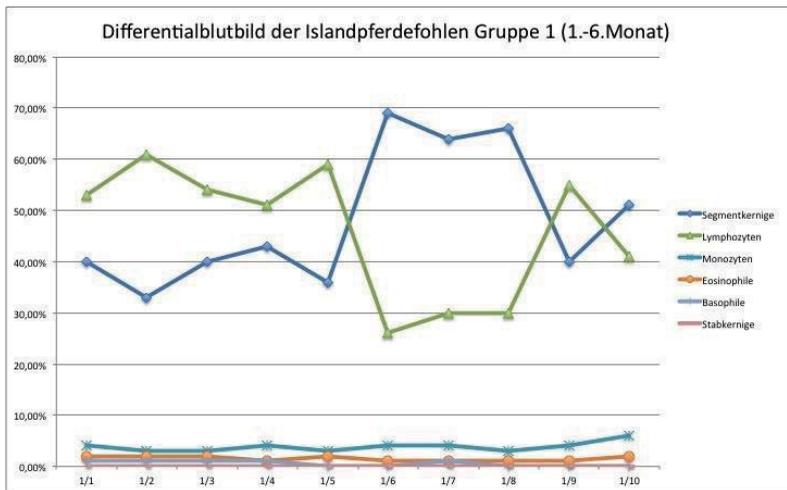


Abbildung 9 : Übersicht der Differentialblutbilder Islandpferde Gruppe 1

In der Gruppe der 6-12 Monate alten Islandpferde (Abb.10) steigt tendenziell die Zahl der Monozyten und eosinophilen Granulozyten an. Bis auf bei zwei Tieren bleibt der Unterschied zwischen der Anzahl von Lymphozyten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten bestehen.

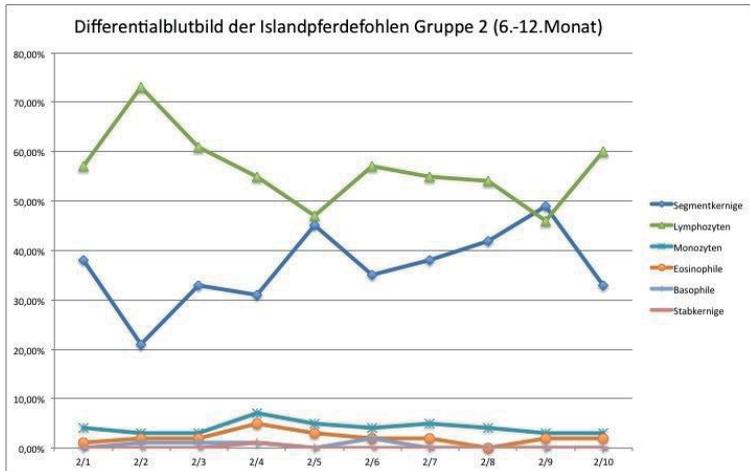


Abbildung 10: Übersicht der Differentialblutbilder Islandpferde Gruppe 2

Auch in der dritten Gruppe der adulten Islandpferde ab dem 5. Lebensjahr (Abb.11) ändert sich das Blutbild kaum. Bis auf bei zwei Tieren bleibt der Unterschied zwischen der Anzahl von Lymphozyten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten bestehen. Die Zahl der eosinophilen Granulozyten und der Monozyten ist weiter etwas gestiegen.

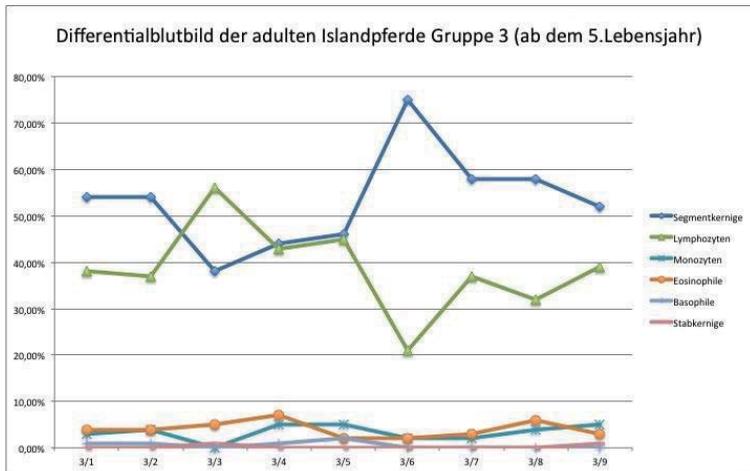


Abbildung 11: Übersicht Differentialblutbilder Islandpferde Gruppe 3

Vergleicht man die Gruppen untereinander (Abb.12) und berücksichtigt dabei den in gelb dargestellten Referenzbereich, fällt auf, dass sich fast keines der Tiere in diesem bewegt. Besonders niedrige Werte weisen die heranwachsenden Tiere der Gruppe 2 auf.

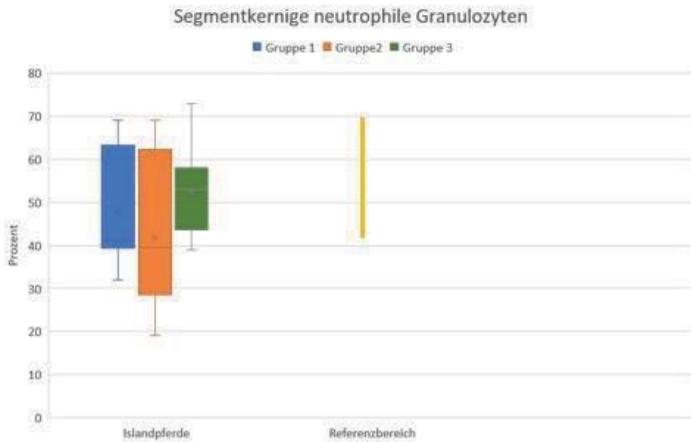


Abbildung 12: Gruppenvergleich neutrophile segmentkernige Granulozyten

Umgekehrt verhält es sich mit den Lymphozyten im Blut der drei Gruppen (Abb.13): Der Großteil der Tiere liegt über dem Referenzbereich. Wieder ist es die Gruppe 2, welche außerhalb des Referenzbereiches liegt. Die Lymphozytenwerte der Islandpferdefohlen zwischen dem 6. und 12. Lebensmonat liegen immer knapp bis deutlich über dem Referenzbereich.

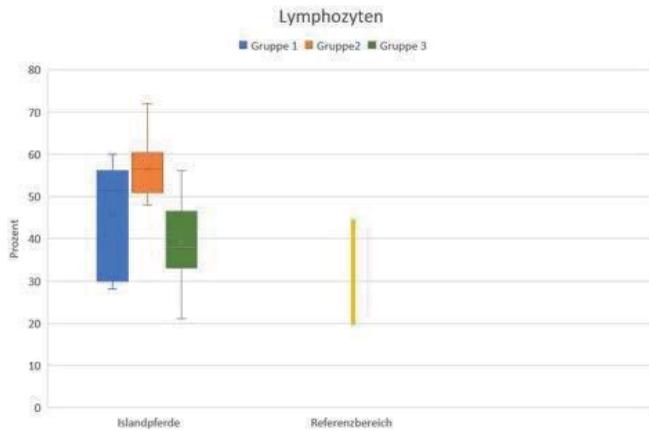


Abbildung 13: Gruppenvergleich Lymphozyten

Das Vorkommen eosinophiler Granulozyten im Blut der Islandpferde (Abb.14) lässt postnatal keine eindeutige Tendenz erkennen: Bei genauer Betrachtung zeigt sich, dass die Gruppe der adulten Islandpferde knapp im Referenzbereich oder darüberliegt. Die Fohlen bewegen sich, bis auf ein Tier mit erhöhter Anzahl, im Referenzbereich.

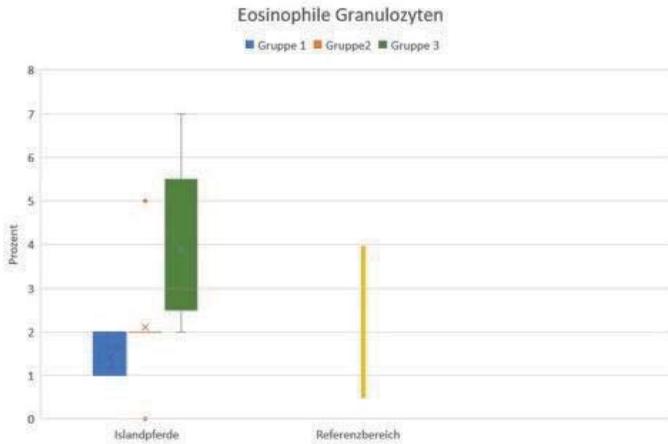


Abbildung 14: Gruppenvergleich eosinophile Granulozyten

Betrachtet man die basophilen Granulozyten (Abb.15), welche in nur sehr geringer Zahl im Blut vorkommen, sind die Werte innerhalb der Gruppen zwar unterschiedlich, aber in der Gesamtzahl im Referenzbereich.

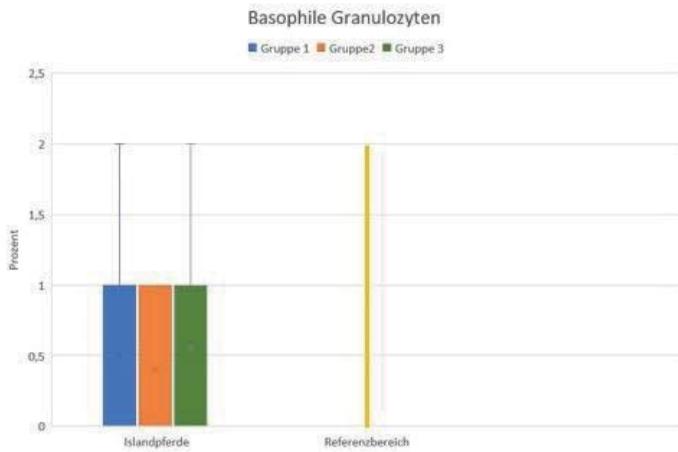


Abbildung 15: Gruppenvergleich basophile Granulozyten

Auch bei den Monozyten (Abb.16) bewegen sich alle Werte, bis auf zwei Einzeltiere ganz unterschiedlichen Alters, im Referenzbereich.

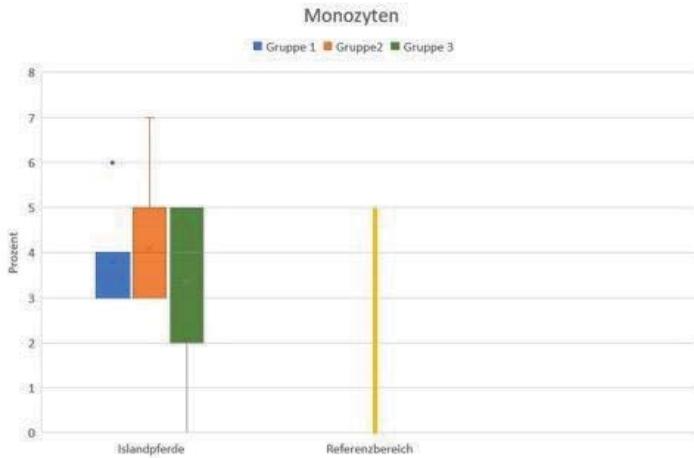


Abbildung 16: Gruppenvergleich Monozyten

2. Lichtmikroskopische Übersichtsfärbungen

Es wurden neun verschiedene Färbemethoden angewendet, um die einzelnen Blutzellen besser differenzieren zu können. Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop Aristoplan (Leitz,Wetzlar).

Die folgende Tabelle und die Abb.17-25 geben eine Übersicht über verwendete Färbungen und deren Anfärbungseigenschaften einzelner zellulärer Strukturen.

Färbungen	Erythrozyten:	Thrombozyten:	Lymphozyten:	Neutrophile Granulozyten:	Eosinophile Granulozyten:	Basophile Granulozyten:	Monozyten: Zytoplasma
	<i>Zytoplasma</i>	<i>Zytoplasma</i>	<i>Zytoplasma</i>	<i>Zellkern</i>	<i>Zellkern</i>	<i>Zellkern</i>	<i>Zellkern</i>
			<i>Zellkern</i>	<i>Granula</i>	<i>Granula</i>	<i>Granula</i>	
DIFF QUICK	Graugrün	Violett	Blau	Dunkelblau	Mittelblau	Hellblau	Dunkelblau
			Lila	Hellblau	Rot	Dunkelblau	Violett
GIEMSA	Rot	Blau	Hellrot	Violett	Violett	Rot-violett	Hellrosa
			Rot-violett	Rot	Rot-braun	Blau	Violett
MAY-GRÜN WALD	Hellrot	Blass-blau	Blau	Blau	Blau	Blau	Hellblau
			Blau	Hellrot-purpur	Ziegelrot	Tiefblau	Blau
PAPPENHEIM	Graugrün	Bläulich	Mittelblau	Mittelblau	Mittelblau	Mittelblau	Hellblau
			Hellblau	Orange	Orange-rot	Ultramarin	Mittelblau
HAEMALAUN-EOSIN (HE)	Rot	Hellrosa	Hellrosa	Mittelblau	Mittelblau	Mittelblau	Hellrosa
			Mittelblau	Hellrosa	Rot	Violett	Mittelblau
SIRIUS RED	Graugrün	blassgrau	Hellblau	Mittelblau	Hellblau	Mittelblau	Hellblau
			Mittelblau	Graurosa	Rosa	Dunkelblau	Mittelblau
ALCIANBLAU pH 1,0 & 2,5	Graugrün	blassgrau	Graurosa	Rosa	Hellrosa	Hellrosa	Graurosa
			Rosa	Hellrosa	Graugrün	Dunkelblau-graugrün	Rosa
TOLUIDINBLAU	Grün	Blassblau	Helllila	Violett	Violett	Violett	Blassgrau
			Violett	Hellgrün	Grün	Dunkellila	Violett
PAS-REAKTION Methylierung Acetylierung & Amylase	Graugrün	Blassviolett	Hellblau	Dunkelblau	Blau	Blau	Hellblau
			Dunkelblau	Violett	Graugrün	Violett	Dunkelblau
Acetylierung & Amylase	Graugrün	Blassgrau	Hellblau	Graugrün	Violett	Violett	Hellblau
			Violett	Violett	Graugrün	Dunkelgrün	Violett

Tabelle 7: Lichtmikroskopische Übersichtsfärbungen

2.1. Erythrozyten

Die Größe der Erythrozyten liegt bei 6 µm. Je nach Färbetechnik färben sie sich hellrosa bis graugrün. In manchen Ausstrichen sind Kernresteinschlüsse in den Erythrozyten zu sehen, die sich dunkelblau anfärben. Diese Einschlüsse werden als Howell-Jolly-

Körperchen bezeichnet. Die Zellmembran gestaltet sich zumeist glatt. Nicht selten kommt es durch dichte Ansammlung der Erythrozyten zu einer Kohäsion und „Geldrollenbildung“.

2.2. Thrombozyten

Deutlich zu beobachten war, dass die kleinen kernlosen Thrombozyten zu Gruppenbildungen neigen. Bei genauer Betrachtung fällt vor allem in der DiffQuick Färbung ein dunkleres Granulomer, in welchem sich Zellorganellen und Granula befinden, und ein etwas helleres Hyalomer mit Zytoplasma auf. Der Durchmesser der Thrombozyten beträgt 1,5-4,8 µm.

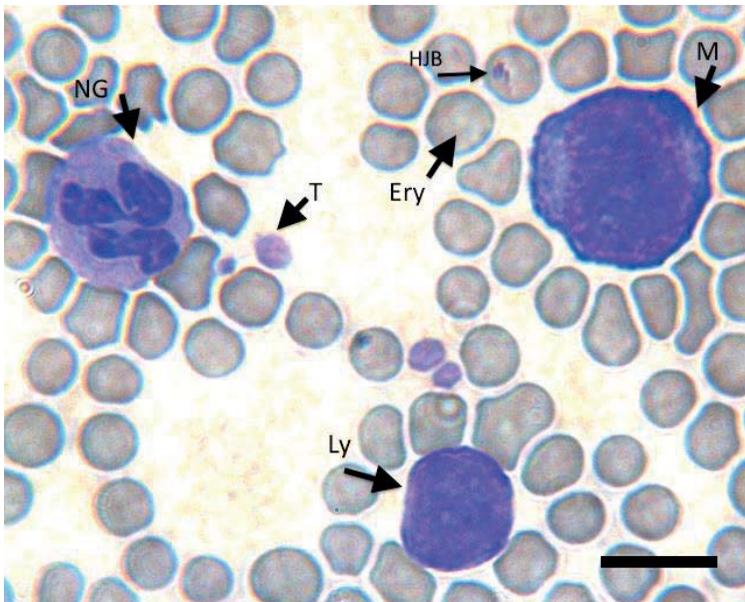


Abbildung 17: Zellübersicht Gruppe 1 Stute "Idunn vom Törring"

Färbung: Diff Quick (SB= 10 µm)

NG: Neutrophiler Granulozyt **T:** Thrombozyt **Ery:** Erythrozyt **Ly:** Lymphozyt **M:** Monozyt

HJB: Howell-Jolly-Bodies im Erythrozyten

2.3. Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten kommen in zwei verschiedenen Formen vor, als

stabkernige und segmentkernige Granulozyten. Ihre Granula färben sich kaum an. Ihre Größe beträgt 10-12 μm . Hin und wieder war ein etwas größeren Zelltyp (ca.15 μm) mit nierenförmig eingebuchtetem Zellkern zu entdecken: Kleiner als ein Monozyt aber mit den Granula eines neutrophilen Granulozyten. Bei diesen Zellen dürfte es sich um Metamyelozyten handeln, den Vorläuferzellen der neutrophilen Granulozyten.

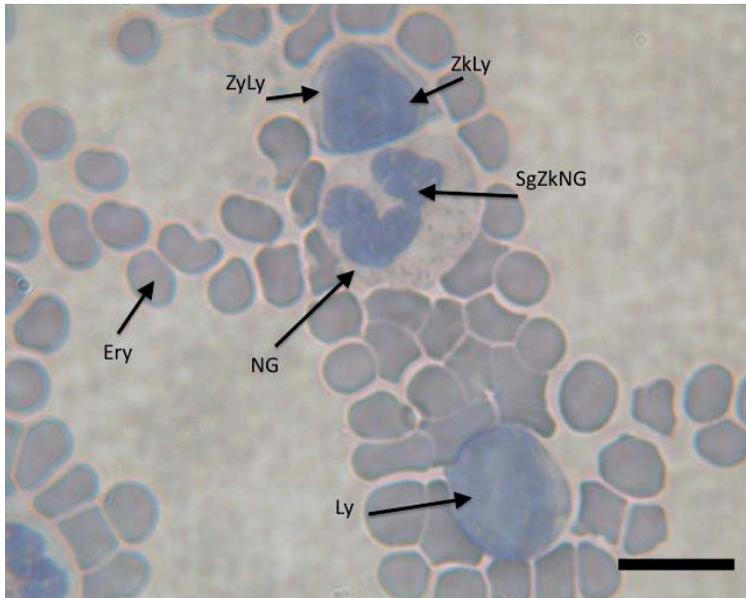


Abbildung 18: Zellübersicht Gruppe 1 Stute "Hjördis vom Burghauserhof"

Färbung: Sirius Red (SB=10 μm)

Ery: Erythrozyt **NG:** Neutrophiler Granulozyt **SgZkNG:** Segmentkerniger Zellkern des neutrophilen Granulozyten **ZyLy:** Zytoplasma großer Lymphozyt **ZkLy:** Zellkern des großen Lymphozyten **Ly:** mittelgroßer Lymphozyt

2.4. Eosinophile Granulozyten

Die equinen eosinophilen Granulozyten besitzen charakteristisch große Granula (durchschnittlich 2 μm), wobei einzelne Granula bis zu 4 μm groß sein können. In den meisten Färbungen sind sie leuchtend rot gefärbt: In den Färbungen Toluidinblau,

Alcianblau und bei der PAS-Reaktion färbten sich die Granula in Grüntönen an. Der Gesamtdurchmesser dieser Zellen ist mit 10-20 μm der größte unter den Granulozyten. Ihr Kern ist aufgrund ihrer großen und zahlreichen Granula selten vollständig zu erkennen. Zumeist ist er zweigeteilt und einer Brille ähnlich geformt.

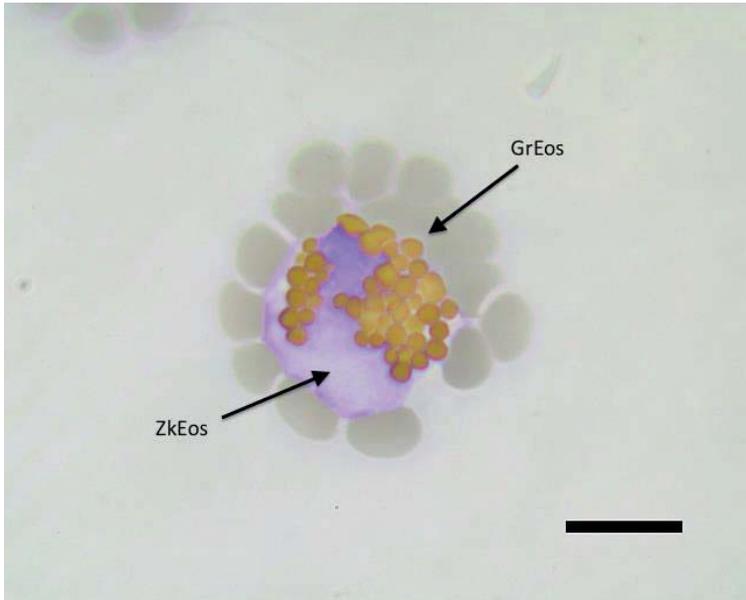


Abbildung 19: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 1 Stute "Hjördis vom Burghäuserhof"

Färbung: Pappenheim (SB=10 μm)

ZkEos: Zellkern des eosinophilen Granulozyten **GrEos:** Granula des eosinophilen Granulozyten

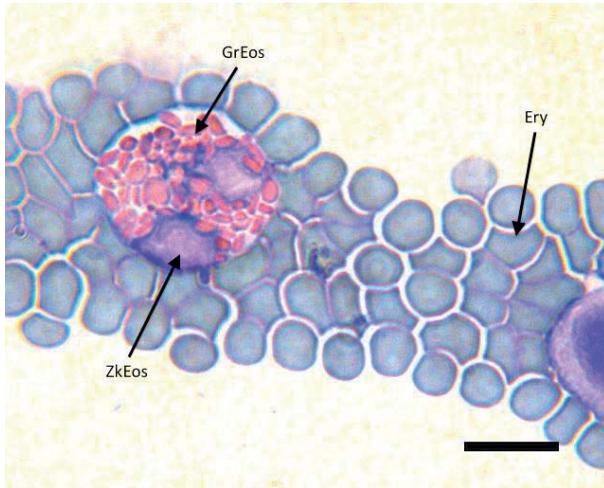


Abbildung 20: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 2 Wallach NN (M:Oda-Fló/V:iðir)

Färbung: DiffQuick (SB=10 µm)

Ery: Erythrozyt ZkEos: Zellkern des eosinophilen Granulozyten GrEos: Granula des eosinophilen Granulozyten

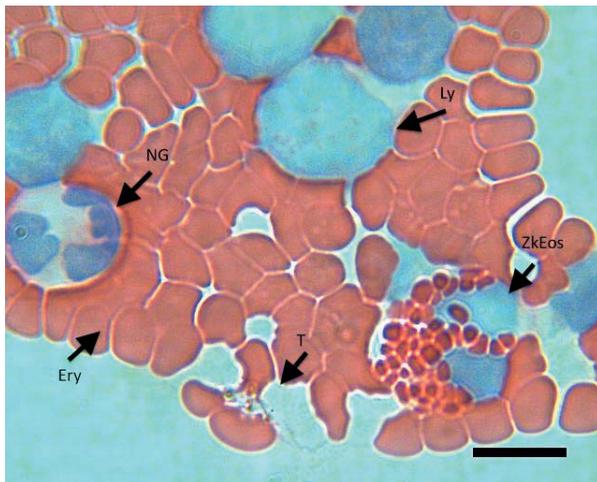


Abbildung 21: Zellübersicht Gruppe 1 Hengst NN (M:Draumsun/V:Hrólfur)

Färbung: HE (Hämalaun-Eosin) (SB=10 µm)

Ery: Erythrozyt T: Thrombozyt ZkEos: Zellkern des eosinophilen Granulozyten Ly: großer Lymphozyt
NG: Neutrophiler Granulozyt

2.5. Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten sind die am seltensten vorkommende Zellart im Pferdeblut. Oft sammelten sie sich in den Randbereichen der Blutausstriche an. Sie waren dann gut zu erkennen. Ihre zahlreichen kleinen Granula (0,5-1,5 μm) färbten sich sehr dunkelblau bis violett an und maskierten zumeist den meist mehrfach gelappten Zellkern. Ihre Größe entspricht in etwa der eines neutrophilen Granulozyten (ca.10 μm).

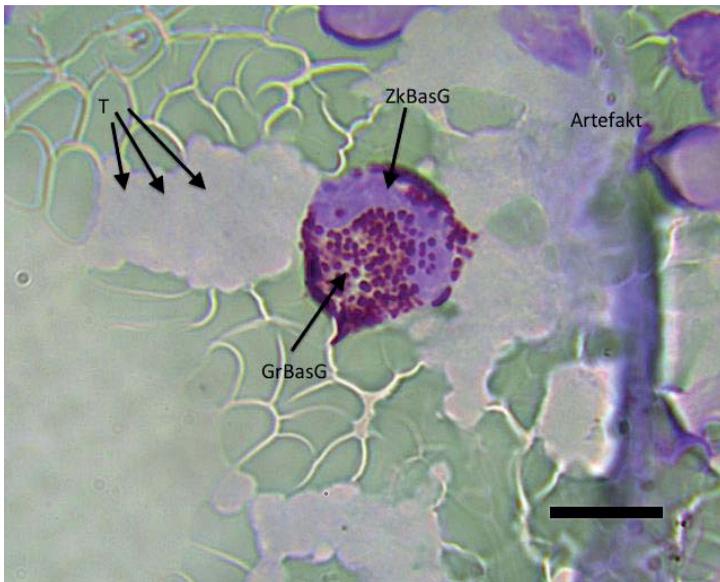


Abbildung 22: Basophiler Granulozyt Gruppe 3 Stute "Hekla vom Burghauserhof"

Färbung: Toluidinblau (SB=10 μm)

T: aneinandergelagerte Thrombozyten GrBasG: Granula des basophilen Granulozyten ZkBasG: Zellkern des basophilen Granulozyten (Artefakt: Färbeartefakt)

2.6. Lymphozyten

Lymphozyten waren trotz ihrer nur kurzen Aufenthaltsdauer im Blut zahlreich in den Blutausstrichen zu finden: Sie stellten sich als runde Zellen mit basophilem oder granuliertem Zytoplasma in verschiedener Größe dar. Kleine Lymphozyten hatten Durchmesser von 4-7 μm , große Lymphozyten besitzen deutlich mehr Zytoplasma und sind bis zu 15 μm groß. Ihr Zellkern war unabhängig von ihrer Größe immer rund oder oval. Die feinen Granula, die sich gelegentlich im Zytoplasma beobachten lassen, färbten sich bläulich an.

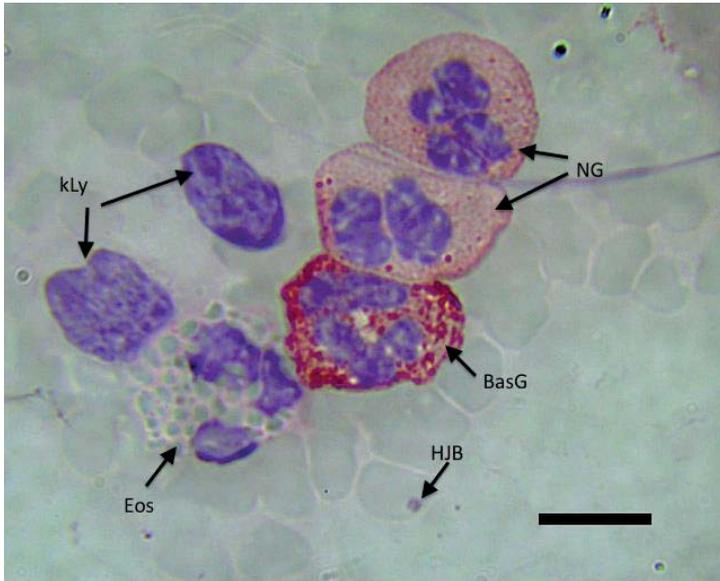


Abbildung 23: Zellübersicht Gruppe 1 Hengst NN (M:Skettla/V:Hrólfur)

Färbung: PAS-Reaktion (SB=10 µm)

Eos: Eosinophiler Granulozyt **BasG:** Basophiler Granulozyt **NG:** Segmentkernige neutrophile Granulozyten
kLY: kleiner Lymphozyt mit schmalem Zytoplasmasaum **HJB:** Howell-Jolly-Body im Erythrozyten

2.7. Monozyten

Monozyten sind die größten Zellen, die in einem Blutaussstrich nachweisbar sind. Die 10-20 µm großen Zellen besitzen einen charakteristisch nierenförmigen Zellkern, der einen großen Teil der Zelle einnimmt. Dieser Zellkern färbte sich in Blau- bis Violettönen. Im graubläulichen Zytoplasma kommen Vakuolen vor, die sich meist in der Nähe des Zellkerns befinden. Vereinzelt gaben feine fadenähnliche Ausstülpungen an der Wand der Monozyten den Hinweis auf einen aktiv tätigen Monozyten.

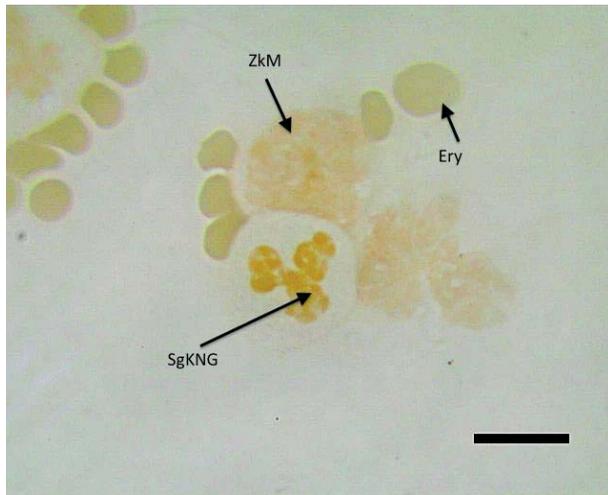


Abbildung 24: Zellübersicht Gruppe 1 Stute "Hjördis vom Burghauserhof"

Färbung: Alcianblau pH 1,0 (SB=10 µm)

Ery: Erythrozyt ZkM: Zellkern eines Monozyten SgKNG: Segmentierter Kern eines neutrophilen Granulozyten

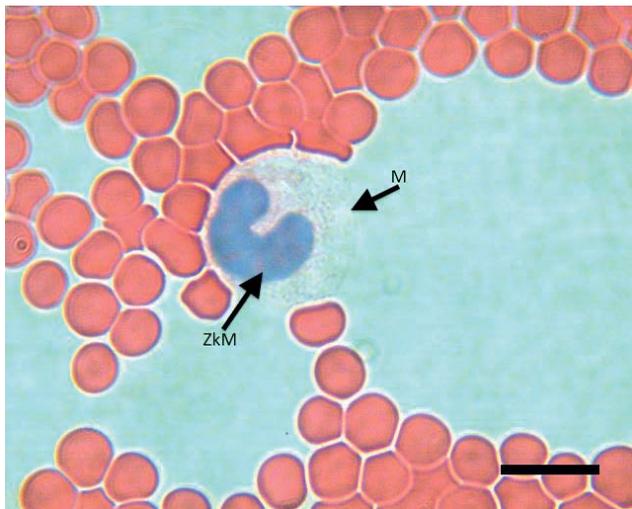


Abbildung 25: Monozyt Gruppe 1 Hengst NN (M: Draumsun/V: Hrólfur)

Färbung: HE (Hämalaun-Eosin) (SB=10 µm)

M: Monozyt ZkM: Nierenförmiger Zellkern eines Monozyten

3. Elektronenmikroskopie

3.1. Erythrozyten

Unter dem Elektronenmikroskop stellten sich die roten Blutkörperchen als Zellen von etwas unterschiedlicher Größe aber homogenem Inhalt dar (Abb. 26). Dieser besteht nahezu ausschließlich aus Hämoglobin. Differenzierende Größe und Gestalt begründen sich durch die sehr dünne Schnittführung. Die Membranen der Erythrozyten waren durchwegs glatt. Zwischen den Altersgruppen der Islandpferde ergaben sich keine morphologischen Differenzen.

3.2. Thrombozyten

Auch die Thrombozyten besitzen keinen Zellkern. Dafür lagern sie aufgrund ihrer Aggregationsfähigkeit häufiger in Gruppen zusammen und in ihrem Zytoplasma findet man folgende Zellorganellen: Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Vakuolen, homogene Granula, als alpha-Granula betitelt, und „dense bodies“, auffällig elektronendichte Granula (Abb. 26). Fanden sich sehr kleine elektronendichte kugelartige Strukturen in den Blutplättchen, handelte es sich um eingelagertes Glykogen. Auch bei den Thrombozyten ergaben sich innerhalb der Altersgruppen der Islandpferde keine morphologischen Differenzen.

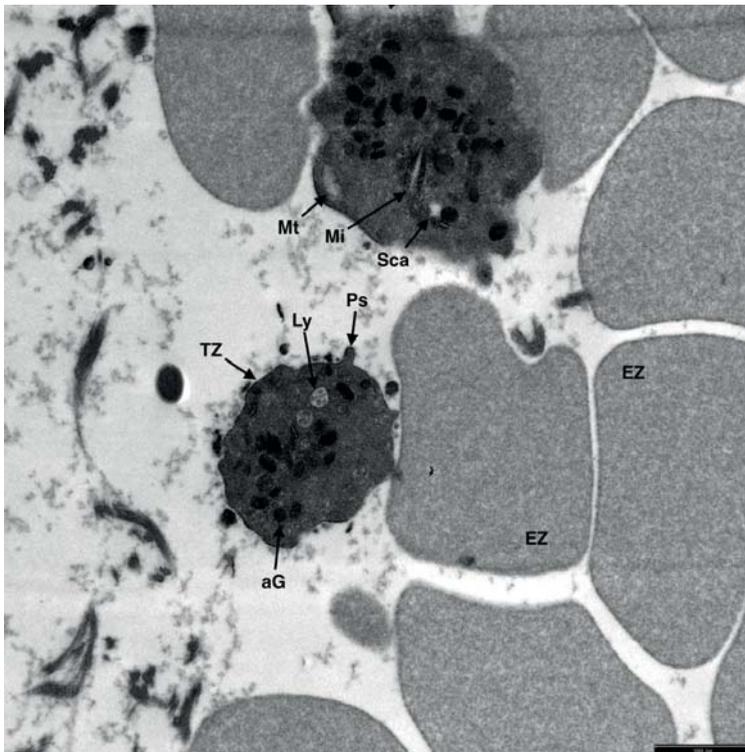


Abbildung 26: Erythrozyten & Thrombozyten Gruppe 2 Stute „Sól vom Burghauserhof“
Elektronenmikroskop

EZ: Erythrozyt **TZ:** Thrombozyt **Sca:** Systemum canaliculare apertum (Einstülpung Zellmembran)

Ly: Lysosom **Mt:** Mikrotubulus **Mi:** Mitochondrium **Ps:** Pseudopodium

aG: elektronendichtes alpha-Granulum

3.3. Neutrophile Granulozyten

Sowohl die segmentkernigen als auch die stabkernigen neutrophilen Granulozyten zeigten im Kern unterschiedlich elektronendichte Strukturen (Abb. 27, 28): Den helleren innenliegenden Bereich bezeichnet man als Euchromatin, der diesen Bereich außen umgebende dunklere Bereich besteht aus Heterochromatin. Im segmentierten neutrophilen Granulozyten sind die Verbindungen zwischen den Kernsegmenten als Chromatinbrücken gebildet. Im Zytoplasma fand man alle üblichen Zellorganellen wie beispielsweise den Golgi-Apparat oder Mitochondrien. Die Granula liessen sich unter

dem Elektronenmikroskop klar in längliche, primäre Granula und in spezifische rundliche Granula differenzieren. Bei einer Größe von 10-12µm und runder Zellgestalt hatten die neutrophilen Granulozyten glatte Zellmembranen mit hin und wieder deutlich ausgeprägten Pseudopodien. Wiederum ergaben sich hinsichtlich der Morphologie und Zusammensetzung der neutrophilen Granulozyten keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen.

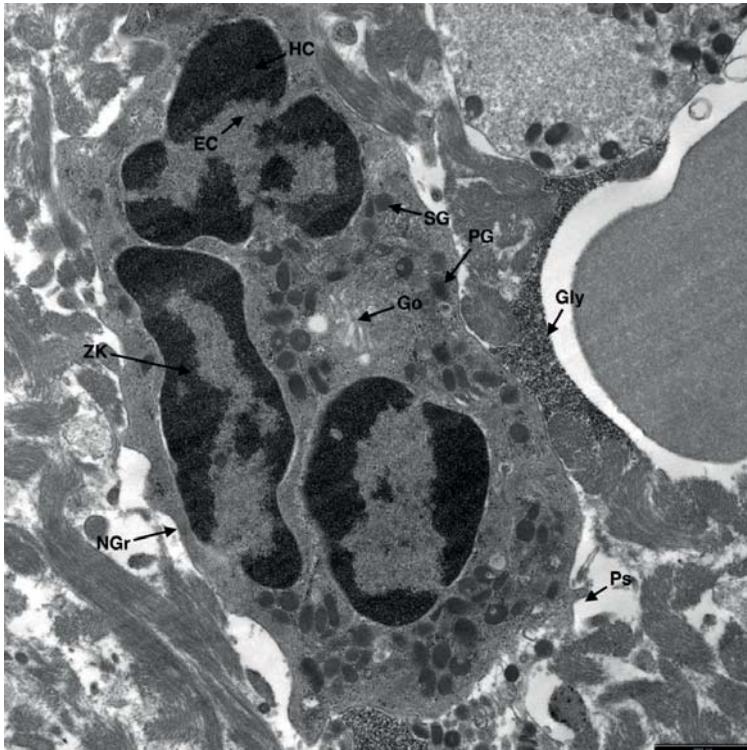


Abbildung 27: Segmentierter neutrophiler Granulozyt Gruppe 3 Stute „Fiorina vom Burghauserhof“

Elektronenmikroskop

NGr: Neutrophiler Granulozyt	ZK: Zellkern	HC: Heterochromatin	EC: Euchromatin
PG: Primäre Granula	SG: Spezifisches Granulum	Go: Golgi-Apparat	Gly: Glykogen
Ps: Pseudopodien			

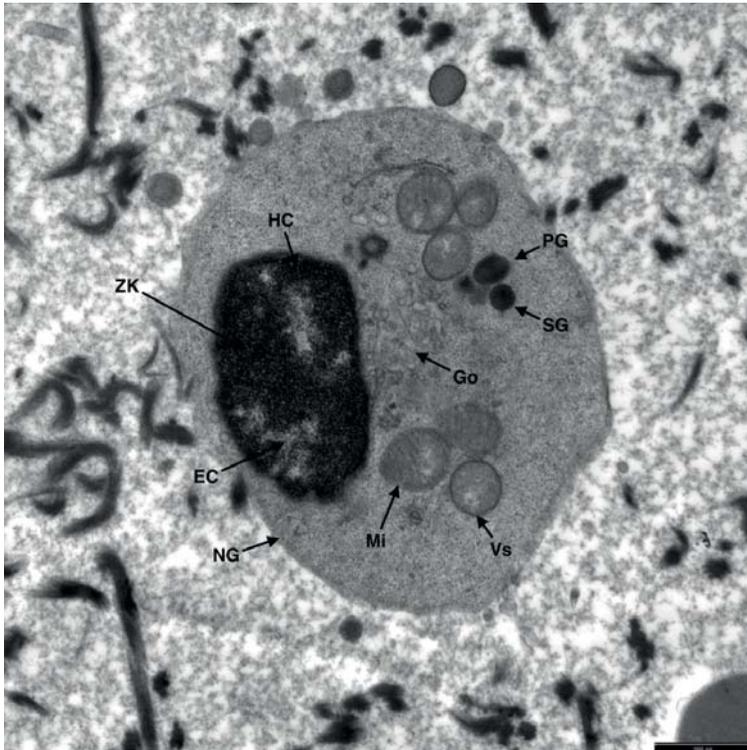


Abbildung 28: Kleiner stabkerniger neutrophiler Granulozyt Gruppe 3 Wallach „Thor“
Elektronenmikroskop

NG: Neutrophiler Granulozyt **ZK:** Zellkern **HC:** Heterochromatin **EC:** Euchromatin
Go: Golgi-Apparat **Mi:** Mitochondrium
Vs: Vesikel (membranumschlossenes Bläschen mit mäßig elektronendichtem Inhalt)
SG: Spezifisches Granulum **PG:** Primäres Granulum

3.4. Eosinophile Granulozyten

Die Granula der eosinophilen Granulozyten weisen unter dem Elektronenmikroskop eine einheitliche, mittelgradig elektronendichte Struktur auf (Abb. 29). Kristalline Einschlüsse der Granula konnte man nicht beobachten. Kleine Ausstülpungen der Zellmembran bezeichnet man als Microridges, da sie teilweise ein Grätenmuster aufweisen. Der heterochromatinreiche Zellkern ist gelappt. Im Zytoplasma sind verschiedene Zellorganellen, wie endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und Mitochondrien zu

erkennen, die sich zwischen den Granula verteilen. Bei den eosinophilen Granulozyten war kein Unterschied hinsichtlich der Altersgruppen feststellbar.

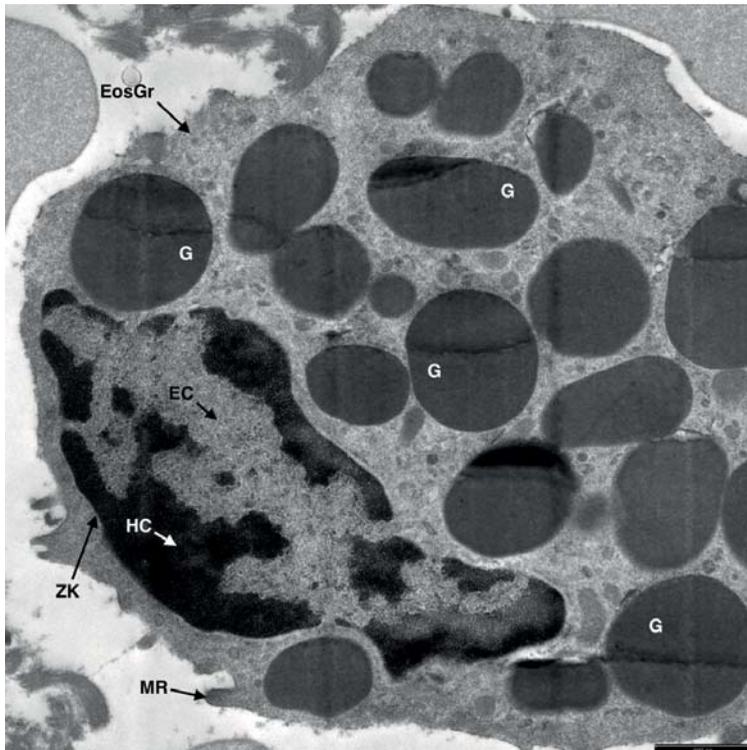


Abbildung 29: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 2 Hengst „Leiknir vom Törring“
Elektronenmikroskop

EosGr: Eosinophiler Granulozyt ZK: Zellkern HC: Heterochromatin EC: Euchromatin
MR: Microridges (Membranausstülpung) G: Granula

3.5. Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten waren nur gelegentlich bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen aufzufinden: Der heterochromatinreiche Zellkern ist gelappt (Abb. 30). Die Granula sind deutlich kleiner ($0,5-1 \mu\text{m}$) als die der eosinophilen Granulozyten und stark elektronendicht. Die Zellmembran des basophilen Granulozyten hat zahlreiche Ausstülpungen. Das Zytoplasma enthält zahlreiche kleine Mitochondrien, einen kleinen Golgi-Apparat und Zisternen des rauen und glatten endoplasmatischen Reticulums. Bei

den relativ wenigen Basophilen, die bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen gefunden wurden, ließen sich keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen feststellen.

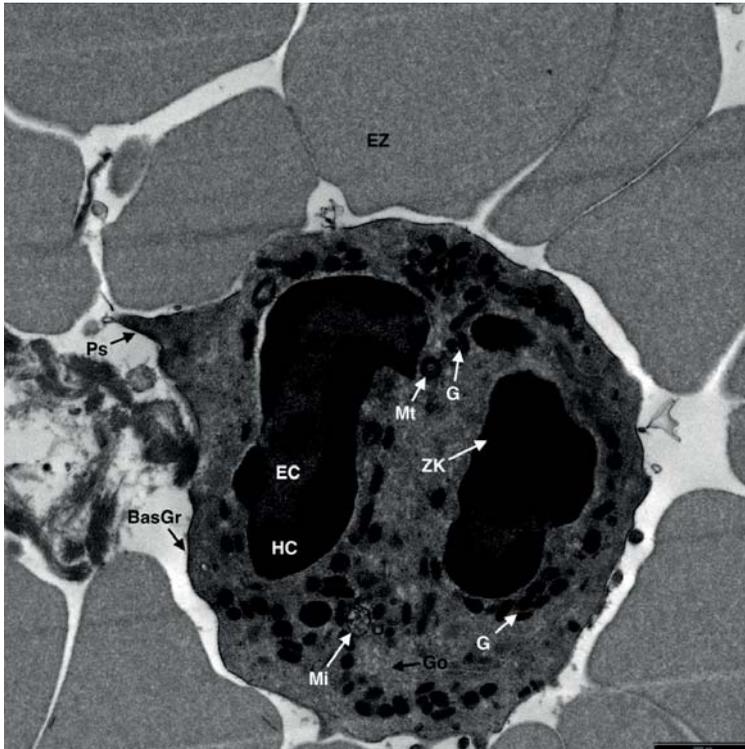


Abbildung 30: Basophiler Granulozyt Gruppe 2 Stute „Sól vom Burghauserhof“

Elektronenmikroskopie

BasGr: Basophiler Granulozyt	ZK: Zellkern	EC: Euchromatin	HC: Heterochromatin
Mt: Mikrotubuli	G: Granula	Mi: Mitochondrium	Go: Golgi-Apparat
Ps: Pseudopodien	EZ: Erythrozyt		

3.6. Lymphozyten

Vor allem kleine Lymphozyten waren zahlreich anzutreffen. Bei allen Lymphozyten fiel der stark heterochromatische Zellkern auf, bei dem aber zentral (im Unterschied zur Lichtmikroskopie) auch kleinere, euchromatische Anteile zu sehen waren (Abb. 31, 32).

Bei den großen Lymphozyten nahmen die zentralen euchromatischen Bereiche einen deutlich größeren Bereich des Zellkerns ein. Das schmale Zytoplasma der Lymphozyten beinhaltet einen kleinen Golgi-Apparat, einige Zisternen des rauhen endoplasmatischen Reticulums, freie Ribosomen, kleine Mitochondrien, Vakuolen und Lysosomen. Innerhalb der Feinstruktur der Lymphozyten fielen keine Unterschiede hinsichtlich des Alters der Tiere auf.

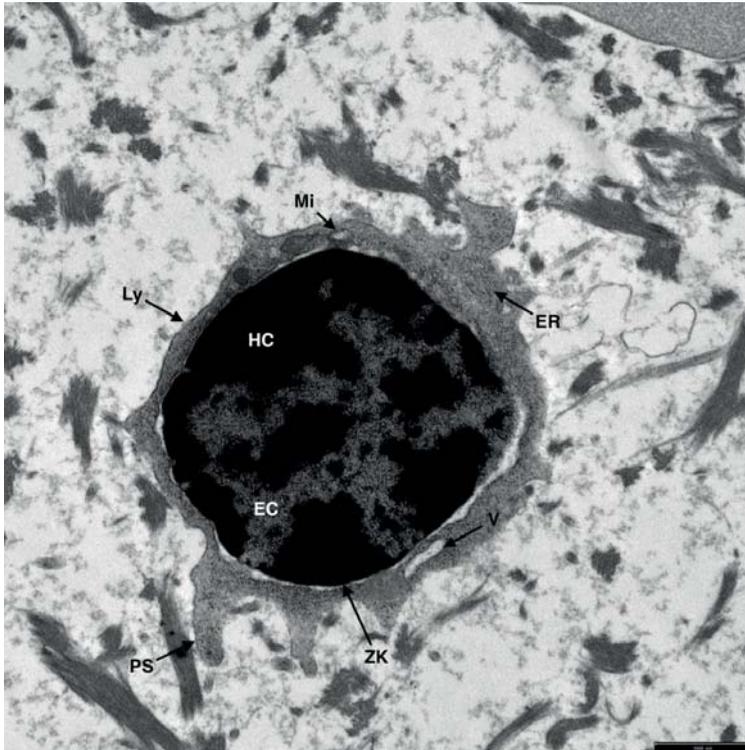


Abbildung 31: Kleiner Lymphozyt Gruppe 1 Stute "Idunn vom Törring"

Elektronenmikroskopie

Ly: Lymphozyt ZK: Zellkern EC: Euchromatin HC: Heterochromatin PS: Pseudopodien
Mi: Mitochondrium ER: Endoplasmatisches Retikulum V: Vakuole

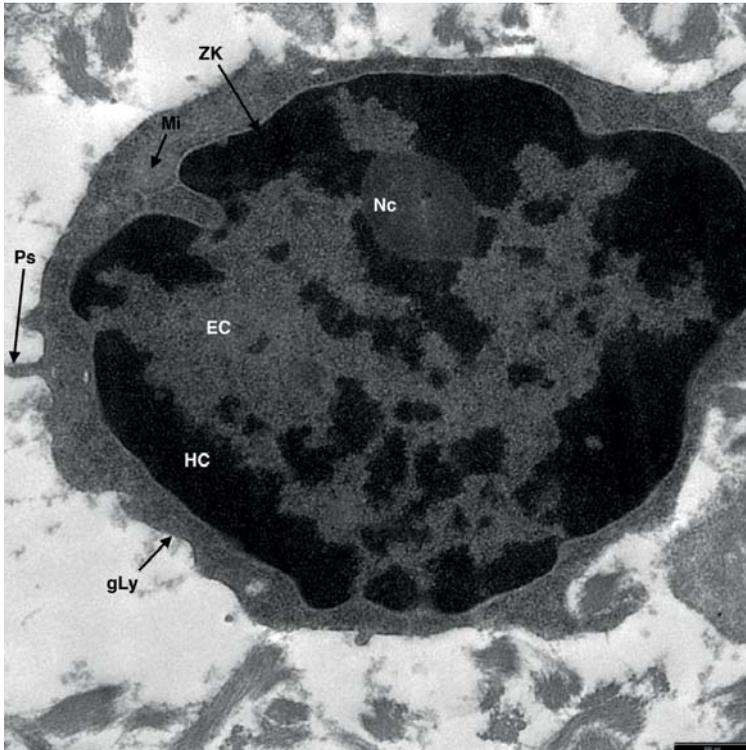


Abbildung 32: Großer Lymphozyt Gruppe 2 Hengst „Leiknir vom Törring“

Elektronenmikroskop

gLy: Großer Lymphozyt ZK: Zellkern EC: Euchromatin HC: Heterochromatin
 Nc: Nucleolus Mi: Mitochondrium Ps: Pseudopodien

3.7. Monozyten

Diese großen Zellen besitzen einen typisch nierenförmigen heterochromatinreichen Zellkern (Abb. 33). Die euchromatinreichen Bezirke liegen im zentralen Kernbereich. Auffallend ist der große Nucleolus, der häufig zentral im Kern liegt und aus einer Pars granulosa, Pars filamentosa und Pars amorpha besteht. Im Zytoplasma sah man kleinere Granula, Vakuolen, Mitochondrien und Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. Elektronendichte Vesikel, bei denen es sich um Lysosomen handeln dürfte, sind regelmäßig anzutreffen. Fingerartige Fortsätze an der Zellmembran waren als

Pseudopodien zu identifizieren. Unterschiede in der Ultrastruktur der Monozyten bestanden zwischen den einzelnen Altersgruppen nicht.

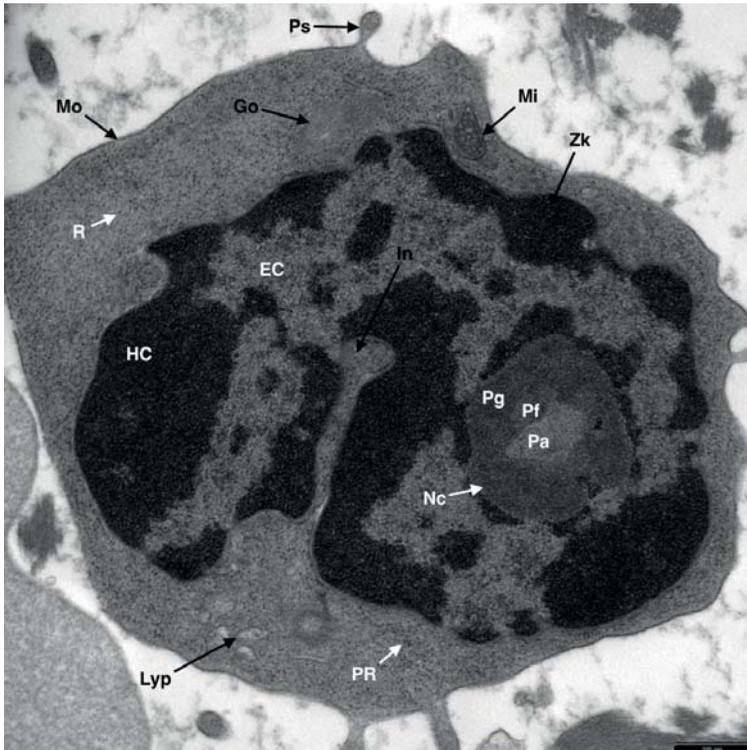


Abbildung 33: Monozyt Gruppe 1 Hengst „Hrimnir vom Burghauserhof“

Elektronenmikroskop

Mo: Monozyt	ZK: Zellkern	EC: Euchromatin	HC: Heterochromatin	Nc: Nucleolus
Pg: Pars granulosa nucleoli	Pf: Pars fibrosa nucleoli	Pa: Pars amorphae nucleoli		
In: Invaginatio nuclearis	Lyp: Lysosoma primariae	PR: Polyribosomen		
R: Ribosom	Go: Golgi-Apparat	Mi: Mitochondrium	Ps: Pseudopodie	

4. Glykohistochemie

4.1. Bindung von Glukose/Mannose spezifischen Lektinen

4.1.1. Bindung von Concanavalia Agglutinin

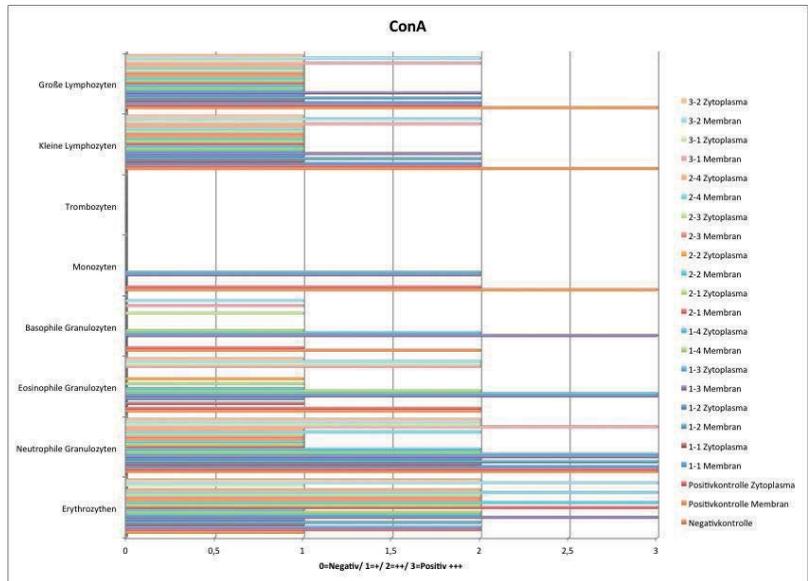


Abbildung 34: Bindungsintensität von ConA an die einzelnen Blutzellen

Bei dem Großteil aller Präparate zeigte sich eine deutliche positive Reaktion der Erythrozyten mit dem *Concanavalia* Agglutinin (Abb. 34-37). Die Zellmembranen färbten sich vornehmlich stark an, das Zytoplasma zeigte vor allem im zentralen Bereich positive Reaktion. Bei den Granulozyten waren auch deutliche Anfärbungen zu verzeichnen: Insbesondere wurden die Granula bei den eosinophilen und basophilen Granulozyten durch positive Reaktion sichtbar. In manchen Fällen färbte sich auch die Membran schwach an. Das Zytoplasma und die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten reagierten im Durchschnitt mittelstark positiv. Bei den Monozyten machte die Gesamtmenge an positiver Reaktion etwa ein Drittel aus: Zumeist färbte sich die Membran an und nur sehr schwach das Zytoplasma. Die Thrombozyten reagierten nicht mit dem ConA. Die Lymphozyten hatten sowohl hinsichtlich der Zytoplasmaanfärbung als auch der Membranfärbung immer ein zumindest schwach positives Signal.

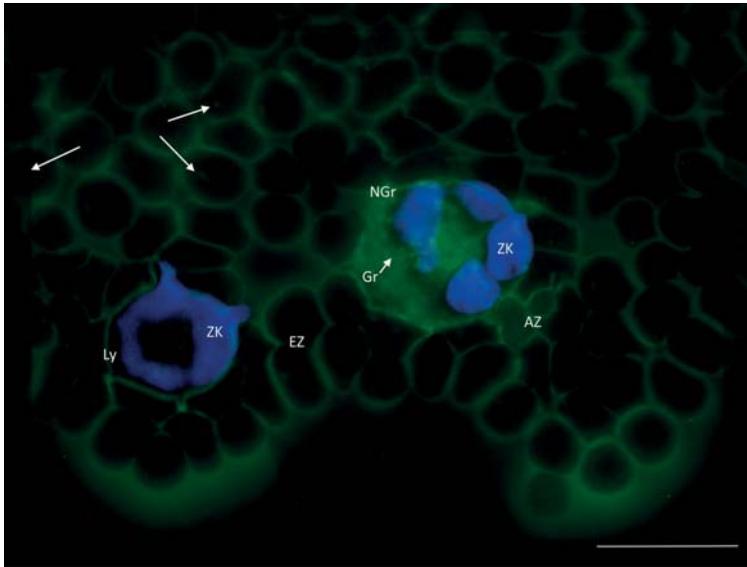


Abbildung 35: Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt & Erythrozyten Gruppe 1 Hengst NN (M:Skettla/V:Hrólfur)

Bindung von ConA-FITC

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt NGr: Neutrophiler Granulozyt Gr: Granula ZK: Zellkern

AK: Akanthozyten LY: Lymphozyt

unbeschriftete Pfeile: die durch die bikonkave Scheibenform bedingte zentrale Aufhellung des Zytoplasmas der Erythrozyten hat das Lektin teilweise gebunden

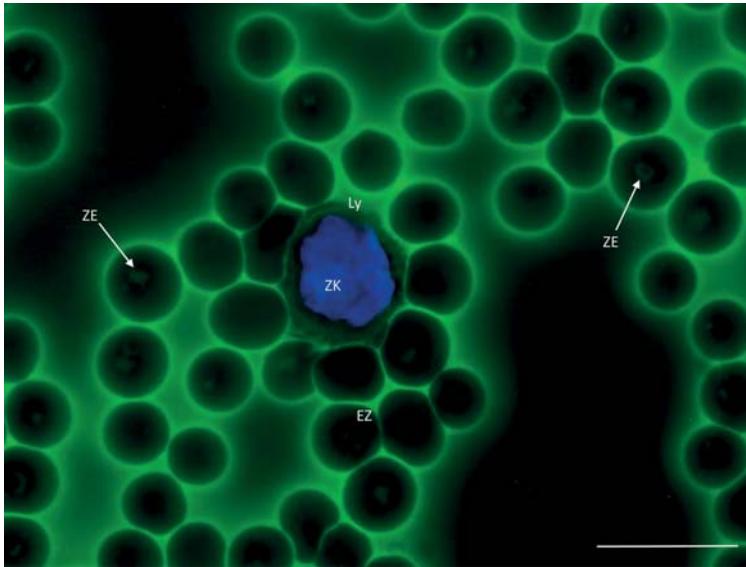


Abbildung 36: Lymphozyt & Erythrozyten Gruppe 3 Stute "Hara di Napoli"
Bindung von ConA-FITC

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt Ly: Lymphozyt ZK: Zellkern

ZE: angefärbte zentrale Eindellung des Erythrozyten

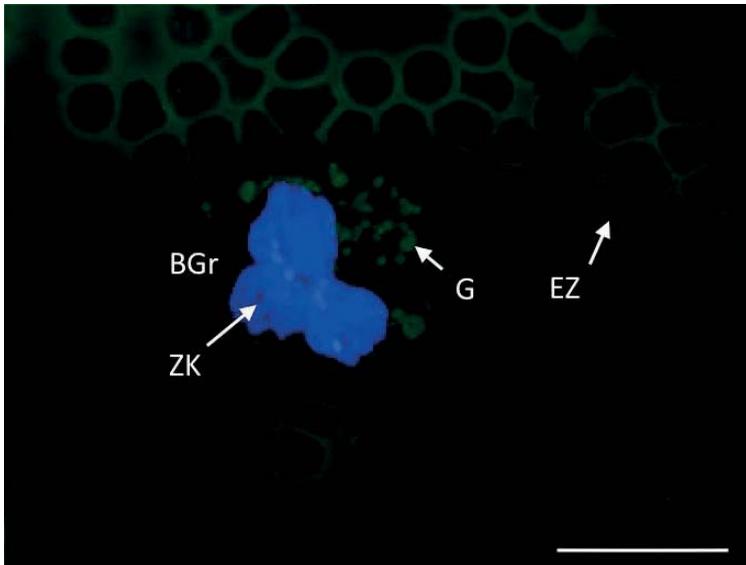


Abbildung 37: Basophiler Granulozyt & Erythrozyten Gruppe 1 Stute „Hjördis vom Burghauserhof“

Bindung von ConA-FITC

SB: 10 μ m

BGr: Basophiler Granulozyt **ZK:** Zellkern

G: Granula

EZ: Erythrozyt

4.1.2. Bindung von *Lens culinaris* Agglutinin

Bei den Versuchen mit dem *Lens culinaris* Agglutinin kam es zu keiner Bindung und somit zu negativen Ergebnissen der Ausstriche.

4.1.3. Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin

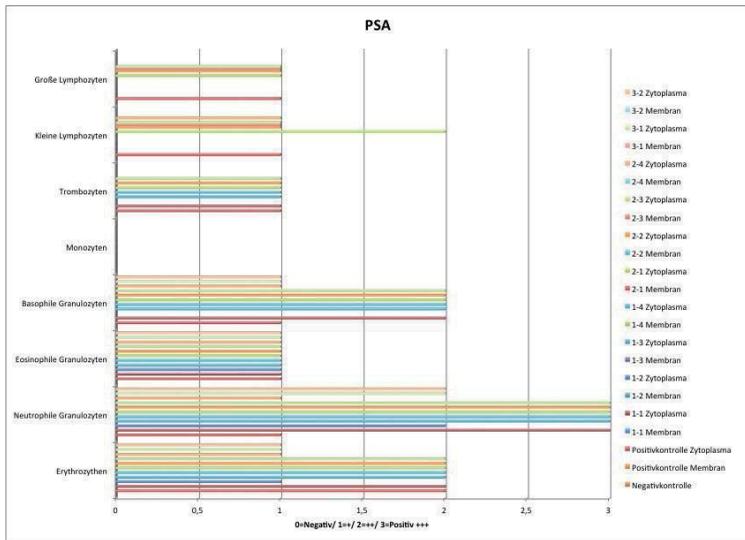


Abbildung 38: Bindungsintensität von PSA an die einzelnen Blutzellen

Bei der Färbung mit PSA-FITC (Abb. 38-41) zeigten die Erythrozyten eine starke Färbung des Zytoplasmas, die Zellmembran färbte sich selten mit an. Die Granula der neutrophilen und basophilen Granulozyten färbten sich stark an, das Zytoplasma in mittlerer Intensität. Die Granula der eosinophilen Granulozyten dagegen reagierten nur schwach mit PSA-FITC. In Monozyten konnte keine Anfärbung gefunden werden. Die Thrombozyten reagierten bei manchen Tieren sowohl im Zytoplasma als auch in der Zellmembran mit schwacher Bindung des Lektins. Bei den Lymphozyten gab es auch schwache positive Reaktion hinsichtlich der Zytoplasmaanfärbung, die Zellmembran reagierte hin und wieder in stärkerer Ausprägung.

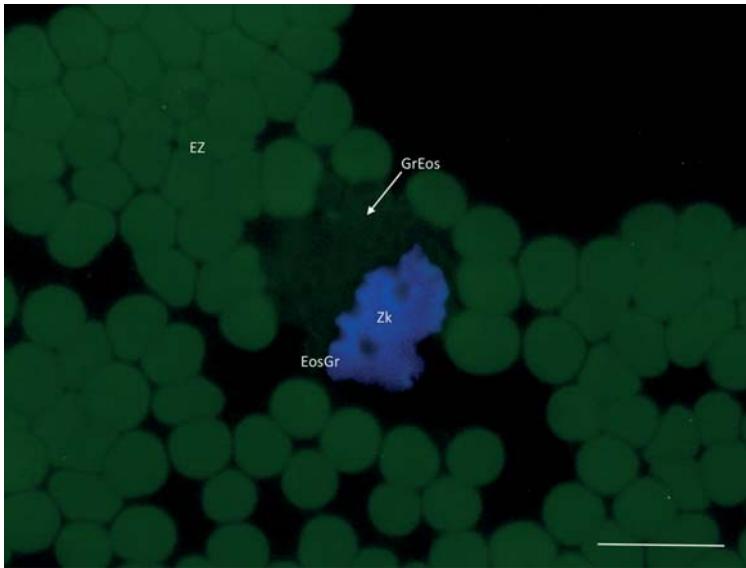


Abbildung 39: Eosinophiler Granulozyt & Erythrozyten Gruppe 1 Stute NN (M:Oda-Fló/V:Hrólfur)

Bindung von PSA-FITC

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt **EosGr:** Eosinophiler Granulozyt **ZK:** Zellkern

GrEos: Granula des eosinophilen Granulozyten

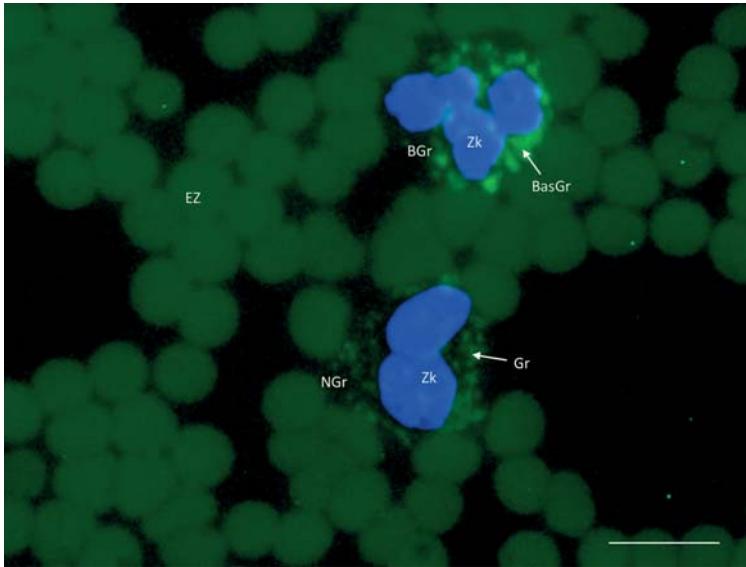


Abbildung 40: Basophiler & Neutrophiler Granulozyt Gruppe 1 Hengst NN (M:Draumsun/V: Hrólfur)

Bindung von PSA-FITC

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt
Granulozyten

BGr: Basophiler Granulozyt
NGr: Neutrophiler Granulozyt

ZK: Zellkern

Gr: Granula des neutrophilen Granulozyten

BasGr: Granula des basophilen

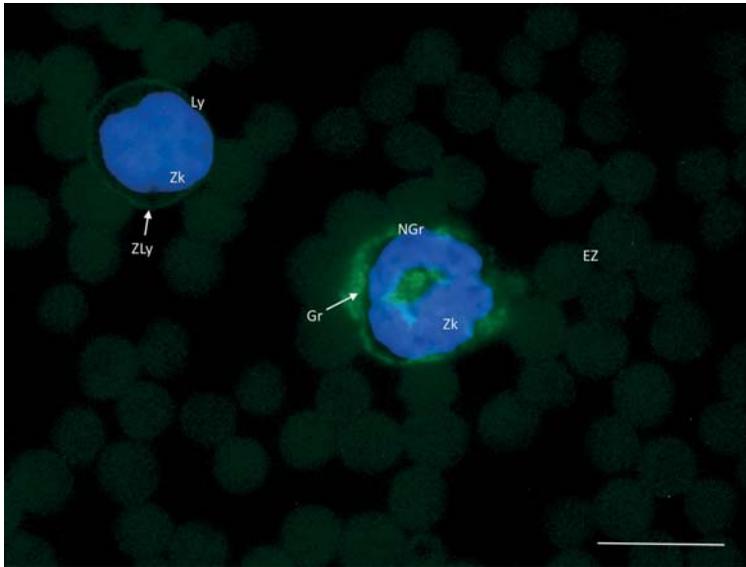


Abbildung 41: Lymphozyt & Neutrophiler Granulozyt Gruppe 2 Hengst "Gáski vom Törring"

Bindung von PSA-FITC

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt NGr: Neutrophiler Granulozyt ZK: Zellkern Gr: Granula des neutrophilen Granulozyten
 Ly: Lymphozyt ZLy: Zellmembran des Lymphozyten

4.2. Bindung von Galaktose spezifischen Lektinen

4.2.1. Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin

Mit dem Lektin GSL kam es zu keiner Bindung an die Blutzellen.

4.2.2. Bindung von Peanut Agglutinin

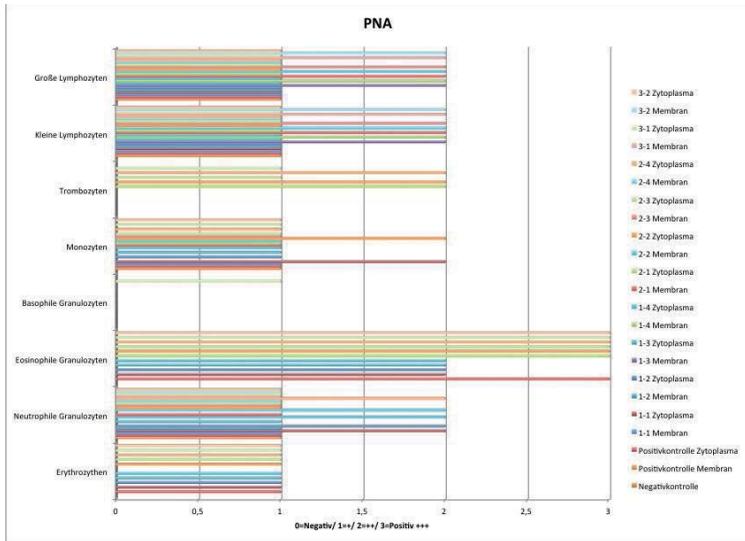


Abbildung 42: Bindungsintensität von PNA an die einzelnen Blutzellen

Bei der Färbung mit PNA-FITC (Abb. 42-44) reagierten die Erythrozyten nur schwach positiv und dies auch nicht in allen Ausstrichen. Bei den Granulozyten zeigten die eosinophilen Granulozyten hinsichtlich der Färbung des Zytoplasmas die deutlichste Reaktion. Die Granula färbten sich immer auffällig stark an, des Öfteren blieb jedoch die Anfärbung der Membran aus. Die neutrophilen Granulozyten reagierten häufig zumindest schwach positiv. Zumeist waren in diesen Färbungen das Zytoplasma und die Granula schwach positiv gefärbt, nur selten auch die Zellmembran. Erstaunlich dagegen, dass die basophilen Granulozyten nicht sichtbar wurden. Bei den Monozyten kam es zu einer geringgradigen Anfärbungen in den Membranen und dem Zytoplasma, bei nur einem Ausstrich färbte sich das Zytoplasma ein wenig stärker an. Wenige Blutplättchen färbten sich schwach bis in mittlerer Intensität an. Alle detektierten Lymphozyten reagierten in der Anfärbung schwach positiv, die Membranen färbten sich öfter auch eine Stufe intensiver als das Zytoplasma an.

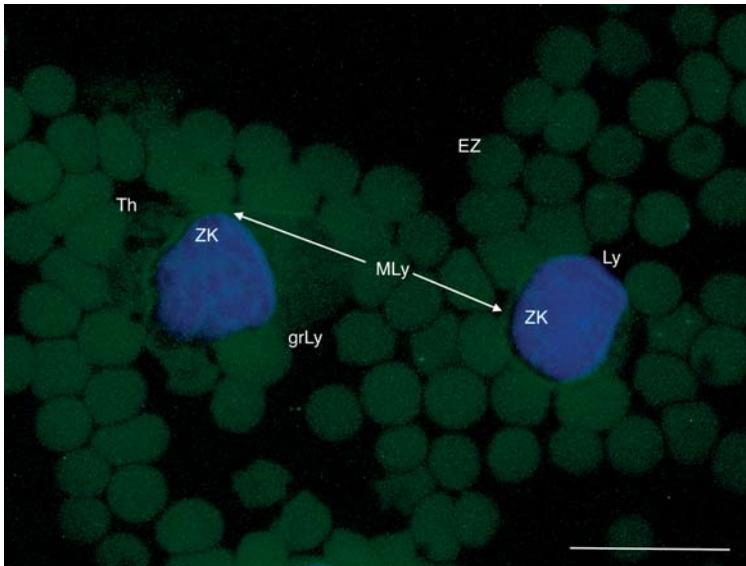


Abbildung 43: Großer und kleiner Lymphozyt Gruppe 1 Hengst NN (M: Draumsun/V: Hrólfur)

Bindung von PNA-FITC

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt

Th: Thrombozyten

Ly: kleiner Lymphozyt

grLy: großer Lymphozyt

ZK: Zellkern

MLy: Membran der Lymphozyten

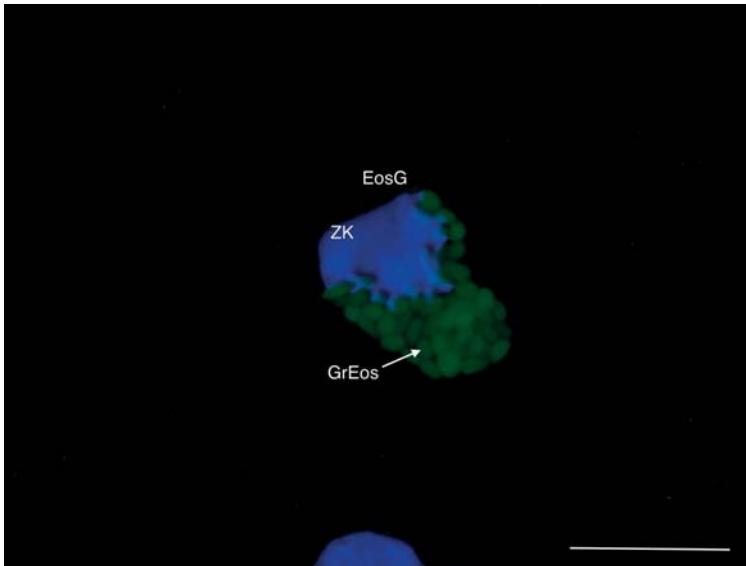


Abbildung 44: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 2 Wallach NN (M: Hroyn/ V: Íðir)
Bindung von PNA-FITC

SB: 10 μ m

EosG: Eosinophiler Granulozyt

ZK: Zellkern

GrEos: Granula des eosinophilen Granulozyten

4.2.3. Bindung von *Ricinus communis* Agglutinin

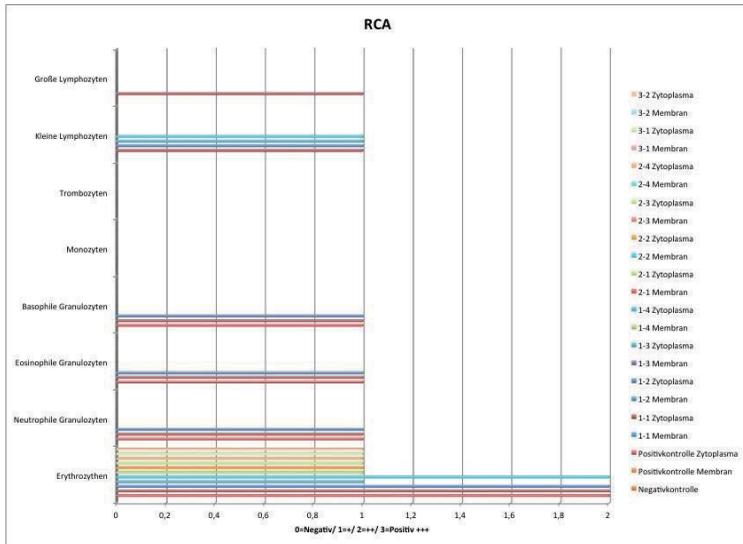


Abbildung 45: Bindungsintensität von RCA an die einzelnen Blutzellen

Für *Ricinus communis* Agglutinin zeigten die Erythrozyten die größte Affinität: Das Zytoplasma färbte sich schwach an, die Membranen weniger. Auch die Granula der eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten färbten sich in einem Fall nur schwach positiv an, ansonsten war bei zwei Fällen eine schwache Anfärbung der Membran der Granulozyten zu verzeichnen. Im Großteil der Ausstriche war keine Färbung der Granulozyten zu sehen. Zu einer Anfärbung der Monozyten und Thrombozyten kam es nicht. Bei den Lymphozyten fielen wenn überhaupt eine schwache Reaktion der Membran und in einem Einzelfall auch eine schwache Färbung des Zytoplasmas auf.

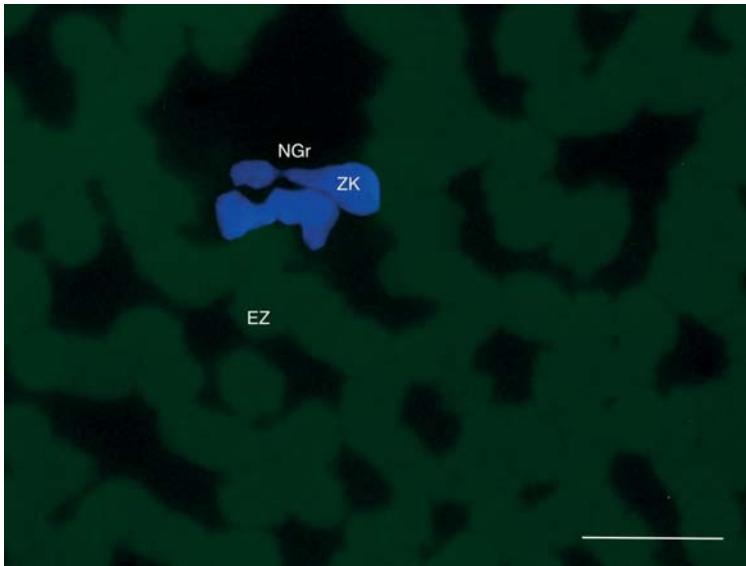


Abbildung 46: Neutrophiler Granulozyt Gruppe 3 Stute "Liv vom Burghauserhof"
Bindung von RCA-FITC

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt

NGr: Neutrophiler Granulozyt

ZK: Zellkern

4.3. Bindung von N-Acetylglukosamin spezifischen Lektinen

4.3.1. Bindung von Wheat germ Agglutinin

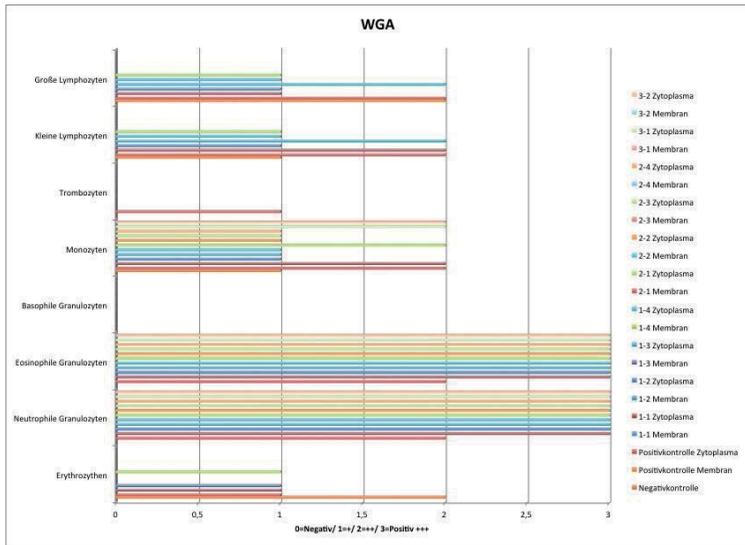


Abbildung 47: Bindungsintensität von WGA an die einzelnen Blutzellen

Das Lektin des Weizens (Abb. 47-50) färbte die Erythrozyten kaum an. Bei den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten dagegen kam es zu einer starken Anfärbung des Zytoplasmas und der Membran. Bei den basophilen Granulozyten konnte keine Farbgebung erkannt werden. Die Monozyten ließen sich von dem WGA Lektin schwach in der Membran und vereinzelt auch etwas stärker im Zytoplasma färben. Die Blutplättchen färbten sich kaum erkenntlich an. Etwa die Hälfte der Lymphozyten färbte sich schwach in Zytoplasma und Membran.

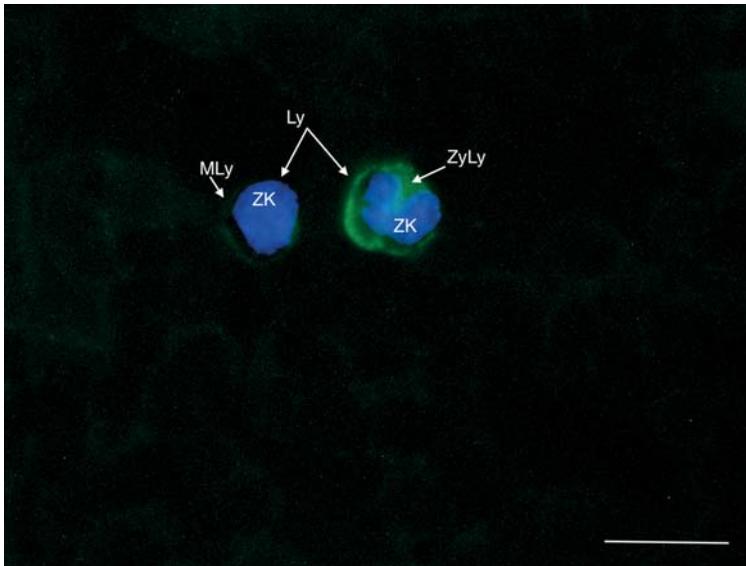


Abbildung 48: Kleine Lymphozyten Gruppe 1 Hengst "Hrimnir vom Burghuserhof"
Bindung von WGA-FITC

SB: 10 μ m

Ly: kleine Lymphozyten **ZK:** Zellkern **ZyLy:** Zytoplasma des Lymphozyten

MLy: Membran des Lymphozyten

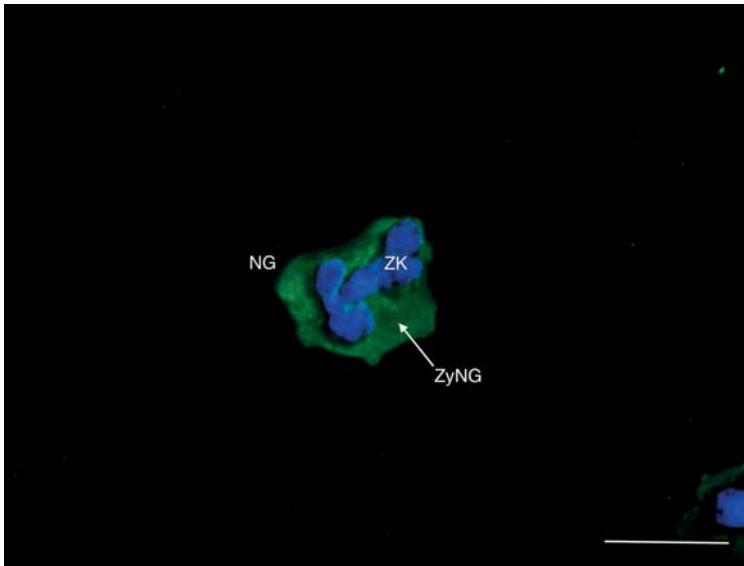


Abbildung 49: Neutrophiler Granulozyt Gruppe 1 Hengst NN (M:Skettla/V:Hrólfur)
Bindung von WGA-FITC

SB: 10 μ m

NG: Neutrophiler Granulozyt

ZK: Zellkern

ZyNG: Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten

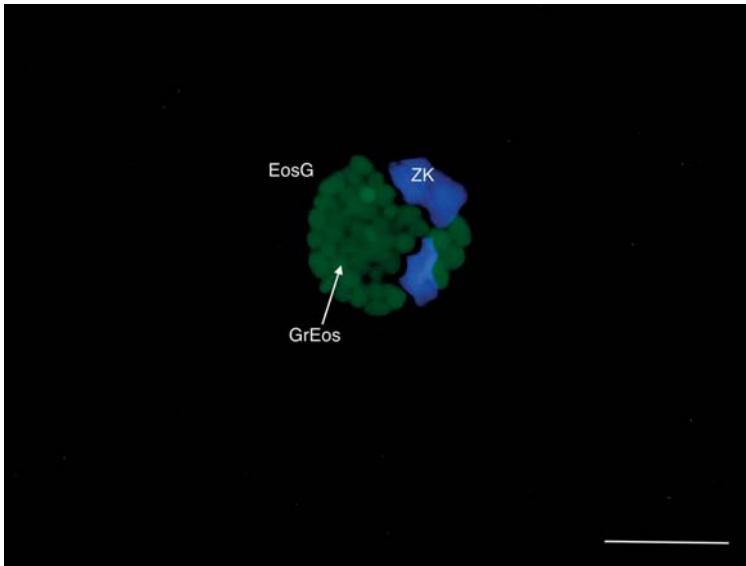


Abbildung 50: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 3 Wallach "Thor"

Bindung von WGA-FITC

SB: 10 μm

EosG: Eosinophiler Granulozyt

ZK: Zellkern

GrEos: Granula des eosinophilen Granulozyten

4.3.2. Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert

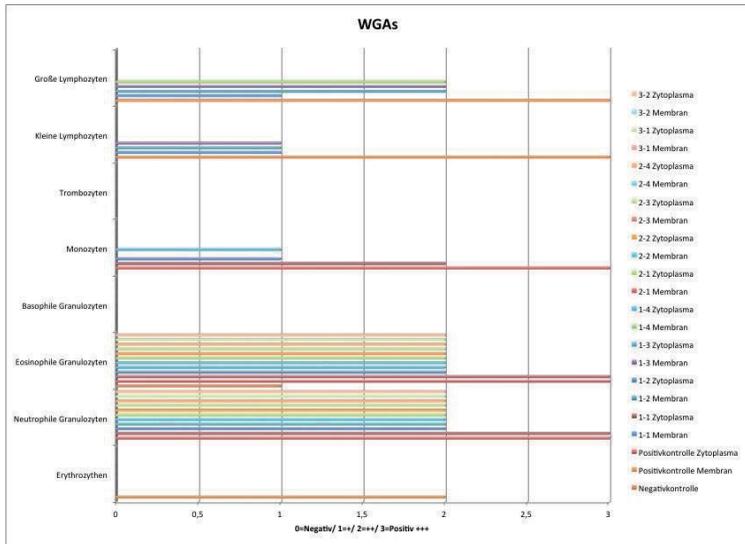


Abbildung 51: Bindungsintensität von WGAs an die einzelnen Blutzellen

Das Ergebnis hinsichtlich der Anfärbung mittels des succinylierten Weizenlektins lässt sich mit dem Resultat des WGA Versuchs vergleichen: WGAs färbte die Erythrozyten bis auf eine Ausnahme nicht an. Bei den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten dagegen kam es zu einer mittleren Anfärbung des Zytoplasmas und der Membran. Bei den basophilen Granulozyten konnte keine Farbgebung verzeichnet werden. Die Monozyten ließen sich, bis auf wenige Ausnahmen, von dem WGAs Lektin kaum anfärben. Die Blutplättchen färbten sich nicht an. Etwa ein Drittel der Lymphozyten färbte sich schwach in Zytoplasma und Membran (Abb. 51, 52).

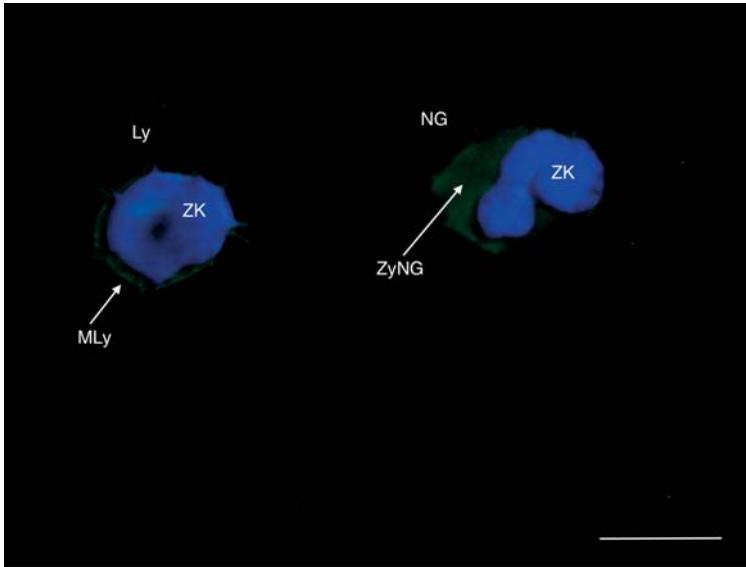


Abbildung 52: Kleiner Lymphozyt und neutrophiler Granulozyt Gruppe 2 Hengst "Kjammi vom Törring"

Bindung von WGAs-FITC

SB: 10 μm

Ly: Kleiner Lymphozyt

ZK: Zellkern

MLy: Membran des Lymphozyten

NG: Neutrophiler Granulozyt

ZyNG: Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten

4.4. Bindung von N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektinen

4.4.1. Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin

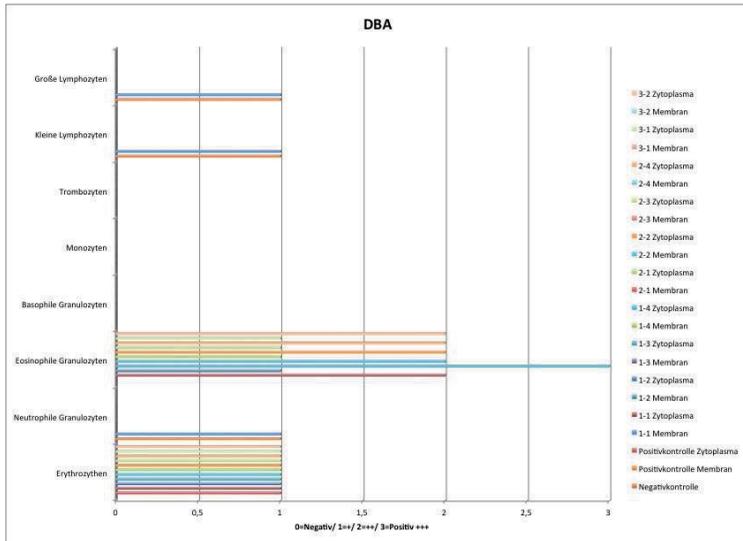


Abbildung 53: Bindungsintensität von DBA an die einzelnen Blutzellen

Das Lektin der afrikanischen Pferdebohne färbte nur schwach die Membran und das Zytoplasma der Erythrozyten an. Bei den Granulozyten konnten nur Granula und das Zytoplasma der meisten eosinophilen Granulozyten von DBA angefärbt werden. Alle anderen Blutzellen wurden, bis auf zwei Fälle mit schwacher Anfärbung der Lymphozyten, nicht gefärbt (Abb. 53-55).

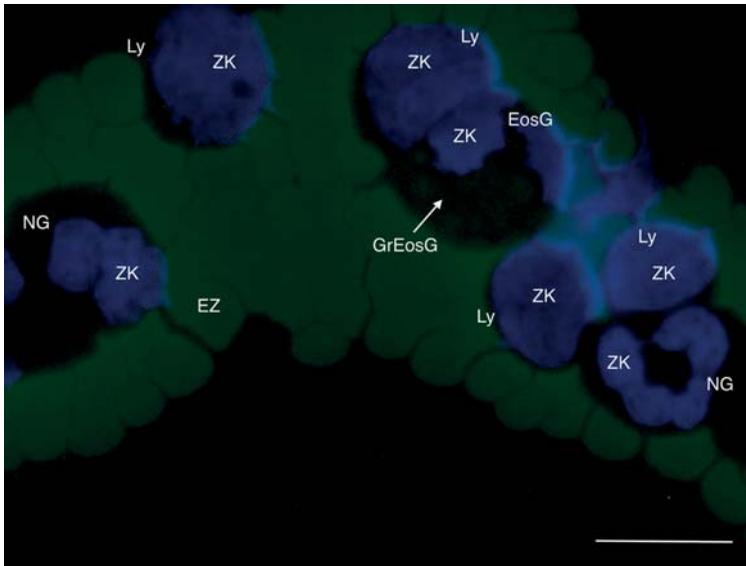


Abbildung 54: Diverse nicht angefärbte Blutzellen und eosinophiler Granulozyt Gruppe 1 Stute "Hjördis vom Burghauserhof"

Bindung von DBA-FITC

SB: 10 μm

EZ: Erythrozyt **ZK:** Zellkern **NG:** Neutrophiler Granulozyt (nicht angefärbt)

Ly: Kleiner Lymphozyt (nicht angefärbt) **EosG:** Eosinophiler Granulozyt

GrEosG: Granula des eosinophilen Granulozyten (schwach angefärbt)

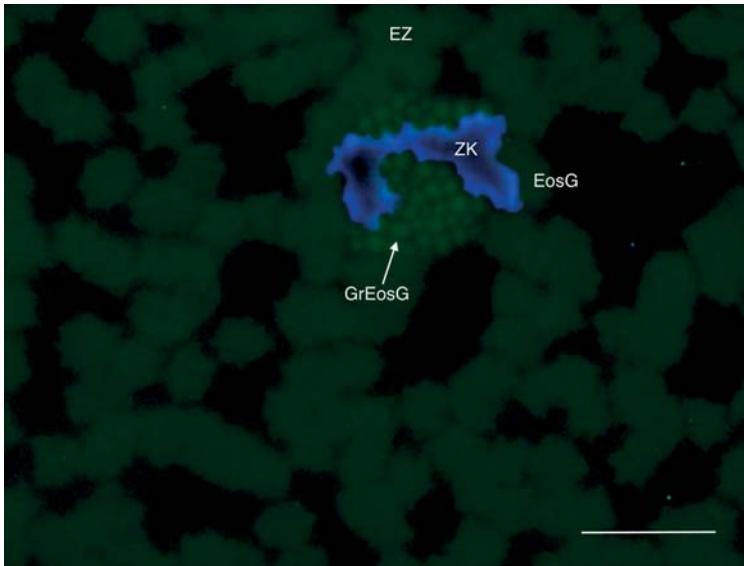


Abbildung 55: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 1 Hengst NN (M:Skettla/V:Hrólfur)
Bindung von DBA-FITC

SB: 10 μm

EZ: Erythrozyt EosG: Eosinophiler Granulozyt ZK: Zellkern

GrEosG: Granula des eosinophilen Granulozyten

4.4.2. Bindung von Soybean Agglutinin

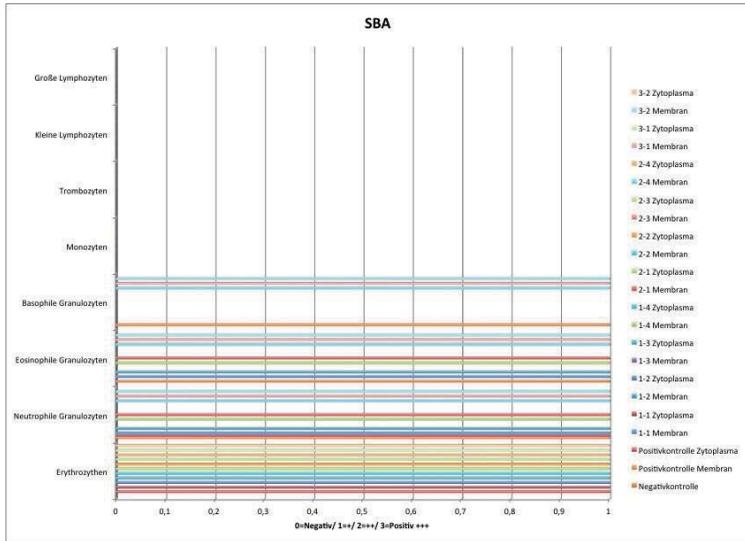


Abbildung 56: Bindungsintensität von SBA an die einzelnen Blutzellen

Die Erythrozyten zeigten für das Lektin der Sojabohne starke Reaktionen: Sowohl Zytoplasma als auch Membran färbten sich in allen Proben stark an. In etwa der Hälfte aller Ausstriche waren Zytoplasma und Membran der Granulozyten stark gefärbt. Die eosinophilen und neutrophilen Granulozyten färbten sich häufiger an als die basophilen Granulozyten. Dagegen kam es bei Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten zu keiner Färbung (Abb. 56, 57).

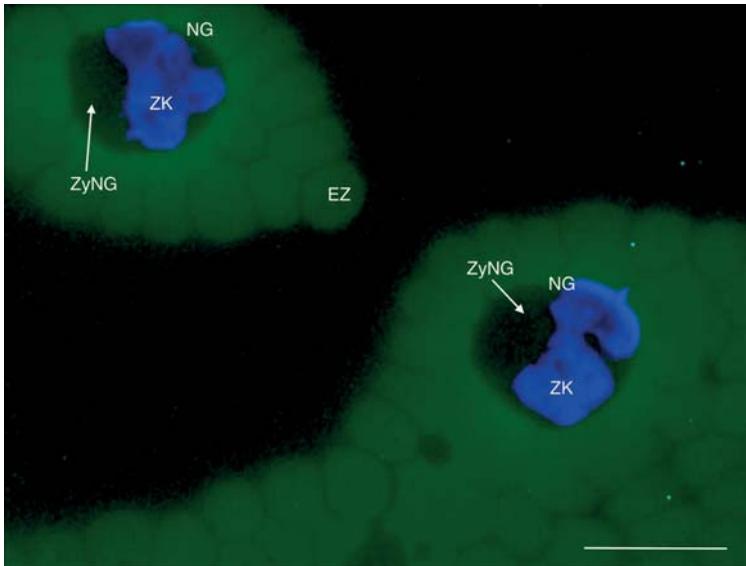


Abbildung 57: Neutrophile Granulozyten Gruppe 3 Stute "Gjölf von der Hainbuche"
Bindung von SBA-FITC

SB: 10 μm

EZ: Erythrozyt NG: Neutrophiler Granulozyt ZK: Zellkern

ZyNG: Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten

4.4.3. Bindung von *Sophora japonica* Agglutinin

Eine Bindung des SJA Lektins fand nicht statt.

4.5. Bindung von Fukose spezifischen Lektinen

4.5.1. Bindung von *Ulex europaeus* Agglutinin

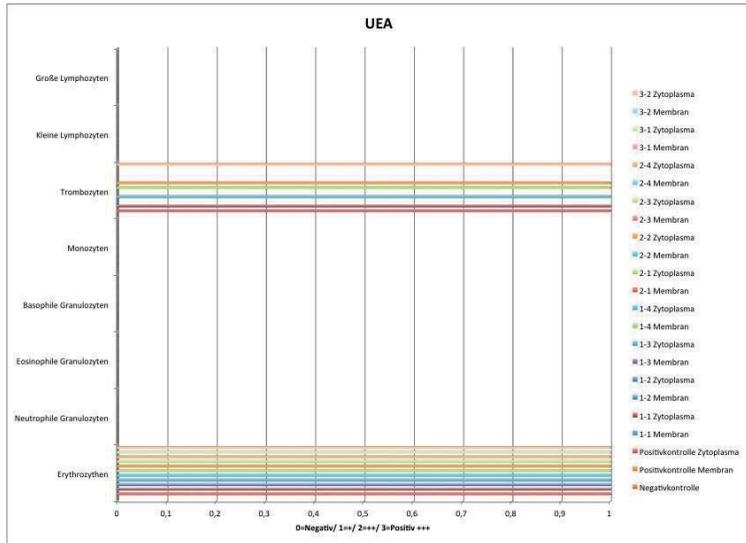


Abbildung 58: Bindungsintensität von UEA an die einzelnen Blutzellen

Das UEA färbte die Erythrozyten in allen Ausstrichen deutlich in Membran und Zytoplasma an (Abb. 58, 59). Die Granulozyten und Monozyten zeigten keine Reaktion. Etwa ein Drittel der Thrombozyten färbte sich stark an. Die Lymphozyten zeigten keine Anfärbung.

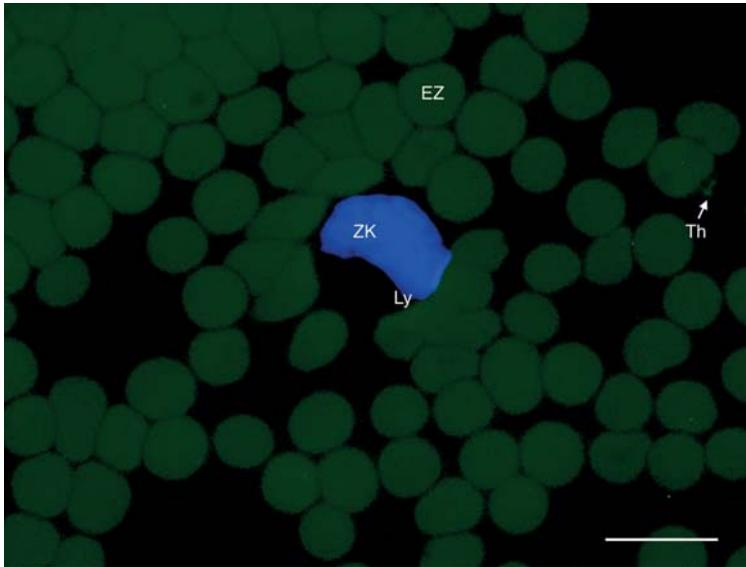


Abbildung 59: Erythrozyten und Thrombozyt Gruppe 2 Hengst „Gáski vom Törring“
Bindung von UEA-FITC

SB: 10 μm

EZ: Erythrozyt

ZK: Zellkern

Ly: großer Lymphozyt (nicht angefärbt)

Th: Thrombozyt

4.6. Bindung komplexer Kohlenhydratstrukturen spezifischer Lektine

4.6.1. Bindung von Phaseolus vulgaris E Agglutinin

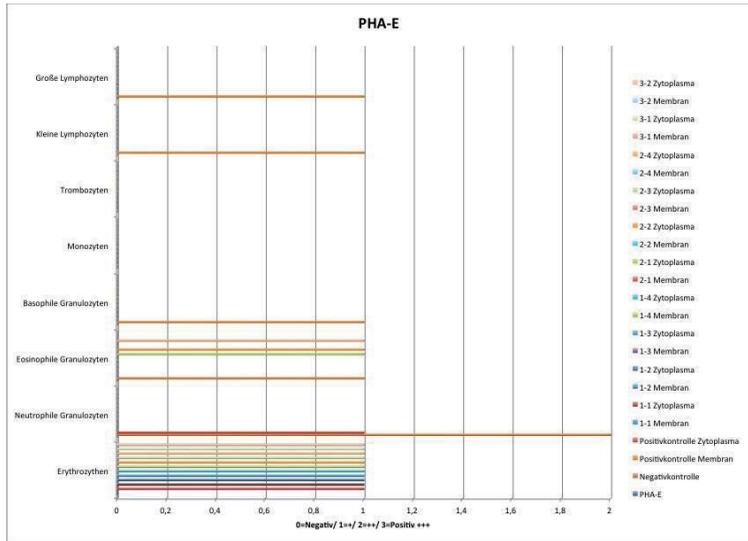


Abbildung 60: Bindungsintensität von PHA-E an die einzelnen Blutzellen

Bei fast allen Erythrozyten konnte eine schwache Bindung des Lektins PHA-E an die Zellmembran und an das Zytoplasma bemerkt werden (Abb. 60, 61). Nur in einzelnen Fällen fand auch das Zytoplasma oder die Membran der Granulozyten schwache Anfärbungsreaktionen. Monozyten und Thrombozyten blieben ungefärbt. Im Einzelfall konnte man eine leichte Färbung des Zytoplasmas der Lymphozyten erkennen.

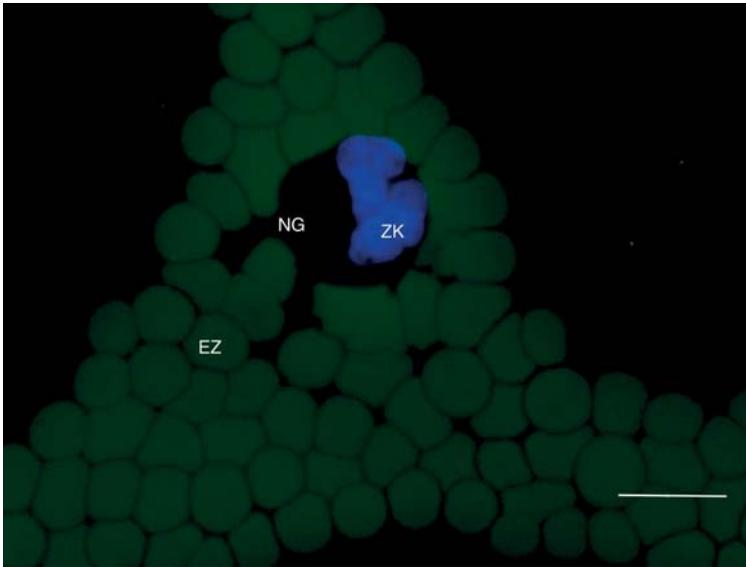


Abbildung 61: Erythrozyten Gruppe 1 Hengst "Hrimnir vom Burghauserhof"
Bindung von PHA-E-FITC

SB: 10 μm

EZ: Erythrozyt NG: Neutrophiler Granulozyt (nicht angefärbt) ZK: Zellkern

4.6.2. Bindung von Phaseolus vulgaris L Agglutinin

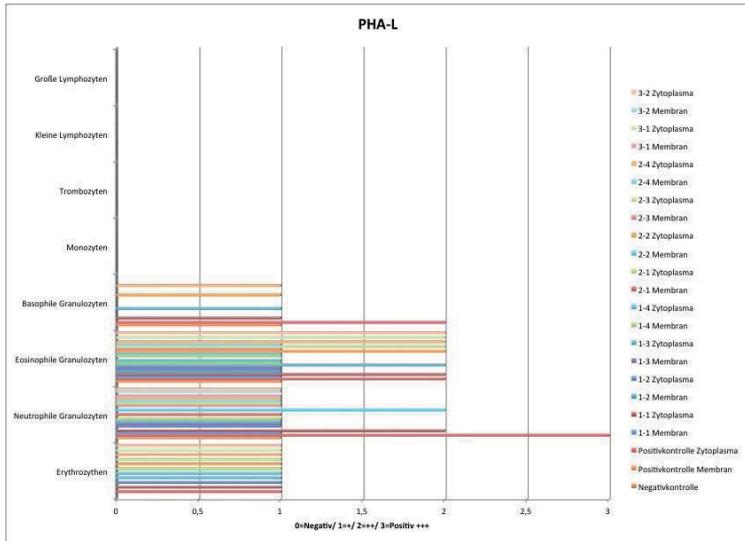


Abbildung 62: Bindungsintensität von PHA-L an die einzelnen Blutzellen

Die Erythrozyten färbten sich nach Kontakt mit PHA-L durchwegs schwach an (Abb. 62, 63). Bei den Granulozyten fand man auch eine schwache Färbeintensität: Die Granula der einzelnen Granulozyten färbten sich gelegentlich in mittlerer Stärke. Die Membranen der basophilen Granulozyten färbten sich nie an, bei den eosinophilen und neutrophilen Granulozyten gab es hin und wieder schwache Anfärbungen. Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten zeigten mit PHA-L keine Reaktion.

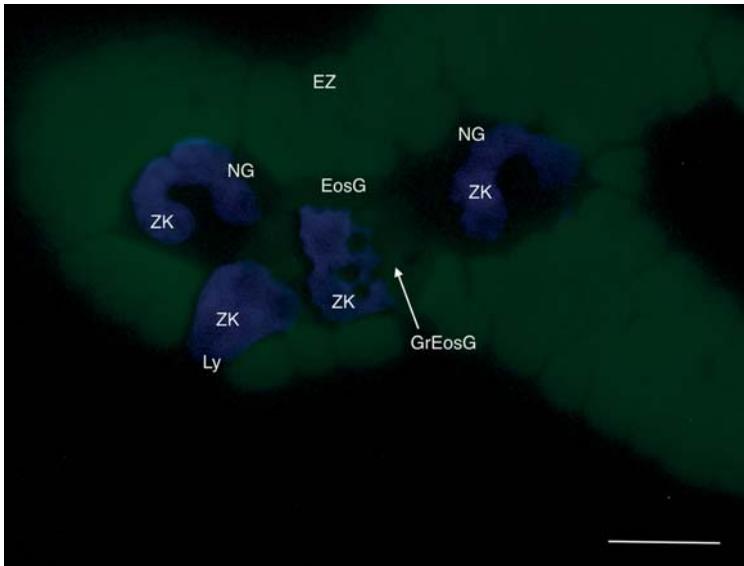


Abbildung 63: Eosinophiler Granulozyt Gruppe 1 Hengst (M:Skettla/V:Hrólfur)
Bindung an PHA-L-FITC

SB: 10 μm

EZ: Erythrozyt ZK: Zellkern NG: Neutrophiler Granulozyt (nicht angefärbt)
Ly: Lymphozyt (nicht angefärbt) EosG: Eosinophiler Granulozyt
GrEosG: Granula des eosinophilen Granulozyten

5. Immunzytochemische Untersuchungen

5.1. T-Lymphozyten spezifische monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Antikörper mAK 4-13, mAK 4-58 und mAK 5-50 sollten eine positive Anfärbung der T-Lymphozyten hervorrufen. Bei den Versuchen mit mAK 4-13 und mAK 5-50 kam es zu keiner Anfärbung. In den Ausstrichen mit mAK 4-58 konnte eine geringgradige Anfärbung von Zytoplasma und Membran der T-Lymphozyten beobachtet werden, wobei sich die Membranen und zeitweise auch das Zytoplasma der Erythrozyten schwach mit anfärbten (Abb. 64).

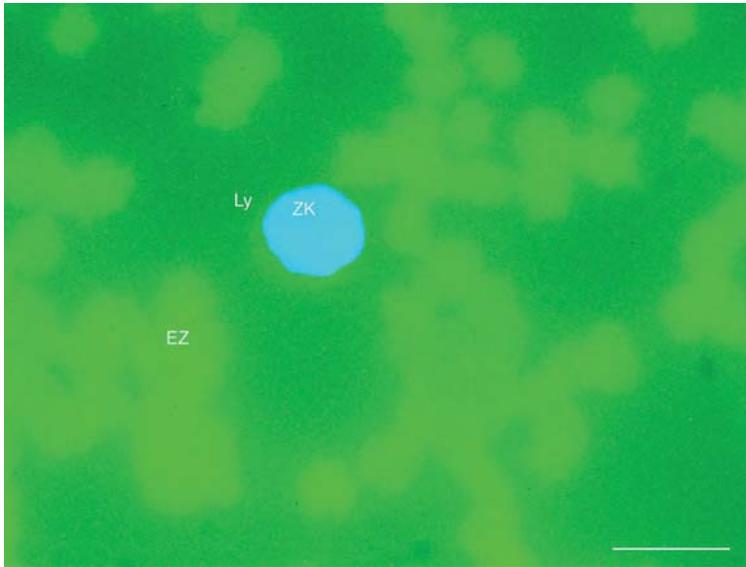


Abbildung 64: T-Lymphozyt Gruppe 2 Wallach (M:Skettla/V:İöir)

Bindung des mAK 4-58

SB: 10 μ m

Ly: äußerst schwach angefärbter T-Lymphozyt ZK: Zellkern EZ: Erythrozyten (Geldrollenbildung)

5.2. B-Lymphozyten spezifische monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Antikörper 1-19, 2-52, 4-36, 4-55 und 6-39 sollten B-Lymphozyten anfärben. Der monoklonale Antikörper 1-19 färbte die Membran der Erythrozyten und ebenso in schwächerem Maße die Membran der B-Lymphozyten. Alle anderen Blutzellen blieben von mAK 1-19 ungefärbt (Abb. 65).

mAK 2-52 färbte bis auf die stark positiv reagierenden B-Lymphozyten keine anderen Blutzellen an; in manchen Ausstrichen sah man höchstens eine geringgradige Anfärbung der Erythrozytenmembranen (Abb. 66).

mAK 4-36 färbte alle Blutzellen an: Bei den Granulozyten und Monozyten konnte man fast nur Membranfärbungen sehen, die Thrombozyten färbten sich vollends an, die Erythrozyten hatten vornehmlich auch nur gefärbte Membranen. Eine Differenzierung

zwischen B- und T-Lymphozyten war nicht möglich, da sich alle Lymphozyten in Membran und Zytoplasma mitanfärbten (Abb. 67, 68).

mAK 4-55 reagierte mit keiner Blutzelle positiv.

mAK 6-39 dagegen färbte bis auf die T-Lymphozyten alle Blutzellen mittelstark an. Die B-Lymphozyten reagierten mit Zytoplasma und Membran, wobei die Zytoplasmafärbung stärker ausfiel (Abb. 69).

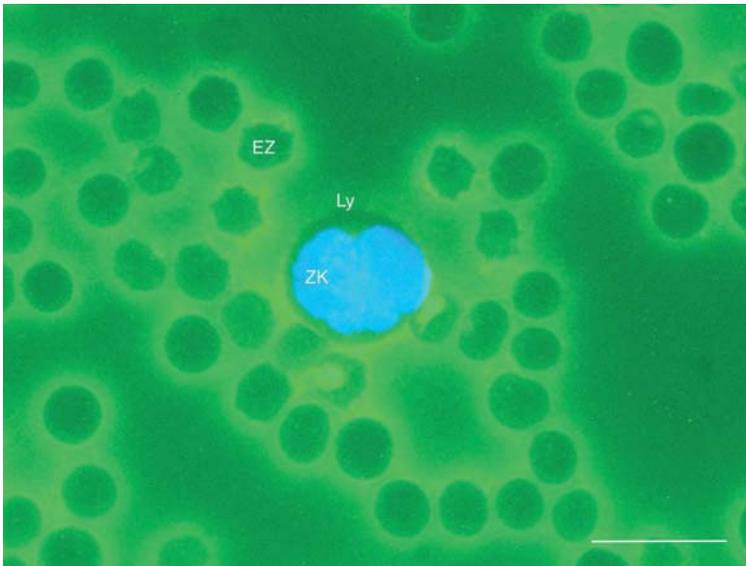


Abbildung 65: B-Lymphozyt Gruppe 1 Stute "Kátina vom Törring"

Bindung des mAK 1-19

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt Ly: B-Lymphozyt mit schwacher Membranfärbung ZK: Zellkern

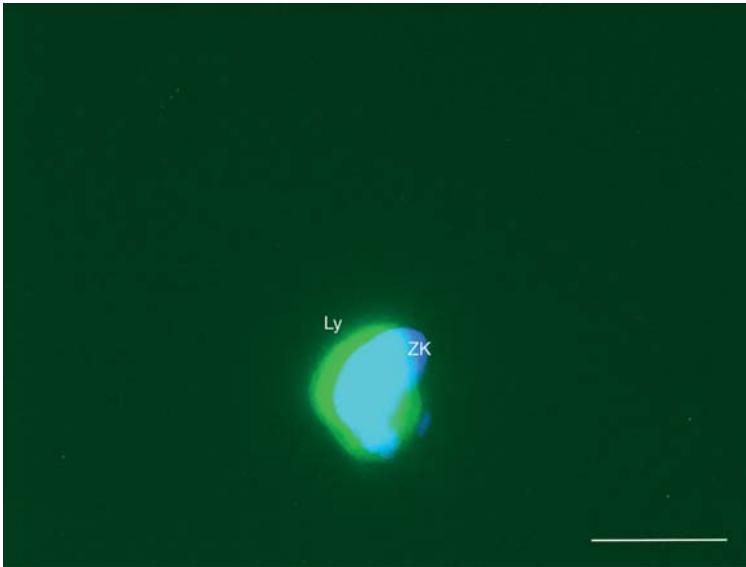


Abbildung 66: B-Lymphozyt Gruppe 2 Hengst "Gáski vom Törring"

Bindung des mAK 2-52

SB: 10 μm

Ly: B-Lymphozyt ZK: Zellkern

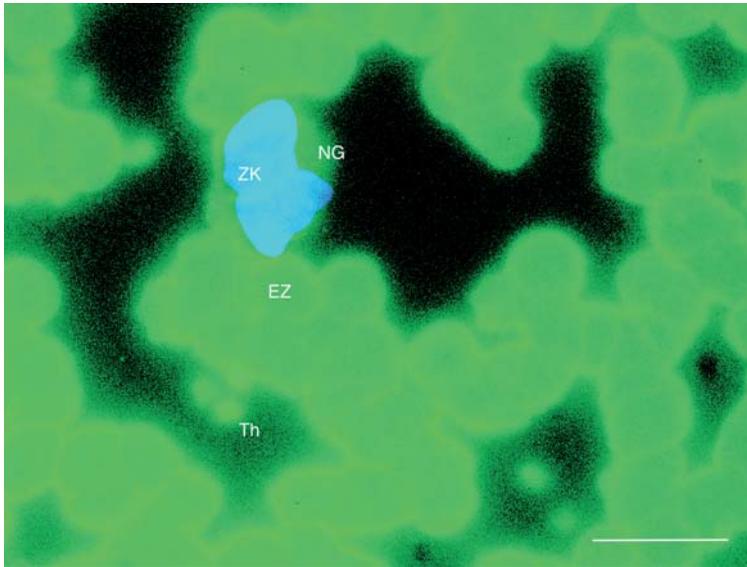


Abbildung 67: Neutrophiler Granulozyt Gruppe 2 Hengst "Potti vom Burrishof"
Bindung des mAK 4-36

SB: 10 μ m

EZ: Erythrozyt ZK: Zellkern NG: Neutrophiler Granulozyt Th: Thrombozyt

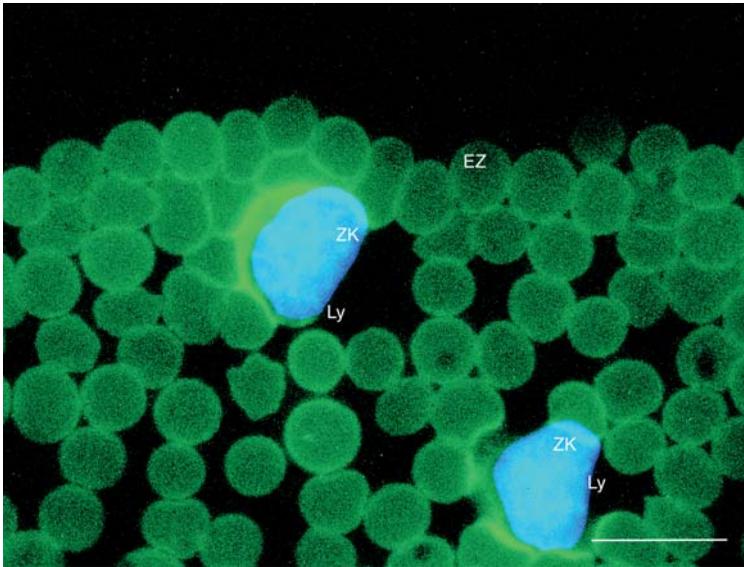


Abbildung 68: Lymphozyten Gruppe 2 Hengst "Potti vom Burrishof"
Bindung des mAK 4-36

SB: 10 μm

EZ: Erythrozyt ZK: Zellkern Ly: Lymphozyten

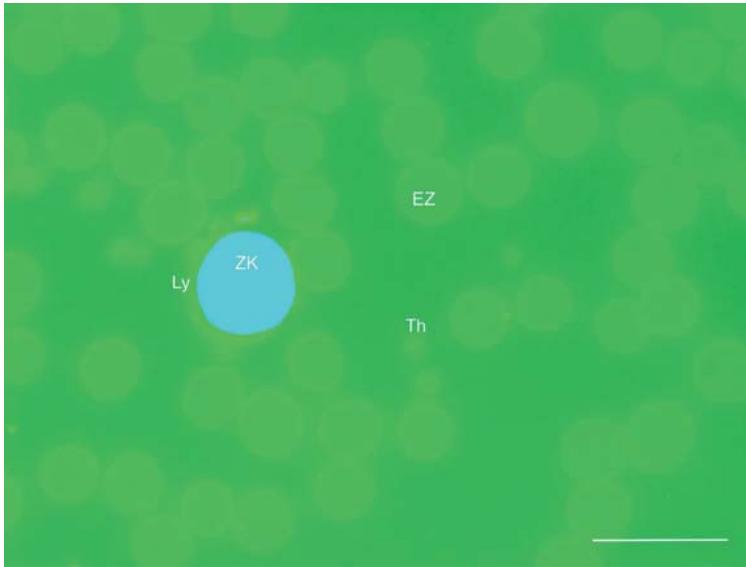


Abbildung 69: B-Lymphozyt Gruppe 3 Stute "Gjölf von der Hainbuche"
Bindung des mAK 6-39

SB: 10 μm

EZ: Erythrozyt

ZK: Zellkern

Ly: B-Lymphozyt

Th: Thrombozyt

V. DISKUSSION

Zielsetzung dieser Arbeit war es, Morphologie und Zytochemie der Blutzellen von Islandpferden näher zu untersuchen. Da über mögliche postnatale Veränderungen der Blutzellen beim Pferd noch sehr wenige Befunde vorliegen wurden gezielt das Blut von drei Altersgruppen von Islandpferden aus verschiedenen Gestüten innerhalb Deutschlands und Österreichs untersucht. Dabei sollte auch ermittelt werden, inwieweit sich das Islandpferdefohlenblut von dem Blut adulter Tiere unterscheidet und ob sich die Blutzellen der Fohlen von denen adulter Pferde in ihrer Ultrastruktur und ihrem zytochemischen Verhalten unterscheiden.

Die Morphologie der einzelnen Blutzelltypen konnte anhand von Licht- und Elektronenmikroskopie dargestellt und differenziert werden. Die Zuckerstrukturen der Blutzellen wurden mit verschiedenen Lektinen analysiert. Die Unterscheidung von B- von T-Lymphozyten wurde mittels monoklonaler Antikörper getroffen.

1. Differentialblutbild

Von 29 Islandpferden wurde vom Labor Laboklin in Bad Kissingen ein Differentialblutbild erstellt. In Gruppe 1 befanden sich 10 neugeborene und junge Fohlen im Alter bis zu 6 Monaten: 5 Hengste und 5 Stuten, davon 7 Tiere gebürtig im Salzburger Land (Straßwalchen, Österreich), 2 Stuten stammten aus dem Münchner Raum (Hohenlinden, Deutschland) und 1 Hengst aus Baden-Württemberg (Frickenhausen, Deutschland). Die zweite Gruppe im Alter von 7-12 Monaten bestand aus 3 Wallachen, 3 Stuten und 4 Hengsten. 4 Tiere kamen von einem Salzburger Gestüt (Straßwalchen, Österreich), 3 Pferde waren gebürtig in Bayern (Hohenlinden, Deutschland), 2 Islandpferde stammten aus Baden-Württemberg und 1 Fohlen war auf Island geboren und wurde dann nach Baden-Württemberg gebracht, wo die Blutproben genommen wurden. Die Gruppe der 9 adulten Islandpferde bestand aus 8 Stuten und einem Wallach: Alle Tiere waren im privaten Besitz, eine Hälfte davon war in Österreich eingestallt, die andere in Oberbayern. Der Wallach und eine Stute stammten ursprünglich aus Island.

Bei Auswertung der Differentialblutbilder war der Unterschied zwischen Lymphozyten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten bei den Jungtieren am auffälligsten: Das Mengenverhältnis verhielt sich gegenläufig. Immer wenn eine hohe Anzahl an segmentkernigen neutrophilen Granulozyten zu verzeichnen war, traten geringe Mengen Lymphozyten auf und umgekehrt.

Nun könnte man den neutrophilen Granulozytenanstieg damit begründen, dass Jungtiere normalerweise höhere Leukozytenzahlen aufweisen (Rose et al., 1983; Rossdale et al., 1982). Allerdings wird diese physiologische Leukozytose bei Pferden in erster Linie durch den Anstieg von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten verursacht (Rossdale et al., 1982). Außerdem macht sich der Leukozytenanstieg bei Stresssituationen wie einer Blutabnahme zwar schon nach Sekunden im Blut bemerkbar. Es handelt sich hierbei jedoch vorrangig um eine physiologische Linksverschiebung durch Mobilisierung stabförmiger neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark (Steward et al., 1977).

Die beobachteten Unterschiede könnten auch durch eine unterschiedliche Definition von segmentkernigen Neutrophilen beim Auszählen im Labor bedingt sein. Allerdings gibt es hier eine verbindliche Definition, die durch die Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) anerkannt ist und von den Labors angewendet werden sollte. Ein segmentkerniger neutrophiler Granulozyt hat eine Kernbrücke, welche als Einschnürung definiert ist, deren Durchmesser nicht mehr als 2/3 der Breite des dicksten Kernsegments beträgt. Zudem zeigt seine Kernform überlappende Segmente, welche geknotete T- oder Y-Formen annehmen (Sysmex, 2010).

Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Jungtiere möglicherweise Wurmbefall oder eine andere subklinische Infektion aufwiesen. Da der Gesundheitsstatus und der Habitus der untersuchten Tiere keine unphysiologischen Abweichungen zu erkennen gaben, gilt es in weiteren Studien zu klären, ob die festgestellten Verhältnisse für das Islandpferd als Robustpferd vielleicht sogar keinen negativen Einfluß auf den Gesundheitszustand dieser Tiere haben.

2. Lichtmikroskopie

Zur lichtmikroskopischen Charakterisierung wurden folgende Färbungen herangezogen: DiffQuick Verfahren, Hämalau-Eosin-Färbung (HE), die panoptische Färbung nach Pappenheim, die Giemsa- und May-Grünwald-Färbung, die Färbemethode mit Alcianblau bei pH 1,0 und pH 2,5, die Toluidinblaufärbung, die Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) und die Sirius-Red-Färbung.

Einem Teil dieser Färbungen (HE, DiffQuick, Giemsa, May-Grünwald, Pappenheim) ist das Vorhandensein basischer und saurer Komponenten gemein: Eosin stellt dabei die saure Komponente dar, Methylenblau ist der basische Anteil.

Die equinen Erythrozyten stellten sich bei diesen Färbungen in der Regel als 4,5-6 µm

große, bikonkave Scheiben dar. Allerdings zeigen sich häufig Unterschiede in ihrer Größe. Dieses Phänomen wird als physiologische Anisozytose bezeichnet. Als Zeichen für gesunde Pferde fern vom absolut anämischen Krankheitsbild war des Öfteren auch die für Pferde typische Geldrollenbildung der Erythrozyten zu beobachten. Dieses Erscheinungsbild basiert auf einer schwachen Membranladung der Erythrozyten. Es lässt sich sogar eine positive Korrelation zwischen der Geldrollenbildung und der Erythrozyten-Sedimentationsrate herstellen (Lording, 2008).

Jugendformen der Erythrozyten, die Retikulozyten, konnten nicht beobachtet werden. Dies ist damit zu erklären, dass Erythrozyten beim Pferd erst nach vollständiger Reifung aus dem Knochenmark entlassen werden und nicht einmal bei hämolytischen Prozessen vorzeitig in das Blut abgegeben werden (Lassen und Swardson, 1995; Lording, 2008). Die von Hees und Tschudi beschriebene Stechapfelform, welche Erythrozyten annehmen, wenn das Trocknen der Ausstriche zu lange dauert, konnte man hin und wieder beobachten (Hees und Tschudi, 1990).

Des Öfteren konnte man jedoch Howell-Jolly-Körperchen entdecken, die sich als violettblaue granuläre Strukturen meist mittig im Erythrozyten liegend identifizieren ließen. Diese DNA-Rückstände kommen gehäuft bei schweren regenerativen Anämien, unterschiedlicher Genese, vor. Da sie aber recht unregelmäßig vorzufinden sind, gelten sie als diagnostisch schwer zu verwerten (Dietz und Huskamp, 2006).

Thrombozyten waren vor allem in der DiffQuick und May-Grünwald-Färbung gut zu erkennen. Sie stellten sich als 1-3µm große, bläulich runde Zellfragmente ohne Zellkern dar. Bei optimaler Färbung ließ sich bei ihnen ein dunklerer zentraler und ein hellerer peripherer Bereich unterscheiden. Der dunklere Bereich entspricht dem Granulomer mit einigen Zellorganellen und Granula, der hellere Bereich dem Hyalomere mit Zytoplasma und Tubuli (Hägler, 1952; Liebich, 2010). An den Blutausrichen ließ sich auch nachweisen, dass Pferde gemeinsam mit Rindern die kleinsten Blutplättchen und unter den Haussäugetieren die geringste Anzahl an Thrombozyten besitzen. Auch den Befund von Moritz und Mitarbeiter, dass Pferdethrombozyten in den Ausstrichen oft Aggregate bilden (Moritz et al., 2014), bestätigte sich.

Ohne immunzytochemische Untersuchungen können im Lichtmikroskop die Lymphozyten nur nach ihrer Größe unterschieden werden (Umlauf, 2004). Da diese zwischen 8 und 15 µm variieren kann, unterteilt man die Lymphozyten grob in kleine (6-8 µm), mittelgroße (9-11 µm) und große (12-15 µm) Lymphozyten (Liebich, 2010). Bei

den großen Lymphozyten war um den fast zellausfüllenden großen Zellkern immer ein Zytoplasma, welches oft feine Azurgranula enthielt. Hees und Tschudi beschreiben feine kurze Fortsätze an der Oberfläche der Zelle, die je nach Funktionsstand der Zelle mehr oder weniger ausgeprägt sind (Hees und Tschudi, 1990). Diese Ausläufer konnte man in den Blutaussstrichen nicht erkennen. Auch zwischen den verschiedenen Altersgruppen konnte man in der lichtmikroskopischen Untersuchung keine morphologischen Unterschiede finden. Aus molekularbiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass es in der Phase des Übergangs zwischen juvenilem und adultem Pferd zu Veränderungen an der DNA der Lymphozyten kommt (Wnuk et al., 2011). Lichtmikroskopischen ließen sich diese aber in dieser Arbeit nicht nachweisen.

Da die neutrophilen Granulozyten mit 50-70% aller Leukozyten sehr zahlreich im Pferdeblut vorkommen, waren sie in der lichtmikroskopischen Durchsicht leicht zu finden (Carrick und Begg, 2008). Je nach Kerngestalt waren 10-12 µm große, stabkernige und segmentkernige Neutrophile zu sehen, wobei der Hauptteil zu etwa 70% aus segmentkernigen Leukozyten bestand. Ihr Kern stellte sich mehrfach gelappt mit Filamenten (Chromatinbrücken) zwischen den Segmenten in dunkelblauem Farbton dar. Diese Segmentierung des Zellkernes entsteht durch Chromatinverdichtung und steht mit dem Reifeprozess der Zelle in Verbindung. Stabkernige Neutrophile kommen nur bis zu 30% im Pferdeblut vor (Smith, 2000). Bei den segmentkernigen Neutrophilen des Fohlenblutes konnte man den Eindruck gewinnen, dass ihre Zellkerne sehr stark gelappt sind. Laut Lassen und Swardson (1995) darf dieser Eindruck jedoch nicht dazu führen, diese Multilobularität als Hypersegmentation zu bezeichnen (Lassen und Swardson, 1995; Mérant et al., 2011). Azurophile Granula waren bei den Neutrophilen des Fohlenblutes nicht zu erkennen. Ein Grund hierfür können etwaige Temperaturschwankungen während des Färbungsvorgangs sein. Laut Bertram und Coignoul steht die Isolationstemperatur der neutrophilen Granulozyten mit einer Degranulation in Verbindung. Sowohl Temperaturen bei 4°C als auch bei 22°C führten zur Degranulation, wobei eine stärkere Degranulation bei 22°C stattfand (Bertram und Coignoul, 1982).

Unabhängig vom angewendeten Färbeverfahren fielen die auffällig großen Granula (2-4µm) der eosinophilen Granulozyten ins Auge. Diese Granula sind für das Pferd charakteristisch und erscheinen bei den verschiedenen Anfärbungen leuchtend orange bis rot. Ausnahmen sind die Färbungen mit Toluidinblau, Alcianblau und die PAS-Reaktion. Hier bekamen die Granula eine grünliche Farbe. Neben den Granula war auch der Zellkern zu sehen: Allerdings wurde er zumeist von den zahlreichen Granula

weitgehend verdeckt.

Die basophilen Granulozyten waren nur schwer in den Ausstrichen zu finden. Charakteristisch für den basophilen Granulozyten sind zahlreiche kleine Granula, die sich intensiv blau anfärben. Bekannt ist, dass die Leukozytengesamtzahl beim Pferd bis zum 5. Lebensjahr abfällt und ab dem 15. Lebensjahr ansteigt: Jedoch bleibt das prozentuale Verhältnis der basophilen Granulozyten beim gesunden Pferd immer dasselbe (Kieferndorf und Keller, 1990) und beträgt ca. 0-2 % der Granulozyten.

Die Monozyten sind mit einem Durchmesser von 10-20µm die größten Zellen in den Blutausstrichen der Fohlen. Der bläulich bis dunkelviolet gefärbte Zellkern zeigte sich deutlich nieren- oder hufeisenförmig. Des Weiteren befanden sich typische helle Flecken im Zytoplasma, welche den in der Literatur beschriebenen Vakuolen gleichkommen (Latimer, 1995). War ein aktivierter Monozyt unter dem Lichtmikroskop zu sehen, wies dieser Ausstülpungen an der Zellmembran auf.

3. Elektronenmikroskopie

In dieser Arbeit gab die Elektronenmikroskopie genaueren Einblick in die Struktur der Blutzellen von Islandpferdefohlen. Ein Unterschied zwischen den Altersgruppen fiel im direkten morphologischen Vergleich der Zellen zwischen den Altersklassen 1-6 Monate, 6-12 Monate und adult (älter als 5 Jahre) nicht auf.

Die Erythrozyten stellen sich elektronenmikroskopisch betrachtet als unterschiedlich große Zellen dar, welche durch ihre Verformbarkeit unterschiedliche Formen annehmen können. Ihre bikonkave Scheibenform hilft ihnen bei diesem Gestaltenwandel (Ebdn, et al., 1986). In den Vorläuferzellen der Erythrozyten wird das Hämoglobin, das bei reifen Erythrozyten später bis zu 95% der Trockensubstanz ausmacht (Liebich, 2010), im endoplasmatischen Retikulum gebildet. Während der Erythropoese werden sämtliche Zellorganellen und der Zellkern aus den sich differenzierenden Erythrozyten ausgestoßen (Lüllmann-Rauch, 2015). Trotz ihrer Elastizität behalten die Erythrozyten eine typische Grundform, welche sich durch ihr vorhandenes Membranskelett, aufgebaut durch Strukturproteine, aufrechterhält (Hees und Tschudi, 1990).

Auch die Thrombozyten besitzen als Zellfragmente keinen Zellkern. Bei den Ausstrichen fielen im Zytoplasma homogene Granula auf. Diese sogenannten *alpha-Granula* stellten sich dunkler als das Zytoplasma dar. Auch vereinzelte Vakuolen als Zellmembraneinschlüsse und Glykogengranula waren im Zytoplasma der Blutplättchen zu finden (Chen et al., 2017). Ihre Form ist stäbchenförmig bis rundlich. Sie bewegen sich

im Größenbereich 1-1,5 μm .

4. Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden 14 Lektine pflanzlichen Ursprungs verwendet. Alle Lektine waren an den Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) gekoppelt. Für die Differenzierung der Blutzellen wurde zudem eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt.

Bei den glykohistochemischen Untersuchungen konnten keine Unterschiede zwischen den Altersstufen der Tiere festgestellt werden.

ConA, LCA und PSA weisen eine Zuckerspezifität für Glukose und Mannose auf. In den Untersuchungen konnten mit ConA und PSA diese Zuckerstrukturen bei verschiedenen Typen von Blutzellen nachgewiesen werden: Am stärksten positiv reagierten die Erythrozyten und alle Formen der Granulozyten. Nur die Granula der eosinophilen Granulozyten färbten sich mit PSA-FITC schwach an. Es ist davon auszugehen, dass Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten wenig Glukose und Mannose enthalten, da sie sich in den Ausstrichen nur schwach anfärben ließen. Warum LCA keine der Zellen anfärbte, ist unklar, da sich die Zellen adulter Islandpferde in der Studie von Brückmann (2010) mit *Lens culinaris* Agglutinin-Lektin durchaus anfärbten. Die Erythrozyten, Thrombozyten und Granula der eosinophilen Granulozyten färbten sich in ihrer Studie besonders stark an (Brückmann, 2010). Allerdings erkennt LCA Sequenzen, welche verknüpfte Mannosereste enthalten: Dadurch hat LCA eine geringere Spezifität als ConA. Unter anderem erhöht ein α -verknüpfter Fucoserest deutlich die Affinität und macht somit die Subfraktionierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden möglich. Es scheint vorstellbar, dass deutlich mehr Glykoproteine als Glykopeptide in den Islandpferdeblutzellen enthalten sind, welche das LCA nicht binden (Signorello und Leoncini, 2017).

An die Zuckerstruktur Galaktose binden die Lektine GSL, PNA und RCA. Gemäß den vorliegenden Ergebnissen ist davon auszugehen, dass die Blutzellen der Islandpferde wenig Galaktose enthalten, da die für diese Zuckerstruktur spezifischen Lektine an die Blutzellen der Pferde kaum binden konnten. Das Lektin der afrikanischen Schwarzbohne (GSL) konnte an keine Blutzelle binden. Bei humanem Blut zeigt GSL unter anderem eine hohe Affinität zu Erythrozyten der Blutgruppe A. Eine besondere Rolle spielen hier die sogenannten Mikrodomänen, welche hydrophile und hydrophobe Polymere an der Membranoberflächenkonfiguration kombinieren (Gabijs, 2009). Zudem wird dieses Lektin vor allem in der Gewebediagnostik beispielsweise für Endothelzellen von Nicht-

Primaten verwendet, da es auch verschiedene Moleküle wie Laminin bindet (Biozol GmbH, 2017). Das Lektin der Erdnuss (PNA) reagierte am intensivsten mit den Granula der eosinophilen Granulozyten der Islandpferdefohlen. An unbehandelte humane rote Blutkörperchen bindet PNA nicht. Werden die terminalen Sialinsäurereste aus Glykophorin (ein großes Blutzellen-Sialoglycoprotein mit MN-Blutgruppen-Spezifität) enzymatisch entfernt, dann bindet PNA intensiv an die Erythrozyten (Cooper, 1984). Die Bindung von PNA an Erythrozyten der Islandpferde fiel in den Versuchen schwach aus, in früheren Versuchen mit Rindererythrozyten (Newman und Uhlenbruck, 1977) und Pferdeerythrozyten (Brückmann, 2010) kam es zu keiner Bindung. Ricinus communis Agglutinin bindet über Wechselwirkungen mit β -gebundenen Gal/GalNAc-haltigen Glykanen an der Zelloberfläche und wird in Endosomen importiert (Cummings und Etzler, 2009). In den Versuchen zeigte RCA nur eine schwache Bindungsaffinität an die Erythrozyten. Somit ist ein geringer Gehalt an Galaktose in den roten Blutkörperchen der Islandpferdefohlen anzunehmen.

Wheat germ Agglutinin und succinyliertes Wheat germ Agglutinin färben Zellen, welche N-Acetyl-Glukosamin enthalten. Thrombozyten und basophile Granulozyten reagieren nicht. Entgegen der deutlichen Bindungsfähigkeit an Rindererythrozyten (Newman und Uhlenbruck, 1977), war die Anfärbung der Islandpferdeerythrozyten fast nicht vorhanden. Dafür war eine mittelstarke Anfärbung des Zytoplasmas von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sichtbar. Etwa die Hälfte der Lymphozyten ließ sich schwach anfärben. Aufgrund dieses Färbeverhaltens kann man vermuten, dass N-Acetyl-Glukosamin für Immunabwehrreaktionen des Islandpferdes wichtig ist. Wieso sich die basophilen Granulozyten nicht mitanfärben, ist möglicher Weise auf ihre andersartige Entwicklung zurückzuführen: Zelllinien, die für das Wachstum des Induktor-T-Zell-synthetisierten Glykoproteinfaktor Interleukin-3 verantwortlich sind, wurden aus kontinuierlichen Maus-Knochenmark-Kulturen gewonnen. Diese faktorabhängigen Linien erwiesen sich entweder als multipotent oder waren unipotente basophile oder neutrophile Granulozytenzelllinien (Greenberger et al., 1984). Darin zeigt sich eine gewisse strukturelle Diversität der basophilen Granulozyten im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten.

Die Auswahl an N-Acetyl-Galaktosamin-bindenden Lektinen bestand aus DBA, SBA und SJA. Die Erythrozyten reagierten mit DBA und SBA durchwegs positiv, allerdings zeigte Soybean Agglutinin eine stärkere Anfärbung. Das auffälligste Ergebnis dieser Gruppe von Lektinen war die Anfärbung von eosinophilen Granulozyten: Bis auf SJA, welches sich in den Versuchen wider Erwarten nicht an die Blutzellen der Islandpferde band, reagierten

die Eosinophilen am stärksten auf DBA und SJA. Frühere Untersuchungen mit Pferdeblut ergaben Anfärbungen der eosinophilen Granulozyten mit allen drei Lektinen (Brückmann, 2010). Ältere Untersuchungen an menschlichem Blut stimmen mit diesem Ergebnis überein, dass eine positive Reaktion der Lektine SBA und DBA mit eosinophilen Granulozyten feststellbar ist (Eguchi et al., 1989; Lee et al., 1987). Somit ist festzuhalten, dass N-Acetyl-Galaktosamin in eosinophilen Granulozyten von Mensch und Pferd enthalten ist. Dies unterstützt die Ergebnisse von Lee und Mitarbeitern (1987), SBA und DBA als Marker zur Unterscheidung von eosinophilen und basophilen Granulozyten in fluoreszenzmikroskopischen histochemischen Untersuchungen zu verwenden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die beiden Lektine nicht an die basophilen Granulozyten binden. Eine Anwendung der beiden Lektine zur Unterscheidung zwischen basophilen und eosinophilen Granulozyten ist somit auch beim Islandpferd interessant.

Das Lektin des Stechginsters UEA zeigt das Vorkommen von α -L-Fukose an. In den Ausstrichen band UEA-FITC an Erythrozyten und Thrombozyten. Allerdings zeigten nicht alle Blutplättchen eine Anfärbungen, so dass davon auszugehen ist, dass sich Fukosereste nur bei einem Teil Thrombozyten befinden. Allerdings war keine Korrelation mit dem Alter oder Geschlecht der Pferde herstellbar. Es gibt eine Studie (Molin et al., 1986) in welcher UEA auch an Glykolipide, welchen Fucose fehlt, bindet.

Eine Reaktion mit komplexen Kohlenhydratstrukturen fand bei den Blutzellen des Pferdes kaum statt. PHA-L und PHA-E banden meistens nur schwach an die Erythrozyten. Im Falle von PHA-L konnte man auch gelegentlich eine mittelstarke Anfärbungen der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sehen, diese waren aber Einzelfälle. PHA-E bindet an menschliche Erythrozyten und insbesondere Lymphozyten. Auf normalen menschlichen Lymphozyten gibt es fünfmal mehr PHA-E-Rezeptoren als auf den Erythrozyten (Nicola et al., 1980). In diesem Punkt scheinen sich die Lymphozyten der Islandpferde zu unterscheiden. PHA-L zeigt dagegen fast keine Bindung an humane Erythrozyten. Sowohl PHA-L wie auch PHA-E weisen eine Reaktivität mit mehreren unterschiedlichen Glykoproteinen auf: PHA-L bindet stark an Tamm-Horsefall-Glykoprotein, an welches PHA-E gar nicht bindet. PHA-E bindet Schweine-Thyroglobulin, während PHA-L nur schwach reagiert (Gürtler et al., 1979). PHA-L reagiert kaum hinsichtlich der Differenzierung humaner Blutgruppen: PHA-E dagegen bindet an Typ 0-Erythrozyten (Nicola et al., 1980). Ob eine Blutgruppendifferenzierung beim Pferd anhand dieser *Phaseolus vulgaris* Lektine möglich ist, erfordert zusätzliche weitergehende Untersuchungen. In humanmedizinischen Versuchen zeigte sich, dass PHA-L stärker allergische Reaktionen hervorruft als PHA-E. Diese erfolgen nicht nur über

den IgE-vermittelten Weg, sondern auch über nicht-IgE-vermittelte allergische Reaktionen (Kumar et al., 2013).

5. Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurde das Blut von insgesamt 15 Islandpferden, jeweils von fünf Individuen aus jeder Altersgruppe verwendet. Die Antikörper waren mit FITC markiert. DAPI wurde zur Kernfärbung bei den immunhistochemischen Untersuchungen verwendet. Die genauen Bezeichnungen für die monoklonalen Maus-Anti-Pferd-Antikörper, welche als T-Lymphozyten spezifisch gelten, lauten mAK 4-13, mAK 4-58 und mAK 5-50. Als monoklonale Antikörper, welche für die B-Lymphozyten spezifisch sind, wurden mAK 1-19, mAK 2-52, mAK 4-36, mAK 4-55 und mAK 6-39 verwendet. Alle verwendeten Antikörper wurden von Herrn Dr. Christian Umlauf im Rahmen seiner Dissertation am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der LMU München hergestellt (Umlauf, 2004).

In seiner Doktorarbeit stellte Christian Umlauf insgesamt 78 monoklonale Maus-anti-Pferde-Lymphozyten-Antikörper her. Zwölf davon wiesen spezifische Bindungen an Lymphozyten und ihren Subpopulationen auf. Er charakterisierte die Antikörper anhand von Durchflusszytometrie. Die Subklassen der monoklonalen Antikörper wurden mittels ELISA bestimmt. Das CD2-AG kommt bei Mensch und Pferd nur auf T-Lymphozyten vor, wobei bei der Maus CD2-Moleküle sowohl auf B- als auch auf T-Lymphozyten nachgewiesen wurden. EqCD3-AG kommt ausschließlich auf EqCD5-positiven-T-Lymphozyten vor. Die Expression des EqCD4 erfolgt nur auf CD8-negativen T-Lymphozyten. Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalysen zeigen, dass die Expression von CD11a/CD18 auf einer T-Zellsubpopulation erhöht ist, die möglicherweise den T-Gedächtniszellen entspricht (Umlauf, 2004).

Insgesamt wurden 13 verschiedene MHC1-Varianten auf Chromosom 20 ermittelt, wovon drei Antikörper EqMHC1 zugeordnet werden. Die Gene des EqMHC2 befinden sich ebenfalls auf Chromosom 20 und in der Fluoreszenzanalyse zeigten sich die B-Lymphozyten und ein großer Teil der T-Lymphozyten positiv. Im Gegensatz zu Mensch und Nager, bei denen sich das MHC2-Antigen ausschließlich auf antigen-präsentierenden Zellen und B-Lymphozyten befindet, wird es bei Pferd, Hund und Schwein auch auf T-Lymphozyten nachgewiesen. Sowohl CD4- als auch CD8- positive T-Lymphozyten können effektiv Antigene präsentieren. Während bei neugeborenen

Fohlen das MHC2-Molekül auf CD4- und CD8-positiven Zellen nicht nachweisbar ist, kann ein kontinuierlicher Anstieg bis zum Alter von 6 Monaten gemessen werden (Umlauf, 2004). In diesen Ergebnissen waren auch die Anfärbungen der Lymphozyten in den Altersgruppen 2 und 3 intensiver, allerdings gab es auch schwache Bindungsreaktionen in Gruppe 1 der neugeborenen Fohlen, so dass eine ausschließliche Bindung über MHC2 unwahrscheinlich scheint.

Die Versuche mit den T-Lymphozyten spezifischen Antikörpern verliefen nicht wie aus den Ergebnissen der Literatur erwartet. Zu einer Anfärbung mit mAK 4-13 und mAK 5-50 kam es nicht. Mit mAK 4-58 konnte eine dezente Bindungsreaktion an T-Lymphozyten und Erythrozyten verzeichnet werden. Somit ist mittels des mAK 4-58 eine Unterscheidung der T-Lymphozyten des Islandpferdeblutes in CD4+ T-Helferzellen und CD8+ Zytotoxische Zellen möglich (Tizard, 2000).

Mit den monoklonalen Antikörpern gegen B-Lymphozyten ergab sich folgendes Bild: mAK 1-19, 2-52 und 6-39 zeigten Anfärbungen der Lymphozyten. Mit dem mAK 2-52 ergab sich die beste Differenzierungsmöglichkeit, da ausschließlich die B-Lymphozyten positiv reagierten. Mittels mAK 4-55 ließ sich gar keine Reaktion erzeugen und im Falle der Versuche mit mAK 4-36 war keine Differenzierung zwischen den Lymphozyten möglich. Zu diesem Ergebnis kam auch Frau Dr. Eva Brückmann, in deren Doktorarbeit es allerdings zu gar keiner positiven Bindung der mAK kam, welche eine Differenzierung zwischen B- und T-Lymphozyten zugelassen hätte (Brückmann, 2010) .

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zielsetzung dieser Dissertation bestand darin, detaillierte Informationen über die funktionelle Morphologie der Blutzellen der Islandpferdefohlen zu erlangen. Blutproben von 29 Islandpferden, unterteilt in drei Altersgruppen, dienten als Material für diese Untersuchungen. Mittels licht- und elektronenmikroskopischer Methoden wurden die Blutzellen der Islandpferde näher charakterisiert. Zuckerstrukturen wurden durch den Einsatz von FITC-markierten Lektinen untersucht. Mit monoklonalen Antikörpern wurde versucht, B- und T-Lymphozyten lichtmikroskopisch zu differenzieren.

Im Differentialblutbild der Fohlen fiel auf, dass sich die segmentierten neutrophilen Granulozyten der Islandpferde im Alter von bis zu einem Jahr unter dem vom Labor angegebenen Referenzbereich befanden und die Lymphozyten, vor allem bei den Islandpferden im Alter von 6-12 Monaten, über dem Referenzbereich lagen.

Die verschiedenen Blutzelltypen ließen sich anhand der neun verschiedenen konventionellen Färbemethoden sehr gut differenzieren. Die großen Granula der maulbeerartigen, eosinophilen Granulozyten stachen bei vielen Färbungen besonders hervor: Sie färbten sich in DiffQuick, Giemsa, May-Grünwald, Pappenheim, Haemalaun-Eosin und Sirius Red rötlich an. In den Färbungen Alcianblau, Toluidinblau und in den PAS-Reaktionen konnte man sie an einer grünlichen Farbgebung erkennen. Die kleinen Granula der neutrophilen Granulozyten waren nur schwach gefärbt, die dunklen kleinen Granula der basophilen Granulozyten waren gut differenzierbar.

In Epon eingebettete Blutzellpellets wurden ultradünn geschnitten und im Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 902) untersucht. In allen Fällen zeichneten sich die Blutzellen durch folgende Charakteristika aus: Die Thrombozyten besaßen α -Granula, die elektronendichten „dense bodies“, Vakuolen und gespeichertes Glykogen im Zytoplasma. Bei den neutrophilen Granulozyten fiel häufig ein stark segmentierter Zellkern mit hellem Euchromatinbereich und elektronendichtem Heterochromatinbereich, die länglichen primären Granula und die rundlichen spezifischen Granula auf. Die eosinophilen Granulozyten besaßen durchwegs bis zu 4 μm große elektronendichte Granula. Bei den Lymphozyten waren Pseudopodien nachweisbar. Alle Lymphozyten besaßen rundliche heterochromatinreiche Zellkerne ohne Granula im Zytoplasma. Der typische nierenförmige Zellkern der Monozyten und die zahlreichen Vakuolen und lysosomalen Einschlüsse konnten gut identifiziert werden.

In den glykohistochemischen Untersuchungen wurde die Bindungsfähigkeit der FITC-

markierten Lektine Concanavalin Agglutinin, *Lens culinaris* Agglutinin, *Pisum sativum* Agglutinin, *Griffonia simplicifolia* Agglutinin, Peanut Agglutinin, *Ricinus communis* Agglutinin, Wheat germ Agglutinin, succinyliertes Wheat germ Agglutinin, *Dolichos biflorus* Agglutinin, Soybean Agglutinin, *Saphora japonica* Agglutinin, *Ulex europaeus* Agglutinin, *Phaseolus vulgaris* Agglutinin-Leuco und *Phaseolus vulgaris* Agglutinin-Erythro an den Islandpferdeblutzellen untersucht. Mit den Lektinen LCA, GSL, SJA kam es in den Versuchen zu keiner Bindungsreaktion. Anhand dieser Ergebnisse ist das Vorkommen von Glukose-, Mannose- und N-Acetylglukosaminresten in den Glykostrukturen der Islandpferdefohlenblutzellen am häufigsten zu verzeichnen.

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurden acht monoklonale Antikörper verwendet: Die Antikörper mAK 4-13, mAK 4-58 und mAK 5-50 gelten als T-Lymphozyten spezifisch, die Antikörper mAK 1-19, mAK 2-52, mAK 4-36, mAK 4-55 und mAK 6-39 sind an die B-Lymphozyten bindungsfähig. Meine Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung der T-Lymphozyten mit diesen Antikörpern schwierig ist. Die Charakterisierung der B-Lymphozyten war dagegen deutlich besser: mAK 2-52 und mAK 6-39 ermöglichten eine spezifische Markierung der B-Lymphozyten.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass sich innerhalb der Altersgruppen der Islandpferde und zwischen den Geschlechtern bei allen Untersuchungen dieser Studie keine morphologischen Unterschiede ergaben.

VII. SUMMARY

Ultrastructural, glycohistochemical and immunocytochemical studies of Icelandic horse-foal's blood cells

The aim of the present study consisted in attaining detailed information about the functional morphology of the blood cells of the Iceland foals. Differential blood counts of 29 Iceland horses, divided into three age groups, were performed. Blood samples of the foals were then studied using conventional staining methods, glycohistochemical and immunohistochemical techniques and transmission electron microscopy.

The differential blood counts showed that the number of neutrophil granulocytes of the Iceland foals up to age of one year was below the reference range and that of lymphocytes was above the general reference range for horses.

The different blood cell types can be clearly differentiated by all nine conventional staining methods applied in this study. Big (2-4 μm) granula of the eosinophil granulocytes stained reddish in DiffQuick, Giemsa, May-Grünwald, Pappenheim, Haemalaun-Eosin. Alcian blue, toluidine-blue and the PAS reactions stained the granula in a green colour. The small granula of the neutrophil granulocytes were only weakly stained, the small granula of the basophil granulocytes showed a dark blue colour.

In Epon embedded blood cell pellets were cut with a Reichert ultramicrotome and the ultrathin sections were studied using a Zeiss 902 transmission electron microscope. The neutrophil granulocytes showed a segmented nucleus with euchromatin areas surrounded by heterochromatin and numerous small primary granula. Eosinophil granulocytes were characterized by their big, moderately dense granula, which occupied most of the cytoplasm. All lymphocytes possessed distinct nucleoli in their mainly heterochromatic nuclei. Different to light microscopy, areas of euchromatin were clearly recognized between the heterochromatin. The typical kidney-shaped nucleus and numerous vacuoles and lysosomal inclusions were characteristic for the monocytes. The thrombocytes contained typical alpha-granula, dense bodies, vacuoles and stored glycogen in their cytoplasm.

The glycohistochemical investigations studied the binding of an array of FITC-marked lectins (Concanavalin agglutinin, Lens culinaris agglutinin, Pisum sativum agglutinin, Griffonia simplicifolia agglutinin, Peanut agglutinin, Ricinus communis agglutinin, Wheat germ agglutinin, succinylated Wheat germ agglutinin, Dolichos biflorus agglutinin,

Soybean agglutinin, *Saphora japonica* agglutinin, *Ulex europaeus* agglutinin, *Phaseolus vulgaris* agglutinin-Leuco and *Phaseolus vulgaris* agglutinin-Erythro) to the blood cells. The results demonstrated that glucose, mannose and N-acetylglycosamin residues are regularly found in blood cells in Icelandic foals.

For immunohistochemistry eight monoclonal antibodies (supplied by Prof. Dr. Göbel, Institute of Physiology, Department of Veterinary Sciences, LMU München) were used. The antibodies mAK 4-13, mAK 4-58 and mAK 5-50 are regarded specific for T-lymphocytes, the antibodies mAK 1-19, mAK 2-52, mAK 4-36, mAK 4-55 and mAK 6-39 for specifically staining B-lymphocytes. My results showed only a weak staining of the T-lymphocytes with mAK 4-58. B-lymphocytes were clearly stained with mAK 2-52 and mAK 6-39.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, K., Wang, L., & Xiang, J. (2012). A new dynamic model of three cell interactions for CTL responses. *Oncology*, *1*, 1430-1432.
- Akers, M., & Denbow, M. (2008). *Anatomy and physiology of domestic animals*. Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Ali, Y., Lynch, N., Haleem, K., Fujita, T., Endo, Y., Hansen, S., Schwaeble, W. (2012). The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLOS pathogens*, *8*(7), 1-11.
- Amirbekov, M. (1981). Cellular immune reactions in the horse: identification of T lymphocytes. *Trudy Vsesoyuznogo Instituta Eksperimental'noi Veterinarii*, *53*, 50-54.
- Archer, R. (1968). The eosinophil leucocytes. *Series Haematologica*, *1*, 3-32ff.
- Aughey, E., & Frye, F. (2001). *Comparative veterinary histology*. London, UK: Manson Publishing Ltd.
- Avellini, L., Silvestrelli, M., & Gaiti, A. (1995). Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. *Veterinary Research Communications*, *19*, 179-184.
- Bailey, E. (1982). Prevalence of anti red blood cell antibodies in serum and colostrum of mares and its relationship to isoerythrolysis. *American Journal of Veterinary Research*, *43*, p.1917-1921.
- Baldrige, C., & Gerhard, R. (1933). The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology*(103).
- Banks, K., & McGuire, T. (1975). Surface receptors on neutrophils and monocytes from immunodeficient and normal horses. *Immunology*, *28*, 581-588.
- Barsnick, R., Hurcombe, S., Smith, P., Slovis, N., Sprayberry, K., Saville, W., & Toribio, R. (2011). Insulin, Glucagon and Leptin in critically ill foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *25*, p.123-131.
- Becht, J., & Semrad, S.D. (1985). Haematology, blood typing and immunology of the neonatal foal. *Veterinary Clinics of North America*, *1*, p.91-105.

- Berland, R., & Wortis, H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annual Review of Immunology*, 20, 253-300.
- Bertram, T., & Coignoul, F. (1982). Morphology of equine neutrophils isolated at different temperatures. *Veterinary Pathology*, 19, p.534-543.
- Bienzie, D. (2000). Monocytes and Macrophages. In J. Douglas, & K. Wardrop, *Schalm's Veterinary Hematology* (pp. p.318-325). New Jersey: Wiley-Blackwell.
- Bier, O., Götze, D., Mota, I., & Dias da Silva, W. (1979). *Experimentelle und klinische Immunologie* (1.Auflage ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Biozol GmbH. (2017). *Biozol Vector Laboratories*. Retrieved 08 24, 2017, from <https://www.biozol.de/de-de/shop/news/vector-laboratories/>
- Boning, D., Maassen, N., & Pries, A. (2011). The hematocrit paradox-how does blood doping really work ? *International Journal of Sports Medicine*(32), 242-246.
- Bowling, A., & Ruvinsky, A. (2000). *The genetics of the horse*. Cambridge, USA: CABI Publishing.
- Bowling, A., & Ryder, O. (1987). Genetic studies of blood markers in Przewalski's horses. *American Genetic Association*, 78, p.75-80.
- Boyd, N., Cohen, N., Lim, W., Martens, R., Chaffin, M., & Ball, M. (2003). Temporal changes in cytokine expression of foals during the first month of life. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 92, p.75.
- Boyd, W. (1954). The proteins of immune reactions. In H. Neurath, & K. Bailey, *The Proteins* (pp. pp.756-844). New York: Academic Press.
- Brückmann, E. (2010). Ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchungen am Blut des Pferdes. 89-92. München: Inaugural-Dissertation.
- Bruner, D., Hull, F., Edwards, P., & Doll, E. (1948). Icteric foals. *Journal of the american veterinary medical association*, 112, 440.
- Cambier, C., Passio, N., Clerbaux, T., Amory, H., Marville, V., Detry, B., . . . Gustin, P. (2005). Blood-oxygen binding in healthy Standardbred horses. *Veterinary Journal*, 169, p.251-256.
- Capomaccio, S., Cappelli, K., Spinsati, G., Mencarelli, M., Muscettola, M., Felicetti, M., . . . Bonifazi, M. (2011). Athletic humans and horses: Comparative analysis of interleukin-6 (IL-6) und IL-6 receptor (IL-6R) expression in peripheral blood

- mononuclear cells in trained and untrained subjects at rest. *BMC Physiology*, 11(9), 47-52.
- Caroli, J., & Bessis, M. (1947). Recherches sur la cause de l'ictère grave familial des muletons. *Revue Hématologie*, 2.
- Carrick, J., & Begg, A. (2008). Peripheral blood leukocytes. *Equine Veterinary Journal*, 24, p.239-259.
- Cebulj-Kadunc, N., Kosec, M., & Cestnik, V. (2003). The Variations of White Blood Cell Count in Lipizzan Horses. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50, p.251-253.
- Center, M. A., & Washington. (2009). <http://www.vetmed.wsu.edu/tkp/search.aspx>. (W. College of Veterinary Medicine, Editor, & L. Marc, Producer) Retrieved 7 13, 2012, from <http://www.vetmed.wsu.edu/tkp/search.aspx>
- CHEMIE.DE Information Service GmbH. (2002). <http://www.bionity.com/de/news/15516/>. Retrieved 12 8, 2013, from <http://www.bionity.com/de/news/15516>
- Chen, C., Lo, R., Urban, D., Pluthero, F., & Kahr, W. (2017). α -granule biogenesis: from disease to discovery. *Platelets*, 28(2), 147-154.
- Clark, R., & Galantino-Homer, H. (2014). Wheat germ agglutinin as a counterstain for immunofluorescence studies of equine hoof lamellae. *Experimental Dermatology*(9), pp. 677-8.
- Coombs, R., Crowhurst, R., Day, F., Heard, D., Hinde, I., Hoogstraten, J., & Parry, H. (1948). Haemolytic disease of newborn foals due to isoimmunization of pregnancy. *Journal of Hygiene*, 46.
- Cooper, H. (1984). Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry: The peanut [Arachishypogaea]Lectin. *Human Pathology*, 15(10), pp. 904-906.
- Cumano A., G. I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual review of immunology*, 1(25), 745-755.
- Cummings, R., & Etzler, M. (2009). R-type lectins. In A. Varki, R. Cummings, & J. Esko (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. (Vol. 2, pp. 308-312). NY: Cold Spring Harbor laboratory press.
- Cywinska, A., Wyszynska, Z., Gorecka, R., Szarska, E., Witkowski, L., Dziekan, P., Schollenberger, A. (2010). The effect of the 162 km endurance ride on equine

- peripheral blood neutrophil and lymphocyte functions. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13, 279-285.
- Dörner, K. (2009). *Klinische Chemie & Hämatologie* (8 ed.). Stuttgart: Thieme.
- Davis, L., Schulze-Koops, H., & Lipsky, P. (1999). Human CD4+ T cell differentiation and effector function - implications for autoimmunity. *Immunology Research*, 19, 25-34.
- De Kromme, L., & Vervaat, M. (1953). On the nature of the antibodies varieties, the location of the antigen and their relation to heamagglutination. *Vox Sanguinis*, 1.
- Denk, H. (1989). Immunhistochemische Färbemethoden. In P. Böck, *Mikroskopische Techniken* (pp. 87-86). Urban&Schwarzenberg.
- Dietz, O., & Huskamp, B. (2006). *Handbuch Pferdepraxis*. Stuttgart: Enke Verlag.
- Donovan, D., Jackson, C., Colahan, P., Norton, N., Clapper, J., Moore, J., & Hurley, D. (2007). Assessment of exercise-induced alterations in neutrophil function in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 68, 1198-1204.
- Dudek, G. (2012). An artificial immune system for classification with local feature selection. *IEEE Transactions of Evolutionary Computation*, 16, 847-849.
- Duk, M., & Lisowska, E. (1984). Effect of pH on the binding of vicia graminea lectin to erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*, 83(1347), 73-78.
- Ebden, P., Banks, J., Peel, T., Buss, D., Routledge, P., & Spragg, B. (1986). The disposition of theophylline in blood in chronic obstructive lung disease. *Therapeutic Drug Monitoring*, 8(4), 424-426.
- Eguchi, M., Ozawa, T., Suda, J., Sugita, K., & Furukawa, T. (1989). Lectins for electron microscopic distinction of eosinophils from other blood cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 37, pp. 743-749.
- Enbergs, H., & Beardi, B. (1971). Zur Feinstruktur der eosinophilen Granulozyten der Hausgans (Anser anser dom.). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 122, 520-527.
- Escribano, B., Castejón, F., Vivo, R., Santisteban, R., Agüera, E., & Rubio, M. (2005). Effects of training on phagocytic and oxidative metabolism of peripheral neutrophils in horses exercised in the aerobic-anaerobic transition area.

Veterinary Research Communications, 29, 149-158.

- Eyquem, A., Podliachouk, L., & Millot, P. (1956). Les groups sanguins des animaux domestiques et leur interet pour l'élevage. *Bericht zum Internationalen Tierzuchtkongress Madrid Thema 2*. Madrid: Le point vétérinaire .
- Foster, A., & Cunningham, F. (2003). Substance P induces activation, adherence and migration of equine eosinophils. *The Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* , 26, 131-138.
- Franks, D. (1962). Horse blood groups and hemolytic disease of the newborn foal. *Ann.N.Y.Acad.Sciences* , 97.
- French, T., Blue, J., & Stokol, T. (2010).
<http://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/coags/typeeq.htm>. (I. N. Cornell University College of Veterinary Medicine, Editor) Retrieved 12 8, 2013, from <http://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/coags/typeeq.htm>
- Freund, H. (1977). *Handbuch der Mikroskopie in der Technik*. Frankfurt/Main: Umschau Verlag.
- Friedrich, K., Seiffert, W., & Zimmermann, H. (1990). Romanowsky dyes and Romanowsky-Giemsa effect. *Histochemistry*, 93(3), 247-256.
- Friess, A., & Schlüns, J. (1990). Das Immunsystem und die Organe der Abwehr. In W. Mosimann, & T. Kohler, *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere* (p. 114ff).Verlag Paul Parey.
- Fudenberg, H., Mandy, W., & Nisonoff, A. (1962). Serologic studies of proteolytic fragments of rabbit agglutinating antibodies. *Journal of Clinical Investigation*,p. 41.
- Gürtler, L., Yeboa, D., & Cleve, H. (1979). The lectin-binding sites of the erythrocyte membrane components of horse, swine and sheep. Characterization by their molecular weights. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 360(3), pp. 421-426.
- Gäbel, G., & Löffler, K. (2008). *Anatomie und Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Eugen Ulmer.
- Gabius, H.-J. (2009). *The Sugar Code: Survey of GSL Functions* (1.Auflage ed.). München: Wiley-Blackwell.

- Geijtenbeek, T. (2011). C-type lectins in HIV-1 infection. *From frontiers of retrovirology* 3.-5.10.2011. 8, p. 27. Amsterdam: Retrovirology.
- Greenberger, J., Sakakeeny, M., Davis, L., Mondey, W., & Reid, D. (1984). Biologic properties of factor-independent nonadherent hematopoietic and adherent preadipocyte cell lines derived from continuous bone marrow culture. *Leukemia Research*, 8(3), pp. 863-875.
- Grosclaude, F. (1980). Les Groupes Sangiuns des Chevaux: Mise Au Point. *Livestock Produktion Science*, 7, p.89-99.
- Hägler, W. (1952). Funktionelle Untersuchungen über das Hyalomer und das Granulomer der Thrombozyten. p.39. Weissenbach.
- Hagmann, F.-G. (2009). *Onkodin Atlas*. Retrieved 08 31, 2017, from PAS Periodic Acid Schiff:
https://www.hematoimages.eu/content/e666/e900/e8427/index_ger.html
- Hardin, J., & Spicer, S. (1970). Ultrastructural study of human eosinophil granules: maturational stages and pyroantimonate reactive cation. *American Journal of Anatomy*, 101, 283.
- Harris, S., Hines, M., Mealey, R., Alperin, D., & Hines, S. (2011). Early development of cytotoxic T lymphocytes in neonatal foals following oral inoculation with *Rhodococcus equi*. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 141, p.312-316.
- Hayhoe, F., Quaglino, D., & Flemans, R. (1960). Consecutive use of romanowsky and periodic-acid-schiff techniques in the study of blood and bone-marrow cells. *BJH British Journal of Haematology*, 6(1), 23-25.
- Hees, H., & Sinowatz, F. (2000). *Histologie-Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Hees, H., & Tschudi, P. (1990). Blut und Knochenmark. In H. Hees, & P. Tschudi, *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere* (pp. 98-100). Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey.
- Heneberg, P. (2011). Mast cells and basophils: trojan horses of conventional lin-stem/progenitor cell isolates. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 3753-3771.
- Hirsfeld, L., & Przesmycki, F. (1923). Isoagglutination des globules rouges chez les chevaux. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie*, 89.

- Hivroz, C., Chemin, K., Tourret, M., & Bohineust, A. (2012). Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Critical Reviews in Immunology*, 32, 139-155.
- Hollis, A., Furr, M., Madgesian, K., Axon, J., Ludlow, V., Boston, R., & Corley, K. (2008). Blood glucose concentrations in critically ill neonatal foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, p.1223-1227.
- Hosoda, T., Mogi, K., & Kaneko, T. (1959). Studies on the hemolytic icterus of foals. *The Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences*, p.16.
- Huth, E. (1948). Über den Rh-Schock der Neugeborenen. *Zeitschrift der Kinder-Heilkunde*, 65(3), 431-453.
- Hytell, P., Sinowatz, F., & Vejlsted, M. (2010). *Essentials of domestic animal embryology* (1.Auflage ed.). Edinburgh: Saunders.
- Ishikawa, T., Kubota, T., Horigome, R., Rimula, N., Honoa, H., Iwagana, A., . . . Yoshida, T. (2013). Prevalence of Howell-Jolly Bodies caused by partial splenic embolization for portal hypertension. *Internal Medicine Journal*, 52(16), p.225-37.
- Ito, H., & Seishima, M. (2009). Regulation of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes by natural killer T cell. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010(4), 8.
- Jastrow, H. (1998). *Vokabular der mikroskopischen Anatomie*. Retrieved 09 19, 2014, from www.unimainz.de/FB/Medizin/Anatomie/Workshop/EM/EMVokabular.html
- Jungi, T. (2000). *Klinische Veterinärimmunologie* (1.Auflage ed.). Stuttgart: Enke Verlag Hippokrates.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (1996). *Histologie* (Vol. Vol. 4.Auflage). Stuttgart: Springer Verlag.
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, pp. 495-497.
- Kässens, D. (2010). Mikroskopische Verfahren, Part 1.2. Elektronenmikroskopie. In P. W. Dr.habil. Maria Mulisch, *Romeis Mikroskopische Technik* (Vol. 18.Auflage, pp. 26-27). Heidelberg: Springer Verlag.
- Kedzierski, W., Bergero, D., & Assenza, A. (2009). Trends of hematological and biochemical values in the blood of young race horses during standardized field

- exercise tests. *Acta Veterinaria*, Vol.59, p.457-466.
- Kedzierski, W., Kusy, R., & Kowalik, S. (2011). Plasma leptin level in hyperlipidemic mares and their newborn foals. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(3), 275-280.
- Kieferndorf, U., & Keller, H. (1990, März). Normalwerte des weißen Blutbildes beim Pferd unter Berücksichtigung der Rasse, des Geschlechts, des Alters und der Jahreszeit. *Pferdeheilkunde*, 6(2), p.73-78.
- Klare, J., Chizhov, I., & Engelhard, M. (2008). Microbial rhodopsins: scaffolds for ion pumps, channels, and sensors. *Results and Problems in Cell Differentiation Journal*, 45(1), 73-122.
- Knottenbelt, D., Holdstock, N., & Madigan, J. (2007). *Neonatologie der Pferde*. München/Jena: Elsevier, Urban & Fischer.
- Kottmann-Jütter, W. (1973). Tageszeitliche Schwankungen der Eoinophilenwerte im Blut beim Pferd. *Dissertation*. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Kramer, J. (2000). Normal hematology of the horse. In J. Douglas, & K. Wardrop, *Schalm's Veterinary Hematology* (pp. 1069-1074). New Jersey: Wiley-Blackwell.
- Kressin, M., & Schnorr, B. (2006). *Embryologie der Haustiere*. Stuttgart: Enke Verlag.
- Kumar, S., Verma, A., Sharma, A., Kumar, D., Tripami, A., Chaudhari, B., . . . Dwivedi, P. (2013). Phytohemagglutinins augment red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced allergic manifestations. *Journal of Proteomics*, 20(93), pp. 50-64.
- Kydd, J., Antczak, D., Allen, W., Barbis, D., Butcher, G., Davis, W., . . . Zhang, C. (1994). Report of the first international workshop on equine leucocyte antigen, Cambridge, UK, July 1991. 42, pp. 1-60. Cambridge, UK: Veterinary Immunology and Immunopathology.
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). Blut und Blutbildung. In A. E. Lüllmann-Rauch R. (Ed.), *Taschenlehrbuch Histologie* (pp. 298-300). Stuttgart: Thieme.
- Landsteiner, K. (1901). Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 14(46), 1-5.
- Lang, G. (2006). *Histotechnik: Praxislehrbuch für Biomedizinische Analytik* (1.Auflage ed.). Wien, NewYork: Springer.
- Lassen, E., & Swardson, C. (1995). Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. *Veterinary Clinics of North America*:

- Equine Practice*, 11(3), 351-389.
- Latimer, K. (1995). Leucocytes in health and disease. In S. Ettinger, & E. Feldman, *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat* (pp. p.1982-1992). Philadelphia: WB Saunders .
- Lee, M., Turcinov, D., & Damjanov, I. (1987). Lectins as markers for eosinophilic leucocytes. *Journal of Histochemistry*, 86, pp. 269-273.
- Liburt, N., Adams, A., Betancourt, A., Horchov, D., & McKeever, K. (2010). Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. *Equine Veterinary Journal*, 38, p.280-288.
- Liebich, H.-G. (2010). *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel* (Vol. 5.Auflage Edition). Stuttgart: Schattauer GmbH.
- Liu, M., Liu, T., Bordin, A., Nerren, J., & Cohen, N. (2009). Activation of foal neutrophils at different ages by CpG oligodeoxynucleotides and *Rhodococcus equi*. *Cytokine*, 48, p.280-289.
- Lording, P. (2008). Erythrocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 34(2), 225-37.
- Lunn, D., Holmes, M., Antczak, D., Agerwal, N., Baker, J., Bendali-Ahcene, S., . . . Vagnoni, K. (1998). Report of the Second Equine Leucocyte Antigen Workshop, Squaw Valley, California, July 1995. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 62(2)), 101-143.
- Müller, W., & Hassel, M. (2003). *Entwicklungsbiologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Marti, E., Horohov, D., Antzak, D., Lazary, S., & Lunn, D. (2003). Advances in equine immunology: Havemeyer workshop reports from Santa Fe, New Mexiko and Hortobagy, Hungary. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91(5), 233-234.
- Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., & Tesarik, J. (1992). Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95, 755-763.
- Mérant, C., Breathnach, C., Kohler, K., Rashid, C., Meter, P., & Horohov, D. (2009). Young

- foal and adult horse monocyte-derived dendritic cells differ by their degree of phenotypic maturity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 131, 1-8.
- Mérant, C., Sheoran, A., & Timoney, J. (2011). Association of streptococcus equi with equine monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(5), 83-86.
- Merck. (2017). *Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III*. Retrieved 08 20, 2017, from <http://uk.vwr-cmd.com/ex/downloads/brochures/clinical/W287021.pdf>
- Molin, K., Fredman, P., & Svennerholm, L. (1986). Binding specificities of the lectins PNA, WGA and UEA I to polyvinylchloride-adsorbed glycosphingolipids. *FEBS Letters*, 205(1), pp. 51-55.
- Moritz, A., Schwendenwein, I., & Kraft, W. (2014). Hämatologie. In A. Moritz, *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin* (p. p.84ff). Stuttgart: Schattauer.
- Morris, D. (1998). Disease of the hemolymphatic system. In S. Reed, & Bayly, W.M., *Equine Internal Medicine* (pp. 564-566). Philadelphia: WB Saunders.
- Mrvar-Brecko A., S. V.-I. (2010). Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44(4), 307-312.
- Mulisch, M., & Welsch, U. (2010). *Romeis Mikroskopische Technik, Immunlokalisation*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nemes, P. (2017). *Untersuchungsprogramm medizinischer Laboratorien Düsseldorf*. Retrieved 07 18, 2017, from <http://www.labor-duesseldorf.de/?p=5&b=H&i=1383>
- Newman, R., & Uhlenbruck, G. (1977). Investigation into the occurrence and structure of lectin receptors of human and bovine erythrocytes, milk-fat globule and lymphocyte plasma-membrane glycoproteins. *European Journal of Biochemistry*(76), pp. 149-155.
- Nicola, N., Morstyn, G., & Metcalf, D. (1980). Lectin receptors on human blood and bone marrow cells and their use in cell separation. *Blood cells*, 6(4), pp. 563-79.
- Ovchinnikov, D. (2009). Alcian blue/alizarin red staining of cartilage and bone in mouse. 2009. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Protocols.
- Padet, L., St-Amour, I., Aubin, É., & Bazin, R. (2011). Neutralization of mitogenic lectins by intravenous immunoglobulin (IVIg) prevents T cell activation: does IVIg really

- have a direct effect on T cells ? *The Journal of Translational Immunology*, 45(3), 352-360.
- Pearson, A. (1980). *Histochemistry, Volume 1: Preparative and Optical Technology*. Edinburgh, London & New York: Churchill Livingstone.
- Pécs, K. Z. (2010). *Lymphozytenisolation*. (Institut für Biotechnologie, Producer)
Retrieved 2012, from http://ww.immbio.hu/de/edu/lymphozyten_isolation.doc
- Petersen, A., & Pedersen, B. (2006). The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57, 43-51.
- Podliachouk, L., & Hesselholt, M. (1962). Les groupes sanguins des equides. *Immungenetics Letters*, 2, p.69.
- Podliachouk, L., & Wroblewski, A. (1958). Recherche des substances de groupes sanguins chez les chevaux et les mulets. *Annales De l'Institut Pasteur journal*, 94, p.748-752.
- Polkes, A., Giguere, S., Lester, G., & Bain, F. (2008). Factors associated with outcome in foals with neonatal isoerythrolysis (72 cases, 1988-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*(22), p.1216-1222.
- Pramod, S., Krishnakantha, T., & Venkatesh, Y. (2006). Effect of horse gram lectin (dolichos biflorus agglutinin) on degranulation of mast cells and basophils of atopic subjects: identification as an allergen. *International Immunopharmacology*, 6(11), 1714-1722.
- Pschyrembel. (2014). *Klinisches Wörterbuch* (Vol. 266). Berlin: De Gruyter.
- Raidal, S., Rose, R., & Love, D. (2001). Effects of training on resting peripheral blood and BAL-derived leucocyte function in horses. *Equine Veterinary Journal*, 33(6), 238-243.
- Reed, S., & Johnson, S. (2008). Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *Journal of Cellular Physiology*, 215, p.329-336.
- Reed, S., Bayly, W., & Sellon, D. (2010). *Equine Internal Medicine*. St.Louis: Saunders Elsevier.
- Riedelsheimer, B., & Welsch, U. (2010). Färbungen. In M. M, U. Welsch, M. M, & U. Welsch (Eds.), *Romeis Mikroskopische Technik* (pp. 181-298). Heidelberg:

Spektrum Akademischer Verlag.

- Romeis, P., & Böck, P. (1989). *Mikroskopische Techniken*. München: Urban & Schwarzenbeck.
- Rose, R., Allen, J., Hodgson, D., Stewart, J., & Chan, W. (1983). Responses to submaximal treadmill exercise and training in the horse: Changes in haematology, arterial blood gas and acid base measurements, plasma biochemical values and heart rate. *Veterinary Record*(113), p.612.
- Ross, M., & Pawlina, W. (2011). *Histology*. Baltimore: Wolters Kluwer Health .
- Rossdale, P., Burguez, P., & Cash, R. (1982). Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. *Equine Veterinary Journal*, p.293.
- Runcan, E., Pozor, M., Zambrano, G., Benson, S., & Macpherson, M. (2014, July). Use of two conventional staining methods to assess the acrosomal status of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, 46(4), pp. 503-506.
- Sadaba S.A., M. G. (2016). First report of cerebellar abiotrophy in an Arabian foal from Argentina. *Open Veterinary Journal*, 6(3), 259-262.
- Saloga, J., Klimek, L., Buhl, R., Mann, W., Knop, J., & Grabbe, S. (2006). *Allergologie-Handbuch, Grundlagen & klinische Praxis* (2. Auflage ed.). Stuttgart: Schattauer.
- Schermer, S. (1928). Untersuchungen über die Blutgruppen des Pferdes. *Zeitschrift Immunforschung*, 58.
- Schermer, S. (1934). Über Blutgruppen bei Haustieren und ihre Vererbung. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 67, p.261-262.
- Schermer, S. (1934/35). Die Blutgruppen der Haustiere (Pferd, Rind, Schwein und Schaf). *Zeitschrift Rassenphysiologie*, 7.
- Schermer, S., & Kaempffer, A. (1933). Weitere gruppenspezifische Differenzierungen im Pferdeblut. *Zeitschrift Immunforschung*, 80.
- Schermer, S., & Kaempffer, A. (1936). Die Blutgruppen des Pferdes und ihre praktische Bedeutung. *Berlin tierärztliche Wochenschrift*, 9.
- Schermer, S., Hofferber, O., & Kaempffer, A. (1932). Weitere Untersuchungen über die Blutgruppen des Pferdes. *Archiv Tierheilkunde*, 64.

- Schmid, D. (1966). Erforschung der Blutgruppen von Rind, Pferd und Huhn. *Habilitation*. München: Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- Schwörer-Haag, A. (1998). *Das Islandpferd, Geschichte-Haltung-Freizeit-Sport*. Stuttgart: Kosmos-Verlag.
- Schwarz, B., Piza, H., Trautinger, F., Rupp, B., Schuster, K., Sevelde, P., . . . Szekeres, T. (2013). http://www.karl-landsteiner.at/karl_landsteiner.html. (Ö. Karl Landsteiner Gesellschaft St.Pölten, Editor) Retrieved 12 08, 2013, from http://www.karl-landsteiner.at/Karl_landsteiner.html
- Sengbusch, P. (2004). *Lektine - Botanik online*. (2. H. Peter v. Sengbusch, Editor, & P. P. Sengbusch, Producer) Retrieved 01 13, 2014, from Lektine: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d17/17h.htm>
- Signorello, L., & Leoncini, G. (2017, 08 28). The molecular mechanisms involved in lectin-induced human platelet aggregation. *Biological Chemistry*.
- Smith, G. (2000). Neutrophils. In J. Douglas, & K. Wardrop, *Schalm's Veterinary Hematology* (pp. p.281-296). Hoboken,NJ: Wiley-Blackwell.
- Smollich, A., & Michel, G. (1992). *Mikroskopische Anatomie der Haustiere* (Vol. Vol.2). Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag .
- Srivastava, S., & Bamum, D. (1982, January). Lymphocyte stimulation response in horses against phytohaemagglutinin and M protein of *Streptococcus equi* using whole blood. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*(46(1)), pp. p.51-6.
- Steward, G., Riddle, C., & Salmon, P. (1977). Heamatology of the racehorse. A recent study of Thoroughbreds in Victoria. *Australian Veterinary Journal*(53), p.353.
- Stobbe, H. (1959). *Haematologischer Atlas* (1.Auflage ed.). Berlin: Akademie Verlag.
- Storey, M., & Jordan, S. (2008). An overview of the immune system. *Nursing Standard*, 23, 47-56.
- Stormont, C., & Suzuki, Y. (1963). Genetic control of albumin phenotypes in horses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 114, p.673.
- Stormont, C., & Suzuki, Y. (1964). Genetic systems of blood groups in horses. *Genetics* 50, p.915-929.

- Stormont, C., Suzuki, Y., & Rhode, E. (1963). Studies of equine bloodgroups. *International Proceedings XIth Congress Genetics (Den Haag)*. Den Haag: International Proceedings XIth Congress Genetics .
- Stormont, C., Suzuki, Y., & Rhode, E. (1964). Serology of the horse blood groups. *Cornell Veterinary Journal*, 54, p.439-452.
- Straaß, V., & Lieckfield, C. (2004). *Mythos Pferd*. München: BLV Verlagsgesellschaft mbH.
- Systemex. (2010). *Stabkernige Granulozyten- ein Parameter mit klinischer Relevanz ?* (Systemex GmbH Deutschland, Norderstedt) Retrieved 08 10, 2017, from https://www.systemex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/14.2.06_Sstabkernige_Granulozyten_Web.pdf
- Systemex Deutschland, G. (2010, Juni 6). *www.systemex.de*. Retrieved 9 16, 2014, from *Stabkernige Granulozyten- ein Parameter mit klinischer Relevanz ?*: http://www.systemex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/14.2.06_stabkernige_Granulozyten_web.pdf
- Tallmadge, R., Such, K., Miller, K., Matychak, M., & Felipe, M. (2012). Expression of essential B cell development genes in horses with common variable immunodeficiency. *Molecular Immunology*, 51, p.169-176.
- Taylor, F., & Hillyer, M. (2001). *Klinische Diagnostik in der Pferdepraxis*. Hannover: Schlütersche GbH & Co.KG.
- Thonton, D., Carlstedt, I., & Seehan, J. (1996). Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels. *Molecular Biotechnology*, 5(2), 171-176.
- Thornhill, R., Gangestad, S., Miller, R., Scheyd, G., McCollough, J., & Franklin, M. (2003). Major histocompatibility complex genes, symmetry, and body scent attractiveness in men and women. *Behavioral Ecology*, 14, 668-678.
- Tizard, I. (2000). *Veterinary Immunology: An Introduction* (6th Edition ed.). Philadelphia,PA: Saunders.
- Toussaint, M., Fievez, L., Desmet, C., Pirottin, D., Farnir, F., Bureau, F., & Lekeux, P. (2012). Increased hypoxia-inducible factor 1alpha expression in lung cells of horses with recurrent airway obstruction. *BMC Veterinary Research*, 8, 1-12.
- Umlauf, C. (2004). Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen equine Leukozyten. *Dissertation*. München: Tierärztliche Fakultät der LMU

München.

- van Furth, R., Cohn, Z., Hirsch, J., Humphrey, J., Spector, W., & Langevoort, H. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *The Bulletin of the World Health Organization*, 46(4), 845.
- Vences-Catalán, F., & Santos-Argumendo, L. (2011). CD38 through the life of a murine B lymphocyte. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 63(4), 840-846.
- Vercauteren, R. (1954). The intracellular distribution of alkaline and acid phosphatase in leucocytes. *Naturwissenschaften*, 41, 532.
- Wehrend, A., Hetzel, U., Huchzermeyer, S., Klein, C., & Bostedt, H. (2004). Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 33(3), pp. 180-182.
- Welsch, U. (2006). *Lehrbuch Histologie* (2.Auflage ed.). München: Elsevier.
- Wnuk, M., Bugno-Poniewierska, M., Lewinska, A., Oklewjowicz, B., Zabek, T., Bartosz, G., & Slota, E. (2011). Age-related changes in genomic stability of horses. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(5), 257-268.
- Woodruff, J., Clarke, L., & Chin, Y. (1987). Specific cell-adhesion mechanisms determining migration pathways of recirculating lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 5, 201-222.
- Yukawa, T., Kroegel, C., Evans, P., Fukuda, T., Chung, K., & Barnes, P. (1989). Density heterogeneity of eosinophil leucocytes: induction of hypodense eosinophils by platelet-activating factor. *Immunology*, 68(2), 68-72.

IX. ANHANG

1. Verzeichnis der Gebrauchslösungen

Lichtmikroskopie

Giemsa- Lösung: Giemsa- Stammlösung¹ Aqua dest.

Elektronenmikroskopie

Bleicitratlösung nach Reynolds:

Natriumcitrat Stock:

Natriumcitrat $\text{Na}_2(\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}^1$	35,7g
Aqua dest.	ad 100ml

Bleinitrat Stock:

Bleinitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2^1$	33,1g
Aqua dest.	ad 100ml

Bleicitrat- Lösung:

Aqua dest.	16ml
Natriumcitrat- Stock	3ml
Bleinitrat- Stock	2ml
NaOH , 1M^1	4ml
Aqua dest.	ad 100ml

Cacodylat- Puffer:

Lösung A:

Cacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}^2$	8,56g
---	-------

Aqua dest.	ad 200ml
------------	----------

Lösung B:

HCl, 0,2M ¹	
------------------------	--

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

Lösung A	50,0ml
----------	--------

Lösung B	4,2ml
----------	-------

Aqua dest.	ad 100ml
------------	----------

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

Cacodylat-Puffer 0,2M	50,0ml
-----------------------	--------

Aqua dest.	50,0ml
------------	--------

Epon:

Poly/bed 812 ³	16ml
---------------------------	------

DDSA ³	10ml
-------------------	------

NMA ³	9ml
------------------	-----

DMP-3O ³	0,3-0,5ml
---------------------	-----------

Fixierlösung nach Karnovsky:**10% Paraformaldehyd- Lösung:**

10% Paraformaldehyd- Lösung ¹	10g
--	-----

Aqua dest.	ad 100ml
------------	----------

NaOH, 0,1M ¹	bis zu 6 Tropfen
-------------------------	------------------

Karnovsky-Stammlösung:

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

Cacodylat- Puffer, 0,2M	50ml
-------------------------	------

Kalziumchlorid, wasserfrei ⁴	0,05g
---	-------

Karnovsky- Gebrauchslösung:

Karnovsky- Stammlösung	10ml
------------------------	------

Glutaraldehyd, 2,5%	1037ml
---------------------	--------

Kontrastierungslösung:**Osmiumtetroxid- Lösung, 3%:**

Osmiumtetroxid, 4%ig ³	2ml
-----------------------------------	-----

Cacodylat- Puffer, 0,1M	2ml
-------------------------	-----

Kaliumferrocyanid- Lösung, 3%:

Kaliumferrocyanid ⁵	0,3g
--------------------------------	------

Cacodylat- Puffer, 0,1M	<i>ad 10ml</i>
-------------------------	----------------

Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%) in Cacodylatpuffer, 0,1M:

Osmiumtetroxid- Lösung, 2%	4ml
----------------------------	-----

Kaliumferrocyanid- Lösung, 3%	4ml
-------------------------------	-----

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

NaCl ¹	42,50g
-------------------	--------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ¹	6,35g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ²	1,95g
Aqua dest.	ad 5,0l

¹ MERCK, Darmstadt

² AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England

³ POLYSCIENCES INC, Warrington, USA

⁴ SERVA, Heidelberg

⁵ SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen

⁶ AGAR-AIDS, Essex, England

⁷ ROTH, Karlsruhe

X. DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Dr. habil. Dr. h.c. Fred Sinowatz für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und die äußerst freundliche, faire und geduldige Unterstützung. Unter seiner Aufsicht diese Doktorarbeit anzufertigen, war mir eine besondere Freude und große Ehre.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Doktormutter Frau Privatdozentin Dr. Daniela Rodler. Sie hat sich bereit erklärt, nach der Pensionierung von Prof. Sinowatz die Anleitung zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit zu übernehmen. Ohne ihr Engagement, ihre Hilfe und nicht selbstverständliche Freundlichkeit wäre diese Arbeit nicht abgeschlossen worden.

Zudem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Histologie, die mich in meinen praktischen Arbeiten stets unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für Fragen hatten: Frau PD Dr. Kenngott, Frau Scholz, Herrn Gök, Frau Rußmeier, Frau Settles.

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

Ein großes Dankeschön gilt den Pferdebesitzern und Züchtern, welche mir ihre Pferde und Fohlen zur Blutprobengewinnung bereitstellten, u.a. Herrn Gerhard Ledl vom Reithof Burghauser, Frau Annette Single vom Burrishof und Frau Raphaela Fritz vom Islandpferdehof am Törring.

Meinen Freundinnen und Kolleginnen Dr. Stefanie Weber, Dr. Kaline Pfaffendorf, Dr. Christina Michler, Dr. Nina Peche und Dr. Franziska Rauch möchte ich für ihre unermüdliche Unterstützung und Aufheiterung danken.

Meinem Lebensgefährten Johannes Tack, meinen Eltern Ingrid und Dr. Frank Hoffmann und meinem Bruder Dr. Holger Hoffmann möchte ich von ganzem Herzen dafür danken, dass sie immer für mich da sind und stets eine unschätzbare große Hilfe sind.