

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

Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.- Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**Ultrastrukturelle und glykohistochemische
Untersuchungen am Blut der Katze**
(*Felis catus*)

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

von
Luise Reifenrath
aus Witten

München 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gabius

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	IV
I Einleitung	1
II Literaturübersicht.....	3
1. Hämatologie	3
1.1 Funktion und Zusammensetzung des Blutes.....	3
1.2 Hämatopoese	5
1.2.1 Pränatale Blutbildung.....	5
1.2.2 Postnatale Blutbildung	6
1.3 Erythrozyten	7
1.3.1 Entwicklung der Erythrozyten	8
1.3.2 Morphologie der Erythrozyten	9
1.3.3 Aufbau der Erythrozytenmembran	11
1.4 Thrombozyten.....	12
1.4.1 Entwicklung der Thrombozyten.....	12
1.4.2 Morphologie der Thrombozyten	14
1.4.3 Aufgabe der Thrombozyten	15
1.5 Leukozyten	16
1.5.1 Granulozyten und ihre Entwicklung	16
1.5.1.1 Neutrophile Granulozyten	18
1.5.1.1.1 Entwicklung der neutrophilen Granulozyten.....	18
1.5.1.1.2 Morphologie der neutrophilen Granulozyten	19
1.5.1.1.3 Aufgabe der neutrophilen Granulozyten	19
1.5.1.2 Eosinophile Granulozyten	21
1.5.1.2.1 Entwicklung der eosinophilen Granulozyten.....	21
1.5.1.2.2 Morphologie der eosinophilen Granulozyten	22
1.5.1.2.3 Aufgabe der eosinophilen Granulozyten	23
1.5.1.3 Basophile Granulozyten	25
1.5.1.3.1 Entwicklung der basophilen Granulozyten.....	25
1.5.1.3.2 Morphologie der basophilen Granulozyten	26
1.5.1.3.3 Aufgabe der basophilen Granulozyten	26
1.5.2 Monozyten	27
1.5.2.1 Entwicklung der Monozyten.....	28
1.5.2.2 Morphologie der Monozyten	29
1.5.2.3 Aufgabe der Monozyten	29
1.5.3 Lymphozyten	30
1.5.3.1 Entwicklung der Lymphozyten.....	31
1.5.3.2 Morphologie der Lymphozyten	33

1.5.3.3	Aufgabe der Lymphozyten	34
1.6	Blutgruppen der Katze	36
2.	Lektine und Lektin histochemie	39
2.1	Historisches	39
2.2	Definition der Lektine	40
2.3	Struktur und Zuckerbindungseigenschaften	40
2.4	Biologische Funktionen der Lektine	44
2.5	Lektin histochemie	44
2.6	Bedeutung der Lektine für Untersuchungen am Blut und an Blutzellen	45
III	Untersuchte Tiere und Methoden	48
1.	Material	48
1.1	Tiere	48
1.2	Übersicht über die verwendeten Lektine	49
2.	Methoden	51
2.1	Probeentnahme und Fixierung	51
2.2	Lichtmikroskopie	52
2.2.1	Färbung nach May-Grünwald	52
2.2.2	Färbung nach Giemsa	53
2.2.3	Panoptische Färbung nach Pappenheim	53
2.2.4	Diff-Quick	54
2.3	Elektronenmikroskopie	55
2.4	Glykohistochemie	55
2.4.1	FITC-markierte Lektine	55
2.4.2	Biotinylierte Lektine	56
2.4.3	Überprüfung der Zuckerspezifität (Zuckerhemmung)	59
2.5	Auswertung	60
IV	Ergebnisse	61
1.	Blutbilder der untersuchten Katzen	61
2.	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung	62
2.1	Erythrozyten	62
2.2	Thrombozyten	63
2.3	Neutrophile Granulozyten	64
2.4	Eosinophile Granulozyten	66
2.5	Basophile Granulozyten	67
2.6	Monozyten	68
2.7	Lymphozyten	69
3.	Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchung	72

3.1	Erythrozyten.....	72
3.2	Thrombozyten.....	72
3.3	Neutrophile Granulozyten.....	74
3.4	Eosinophile Granulozyten.....	78
3.5	Basophile Granulozyten.....	81
3.6	Monozyten.....	81
3.7	Lymphozyten.....	81
4.	Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchung.....	85
4.1	Für GlcNAc/βGlcNAc spezifische Lektine.....	85
4.1.1	WGA – Wheat germ Agglutinin.....	85
4.1.2	WGAs – Wheat germ Agglutinin succinyliert.....	88
4.2	Für GalNAc/Galaktose spezifische Lektine.....	91
4.2.1	GSA-I – Griffonia simplicifolia Agglutinin I.....	91
4.2.2	PNA – Peanut Agglutinin.....	94
4.2.3	RCA – Ricinus communis Agglutinin.....	97
4.2.4	DBA – Dolichos biflorus Agglutinin.....	100
4.2.5	SJA – Saphora japonica Agglutinin.....	103
4.2.6	SBA – Soybean Agglutinin.....	106
4.2.7	VAA – Viscum album Agglutinin.....	108
4.2.8	SNA – Sambucus nigra Agglutinin.....	111
4.3	Für Fukose spezifische Lektine.....	113
4.3.1	UEA-I – Ulex europaeus Agglutinin.....	113
4.4	Für Mannose/Glukose spezifische Lektine.....	116
4.4.1	Con A – Concanavalin A.....	116
4.4.2	LCA – Lens culinaris Agglutinin.....	118
4.4.3	PSA – Pisum sativum Agglutinin.....	121
4.5	Für Oligosaccharide spezifische Lektine.....	124
4.5.1	PHA-E – Phaseolus vulgaris Erythro-Agglutinin.....	124
4.5.2	PHA-L – Phaseolus vulgaris Leuco-Agglutinin.....	127
4.5.3	MAA-I – Maackia amurensis Agglutinin.....	130
4.6	Zuckerhemmung.....	132
V	Diskussion.....	133
1.	Blutbild.....	133
2.	Lichtmikroskopie.....	133
3.	Elektronenmikroskopie.....	138
4.	Glykohistochemie.....	143
VI	Zusammenfassung.....	149

VII Summary	151
VIII Literaturverzeichnis.....	152
IX Anhang	167
1. a. Abkürzungsverzeichnis Lektine	167
b. Abkürzungsverzeichnis allgemein	167
2. Gebrauchslösungen	169
3. Tabellenverzeichnis.....	172
4. Abbildungsverzeichnis	172
Danksagung	175

I Einleitung

Das Zusammenleben von Katzen und Menschen nahm seinen Ursprung vor etwa 5000 Jahren im alten Ägypten. Katzen, die dort zunächst gezähmt wurden, um Ratten und Mäuse in Kornsilos und Vorratsspeichern zu jagen, wurden bald in der Katzengöttin Bastet verehrt. Während die Katze in Europa im Mittelalter aus Aberglauben vorübergehend einen schweren Stand hatte und regelrecht verfolgt wurde, hat sie sich bis zur heutigen Zeit zu einem der beliebtesten Haustiere des Menschen entwickelt. Man schätzt sie nicht mehr nur als nützlichen Jäger, viele Menschen lieben auch das Wesen der Katze und halten sie aufgrund ihrer angenehmen Gesellschaft. Das planmäßige Züchten von besonderen Erscheinungsformen hat zu der Entstehung von mittlerweile etwa 40 anerkannten Rassen geführt, bei denen ein einzelnes Tier zum Teil einen beträchtlichen materiellen Wert haben kann. Nicht selten werden Katzen heute als Familienmitglied betrachtet. Darum ist es nicht verwunderlich, dass der Mensch heute im Hinblick auf die Gesundheit seiner Katze hohe Anforderungen stellt, sowohl was die Prophylaxe als auch die Therapie betrifft. Viele Krankheiten können zufriedenstellend therapiert werden, auch existieren gute Schutzimpfungen gegen Erkrankungen, die früher große Verluste unter Katzenpopulationen angerichtet haben, wie zum Beispiel die Panleukopenie oder der Katzenschnupfen. Andere Erkrankungen dagegen, vor allem Infektionskrankheiten wie die Katzenleukose (verursacht durch FeLV) oder das erworbene Immundefizienzsyndrom (verursacht durch FIV), stellen nach wie vor ein großes Problem dar, da weder zufriedenstellende Impfungen noch optimale Therapieformen zur Verfügung stehen.

Blutzellen, besonders Leukozyten, sind an der Abwehr vieler Erkrankungen direkt oder indirekt beteiligt. Daher liegt es auch nahe, diese Zellen in prophylaktische und therapeutische Maßnahmen mit einzubeziehen. Dies kann durch Stimulierung des Immunsystems über Impfstoffe, oder den Einsatz von Medikamenten bzw. Wirkstoffen, die direkt an der Blutzelle wirken, erfolgen. Dafür ist es allerdings wichtig, die funktionelle Morphologie der Blutzellen der Katze möglichst gut zu kennen. Die Blutzellen der Katze sind schon von vielen Autoren untersucht und beschrieben worden. Man kennt viele Details ihres Aufbaus, ihre Ultrastruktur, ihre zytochemische Zusammensetzung, und auch ihre jeweiligen Funktionen sind relativ gut erforscht. Ziel dieser Arbeit ist es nun, wichtige Merkmale der Blutzellen der Katze mit glykohistochemischen und ultrastrukturellen Methoden näher zu charakterisieren. Dabei wurde bei meiner Arbeit den Zuckerstrukturen der verschiedenen Blutzellen besondere

Aufmerksamkeit geschenkt. Sie wurden mittels fluoreszenzmarkierter Lektine dargestellt. Die speziellen Zuckerstrukturen der Blutzellen der Katze sind noch wenig erforscht, könnten aber im Hinblick auf die Entwicklung potentieller Impfstoffe oder anderer Wirkstoffe etwa in der Krebstherapie von Bedeutung sein. Auch in der Humanmedizin erhofft man sich, durch die Aufklärung des sogenannten „Zuckercodes“ auf Zellen Impfungen gegen beispielsweise verschiedene Krebsarten entwickeln zu können. Forschungsergebnisse amerikanischer Studien ließen den Schluss zu, dass Krebserkrankungen mit einer Veränderung der Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche einhergehen. So weiß man heute auch, dass die Zuckerstrukturen der Kommunikation von Zellen und Viren dienen, zum Beispiel bei der Interaktion zwischen Spermium und Eizelle, aber auch zwischen HI-Virus und Lymphozyten oder auch zwischen metastasierenden Krebszellen und dem Gefäßendothel. Zuckerstrukturen der Zellmembranen sind auch am Wachstum und der Regeneration von Geweben beteiligt. Über sie und spezifische korrespondierende Bindungsproteine erfolgen wichtige Kommunikationsprozesse zwischen den Zellen. Die Beteiligung der Zuckerstrukturen an vielen pathologischen Prozessen macht deutlich, dass es wichtig ist, ihre genaue Lokalisation in den Zellen und Geweben zu ermitteln.

II Literaturübersicht

1. Hämatologie

1.1 Funktion und Zusammensetzung des Blutes

Die Funktionen des Blutes sind vielfältig und umfangreich. Grundsätzlich können drei Hauptfunktionen unterschieden werden.

Zum Ersten erfolgt über die Blutbahn der Transport verschiedenster Stoffe, wie z.B. Nahrungsstoffe, Stoffwechselprodukte, Wasser, Proteine, Hormone und Gase. Eine der wichtigsten Transportfunktionen des Blutes ist der Sauerstofftransport.

Die zweite wichtige Aufgabe ist der Beitrag des Blutes zur Homöostase, d.h. zur Aufrechterhaltung des physikochemischen Gleichgewichts im Körper, indem das Blut den Wasserhaushalt sowie den osmotischen Druck und den pH-Wert in den Geweben reguliert.

Drittens übernimmt das Blut Aufgaben der spezifischen und unspezifischen Körperabwehr, wobei vor allem die weißen Blutzellen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) eine wichtige Rolle spielen (Kraft et al., 2005).

In seiner Gesamtheit besteht Blut aus einem flüssigen Anteil, dem Blutplasma, in dem alle nichtzellulären Bestandteile gelöst sind, und den im Plasma suspendierten Zellen, den Blutkörperchen. Eine Übersicht über diese Zusammensetzung ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abb. 1: Übersicht über die Zusammensetzung des Blutes

Blut	Blutplasma ca. 55%	Wasser, ca. 90% Ionen (Na, Ca, Cl, K, Mg, Fe, u.a.) Nahrungsstoffe (AS, KH, Fette) Stoffwechselprodukte (Harnstoff, Kreatin, u.a.) Proteine (Albumin, Globuline, Fibrinogen) Hormone, Enzyme											
	zelluläre Bestandteile ca. 45%	Erythrozyten Thrombozyten Leukozyten <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">Granulozyten</td> <td><i>Neutrophile Granulozyten</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Basophile Granulozyten</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Eosinophile Granulozyten</i></td> </tr> <tr> <td>Lymphozyten</td> <td><i>B-Lymphozyten</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>T-Lymphozyten</i></td> </tr> <tr> <td>Monozyten</td> <td></td> </tr> </table>	Granulozyten	<i>Neutrophile Granulozyten</i>		<i>Basophile Granulozyten</i>		<i>Eosinophile Granulozyten</i>	Lymphozyten	<i>B-Lymphozyten</i>		<i>T-Lymphozyten</i>	Monozyten
Granulozyten	<i>Neutrophile Granulozyten</i>												
	<i>Basophile Granulozyten</i>												
	<i>Eosinophile Granulozyten</i>												
Lymphozyten	<i>B-Lymphozyten</i>												
	<i>T-Lymphozyten</i>												
Monozyten													

Das Plasma besteht zu etwa 90% aus Wasser, der Rest setzt sich zusammen aus organischen Bestandteilen/Transportstoffen (z.B. Plasmaproteine, Harnstoff, Kohlenhydrate, Fette, u.a.), anorganischen Bestandteilen (z.B. Natrium, Chlorid, Kalium, u.a.) sowie Hormonen, Enzymen, Antikörpern und Gerinnungsfaktoren.

Im Verhältnis Plasma zu zellulären Bestandteilen bestehen große tierartliche Unterschiede. Der prozentuale Anteil der zellulären Bestandteile am gesamten Blutvolumen wird über den Hämatokritwert angegeben, für den es jeweils tierartspezifische Referenzbereiche gibt. Für die Katze wurden in frühen Untersuchungen Werte von 40–41% angegeben (Windle et al., 1940), laut heutigen Standardwerken liegt der Referenzbereich für den Hämatokrit bei 24–45% (Jain, 1993) bzw. 30–44% (Kraft et al., 2005). Zu den zellulären Bestandteilen gehören Erythrozyten, Leukozyten, und Thrombozyten. Erythrozyten bilden mengenmäßig den größten Anteil der Blutkörperchen. Sie sind hauptsächlich für den Sauerstofftransport verantwortlich, welcher an das in den Erythrozyten vorkommende Hämoglobin gebunden ist. Die Leukozyten wiederum lassen sich einteilen in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten; sie haben vor allem Abwehrfunktionen.

In Tabelle 1 werden Referenzbereiche für verschiedene Blutparameter der Katze angegeben.

Tab. 1: Referenzbereiche einiger Blutwerte der Katze

Messgröße	konventionelle Einheit	SI-Einheit
Erythrozyten	5–10 x10 ⁶ /μL	5–10 T/L
Hämatokrit	30–44%	0,30–0,44 L/L
Hämoglobin	9–15 g/dL	5,6–9,3 mmol/L
MCV	40–55 μm ³	40–55 fl
MCH	13–17 pg	0,8–1,0 fmol
MCHC	25–31 g/dL	19–22 mmol/L
Retikulozyten	bis 30.000/μL	
Thrombozyten	180–550 x10 ³ /μL	180–550 G/L
Gesamtleukozytenzahl	6–11 x10 ³ /μL bis 18 x10 ³ /μL ¹	6–11 G/L bis 18 G/L ¹

Differentialblutbild	relative Zahlen (%)	absolute Zahlen (konv.: / μ L; SI: $\times 10^6$ /L)
Stabkernige neutrophile Granulozyten	0–4	0–600
Segmentkernige neutrophile Granulozyten	60–78	3000–11000
Eosinophile Granulozyten	0–6	40–600
Basophile Granulozyten	0–1 (selten)	bis 40 (selten)
Lymphozyten	15–38	1000–4000
Monozyten	0–4	40–500

¹ im erregten Zustand

1.2 Hämatopoese

Die Hämatopoese (Gr. *haima* = Blut, *poiesis* = Bildung) bezeichnet die Bildung der verschiedenen Blutzellen. Da diese nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen, mit Ausnahme bestimmter Lymphozyten, werden zeitlebens neue Zellen in den blutbildenden Organen gebildet. Entsprechend ihrer Funktion und antigenen Eigenschaften lassen sich die Zellen der Blutbildung grob in drei Kompartimente einteilen: das Stammzellkompartiment, die Progenitoren und die Effektorzellen (Gasper, 2000). Aus den pluripotenten Stammzellen, die zur Selbsterneuerung fähig sind, gehen letztendlich alle Blutzellen hervor (Orlic und Bodine, 1994). Zunächst entstehen aus ihnen die Progenitoren, dies sind uni-, bi- oder oligopotente Vorläuferzellen, die nur im begrenzten Maß zur Selbsterneuerung fähig sind und deren Differenzierungsrichtung weitgehend festgelegt ist. Aus den myeloischen Vorläuferzellen gehen die erythrozytären, neutrophilen, eosinophilen, basophilen, monozytären und thrombozytären Zellreihen hervor, aus den lymphatischen Vorläuferzellen die lymphozytären Zellen. Die reifen Zellen bilden das letzte Kompartiment, die Effektorzellen, welche nicht mehr zur Teilung fähig sind und nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen (Sinowatz, 2000).

1.2.1 Pränatale Blutbildung

Während der embryonalen Entwicklung werden drei Phasen der Blutbildung unterschieden: die megaloblastische, hepatolienale und medulläre Phase (Sinowatz, 2000). Anfänglich, während der megaloblastischen Phase, erfolgt die Differenzierung der Blutzellen in den Blutinseln der Wand des Dottersacks. Diese intravasale Blutzellbildung erfolgt bei der Katze vom 14. bis 20.

Graviditätstag. Während dieser Phase der Erythropoese werden primitive rote Blutzellen gebildet, die kernhaltig sind und embryonales Hämoglobin enthalten. Am 19. Tag der Gravidität sind diese Zellen ausgereift und stellen zu diesem Zeitpunkt 98% der zirkulierenden Blutzellen dar (Tiedemann, 1978). Die definitive Erythropoese im Dottersack beginnt bei der Katze zwischen dem 17. und 19. Tag und endet um den 45. Graviditätstag. Es entstehen kernlose Erythrozyten mit adultem Hämoglobin. Etwa ab dem 20. Graviditätstag beginnt bei der Katze die hepatolienale Phase mit der definitiven Erythropoese zunächst in der Leber. Um den 36. Tag entstehen Blutzellen auch in der Milz, allerdings nur in geringem Umfang. Am 25. Tag beginnt die Granulopoese (Neutrophile und Eosinophile) in der Leber, ab dem 45. Tag der Gravidität auch in der Milz (Tiedemann, 1978). Die hämatopoetische Aktivität in Leber und Milz reduziert sich allmählich, kann jedoch zeitlebens bei Erkrankungen des Knochenmarks wieder gesteigert werden (Jain, 1993). In der Mitte der Gravidität der Katze beginnt die Blutzellbildung auch im Knochenmark. Um den 45. Tag stellt sie ca. 50% der Blutzellen. Während der Hämatokrit am 36. Graviditätstag noch bei 22% liegt, steigt er bis zur Geburt auf 47% an (Tiedemann, 1978).

1.2.2 Postnatale Blutbildung

Nach der Geburt werden Erythrozyten und Granulozyten fast ausschließlich im roten Knochenmark gebildet. In den Zwischenräumen der knöchernen Spongiosa von Wirbelkörpern, Rippen, Brustbein, Darmbein und den proximalen Enden langer Röhrenknochen befindet sich das hämoretikuläre Gewebe, in dem man neben Blutzellen unterschiedlichster Entwicklungsstadien außerdem Fibroblasten, Fettzellen, Makrophagen und zahlreiche weitlumige Sinusoide findet (Weiss, 1967). Ausgangszellen für sämtliche differenzierte Blutzellen sind die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC = hematopoietic stem cells). Diese machen nur einen geringen Anteil, etwa 0,01% aller Knochenmarkszellen aus. Sie befinden sich meist in der Ruhephase (G_0), und teilen sich nur bei Bedarf mitotisch. Dabei entwickelt sich eine Tochterzelle innerhalb der Hämatopoese weiter, die andere verweilt weiter als Stammzelle (Brummendorf et al., 1998). Untersuchungen von Till und McCulloch (1961) zeigten, dass die HSC in der Milz hämatopoetische Zellkolonien bilden können, diese werden deshalb auch „colony forming units in the spleen“ (CFU-S) genannt. Nach der mitotischen Teilung von pluripotenten Stammzellen entwickeln sich im weiteren Verlauf determinierte hämatopoetische Vorläuferzellen (Progenitoren). Dies sind zunächst die sogenannten koloniebildenden Einheiten oder colony-forming units CFU-GEMM und CFU-L, welches die ersten

identifizierbaren Vorläuferzellen der myelopoetischen bzw. lymphatischen Hauptzelllinien sind. Aus der CFU-GEMM entstehen die differenzierten Progenitoren der erythrozytären (CFU-E), neutrophilen (CFU-G), eosinophilen (CFU-Eo), basophilen (CFU-Ba), monozytären (CFU-M) und thrombozytären (CFU-MK) Zellreihe. Aus der CFU-L entstehen die Progenitoren der lymphozytären Zellen (CFU-B, CFU-T). Morphologisch ähneln sich diese Zellen noch sehr, sie sind klein, stark basophil und haben einen runden Kern. Die Progenitoren entwickeln sich im Knochenmark zu reifen Blutzellen der einzelnen Zelllinien, die über sinusoidale Kapillare aus dem retikulären Raum in das zirkulierende Kapillarblut übertreten können (Liebich, 2004). Die weiteren Reifungsstufen der Zellreihen werden in den folgenden Unterkapiteln beschrieben.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Blutzellbildung sind Zytokine. Diese löslichen Botenstoffe werden von zahlreichen hämatopoetischen und nichthämatopoetischen Zellen gebildet und wirken schon in geringen Konzentrationen. Ihre Wirkung wird über Oberflächenrezeptoren der Zielzellen vermittelt. Sie regulieren die Teilung, Proliferation, Differenzierung, Mobilität und Aktivität der hämatopoetischen Zellen. Es gibt verschiedene Gruppen von Zytokinen, von denen den koloniestimulierenden Faktoren (CSF) und den Interleukinen (IL) bei der Blutzellbildung die größte Bedeutung zukommt (Alexander, 1998).

Spätere Differenzierungsstadien werden durch weitere Faktoren beeinflusst. So stimuliert zum Beispiel Thrombopoetin die Entwicklung der Blutplättchen und Erythropoetin die der roten Blutkörperchen (Jackson, 1989; Woodman, 1992).

1.3 Erythrozyten

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff in alle Gewebe des Körpers sowie der Abtransport von Kohlendioxid. Der Sauerstoff wird dafür reversibel an den intrazellulären Blutfarbstoff, das Hämoglobin, gebunden. Hämoglobin besteht aus einer sauerstoffbindenden, prosthetischen Gruppe, dem Häm, und einem tierartsspezifischen Proteinanteil, dem Globin. Es ist aus vier Untereinheiten aufgebaut (Tetramer), von denen jeweils zwei identisch sind. Das komplette Hämoglobin besteht demzufolge aus vier Häm-Molekülen mit je zwei α - bzw. β -Polypeptidketten. Ein Häm-Molekül besteht aus vier substituierten Pyrrolringen, die einen Protoporphyrinring um ein zweiwertiges zentrales Eisenatom (Fe^{2+}) bilden. Das zentrale Fe^{2+} -Atom kann ein Sauerstoffmolekül binden, ein Hämoglobinmolekül kann somit maximal vier Sauerstoffmoleküle reversibel binden (Jain, 1993). Erythrozyten stammen, wie alle Blutzellen, von einer pluripotenten Stammzelle ab.

Während der Entwicklung zum reifen Erythrozyten, der Erythropoese, wird die Zelle kleiner, und beim Säugetier verliert sie den Zellkern sowie alle Zellorganellen. Der reife Erythrozyt ist kernlos, hat eine bikonkave runde Scheibenform und variiert tierartlich in der Größe des Durchmessers (Jain, 1993). Die Katze hat einen Erythrozytendurchmesser von 5,9 μm (Scarborough, 1930) bzw. 5,8 μm (Jain, 1993). Die Lebensdauer im zirkulierenden Blut beträgt nach Angaben von Jain (1993) etwa 68 Tage bzw. nach den Angaben von Mischke (2003) 73–79 Tage. Die Anzahl der Erythrozyten im Blut zeigt ebenfalls große individuelle Unterschiede sowohl zwischen den Tierarten als auch innerhalb einer Tierart. Die Zahl ist unter anderem abhängig von der Rasse, dem Geschlecht und dem Alter der Tiere. Bei der Katze werden Referenzbereiche von 7,2–10 $\times 10^6/\mu\text{L}$ (Scarborough, 1930) bzw. 5,0–10 $\times 10^6/\mu\text{L}$ (Jain, 1993) angegeben. Neugeborene Katzen und Hunde besitzen eine halb so hohe Erythrozytenzahl, und erst im ersten Lebenshalbjahr kommt es zu einem Angleich an die Werte adulter Tiere (Windle et al., 1940; Kraft et al., 2005).

Mit zunehmendem Alter vermindert sich die Stoffwechselaktivität der Zellen. Es kommt zum Wasserverlust, die Struktur der Zellmembran ändert sich und somit auch die Verformbarkeit der Zellen (Nash und Meiselman, 1981; Waugh et al., 1992). Letztere ist eine wichtige Voraussetzung dafür, dass Erythrozyten auch kleine Kapillaren mit einem Durchmesser von nur 3 μm passieren können. Gealterte Erythrozyten werden vor allem in der Milz, aber auch in der Leber und im Knochenmark von Zellen des mononukleären Phagozytensystems abgebaut (Christian, 2000).

1.3.1 Entwicklung der Erythrozyten

Die Entwicklung der Erythrozyten findet postnatal hauptsächlich im Knochenmark statt und beginnt wie bei allen Blutzellen mit der mitotischen Teilung pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, im Fall der Erythropoese vor allem durch IL-3 und GM-CSF, kommt es zur Differenzierung der erythropoetischen Progenitorzellen BFU-E bzw. CFU-E. Aus ihnen entwickeln sich die Proerythroblasten. Dies sind die am frühesten erkennbaren Zellen, die der Erythropoese zugeordnet werden können (Jain, 1993). Eine wichtige Rolle spielt auch Erythropoetin, ein Glykoprotein, das in der Niere gebildet wird (Jacobson et al., 1957). Es stimuliert die Proliferation vor allem von erythropoetischen Progenitorzellen, besonders CFU-E, außerdem fördert es die Ausschleusung von Retikulozyten in den Blutstrom (Woodman, 1992). Seine Bildung wird vor allem bei Sauerstoffmangel

(Anämie, Hypoxie) ausgelöst (Jacobson et al., 1957). Erythropoetin wird innerhalb von Minuten bis Stunden gebildet und erreicht ein Maximum nach etwa 24 Stunden. Die ersten daraufhin neu gebildeten roten Blutkörperchen erscheinen nach etwa fünf Tagen im zirkulierenden Blutstrom. Diese Zeit wird benötigt, bis sich aus den CFU-E-Progenitoren reife Erythrozyten entwickeln (Porter und Goldberg, 1994). Auch andere Signalstoffe, wie Steroidhormone, Peptide und Vitamin B12, beeinflussen die Erythrozytenbildung im Knochenmark (Liebich, 2004).

Ein Proerythroblast ist etwa 20–25 µm groß und basophil. Es erfolgt eine weitere Mitose, und es entstehen Makroblasten. Der Zellkern wird dabei kleiner, und es kommt bereits zur Einlagerung von Hämoglobin in das Zytoplasma. Nach nochmaliger Teilung differenzieren sie zu basophilen Erythroblasten (Jain, 1993). Diese liegen in Gruppen um Retikulumzellen bzw. Makrophagen, welche den Erythroblasten Eisen für die Hämoglobinsynthese liefern (Sinowatz, 2000). Der Kern hat wiederum an Größe verloren und erscheint stark verdichtet und basophil. Eine weitere Teilung führt zur Bildung polychromatischer Erythroblasten. Der Hämoglobingehalt steigt, die Ribosomenzahl nimmt ab, das Zytoplasma wird somit polychromatisch. Reifungsvorgänge führen dazu, dass die Hämoglobinkonzentration weiter zu- und der Gehalt an basophilen Organellen (Ribosomen, rauhes ER) abnimmt. Es entstehen azidophile Erythroblasten. Gleichzeitig verkleinert sich der rundliche Zellkern und wandert an die Zellperipherie. Der pyknotische Zellkern wird aus der Zelle ausgestoßen, und es verbleiben zunächst Reste von Zellorganellen im Zytoplasma, die sogenannte „Substantia granulofilamentosa“ (Golgi-Vesikel, Ribosomen, ER-Membranen, Mitochondrien), die netzartig verklumpen. Diese Zellen werden Retikulozyten genannt (Jain, 1993). Sie lassen sich durch eine Anfärbung mit Brillantkresylblau nachweisen (Bessis, 1977). Bei der endgültigen Ausreifung verlieren die Retikulozyten auch die letzten Innenstrukturen, und es entstehen die reifen, organelllosen, hämoglobinhaltigen Erythrozyten (Sinowatz, 2000; Liebich, 2004). Der Prozess der Erythropoese beträgt bis zur Entstehung reifer Erythrozyten 7–8 Tage (Jain, 1993).

1.3.2 Morphologie der Erythrozyten

Die Erythrozyten der meisten Säugetiere haben die Form einer bikonkaven Scheibe und sind kernlos. Sie weisen bei Hunden, Rindern und Schafen eine deutliche zentrale Vertiefung auf. Bei Katzen und Pferden ist die zentrale Vertiefung der Erythrozyten etwas flacher (Jain, 1993). Der Durchmesser der Erythrozyten liegt bei den verschiedenen Haustierarten zwischen 4–9 µm, bei der Katze beträgt er 5,9 µm (Scarborough, 1930) bzw. 5,8 µm (Jain, 1993). In Blutausstrichen

von Pferden, und manchmal auch von Hunden und Katzen, findet man die sogenannte Geldrollenbildung (Jain, 1993).

Im Blutbild gesunder Katzen können 5–10% bzw. bis 30.000/ μ L Retikulozyten nachgewiesen werden (Kraft et al., 2005). Diese polychromatischen, jugendlichen Erythrozyten enthalten nach Ausschleusung des Zellkerns während der Entwicklung noch Reste von Zellorganellen, die sich durch Färbung mit Brilliantkryselblau oder Methylenblau sichtbar machen lassen (Brecher, 1949; Bessis, 1977). Sie sind etwas größer als die reifen Erythrozyten und verfügen über eine höhere metabolische Aktivität (Jain, 1993). Bei der Katze entwickeln sich aus Retikulozyten mit zunächst netzförmigem bzw. aggregiertem Farbstoffniederschlag innerhalb von 12 Stunden Retikulozyten mit nur punktförmiger Anfärbung. Diese weisen noch über 10–12 Tage ein schwaches Färbeverhalten auf bevor sie zu vollständig reifen Erythrozyten werden (Reagan et al., 1992). Eine erhöhte Zahl an aggregierten Retikulozyten weist auf eine frühe Regenerationsphase während/nach einer Anämie hin, punktierte Stufen sind Indikator für eine einige Tage zurückliegende Regenerationsphase. Eine Steigerung der Erythropoese im Knochenmark lässt sich nach etwa zwei Tagen anhand erhöhter aggregierter Retikulozytenzahlen im peripheren Blut nachweisen (Alsaker et al., 1977).

Im Blutbild gesunder Katzen finden sich regelmäßig Erythrozyten mit Heinz-Innenkörpern, ohne dass die Tiere erkennbare Krankheitssymptome zeigen. Die Heinz-Innenkörper bestehen aus denaturiertem Hämoglobin und erscheinen in Supravitalfärbungen mit z.B. Methylenblau als kräftig blau gefärbte, 0,5–1 μ m große, unregelmäßige Einschlüsse. Ihr Vorkommen ist so häufig, dass eine geringe Anzahl Heinz-Innenkörper bei der Katze als physiologisch angesehen wird (Jain, 1993; Kraft et al., 2005). Der Grund für das natürliche Vorkommen bei Katzen ist, dass deren Hämoglobinmolekül acht reaktive Sulfhydrylgruppen besitzt, während es bei den meisten anderen Spezies nur zwei sind. Dies macht das Hämoglobin sehr instabil, und es unterliegt leicht der Denaturierung durch Oxidation (Jain, 1993). Dazu kommt, dass die Milz der Katze aufgrund ihrer nicht sinusoidalen Struktur Erythrozyten mit Heinz-Innenkörpern nicht effizient aus dem zirkulierenden Blut entfernen kann (Christopher et al., 1990). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigt sich, dass sie meist marginal in der Zelle liegen und an der Zellmembran haften (Bain, 1995). Bei anderen Spezies treten sie bei Milzfunktionsstörungen, aber vor allem bei Schäden durch Oxidantien auf und resultieren in einer hämolytischen Anämie. In Katzenpopulationen treten Heinz-Innenkörper mit einer Häufigkeit von <1% bis >50% auf, ohne dass eine hämolytische Anämie vorliegt (Jain, 1993). Im Blut gesunder Katzen sind die Heinz-Innenkörper im Durchmesser etwa 0,5–1,0 μ m groß (Jain, 1993; Mischke, 2003).

In bis zu 1% der Erythrozyten gesunder Katzen werden Howell-Jolly Körper beobachtet (Clinkenbeard und Meinkoth, 2000). Dies sind Reste von Kernchromatin. Sie entstehen durch eine unvollständige Kernausschleusung, der sogenannten Karyorrhesis, oder durch eine zu frühe Separation von Chromatin vom Spindelapparat. Bei den meisten Haustieren werden sie normalerweise nach Blutungen im Regenerationsstadium gefunden, nach einer Splenektomie oder unter Kortikosteroidtherapie (Kraft et al., 2005), während sie bei der Katze auch unter physiologischen Bedingungen auftreten (Clinkenbeard und Meinkoth, 2000).

1.3.3 Aufbau der Erythrozytenmembran

Die Membran der Erythrozyten besteht aus zwei elektronendichten Schichten, welche sich aus Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten zusammensetzen. Es handelt sich um eine Lipid-Doppelschicht, die hauptsächlich aus Phospholipiden besteht, deren hydrophobe Anteile einander zugewandt sind, während ihre hydrophilen Anteile auf der einen Seite zum Zytoplasma im Zellinneren und auf der anderen Seite nach außen zum Plasma gerichtet sind. Zwischen die Phospholipide sind Cholesterolemoleküle, andere Lipide und zahlreiche Membranproteine gelagert (Jain, 1993). Während das Cholesterolemolekül relativ gleichmäßig innerhalb der Doppelschicht verteilt ist, sind andere Lipide dagegen asymmetrisch angeordnet. Glykolipide, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin befinden sich eher in der äußeren Hälfte der Doppelschicht, Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin findet man eher in der inneren, dem Zytoplasma zugewandten Schicht (Bretscher, 1972). Die Membranproteine können nach ihrer Struktur in eine interne hydrophile Gruppe, eine membranübergreifende hydrophobe Gruppe (Integralproteine) und eine externe hydrophile Gruppe mit anhaftenden Kohlenhydraten aufgeteilt werden (Steck, 1974). Die flüssig-kristalline Lipidmatrix ist mitverantwortlich für die Verformbarkeit der Membran (Jain, 1993). Ebenso entscheidend für die Verformbarkeit, aber auch für die Stabilität der Membran ist das Membranskelett. Es besteht aus faserähnlich strukturierten Proteinen und liegt unmittelbar unter der Lipid-Doppelschicht (Yeagle, 1992; Jain, 1993). Zu den Proteinen gehören Spektrin (Band 1 und 2), Ankyrin oder Syndein (Band 2.1), Band 3 und 4.1, Glycophorin A, B und C und Actin (Band 5). Spektrin kommt am Häufigsten vor. Es verbindet die Proteine innerhalb des Zytoskeletts sowie das Zytoskelett selbst mit Phospholipiden der Membraninnenseite (Smith, 1987). Es besteht aus zwei langen, flexiblen Proteinen, welche Heterodimere bilden (Shotton et al., 1979). Ankyrin verbindet das Zytoskelett mit dem Membranprotein 3 (Bennett und Stenbuck,

1980), das Protein 4.1 stellt eine Verbindung zum Transmembranprotein Glykophorin her (Müller und Morrison, 1981). Das Membranskelett spielt eine physiologisch wichtige Rolle. Es sind erblich bedingte Fehler in seinen Proteinen bekannt, die zu einer Instabilität der Erythrozytenmembran sowie zu einer erhöhten Neigung der Erythrozyten miteinander zu verschmelzen, führen (Smith, 1987).

1.4 Thrombozyten

Im Knochenmark reifen zunächst aus pluripotenten Stammzellen über Vorläuferstadien die Megakaryozyten heran. Die reifen Megakaryozyten verlassen das Knochenmark und gelangen ins Blut. Bei diesem Vorgang zerfallen die Zellen in Thrombozyten, wobei 2000 bis 8000 Plättchen pro Megakaryozyt entstehen können (White, 1994). Nach anderen Beobachtungen werden die Thrombozyten noch im Knochenmark von den außerhalb der Sinusoide gelagerten Megakaryozyten in das Lumen der GefäÙe abgeschnürt. Die Thrombozyten der Säugetiere sind kernlos und haben bei der Katze einen mittleren Durchmesser von 1–4 µm (Mischke, 2003). Ihre Anzahl im Blut ist speziesabhängig. Der Referenzbereich der Katze wird mit 180.000–550.000 Zellen/µL bzw. 180–550 G/L angegeben. Die Lebensdauer der Plättchen beträgt 5–9 Tage (Kraft et al., 2005). Während des Alterungsvorgangs kommt es zu Veränderungen der Kohlenhydratstruktur auf der Zellmembran, welche von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) in Milz und Leber erkannt werden. Es kommt zur Phagozytose und zum Abbau der alten Thrombozyten.

1.4.1 Entwicklung der Thrombozyten

Die im Blut zirkulierenden Thrombozyten sind kernlose Zytoplasmafragmente, die von polyploiden Riesenzellen, den Megakaryozyten abstammen. Megakaryozyten entstehen wie alle Blutzellen aus einer pluripotenten Stammzelle. Über die BFU-MK und CFU-MK, die Progenitoren dieser Zellreihe, entstehen Megakaryoblasten, die ersten morphologisch identifizierbaren Zellen der Megakaryopoese im Knochenmark. Sie haben einen Durchmesser von 15–50 µm und einen runden, ovalen oder nierenförmigen Kern. Außerdem einen schmalen Zytoplasmasaum von ca. 5 µm, der aufgrund vieler freier Ribosomen basophil erscheint (Ebbe, 1988). Megakaryoblasten können keine weiteren Mitosen mehr durchlaufen, d.h. es findet eine mehrfache Vermehrung des Chromosomensatzes ohne nachfolgende Kernteilung statt

(Endomitose). Es entwickeln sich die Promegakaryozyten mit einem stark gelappten, polyploiden Kern. Nach einer weiteren Teilung der Chromosomen entstehen Megakaryozyten mit einem Durchmesser von 50–70 µm und unregelmäßig stark gekerbtem Zellkern. Das Zytoplasma schließt vermehrt Ribosomen und azurophile Granula ein. Das Zytoplasma nimmt zu, und die Zellen differenzieren sich zu reifen Megakaryozyten, die mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 µm zu den größten Zellen im Organismus gehören. Reife Megakaryozyten liegen subendothelial im Knochenmark, besitzen einen gelappten, kompakten Zellkern sowie ein leicht eosinophiles Zytoplasma mit zahlreichen azurophilen Granula (Ebbe, 1988; Cramer, 1999).

Durch die Abschnürung und Fragmentierung von Zytoplasmaanteilen reifer Megakaryozyten entstehen die Blutplättchen. Diese membranbegrenzten, kernlosen Zerfallsprodukte der Megakaryozyten enthalten deren Zytoplasmaanteile mit azurophilen Granula, Vesikeln, Mikrotubuli und Mikrofilamenten. Welche Mechanismen bei der Abschnürung der Thrombozyten aus den Megakaryozyten eine Rolle spielen, ist noch nicht geklärt. Derzeit gibt es dazu drei Theorien. Eine Theorie besagt, dass sich innerhalb der Megakaryozyten kleine zytoplasmatische Territorien bilden, die am Ende der Zellreifung abgegeben werden. Eine weitere Theorie besagt, dass die Thrombozyten von der Zelloberfläche abgeschnürt werden, und eine dritte vermutet die Bildung von Demarkationsmembranen und Abgabe von Vorläuferzellen, die sich erst später im Blutstrom in Thrombozyten aufspalten (Norol et al., 1998; Cramer, 1999).

An der Regulation der Megakaryopoese und Thrombozytopoese sind verschiedene Wachstumsfaktoren, unter anderem Thrombopoetin, beteiligt. Thrombopoetin ist der wichtigste Mittler der Plättchenproduktion. In vitro kann er das Wachstum von sogenannten „koloniebildenden Megakaryozyten“ und die Bildung reifer polyploider Megakaryozyten induzieren (Miyazaki und Kato, 1999). In Tieren mit supprimiertem Knochenmark beschleunigt Thrombopoetin die Bildung von Thrombozyten (Eaton und de Sauvage, 1995). In Abhängigkeit von der Zahl der zirkulierenden Thrombozyten und Megakaryozyten im Knochenmark wird Thrombopoetin in Leber und Niere produziert (Long, 1999).

In vitro konnte die Reifung von Megakaryozyten und Thrombozyten außerdem durch das Zytokin IL-3 allein, sowie in Kombination mit anderen Faktoren (z.B. Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor [GM-CSF], IL-6, IL-11) induziert werden (Norol et al., 1998; Leven, 2000).

1.4.2 Morphologie der Thrombozyten

Im Blutausschlag erscheinen Thrombozyten im nicht aktivierten Zustand scheibenförmig, bei der Katze zum Teil auch länglich, und haben im Allgemeinen einen Durchmesser von 1–4 μm . Bei der Katze kommen gelegentlich auch Riesenformen vor (Jain, 1986; Mischke, 2003). Mit bestimmten Färbemethoden sind im Lichtmikroskop rötlich-violette Granula zu erkennen, die im Zytoplasma verteilt, meist jedoch in der Mitte der Zelle lokalisiert sind (Schalm, 1965). Man unterscheidet somit zwei Zonen: eine dichte Zentralzone, das Granulomer, welche von einer durchsichtigen, schwach gefärbten Randzone, dem Hyalomer, umgeben wird (Bain, 1995; Liebich, 2004). Das Granulomer enthält zahlreiche azurophile Granula, die auch vereinzelt im Hyalomer vorkommen. Das Hyalomer schließt ein System aus Vesikeln und Mikrotubuli ein, die durch Einstülpungen des Plasmalemmis entstanden sind (Liebich, 2004). Man findet einzelne Plättchen in Blutausschlägen, häufig sind sie aber auch in größerer Anzahl zusammengelagert. Diese Bildung von Mikroaggregaten, die besonders bei Katzen beobachtet wird, kann durch vorsichtige Blutentnahme und vor allem durch die Verwendung eines Antikoagulanz aus Zitratverbindungen wie Na-Citrat vermindert werden (Moritz und Hoffmann, 1997).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die äußere Membran der Plättchen mit einem amorphen Material bedeckt ist, welches eine dünne, externe Hülle, die Glykokalix, bildet. Diese Hülle ist reich an Glykoproteinen. Dicht unter der Oberflächenmembran befinden sich Mikrofilamente und Mikrotubuli. Im Zellinneren finden sich viele α -Granula, Glykogen, die elektronendichten Granula, Lysosomen, Ribosomen und wenige Mitochondrien. Die α -Granula enthalten unter anderem den Plättchenfaktor 4 und β -Thromboglobulin, welche nur in Plättchen vorkommen. Außerdem beinhalten sie verschiedene Wachstumsfaktoren, Gerinnungsinhibitoren, Gerinnungsfaktoren, adhäsive Glykoproteine wie z.B. Fibrinogen und andere Proteine (Corash et al., 1984). Die elektronendichten Granula enthalten ADP, Ca^{2+} und Serotonin. Je mehr Serotonin enthalten ist, desto elektronendichter erscheinen sie (Meyers, 1985). Die Thrombozyten werden von einem offenen kanalikulären System durchzogen, das durch Einstülpungen der äußeren Membran entstanden ist. Seine tubulären Kanäle sind mit der Matrix der Plättchen verbunden und auf der Zelloberfläche können ihre Öffnungen sichtbar sein. Je nach Schnittrichtung erscheinen sie meist als Vesikel oder Tubuli (Jain, 1993). Im Inneren der Plättchen, ohne Verbindung zur Zelloberfläche, befindet sich das kleinere, dichte tubuläre System, welches aus dem endoplasmatischen Retikulum der Megakaryozyten hervorgegangen ist und als Ca^{2+} Reservoir dient (Meyers, 1985). Aktivierte Thrombozyten verändern ihre Scheibenform. Sie erscheinen länglicher und ihre Oberfläche wird sehr unregelmäßig, was unter anderem durch die

Granula verursacht wird, die abgegeben werden (Meyers, 1985). Auf der Oberfläche bilden sich Pseudopodien (Bessis, 1977).

1.4.3 Aufgabe der Thrombozyten

Thrombozyten sind entscheidend an der Blutgerinnung beteiligt. In einem intakten Gefäßsystem zirkulieren sie einzeln als scheibenförmige Zellfragmente am Rande des Blutstroms (Kraft et al., 2005). Kommt es zu einer Verletzung des Gefäßendothels, wird die Basalmembran bzw. werden die kollagenen Fasern des subendothelialen Bindegewebes der Gefäße freigelegt und die Thrombozyten lagern sich an diese Strukturen an. Während dieses Prozesses verändern die Plättchen ihre Gestalt. Sie bilden verzweigte Fortsätze aus, was durch eine geänderte Anordnung der Mikrotubuli und die Ausschüttung von Calcium ins Zytoplasma verursacht wird (Gentry, 1992). Die Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliale Strukturen erfolgt über den von-Willebrand-Faktor, der von den Endothelzellen synthetisiert und sezerniert wird (Mischke, 2003). Zusätzlich kommt es zu einem positiven Feedback-Mechanismus, unter anderem indem die Thrombozyten bei der Aggregation sekundäre Plättchenaktivatoren wie Thromboxan A, Adenosindiphosphat und plättchenaktivierenden Faktor aus ihren Granula freisetzen (Gentry, 1992). Durch das Aneinanderlegen und Verkleben mit weiteren Thrombozyten bildet sich ein Thrombozytenaggregat, welches zu einem temporären Verschluss der Gefäßläsion führt. Dieser Vorgang wird auch primäre Hämostase genannt (Mischke, 2003).

Zusätzlich führt die Endopeptidase Thrombin, welche durch Gewebefaktorfreisetzung im Rahmen einer Verletzung entsteht, zu einer Thrombozytenaktivierung und Freisetzung von Plättchenfaktoren. Eine weitere Wirkung von Thrombin ist die Bildung von Fibrin (Ruggeri, 1994). Der Plättchentrombus wird durch ein Netz aus Fibrin stabilisiert. Es umgibt die Thrombozytenaggregate und verbindet sie mit der Gefäßwand. Thrombin spaltet von Fibrinogenmolekülen die Fibrinopeptide A und B ab, wodurch Fibrinmonomere entstehen, die spontan zu Strängen und schließlich zu einem Netz polymerisieren (Mischke, 2003). Der Trombus verklebt die Wundfläche solange, bis junge Bindegewebszellen, die Fibroblasten, einsprossen und die Gefäßverletzung dauerhaft abdecken (Kraft et al., 2005).

Thrombozyten sind durch die Freisetzung vasoaktiver Substanzen auch an entzündlichen Prozessen beteiligt. Dazu gehören Serotonin und der plättchenaktivierende Faktor, die Produktion von Zytokinen wie z.B. Interleukin-I und ihre Interaktion mit polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) (Allegrezza-Giulietti et al., 1991).

1.5 Leukozyten

Leukozyten, die weißen Blutzellen, dienen der Abwehr von Fremdstoffen in der Blutbahn. Artfremde Substanzen, die in den Organismus eingedrungen sind, werden unspezifisch durch Phagozytose oder mit Hilfe der Zellen des lymphatischen Systems durch gezielte immunologische Abwehrreaktionen eliminiert (Liebich, 2004).

Leukozyten können in Granulozyten und Agranulozyten unterteilt werden. Zu den Agranulozyten zählt man die Lymphozyten und Monozyten. Die Granulozyten werden aufgrund der histologischen Anfärbbarkeit ihrer Granula in neutrophile, eosinophile und basophile Granula unterteilt (Klebanoff und Clark, 1978). Es lässt sich auch eine funktionelle Aufteilung in Phagozyten (neutrophile Granulozyten und Monozyten) und Zellen des immunologischen Abwehrsystems (Lymphozyten, eosinophile Granulozyten) vornehmen. Basophile Granulozyten nehmen eine Sonderstellung ein (Liebich, 2004). Granulozyten sind polymorphkernig, bewegen sich amöboid und können den Blutstrom aktiv durch die Gefäßwand verlassen (Diapedese). Sie nehmen somit auch im interstitiellen Bindegewebe unspezifische Abwehraufgaben wahr und spielen bei entzündlichen Prozessen eine entscheidende Rolle (Liebich, 2004).

Allgemein sind Leukozyten kernhaltige, kugelförmige Zellen (Sinowatz, 2000). Sie benutzen das Blutplasma als Transportmedium für den Weg von ihrer Bildungsstätte zum Ort der Wirkung. Somit zirkuliert im Blut nur ein kleiner Teil der im Körper vorhandenen weißen Blutzellen, der im Blutausschlag erfasst werden kann (Kraft et al., 2005). Der weitaus größere Teil der Zellen befindet sich in den lymphatischen Organen und im Bindegewebe. Die Gesamtleukozytenzahl der Katze wird mit 6000–11000 Zellen/ μL im ruhigen Zustand und bis 18000 Zellen/ μL im erregten Zustand angegeben (Kraft et al., 2005). Die Ermittlung des Referenzbereiches bei der Katze ist schwierig, da Katzen sehr stark auf äußere Beeinflussungen wie Aufregung bei der Blutentnahme reagieren. Dies ist bei der Beurteilung der Gesamtleukozytenzahl zu berücksichtigen. Außerdem spricht man bei der Katze, ebenso wie bei z.B. Menschen, Pferden und Hunden, von einem granulozytären Blutbild, da bei diesen Spezies die Granulozyten mehr als 50% der Leukozyten ausmachen. Im Gegensatz dazu weisen Wiederkäuer, Schweine, Nager und Hühner ein lymphozytäres Blutbild auf, bei dem die Lymphozyten überwiegen (Latimer, 1995).

1.5.1 Granulozyten und ihre Entwicklung

Im Rahmen der Granulopoese werden neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten

gebildet. Ihre Entwicklung beginnt zunächst wie bei allen Zellen des hämatopoetischen Systems mit der Teilung von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Verantwortliche hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind der Stammzellfaktor (SCF), der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), Interleukin-3 (IL-3) und Interleukin-6 (IL-6) (Metcalf, 1989). Es entstehen die Progenitoren CFU-G, CFU-Eo und CFU-Ba, die nach weiterer Teilung zu sogenannten Myeloblasten differenzieren. Diese haben einen Durchmesser von ca. 15 μm und stellen die gemeinsamen Vorläuferzellen aller Granulozyten dar. Sie haben einen runden, heterochromatinarmer Kern und ein gut ausgebildetes Zytoplasma mit zahlreichen Organellen, vor allem Ribosomen, Polyribosomen und ER. Das Zytoplasma erscheint daher stark basophil. Weiterhin kann zwischen einem Typ I und Typ II Myeloblast unterschieden werden. Während der Typ I keine Granula enthält, können im Zytoplasma von Typ II wenige membranbegrenzte azurophile Granula nachgewiesen werden (Jain, 1993). Die Myeloblasten differenzieren zu Promyelozyten, welche im Zytoplasma vermehrt azurophile Granula (Primärgranula) enthalten, die eine Größe von etwa 0,4 μm haben. Promyelozyten sind mit ca. 18–25 μm die größten Zellen der Granulozytopoese. Ihr Kern ist nierenförmig eingezogen, das Zytoplasma enthält viele Mitochondrien und andere Organellen (wie Ribosomen, Polyribosomen, ER) sowie mehr Granula als die Typ II Myeloblasten. Die azurophilen Primärgranula differenzieren innerhalb einer Woche zu spezifischen Granula, den sogenannten Sekundärgranula (Jain, 1993), welche eine Größe von etwa 0,3 μm haben. Ab diesem Stadium kann man die Differenzierung zu neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granula unterscheiden, und es entwickeln sich entsprechend neutrophile, eosinophile und basophile Myelozyten. Diese haben einen runden bis leicht eingebuchteten Kern, das Zytoplasma erscheint blau und enthält die spezifischen Granula der entsprechenden Zelllinie. Zu diesem Zeitpunkt und auch später sind lichtmikroskopisch keine azurophilen Granula mehr sichtbar. Die neutrophilen Myelozyten enthalten zahlreiche, kaum sichtbare, blasse Granula, die eosinophilen Myelozyten große, rötliche Granula, und die Granula der basophilen Myelozyten sind dunkel violett. Durch weitere Teilung entstehen Metamyelozyten. Diese haben einen eingebuchteten, nierenförmigen Kern. Teilweise ist er auch breit und gestreckt mit dicken Enden. Sie variieren in ihrer Größe, die Zusammensetzung des Zytoplasmas entspricht dem der Myelozyten (Gilmore et al., 1964). Nach einer letzten Teilung und einwöchigen Reifung entstehen die polymorphkernigen neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten (Liebich, 2004).

1.5.1.1 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten im Blut sind relativ groÙe Zellen mit einem Durchmesser von 10–15 µm (Calamai und Spitznagel, 1982), 10–14 µm (Liebich, 2004), 9–13 µm (Kraft et al., 2005). Bei Pferd, Hund und Katze bilden sie mit 50–70% den größten Anteil der Zellen des weiÙen Blutbildes (Liebich, 2004). Für die Katze werden Referenzbereiche von 55–65% (Liebich, 2004), bzw. 60–78% (segmentkernige) (Kraft et al., 2005) angegeben.

Im Knochenmark können die neutrophilen Granulozyten in zwei Kompartimente unterteilt werden. 10–30% gehören dem Proliferationskompartiment an, diese Zellen sind noch zur Teilung fähig. Dazu gehören Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten. Etwa 65–90% der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark (Metamyelozyten, stab- und segmentkernige Granulozyten) gehören zum Speicherkompartiment und sind nicht mehr teilungsfähig (Grindem, 1989). Die Aufenthaltsdauer in beiden Kompartimenten beträgt bei Hund und Katze jeweils etwa 2–3 Tage (Prasse et al., 1973). Ihr Übertritt in den Blutstrom wird über humorale Faktoren und den Bedarf im Gewebe geregelt. Die neutrophilen Granulozyten besitzen die Fähigkeit, sich vorübergehend an Gefäßwände anzuheften, bevor sie wieder in den Blutstrom zurückkehren oder in das Gewebe übertreten (Cartwright et al., 1964). So entsteht neben den Zellen, die frei im Blut zirkulieren, ein marginaler Zellpool, der bei der Katze etwa dreimal so groß ist (Prasse et al., 1973). Bei einer Erhöhung des Blutdrucks, z.B. durch Aufregung bei der Blutentnahme, steigt die Fließgeschwindigkeit des Blutstroms, die Neutrophilen lösen sich von der Wand und können im Blut nachgewiesen werden. Dieser Umstand ist bei der Beurteilung eines Leukogramms zu berücksichtigen (Hall, 1994). Die neutrophilen Granulozyten befinden sich durchschnittlich 6–10 Stunden im Blutstrom, bevor sie ins Gewebe einwandern, wo sie ihre eigentlichen Abwehrfunktionen als Phagozyten aufnehmen. Dabei werden sie von Chemokinen, die bei entzündlichen Prozessen freigesetzt werden, angelockt (Smith, 1983). Sie kehren nicht mehr in den Blutkreislauf zurück, ihre Überlebenszeit im Gewebe beträgt 2–3 Tage (Jain, 1993).

1.5.1.1.1 Entwicklung der neutrophilen Granulozyten

Auf die Entwicklung der neutrophilen Granulozyten wurde bereits im Kapitel 1.5.1 eingegangen. Erstmals lässt sich die Entwicklung der drei Zellreihen der Granulopoese vom Übergang der Promyelozyten zu Myelozyten erkennen, mit Bildung der Sekundärgranula. Über das Stadium der Myelozyten und Metamyelozyten entstehen zunächst stabkernige neutrophile Granulozyten, mit einem unregelmäßigen, meist gebogenen stab- und bandförmigen Zellkern. Sie sind die

unmittelbare Vorstufe der reifen, segmentkernigen Granulozyten (Jain, 1993).

1.5.1.1.2 *Morphologie der neutrophilen Granulozyten*

Jugendliche neutrophile Granulozyten haben einen nicht segmentierten, länglichen Kern und werden deshalb stabkernige neutrophile Granulozyten genannt. Reife, sogenannte segmentkernige neutrophile Granulozyten haben eine runde Gestalt und einen mehrfach gelappten/segmentierten Zellkern. Die Segmente sind über schmale Chromatinstege verbunden (Bertram, 1985).

Ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass neutrophile Granulozyten und ihre Vorläuferzellen mindestens zwei Typen von Granula enthalten, die azurophilen bzw. Primärgranula und die spezifischen bzw. Sekundärgranula. Bei der Katze konnte auch ein dritter Granulatyp nachgewiesen werden, der Peroxidase, saure Phosphatase und vicinale Glykole enthält (Fittschen et al., 1988b). Mit dem Elektronenmikroskop sind azurophile Granula auch in reifen Neutrophilen sichtbar, sie liegen mit den spezifischen Granula in einem Verhältnis von 1:2 vor. Lichtmikroskopisch sieht man die azurophilen Granula nur in den Typ II Myeloblasten und Promyelozyten, danach lassen sie sich aufgrund der Reduzierung von Glykosaminoglykanen nicht mehr genügend anfärben (Fittschen et al., 1988a). Die Primärgranula schließen unter anderem Myeloperoxidase, saure Phosphatasen, Lysozyme, saure hydrolytische Enzyme und andere Enzyme ein. Außerdem enthalten sie Polypeptide, welche eine mikrobielle Aktivität gegenüber Bakterien, Pilzen und bestimmte Viren aufweisen (Williams et al., 1990).

Die spezifischen Granula (Sekundärgranula) enthalten z.B. Laktoferrin, NADPH-Oxidase, Histaminase, Lysozyme sowie Laminin zur Anheftung der Granulozyten an das Endothel von Gefäßwänden, und andere Enzyme sowie antibakterielle Substanzen (Williams et al., 1990).

Auf ihrer Oberfläche haben die Granulozyten bestimmte Oberflächenrezeptoren, die Selektine, welche über Integrine und endotheliale Adhäsionsmoleküle den Kontakt zu Endothelzellen herstellen.

1.5.1.1.3 *Aufgabe der neutrophilen Granulozyten*

Die wichtigste Funktion der neutrophilen Granulozyten ist die Phagozytose und lysosomale Abtötung von Bakterien und anderen infektiösen Mikroorganismen, virusinfizierten Zellen und Tumorzellen, flüssigen oder zellulären Bestandteilen (Smith, 1983). Weiterhin wurde

nachgewiesen, dass sie das Ausmaß und die Dauer akuter entzündlicher Prozesse beeinflussen können (Jain, 1986). Außerdem können sie Gewebeschäden verursachen sowie zytotoxische Effekte auslösen, z.B. antikörpervermittelte parasitizide und tumorizide Aktivität (Smith, 1983). Durch physikalische oder chemische Reize, wie z.B. Entzündungsmediatoren (Leukotriene, IL-8, u.a.) bei einer lokalen Infektion, werden neutrophile Granulozyten aktiviert. Diese begeben sich entlang des Gradienten der Mediatoren zum Ort der Entzündung (Harvath, 1991). Durch die Aktivierung bestimmter Oberflächenrezeptoren, der Integrine, verändern die Neutrophilen ihr Zytoskelett, so dass eine Adhäsion an Endothelzellen und anschließende Migration möglich wird (Arnaout, 1990). So gelangen die neutrophilen Granulozyten in das interstitielle Bindegewebe. Dort bewegen sie sich wiederum mit Hilfe von Integrinen, welche an Proteine der extrazellulären Matrix binden können, zum Ort der Entzündung bzw. Infektion (Brown, 1997). Dort angekommen, werden die verursachenden Mikroorganismen von den Neutrophilen phagozytiert. Sie setzen den Inhalt ihrer Granula frei, NADPH Oxidase wird aktiviert, was wiederum zur Bildung toxischer Sauerstoffradikale führt (Bokoch, 1995). Die Phagozytose ist ein aktiver Prozess, bei dem die Partikel von den Pseudopodien der neutrophilen Granulozyten umflossen und in einer Vakuole in das Zellinnere aufgenommen werden. Dort verschmilzt die Membran des sogenannten Phagosoms mit der Membran der Granula im Zytoplasma, und es entstehen Phagolysosomen. Die Enzyme der Granula führen zur Verdauung der aufgenommenen Partikel. Zusätzlich kommt es durch die Phagozytose zum oxidativen Burst: durch Zunahme der aeroben und anaeroben Glykolyse und einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs entwickeln sich verschiedene reaktive Sauerstoffspezies (Sauerstoffradikale), wie Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale (OH). Diese wiederum sind toxisch und reagieren unter anderem mit Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Zellbestandteilen der Erreger (Klebanoff und Clark, 1978; Stickle, 1996).

Unter sauerstoffhaltigen, aber auch sauerstoffunabhängigen Bedingungen erfolgt die Beseitigung der aufgenommenen Mikroorganismen durch den Inhalt der Granula und im Zusammenspiel mit Enzymen der Zellmembran und des Zytoplasmas. Dazu gehören kationische Proteine und Enzyme, z.B. Defensine, Lysozyme, Hydrolasen, neutrale und saure Proteasen und Laktoferrin (Bertram, 1985). Durch die Entstehung des Phagolysosoms wird der Inhalt der Granula freigesetzt, phagozytierte Bakterien werden getötet und verdaut. Die primären bzw. azurophilen Granula enthalten beispielsweise Myeloperoxidase (MPO), welche während des oxidativen Bursts der Neutrophilen aus Wasserstoffperoxid und Chlorid- sowie Bromidanionen Chlor, Brom und Bromchlorid bildet. Unter physiologischen Bedingungen entstehen daraus sofort

Hypochlorid (HOCl) und Hypobromid (HOBr). Das reaktive HOCl reagiert mit einer Vielzahl oxidierbarer Biomoleküle, die ungesättigte Doppelbindungen, Thiole oder Stickstoffkomponenten enthalten. Die durch MPO gebildeten, halogenierten Produkte können somit z.B. Membranlipide oxidieren und haben somit eine antimikrobielle Wirkung (Arnhold et al., 2001). Durch seine Absorptionseigenschaften trägt MPO maßgeblich zur grünlich-gelben Farbe des Eiters bei (Jain, 1993).

Lysozyme sind sowohl in den azurophilen als auch in den spezifischen Granula enthalten. Diese Enzyme haben eine lytische Funktion und richten sich vor allem gegen gramnegative Bakterien (Bertram, 1985). Laktoferrin kommt vor allem in den spezifischen Granula vor und wirkt bakteriostatisch, indem es das Eisen bindet, welches die Bakterien für ihr Wachstum benötigen.

1.5.1.2 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten sind durchschnittlich 12–14 µm groß, und mit einem relativen Anteil von 2–10% an den Gesamtleukozyten treten sie bei den Haussäugetieren nur in relativ geringer Anzahl im Blut auf (Clinkenbeard und Meinkoth, 2000). Für die Katze werden Referenzbereiche von 0–6% (40–600/µL) (Kraft et al., 2005) bzw. 2–12% (0–1500/µL) (Jain, 1993) angegeben. Im Knochenmark gibt es nur einen sehr geringen Speicherpool (Mischke, 2003). Nach einer Reifungszeit im Knochenmark von 2–6 Tagen treten die Eosinophilen in den Blutstrom über und zirkulieren dort für ca. 6–12 Stunden, bevor sie die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern. Dort haben sie eine Lebensdauer von einigen Tagen (Clinkenbeard und Meinkoth, 2000). Ihr Abbau erfolgt über das mononukleäre Phagozytensystem, oder die Eosinophilen gehen durch Apoptose zugrunde. Besonders zahlreich treten sie in subepithelialen Strukturen von Haut, Atmungs-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt auf, also in Geweben von Organen, die häufig Eintrittspforten für körperfremde Substanzen sind. Bei Erkrankungen dieser Organe kommt es deshalb oft zu einer Gewebeeosinophilie. Diese kann von einer Bluteosinophilie begleitet werden. Aufgrund der kurzen Aufenthaltsdauer der Eosinophilen im Blut kann letztere jedoch, z.B. bei allergischen Reaktionen, bei denen die Eosinophilen eine wichtige Rolle spielen, fehlen (Mischke, 2003; Kraft et al., 2005).

1.5.1.2.1 Entwicklung der eosinophilen Granulozyten

Die Grundzüge der Entwicklung der eosinophilen Granulozyten wurden bereits in Kapitel 1.5.1

beschrieben. Hier sollen noch weitere Details ihrer Differenzierung besprochen werden. Erst mit der Entwicklung der Sekundärgranula, also mit dem Übergang der Promyelozyten zu Myelozyten, können die Eosinophilen morphologisch von den anderen Zellen der granulozytären Reihe unterschieden werden. An ihrer Reifung sind verschiedene Wachstumsfaktoren beteiligt, wie Interleukin-3 (IL-3), der Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) und Interleukin-5 (IL-5). Besonders IL-5 ist für die selektive Reifung der Eosinophilen verantwortlich und beeinflusst ihre Differenzierung, Proliferation und Reifung. Die erwähnten Zytokine IL-3, IL-5 und GM-CSF werden hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und Makrophagen produziert (Williams et al., 1990; Young et al., 1997). Die Entwicklung der Eosinophilen erfolgt hauptsächlich im Knochenmark, in geringem Umfang können sie aber auch in Thymus, Milz und Lymphknoten heranreifen (Till und McCulloch, 1961).

Promyelozyten und Myelozyten, die zu eosinophilen Granulozyten differenzieren, können auch zytochemisch durch den Nachweis von eosinophiler Peroxidase (EPO) identifiziert werden. Man findet das Enzym im rauen endoplasmatischen Retikulum, perinuklearen Zisternen, Golgi-Zisternen und den sekundären Granula. In reifen Eosinophilen lässt es sich nur noch in den Granula nachweisen (Dvorak et al., 1991).

1.5.1.2.2 Morphologie der eosinophilen Granulozyten

Der Zellkern der eosinophilen Granulozyten ist typischerweise zweig gelappt und hantelförmig. Ihre sekundären bzw. spezifischen Granula variieren tierartlich in ihrer Größe, Form und chemischen Zusammensetzung. Die Granula der Katze haben eine typisch längliche, stäbchenförmige Gestalt und können so zahlreich sein, dass sie teilweise den Zellkern verdecken (Schalm, 1965; Bainton, 1995). Die spezifischen Granula enthalten einige argininreiche Proteine, die dafür verantwortlich sind, dass sie sich mit sauren Farbstoffen wie Eosin rötlichbraun anfärben lassen (Walsh, 2001). Zu diesen Proteinen gehört zum Beispiel das zytotoxische und argininreiche major basic protein (MBP), welches mehr als 50% der Granula-Proteine ausmacht und im Kern der Granula (Kristalloid) lokalisiert ist. In der Matrix der Granula befinden sich weitere basische Proteine wie EPO, die eosinophile Peroxidase, der eine antibakterielle Funktion zugesprochen wird. Ebenfalls in der Matrix befindet sich das eosinophile kationische Protein (ECP), welches etwa 30% der Granula-Proteine ausmacht und eine membranschädigende Funktion hat (Bainton, 1995; Young, 2000).

Im Elektronenmikroskop kann man bei den Eosinophilen der Haussäugetiere kristalloide und

homogene Granula unterscheiden. Die kristalloiden Granula besitzen einen elektronendichten Kern, der bei der Katze lamellenartig erscheint und von einer homogenen Matrix umgeben ist (Jain, 1986). Im Gegensatz zu anderen Haussäugetieren, deren Eosinophile zusätzlich oder ausschließlich homogene Granula enthalten, sind die der Katze nach den Angaben von Jain (1993) ausschließlich kristalloid. Die Granula entstehen im Golgi-Komplex und haben eine lysosomale Funktion. Im Kern der Granula sind unter anderem kationische Proteine, Zink und Phospholipase C, in der Matrix Peroxidase, saure Phosphatase und hydrolytische Enzyme, im Zytoplasma alkalische Phosphatase und unspezifische Esterase enthalten (Dvorak et al., 1991; Jain, 1993).

Ebenfalls nur elektronenmikroskopisch sichtbar sind die spezifischen Mikrogranula (auch vesikulotubuläre Strukturen – VTS), die vom endoplasmatischen Retikulum abstammen. Sie besitzen eine doppelte Membran und sind rund, C-förmig oder hantelförmig (Dvorak et al., 1991). Außerdem enthalten die Eosinophilen zwei weitere Arten von Granula: die Primärgranula, die vor allem in frühen Entwicklungsstadien auftreten und sogenannte Charcot-Leyden-Kristalle enthalten (diese bestehen aus Lysophospholipase), und kleine, dichte Granula, die Arylsulfatase und andere Enzyme enthalten (Weller, 1994).

Außer den Granula sind im Zytoplasma Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, Golgi-Apparat und Lipidkörper enthalten (Presentey et al., 1980).

1.5.1.2.3 Aufgabe der eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Überempfindlichkeitsreaktionen, immunvermittelten Reaktionen und Entzündungen. Zudem wirken sie bei der Blutgerinnung und Fibrinolyse mit und sind zur Phagozytose befähigt (Mischke, 2003). Sie phagozytieren hauptsächlich Antigen-Antikörper-Komplexe, aber auch Mastzellgranula, Hefen, Bakterien und andere fremde Partikel. Ihre phagozytären und bakteriziden Fähigkeiten sind jedoch geringer ausgeprägt als die der neutrophilen Granulozyten (Jain, 1986; McEwen, 1992).

Die Eosinophilen sind amöboid beweglich und können aktiv den Blutstrom verlassen. Mittels Chemotaxis, also über die Wahrnehmung eines Stoffkonzentrationsgradienten im Gewebe, wird die Migration zu ihrem Ziel ausgelöst. Viele chemotaktisch wirksame Substanzen sind bekannt, ihre biologische Bedeutung ist jedoch erst zum Teil geklärt (McEwen, 1992).

An ihrem Ziel angelangt, wirken die Eosinophilen unter anderem bei Immunglobulin (Ig)-E-

vermittelten Immunreaktionen vom Soforttyp (Typ I) und zellvermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ (Typ IV) mit. Dabei geben sie den Inhalt ihrer Granula an Zielstrukturen außerhalb der Zelle ab, z.B. um parasitäre Würmer im Gewebe abzutöten. Die unter anderem aus den Granula freigesetzte Histaminase und Arylsulfatase können Histamin inaktivieren. Man nimmt daher an, dass die Effekte von Histamin, welches von IgE-sensibilisierten Mastzellen in Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp (Typ I) freigesetzt wird, dadurch kontrolliert werden (Mischke, 2003). Eosinophile Granulozyten tragen weiterhin zur Hemmung von Entzündungsreaktionen bei, indem sie andere Entzündungsmediatoren wie Serotonin und Bradykinin binden, welche von basophilen Granulozyten und Mastzellen abgegeben werden. Darüber hinaus können sie auch deren Degranulation verhindern (Young, 2000). Die Beteiligung von Eosinophilen an chronisch entzündlichen Prozessen ist häufig mit einer starken Gewebeschädigung verbunden (Williams et al., 1990; Mischke, 2003). Dies ist vor allem für allergische Erkrankungen wie Asthma nachgewiesen (Weller et al., 1996). In der Lunge und anderen Geweben verursachen sie durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren langfristig Schäden. Besonders MBP, das major basic protein aus den Granula, ist toxisch für das Epithel des Atmungstraktes und kann bronchiale Hyperreaktionen verursachen (McEwen, 1992). Das verstärkte Vorkommen von eosinophilen Granulozyten bei allergischen Reaktionen wird vor allem durch die Freisetzung von IL-5 und GM-CSF durch CD4⁺-T-Lymphozyten verursacht. Diese Zytokine bewirken eine vermehrte Produktion von Eosinophilen (Young, 2000).

Bei der Immunabwehr von Parasitosen interagieren die eosinophilen Granulozyten mit T- und B-Lymphozyten sowie Mastzellen (Mischke, 2003). Da die zu bekämpfenden Organismen, insbesondere Helminthen, in der Regel zu groß sind um phagozytiert werden zu können, werden sie über andere Mechanismen beseitigt. In Gegenwart von Antikörpern und/oder Komplement wird die parasitizide Funktion der Eosinophilen verstärkt (Jain, 1993). Aktivierte T-Lymphozyten führen zu einer vermehrten Bildung von eosinophilen Granulozyten. Aktivierte B-Lymphozyten produzieren Immunglobulin E (IgE), welches spezifisch an Mastzellen im Gewebe bindet. Nach Bindung von IgE an die Zellmembran der Mastzellen setzen diese Mediatoren frei, welche die eosinophilen Granulozyten anlocken (Butterworth und David, 1981). Die aktivierten Eosinophilen setzen den Inhalt ihrer Granula frei, und die darin enthaltenen Toxine und hydrolytischen Enzyme führen zu einer Schädigung des Parasiten (Jain, 1993). Spezifische IgG-Antikörper bilden Antigen-Antikörper-Komplexe mit eingedrungenen Parasiten und führen ebenfalls zu einer Aktivierung der Eosinophilen. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit von

Komplement verstärkt (Jain, 1986).

1.5.1.3 Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten treten mit einem Anteil von 0,5% der zirkulierenden Leukozyten bei Haussäugetieren sehr selten auf. Im Differenzialblutbild der Katze sind sie noch seltener zu finden, es werden Referenzwerte von 0–100/ μL (Kraft et al., 2005) angegeben, meist ist jedoch nur vermerkt, dass sie „selten“ vorkommen (Schalm 1965; Jain, 1993). Ihr durchschnittlicher Durchmesser beträgt 9–12 μm (Liebich, 2003) bzw. nach anderen Angaben 8–12 μm (Scarborough, 1930). Ihre Halbwertszeit im Blutstrom beträgt etwa sechs Stunden. Einige Studien weisen allerdings darauf hin, dass sie im Gewebe bis zu zwei Wochen überleben können (Scott und Stockham, 2000). Basophile Granulozyten werden häufig im Zusammenhang mit Gewebemastzellen beschrieben, da beide Zellarten die einzig bekannten Säugetierzellen sind, die Histamin synthetisieren können, und beide verfügen über Rezeptoren die mit hoher Affinität IgE binden (Marone et al., 1997).

1.5.1.3.1 Entwicklung der basophilen Granulozyten

Auf die Entwicklung der basophilen Granulozyten im Knochenmark wurde bereits im Kapitel 1.5.1 eingegangen. Erstmals von den anderen Zellen der granulozytären Reihe zu unterscheiden sind die basophilen Myelozyten, deren Sekundärgranula sich typisch basophil anfärben lassen. Über Metamyelozyten und stabkernige basophile Granulozyten entstehen die reifen basophilen Granulozyten, die in den Blutstrom abgegeben werden (Dvorak und Monahan, 1985). Dieser Prozess dauert etwa 2,5 Tage (Scott und Stockham, 2000). Das Wachstum und die Differenzierung von Basophilen aus den Progenitoren werden wahrscheinlich hauptsächlich durch das Interleukin 3 (IL-3) gesteuert, an dem Prozess sind aber auch der Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) und Interleukin 5 (IL-5) beteiligt (Enerbäck, 1997). Aktivierte T-Lymphozyten, sowie aktivierte eosinophile Granulozyten können durch die Ausschüttung von IL-3, IL-5 und GM-CSF zu einer vermehrten Bildung von basophilen Granulozyten führen (Jain, 1993).

1.5.1.3.2 *Morphologie der basophilen Granulozyten*

Bei den meisten Säugetierspezies ist der Kern der Basophilen nur mäßig gelappt. Besonders bei Hund und Katze ist der Kern eher lang und bandförmig und erscheint oft gedreht oder gefaltet, mit wenigen Segmenten. Der Kern wird häufig, vor allem bei der Katze, durch die zahlreichen Granula im Zytoplasma verdeckt. Die Granula sind rund bis oval und können in ihrer Größe und Anzahl variieren (Bessis, 1977; Scott und Stockham, 2000). In der Wright-Färbung erscheinen die Granula normalerweise rötlich-violett, die der Katze färben sich jedoch orange-grau und heben sich von dem grünlich gefärbten Zytoplasma nicht allzu deutlich ab (Jain, 1993). Auch in der Romanowsky-Färbung sind die Granula blassgrau bis lavendel-farbend. Aufgrund der blassen Färbung und manchmal sehr dichten Lagerung der Granula können feline Basophile mit Monozyten oder Neutrophilen verwechselt werden (Scott und Stockham, 2000). Gelegentlich treten dunkellila, noch nicht ausgereifte Granula auf (Clinkenbeard und Meinkoth, 2000).

Elektronenmikroskopisch sind die Basophilen nicht leicht von den anderen Granulozyten zu unterscheiden. Schon ihre Fixation ist schwierig, da ihre Granula wasserlöslich sind und somit bei der Fixierung eine deutliche Veränderung ihrer Ultrastruktur verursacht werden kann (Dvorak, 1998). Im Allgemeinen erscheinen die Basophilen rund, mit einer gefalteten Oberfläche und Mikrovilli. Im Zytoplasma befinden sich neben den basophilen Granula außerdem Ribosomen, Polyribosomen und Glykogengranula. In reifen Basophilen treten nur wenige Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplexe auf (Steffens, 2000). Die Granula der reifen Basophilen erscheinen in kleinen Vergrößerungen homogen, in stärkeren Vergrößerungen sind in der Matrix feine Granula zu erkennen, die etwa einen Durchmesser von 15 nm haben, sowie Fibrillen oder Lamellen (Terry et al., 1969). Sie beinhalten unter anderem Histamin, Heparin, Leukotriene, Plättchen-aktivierenden Faktor und Thromboxan A₂ (Mischke, 2003).

1.5.1.3.3 *Aufgabe der basophilen Granulozyten*

Die Granula der basophilen Granulozyten enthalten wichtige Mediatoren allergischer und entzündlicher Reaktionen, wie Histamin, Heparin, den chemotaktischen Faktor für Eosinophile (ECF-A, eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis), Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF), Thromboxan A₂ und Leukotriene (Mischke, 2003). Histamin führt zur Dilatation kleiner Gefäße und erhöhter Gefäßpermeabilität sowie zur Kontraktion glatter Muskulatur, vor allem in den Bronchien (Bronchokonstriktion) (Costa et al., 1997). Eosinophile Granulozyten werden

chemotaktisch durch das abgegebene Histamin angelockt, welches sie inaktivieren (Jain, 1986). Durch die Ausschüttung von Heparin haben die Basophilen einen antikoagulatorischen Effekt, über die Aktivierung der Lipoprotein-Lipase wirkt Heparin auch lipolytisch. Aktivierte basophile Granulozyten synthetisieren sekundäre Wirkstoffe, z.B. Leukotrien C₄, welches zu erhöhter Gefäßpermeabilität und Kontraktion der glatten Muskulatur führt, oder IL-4, ein Zytokin, das Eosinophile anlockt (Marone et al., 1997; Costa et al., 1997).

Basophile Granulozyten sind an IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp (Typ I) durch die plötzliche Freisetzung ihrer Mediatoren beteiligt (Scott und Stockham, 2000). Sie sind außerdem dazu in der Lage, nach der Degranulation ihre Granula neu zu synthetisieren (Dvorak, 1998).

Im Rahmen allergischer Prozesse, deren erste klinische Anzeichen vor allem auf die Aktivität von Mastzellen zurückzuführen sind, werden basophile Granulozyten und andere Leukozyten aktiviert, die auch Stunden oder Tage später durch die verzögerte Lyse ihrer Granulozyten zu Spätphasereaktionen führen können (Costa et al., 1997).

Für den Menschen wurde auch eine Beteiligung von Basophilen bei viralen und bakteriellen Infektionen sowie chronischen und fibrotischen Funktionsstörungen verschiedener Organe nachgewiesen (Marone et al., 1997). Eine weitere Rolle spielen sie auch bei der Bekämpfung von Parasitosen, ihre Bedeutung dabei scheint aber von dem Parasiten, der betroffenen Spezies und dem Ort der Infektion abhängig zu sein (Costa et al., 1997).

1.5.2 Monozyten

Monozyten und Makrophagen, einschließlich deren Vorläuferzellen im Knochenmark, bilden zusammen das mononukleäre Phagozytensystem (MPS). Im Knochenmark gereifte Monozyten zirkulieren zunächst ein bis zwei Tage im Blutkreislauf, bevor sie zufällig oder durch chemotaktische Reize bei pathologischen Prozessen angelockt, in verschiedene Gewebe einwandern und sich dort unter dem Einfluss spezieller Gewebefaktoren zu ortsständigen oder beweglichen, gewebetypischen Makrophagen differenzieren (Jain, 1986). Diese kehren nicht mehr in den Blutkreislauf zurück, ihre Lebenszeit im Gewebe kann mehrere Monate betragen. Modifizierte Makrophagen findet man in nahezu allen Geweben, wie z.B. die Kupfer-Sternzellen in der Leber, Alveolarmakrophagen in der Lunge, Histozyten im Bindegewebe oder Mikrogliazellen im Nervensystem. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Phagozytose und Verdauung von Zellresten und Mikroorganismen, der Sekretion von Zytokinen und Entzündungsmediatoren,

und der Antigenpräsentation für Lymphozyten zur Auslösung einer Immunantwort (Bienzle, 2000; Mischke, 2003). Monozyten sind mit durchschnittlich 12–20 µm die größten Zellen im peripheren Blutkreislauf (Liebich, 2004). Für die Katze werden in der Literatur Referenzwerte von 0–850/µL (Jain, 1986) bzw. 40–500/µL (Kraft et al., 2005) angegeben.

1.5.2.1 Entwicklung der Monozyten

Die Monozyten entstehen wie alle Blutzellen im Knochenmark aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle. Unter dem Einfluss entsprechender hämatopoetischer Wachstumsfaktoren entstehen Vorläuferzellen der verschiedenen Zellreihen. Der Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) und Interleukin-3 (IL-3) sind hauptsächlich dafür verantwortlich, dass bipotente Vorläuferzellen (die Granulozyten-Makrophagen-koloniebildende Einheit [CFU-GM, colony-forming unit granulocyte macrophage]) entstehen. Aus ihnen können sich zunächst noch neutrophile Granulozyten und Monozyten entwickeln. Die weitere Differenzierung hängt wiederum von den beteiligten Wachstumsfaktoren ab. Unter dem zusätzlichen Einfluss des Makrophagen-koloniestimulierenden Faktors (M-CSF), der unter anderem von Fibroblasten, Endothelzellen und Lymphozyten produziert wird, entstehen nun unipotente Vorläuferzellen der Makrophagen, CFU-M (colony-forming unit monocyte) (Metcalf, 1989 und 1991). Durch weitere Zellteilung entwickeln sich Monoblasten, die frühesten, lichtmikroskopisch zu unterscheidenden Vorläuferzellen der Monozytopoese. Sie ähneln den Myeloblasten (siehe Kapitel 1.5.1), haben jedoch einen leicht eingekerbten, runden Kern, und das Kernchromatin kann getüpfelt erscheinen. Nach einer weiteren Teilung der Monoblasten entstehen Promonozyten. Ihr Kern ist noch unregelmäßiger und neigt während der weiteren Reifung dazu, vermehrt einzukerben oder länger zu werden. Es ist viel Zytoplasma zu erkennen, welches sich hell-basophil anfärbt. Nach einer ein- oder zweimaligen Teilung gehen aus den Promonozyten letztlich die Monozyten hervor (Jain, 1993). Im Knochenmark gibt es für Makrophagen keinen Speicherpool vergleichbar mit dem der Granulozyten. Die reifen Zellen gelangen also bald in den Blutkreislauf, den sie nach etwa 1–2 Tagen verlassen und ins Gewebe übertreten. Dort differenzieren die Monozyten unter dem Einfluss spezifischer Gewebefaktoren zu Makrophagen (Bienzle, 2000).

1.5.2.2 Morphologie der Monozyten

Charakteristisch für die Monozyten ist der vielgestaltige Zellkern. In der Regel ist er relativ groß, hat eine unregelmäßige Kontur, ist bohnenförmig, oval oder leicht gelappt und kann gefaltet erscheinen. Meist liegt er exzentrisch in der Zelle. Das Kernchromatin ist netzförmig und kann an manchen Stellen verdichtet sein. Es ist ein breites, graublau gefärbtes Zytoplasma sichtbar, das durch feine Vakuolisierung schaumig erscheint. Feine, azurophile Granula können lichtmikroskopisch nicht dargestellt werden (Jain, 1993). Häufig treten im Zytoplasma auch große, gut sichtbare Vakuolen auf (Bain, 1995). Im Elektronenmikroskop ist eine unregelmäßige, mit vielen Ausläufern versehene Oberfläche zu erkennen. Die Monozyten enthalten sehr viel weniger und kleinere lysosomale Granula als die neutrophilen Granulozyten und viele Mitochondrien. Die Granula entstehen aus dem Golgi-Apparat und reagieren positiv auf saure Phosphatase und Arylsulfatase. Im Zytoplasma der Monozyten sind nichtspezifische Esterasen enthalten, durch die sie sich sicher von neutrophilen Granulozyten bei Hunden, Katzen, Rindern und Schafen unterscheiden lassen (Jain, 1986). Im Gegensatz zu anderen Spezies enthalten die Monozyten der Katze keine alkalische Phosphatase, Glykogen oder Peroxidase (Bienzle, 2000). Das raue endoplasmatische Retikulum und Polyribosomen im Zytoplasma sind für dessen Basophilie verantwortlich.

1.5.2.3 Aufgabe der Monozyten

Die Hauptfunktion der Monozyten und auch der Makrophagen ist neben der Antigenpräsentation die Phagozytose, sowohl von körpereigenen, toten Zellen als auch von Fremdpartikeln wie Mikroorganismen. Phagozytierte Partikel werden intrazellulär durch die in den Lysosomen enthaltenen Substanzen zerstört (Mischke, 2003). Die Zellen des MPS phagozytieren vor allem Pathogene, die nicht effektiv von neutrophilen Granulozyten bekämpft werden können. Dazu gehören besonders intrazelluläre Organismen und solche, die granulomatöse Entzündungen verursachen, wie z.B. Pilze, Protozoen, Viren, Listerien und Brucellen. Die Phagozytose wird durch Opsonine wie Antikörper oder Komplementfaktoren unterstützt, indem das Opsonin als Brücke zwischen dem Mikroorganismus und dem Phagozyten fungiert und an dessen entsprechenden Oberflächenrezeptor bindet. Die aufgenommenen Organismen werden ähnlich wie bei den neutrophilen Granulozyten über sauerstoffabhängige und -unabhängige Mechanismen zerstört. Daran können Sauerstoffmetaboliten, Peroxidase, Lysozyme und proteolytische Enzyme beteiligt sein (Jain, 1986; Lehrer und Ganz, 1995). Nach erfolgter

Phagozytose geht ein Monozyt nicht unbedingt zugrunde. Manche Organismen haben Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen in der Zelle zu überleben. Toxoplasmen beispielsweise können das toxische Wasserstoffperoxid durch eigene Katalase und Glutathionperoxidase in unschädliches Wasser umwandeln (Lin und Bowman, 1992). Andere Organismen wiederum können die Bildung der Phagolysosomen verhindern.

Da die Makrophagen aus den Monozyten hervorgehen, können ihre Funktionen indirekt auch den Monozyten zugesprochen werden. Makrophagen sezernieren im Gewebe viele biologisch aktive Substanzen, wie z.B. IL-1, IL-6, Tumornekrosefaktor, Komplementkomponenten, proteolytische Enzyme und Prostaglandine. Über Rezeptoren für Immunglobulin und Komplement können sie Antikörper und/oder komplementbeladene Erythrozyten und Thrombozyten phagozytieren (Mischke, 2003).

Eine gewisse natürliche Resistenz von adulten Katzen gegenüber Virusinfektionen wird der Funktion der Makrophagen zugeschrieben. Man fand heraus, dass Makrophagen von Katzenwelpen fünfmal anfälliger für Infektionen mit dem feline Leukämievirus (FeLV) sind als die von adulten Tieren (Jain, 1993).

1.5.3 Lymphozyten

Der größte Teil der Lymphozyten ist in den lymphatischen Organen ansässig, und nur ein geringer Teil, etwa 2%, zirkuliert im Blut. Zu den primären Organen des lymphatischen Systems, die an Bildung und Entwicklung von Lymphozyten beteiligt sind, gehören Knochenmark und Thymus. Zu den sekundären Organen, in denen die Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten zu Effektorzellen stattfindet, zählen Lymphknoten, Milz und die in Schleimhäuten ansässigen lymphatischen Zellen. Sie sind durch die Blut- und Lymphbahn miteinander verbunden. Lymphozyten werden nach ihrer Funktion in mehrere Hauptgruppen unterteilt. Man unterscheidet T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Die T-Lymphozyten entstehen aus Vorläuferzellen, die erst im Thymus (daher T-Lymphozyten) zu immunkompetenten Zellen geprägt werden. Sie produzieren Lymphokine, die zytotoxische Eigenschaften besitzen. Ihre Immunantwort ist eine verzögerte, zellvermittelte Reaktion. B-Lymphozyten entstehen im Knochenmark, sie enthalten membrangebundene Immunglobuline und sind Träger der humoralen Immunantwort (Kraft et al., 1995). Abgeleitet wird ihr Name von der Bursa Fabricii der Vögel, wo sie ihre Immunkompetenz erlangen. Die natürlichen Killerzellen entwickeln sich ebenfalls aus lymphoiden Stammzellen, über ihre weitere

Differenzierung und Reifung ist allerdings nichts bekannt (Liebich, 2004). Lichtmikroskopisch können die Zellen nicht voneinander unterschieden werden. Das Verhältnis B- zu T-Lymphozyten beträgt 1:5 (Kraft et al., 1995). Bei der Katze sind etwa 30–35% der Leukozyten des Blutes Lymphozyten. Bei anderen Haussäugetieren, wie z.B. Rindern, Schafen oder Ziegen, ist der Anteil am weißen Blutbild mit 50–70% sehr viel höher, so dass man bei diesen Tieren von einem lymphozytären, bei der Katze dagegen von einem granulozytären Blutbild spricht (Liebich, 2004).

1.5.3.1 Entwicklung der Lymphozyten

Die Lymphozyten gehen aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks hervor. Es differenzieren sich Vorläuferzellen, die bereits eine Determination zu späteren T- oder B-Lymphozyten auf ihrer Zelloberfläche tragen. Durch mitotische Teilung dieser Zellen entsteht ein großes Lymphozytenreservoir, aus dem sich noch unreife, mittelgroße und kleine Vorläuferzellen entwickeln. In diesem Übergangsstadium sind die Zellen noch kurzlebig und funktionell unreif (Chung et al., 2003). Solche unreifen T-Lymphozyten gelangen über den Blutkreislauf in den Thymus, wo sie zu immunkompetenten Zellen heranreifen. Diese erreichen wiederum über den Blutkreislauf die sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz, Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe), welche sie besiedeln. Die Vorgänge im Thymus sind sehr komplex und beinhalten das Zusammenspiel zwischen den T-Lymphozyten und verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen. Eine wichtige Rolle spielt dabei der T-Zell-Rezeptor (TCR, T cell receptor), welcher den T-Lymphozyten ihre Antigen-spezifität verleiht. Im Thymus findet über diesen Rezeptor eine positive bzw. negative Selektion statt. Es wird geprüft, ob die T-Zell-Rezeptoren einer T-Zelle nur eine geringe Affinität zu körpereigenen MHC-Proteinen haben (positive Selektion), oder ob sie sehr stark mit körpereigenen Strukturen reagieren (negative Selektion). Ist letzteres der Fall, werden diese Lymphozyten durch Apoptose ausgesondert (Wilson, 1991). Die funktionsfähigen T-Lymphozyten verlassen den Thymus und gelangen über den Blutstrom in die sekundären lymphatischen Organe. Für die Aktivierung der noch naiven T-Lymphozyten ist die Präsentation des Antigens über andere Zellen notwendig. Dazu zählen dendritische Zellen sowie Makrophagen und B-Lymphozyten (Banchereau und Steinman, 1998). Diese Zellen nehmen exogene Antigene wie Mikroorganismen oder Allergene auf, bauen diese enzymatisch ab und präsentieren die entstandenen Peptidbruchstücke über sogenannte MHC-Moleküle (major

histocompatibility complex) auf ihrer Oberfläche. Über ihren TCR erkennen die T-Lymphozyten die Peptidfragmente, treten über verschiedene Oberflächenrezeptoren mit den antigenpräsentierenden Zellen in Interaktion, und es kommt zur klonalen Expansion, bei der eine große Zahl identischer Lymphozyten gebildet wird. Diese Lymphozyten differenzieren letztendlich entweder zu Effektorzellen (T-Helferzellen oder zytotoxische T-Zellen) oder zu langlebigen Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen sofort zur Verfügung stehen (Kay, 1991).

B-Lymphozyten reifen zunächst im Knochenmark heran. Daran sind vor allem Stromazellen beteiligt, die entsprechende Wachstumsfaktoren wie Interleukin-7 (IL-7) bilden (Jain, 1993). Ebenfalls im noch unreifen Übergangsstadium treten sie in den Blutstrom über und gelangen so zu Milz und Lymphknoten, wo sie sich zu reifen B-Zellen entwickeln. Bei manchen Spezies (Schaf, Rind, Kaninchen) sind auch die lymphoiden Organe des Darmes, das sogenannte GALT (gut associated lymphoid tissues), an der Reifung der B-Lymphozyten beteiligt (LeBien und Tedder, 2008). Von entscheidender Bedeutung bei der B-Zell-Entwicklung ist die Bildung eines funktionierenden B-Zell-Rezeptors, die membrangebundene Form des Antikörpers. Nur mit diesem Antigenrezeptor können die reifen B-Lymphozyten später fremde Antigene erkennen und entsprechende Antikörper bilden (LeBien und Tedder, 2008). In den lymphatischen Geweben kommt es durch direkten Antigenkontakt zur klonalen Expansion und zur Aktivierung und Differenzierung zu Effektorzellen, im Fall der B-Lymphozyten zu Plasmazellen. T-Helfer-2-Zellen, eine Subpopulation der CD4⁺-T-Helferzellen, stimulieren zusätzlich die Differenzierung und Sekretion von Antikörpern, unter anderem durch die Ausschüttung der Zytokine IL-4 und IL-13. Plasmazellen produzieren große Mengen an spezifischen Antikörpern, im Rahmen der primären Immunantwort zunächst Immunglobulin M (IgM). Im weiteren Verlauf der Differenzierung, vor allem nach wiederholtem Antigenkontakt und unter dem Einfluss verschiedener Zytokine, erfolgt ein Immunglobulin-Klassenwechsel, und die B-Zellen produzieren hauptsächlich IgG oder einen anderen Isotypen (Sekundärantwort). Die Affinität zum Antigen ist bei IgG im Vergleich zu IgM viel höher (McLennan et al., 1997). Neben der Differenzierung zu den Plasmazellen kommt es ebenso wie bei den T-Lymphozyten zur Bildung langlebiger Gedächtniszellen.

So wie im Thymus finden auch im Knochenmark Selektionsvorgänge statt, und nur etwa 5–10% der Zellen werden als reife Lymphozyten ins Blut abgegeben. Bei dieser sogenannten negativen Selektion werden Lymphozyten, die zu stark mit körpereigenen Strukturen reagieren, durch Apoptose ausgesondert (Day, 2000).

1.5.3.2 Morphologie der Lymphozyten

Die T- und B-Lymphozyten sind kugelförmige Zellen, die licht- oder elektronenmikroskopisch nicht voneinander unterschieden werden können. Nur mit Hilfe immunhistochemischer Methoden können unterschiedliche, spezifische Oberflächenmoleküle dargestellt werden (Wilson, 1991). Nach lichtmikroskopischen Kriterien können kleine (5–10 µm), mittlere (10–18 µm) und große Lymphozyten (bis 25 µm) bei den Haussäugetieren unterschieden werden (Liebich, 2004). Die kleinen Lymphozyten der Katze haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 4–7 µm, und sind am häufigsten im zirkulierenden Blut anzutreffen. Große Lymphozyten der Katze sind 7–12 µm groß (Wilkins, 1974). Die Kerne der Lymphozyten bei Katzen sind in der Regel rund, manchmal auch leicht eingedellt, das Kernchromatin erscheint dicht, grobschollig und ist stark anfärbbar. Meist ist nur ein schmaler Zytoplasmasaum sichtbar, bei größeren Lymphozyten kann er auch etwas breiter sein. Manchmal sind im Zytoplasma kleine azurophile Granula sichtbar (Schalm, 1963). Darüber hinaus ist nur eine geringe Anzahl an Zellorganellen vorhanden. Ribosomen, Polyribosomen und das raue endoplasmatische Retikulum verursachen die basophile Anfärbbarkeit. Das Zytoplasma aktivierter Lymphozyten, die Proteine oder Immunglobuline produzieren, färbt sich dunkler an als das Zytoplasma funktionell inaktiver Zellen.

Lymphozyten im Blut, die einen weiten Zytoplasmasaum und zahlreiche größere Azurgranula enthalten (sogenannte large granular lymphocytes, LGL), sind meist natürliche Killerzellen. Diese sind Zellen der lymphozytären Reihe, die weder T- noch B-Zellmarker auf ihrer Oberfläche exprimieren (Jain, 1993).

Im Elektronenmikroskop werden kurze Mikrovilli auf der Oberfläche der Lymphozyten sichtbar. Kleine Lymphozyten haben ein hohes Kern:Zytoplasma-Verhältnis, das Zytoplasma erscheint als dünnes Band um den Zellkern und enthält hauptsächlich freie Ribosomen. Andere Organellen sind kaum vorhanden. Etwa 10% der kleinen Lymphozyten enthalten wenige kleine, azurophile Granula. Die mittleren Lymphozyten enthalten mehr freie Ribosomen, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum, auch ein kleiner Golgi-Apparat ist in der Regel sichtbar. Große Lymphozyten finden sich hauptsächlich in Lymphknoten, den Peyerschen Platten und der Milz, im Blut sind sie normalerweise nicht vorhanden. Ihr Zellkern ist unregelmäßiger geformt, enthält viel Euchromatin, welches von einem schmalen Heterochromatinsaum umgeben ist. Der Zytoplasmasaum ist breiter als bei den anderen Zellen, es enthält viel freie Ribosomen, Polyribosomen, endoplasmatisches Retikulum und wenige Mitochondrien. Typisch ist das Fehlen eines Golgi-Apparates (Steffens, 2000).

Mittels immunologischer Methoden können T- und B-Lymphozyten unterschieden werden. T-Lymphozyten zeichnen sich durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf ihrer Oberfläche aus, der für die Antigenerkennung verantwortlich ist. Andere Oberflächenmoleküle, die nach Antigenbindung Signale ins Zellinnere leiten, bilden den sogenannten CD3-Komplex. Zwei weitere Oberflächenmoleküle lassen eine weitere Unterteilung der T-Lymphozyten in zwei Subpopulationen zu: CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (CD = cluster of differentiation) (Wilson, 1991). Sie unterscheiden sich in ihrer Funktion, worauf im nächsten Kapitel eingegangen wird. Beim Menschen wie bei der Katze sind zwei Drittel der T-Lymphozyten CD4⁺ und ein Drittel CD8⁺ T-Lymphozyten (Jain, 1993). Wie bei AIDS Erkrankungen des Menschen sind bei Infektionen von Katzen mit FIV und auch FeLV die Zahl der CD4⁺ T-Zellen reduziert, die der CD8⁺ T-Zellen erhöht (Hoffmann-Fezer et al., 1996).

B-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den B-Zell-Rezeptor. Dieser setzt sich zusammen aus einem membranständigen Immunglobulin, das mit Immunglobulin α und Immunglobulin β (CD79) assoziiert ist. Jede B-Zelle hat einen anderen B-Zell-Rezeptor mit individueller Spezifität. Auch die T-Zell-Rezeptoren verfügen über einen variablen Teil, der ihnen ihre individuelle Antigenspezifität verleiht. Diese Vielfalt wird durch die genetische Rekombination von Gensegmenten für die Rezeptoren erreicht (Day, 2000).

Auf der Oberfläche der Lymphozyten befinden sich noch eine Reihe anderer CD-Moleküle in unterschiedlicher Anzahl und Zusammensetzung, die sich zum Teil auch auf anderen Zellen nachweisen lassen. Die oben erwähnten Moleküle übernehmen jedoch bei der Immunantwort eine wichtige Rolle im Rahmen der Antigenerkennung, Zellaktivierung und Proliferation. Ebenso sind sie hilfreich zur Unterscheidung der verschiedenen Lymphozyten-Gruppen (Jain, 1993).

Ein kleiner Teil der peripheren Lymphozyten trägt den CD3-Komplex, exprimiert aber weder CD4⁺ noch CD8⁺ Moleküle auf der Oberfläche. Dabei handelt es sich um die natürlichen Killerzellen (von Boehmer, 1988).

1.5.3.3 Aufgabe der Lymphozyten

Die Lymphozyten sind Träger der erworbenen Immunantwort, wobei die T-Lymphozyten hauptsächlich für die zelluläre und die B-Lymphozyten für die humorale Immunreaktion verantwortlich sind. Sie verfügen über Rezeptoren, mit denen sie Antigene erkennen. Da jeder Lymphozyt eine eigene Antigenspezifität aufweist, somit die Frequenz von Lymphozyten, die

für ein definiertes Antigen spezifisch sind, sehr gering ist, erfolgt der Antigenkontakt und somit die Lymphozytenaktivierung in den lymphatischen Organen. Dort ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass ein Lymphozyt auf das passende Antigen trifft (Kaspers und Göbel, 2009).

T-Lymphozyten werden durch Antigenkontakt über ihre T-Zell-Rezeptoren aktiviert. Weitere Oberflächenmoleküle bestimmen ihre Zugehörigkeit zu Subpopulationen der T-Lymphozyten, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. $CD8^+$ T-Lymphozyten wirken funktionell als zytotoxische Zellen. Ihre Zielzellen, in der Regel virusinfizierte oder neoplastische Zellen, präsentieren das Antigen über MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. MHC-I-Moleküle kommen auf den meisten kernhaltigen Zellen des Organismus vor (von Boehmer, 1988). Nach Antigenerkennung und Aktivierung werden die Zellen durch Lyse des Plasmalemmes unter Abgabe von Perforin, lytischer Enzyme und Zytokinen durch die $CD8^+$ T-Lymphozyten zerstört. Auch die Apoptose der Zielzelle wird durch bestimmte Interaktionen induziert (Day, 2000). Durch die gleichzeitig ablaufende klonale Expansion entstehen viele identische Lymphozyten, die das lymphatische Gewebe verlassen und in das Infektionsgebiet einwandern, um dort direkt viral infizierte Zellen zu zerstören. Untersuchungen ergaben, dass Virus-spezifische zytotoxische T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von gegen FeLV geimpften Katzen, oder Katzen die natürlichen FeLV Kontakt hatten, spielen (Flynn et al., 2000). Eine weitere Subpopulation der T-Lymphozyten, die $CD4^+$ T-Lymphozyten, wirken funktionell als T-Helferzellen. Mit dem T-Zell-Rezeptor erkennen sie ihr spezifisches Antigen, welches über MHC-II-Moleküle auf spezialisierten Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten, präsentiert wird. Diese Zellen nehmen fremde Organismen wie Bakterien durch Phagozytose oder Endozytose aus dem extrazellulären Raum auf, zersetzen diese und präsentieren die entstandenen Peptidbruchstücke über den MHC-II auf ihrer Oberfläche (von Boehmer, 1988). Unter dem Einfluss bestimmter Zytokine differenzieren die T-Helferzellen entweder in T-Helfer-1- (TH1) oder T-Helfer-2-Zellen (TH2). Makrophagen und dendritische Zellen bilden nach Stimulation Interleukin 12, welches die $CD4^+$ T-Lymphozyten zur Differenzierung in TH1-Zellen anregt. Diese wiederum bilden vor allem Interferon- γ und IL-2, Zytokine, die Makrophagen, $CD8^+$ T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen aktivieren. Es werden somit zellvermittelte Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Erreger stark stimuliert. Sind jedoch B-Lymphozyten die antigenpräsentierenden Zellen, so entstehen TH2-Zellen. Diese produzieren verschiedene Zytokine, wie IL-4 und IL-13, und stimulieren über diesen Prozess die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und Sekretion von Antikörpern. Damit wird also die humorale Immunantwort angeregt, die vor allem bei der Bekämpfung

extrazellulärer Erreger eine Rolle spielt (Abbas et al., 1996).

Die B-Lymphozyten als Träger der humoralen Immunantwort bilden nach Antigenstimulation hochspezifische Proteine, die Immunglobuline oder Antikörper. Als Antigenrezeptoren haben die B-Lymphozyten membranständiges Immunglobulin des IgM-Isotyps auf ihrer Oberfläche. Der Antigenkontakt dieses B-Zell-Rezeptors findet direkt mit dem löslichen Antigen statt. Es muss nicht wie bei den T-Lymphozyten über andere Zellen präsentiert werden. Nach der erfolgreichen Bindung und unter dem Einfluss aktivierter TH2-Zellen kommt es zur Aktivierung und Proliferation, und es entstehen Plasmazellen, die große Mengen an spezifischen Immunglobulinen produzieren. Ebenfalls entstehen langlebige B-Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt in kurzer Zeit Antikörper produzieren können. Sie tragen auf ihrer Oberfläche keine Immunglobuline mehr (Shapiro-Shelef und Calame, 2005). Die verschiedenen Antikörperklassen (IgM, IgG, IgA und IgE), die gebildet werden, haben jeweils unterschiedliche Funktionen, wie lokalen Immunschutz, Komplementaktivierung und Neutralisation.

Die natürlichen Killerzellen können Zielzellen antigenunspezifisch und unabhängig vom Vorkommen von MHC-Molekülen auf deren Oberfläche lysieren sowie neoplastische und virusinfizierte Zellen eliminieren. Sie besitzen eine sogenannte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, die durch an die Zielzelle gebundene Antikörper ausgelöst wird, sobald diese mit den Fc-Rezeptoren der natürlichen Killerzellen in Kontakt treten (Mischke, 2003).

1.6 Blutgruppen der Katze

Blutgruppen definieren angeborene Antigene auf der Oberfläche der Erythrozyten.

Holmes führte 1950 Untersuchungen über das Vorkommen von Isoagglutininen und Isohämolysinen durch, die ihn zu der Schlussfolgerung brachten, dass zwei feline Blutgruppenantigene, 0 und EF, existieren. Bei Katzen der Blutgruppe 0 fand er ein Isoagglutinin im Serum, Katzen der Blutgruppe EF hatten das korrespondierende Antigen auf ihren Erythrozyten. 1953 beschrieb Holmes ein weiteres Blutgruppenantigen – F –, welches sowohl mit dem 0- als auch dem EF-Serum agglutinierte, wobei die Reaktion mit dem 0-Serum schwächer ausfiel als mit dem EF-Serum. Das Serum der Gruppe 0 enthielt Anti-E- und Anti-F-Antikörper, das der Blutgruppe F nur Anti-E-Antikörper. Eine Untersuchung von 103 Katzen ergab eine Verteilung von 95,15% der Tiere mit Blutgruppe EF, 3,88% mit der Blutgruppe 0 und 0,97% mit der Blutgruppe F. Eyquem et al. (1962) untersuchten Blutproben von 350 Katzen, und

identifizierten die beiden Blutgruppen A (85%) und B (15%). Sie stellten fest, dass diese identisch mit den von Holmes (1950) beschriebenen Typen EF und 0 waren. Das aus Typ-0-Katzen isolierte Anti-E und Anti-F setzten sie mit Anti-A gleich. Die von Holmes (1950) benannte Gruppe F war möglicherweise ein Subtyp der Blutgruppe EF (Blutgruppe A) (Bell, 1983). Sowohl Holmes (1950) als auch Eyquem et al. (1962) fanden keine Katzen, denen das Antigen A oder B fehlte bzw. beide Antigene aufwiesen. Eyquem et al. konnten die Blutgruppenantigene bereits auf Milz- und Leberzellen des Fetus nachweisen.

Im heute gültigen AB-Blutgruppensystem der Katze sind drei Blutgruppen bekannt: A, B und AB. Die meisten Katzen gehören der Blutgruppe A an, seltener nachzuweisen ist die Blutgruppe B, und bei weniger als 1% liegt die Blutgruppe AB vor. Diese Ergebnisse sind auf Untersuchungen von Auer und Bell zurückzuführen, die 1981 serologische Untersuchungen an 1895 Katzen durchführten, bei denen sie die dritte Blutgruppe AB nachwiesen. Dieses Antigen entsprach jedoch nicht dem von Holmes benannten Antigen F, da das AB-Serum keine Antikörper enthielt. Einen Subtyp der Blutgruppe A konnten Auer und Bell (1981) nicht finden.

Die prozentuale Verteilung der Blutgruppen A und B unterliegt geografischen Unterschieden. Nach Untersuchungen von Haarer und Grünbaum (1993) gehören in Deutschland ca. 94% der Katzen der Blutgruppe A und ca. 6% der Blutgruppe B an. Aus anderen Ländern liegen andere Zahlen vor. In Brisbane, Australien, z.B. wies die Untersuchung von Auer und Bell (1981) an 1895 Tieren bei 73,3% der Katzen die Blutgruppe A und bei 26,3% die Blutgruppe B nach. Außerdem fand man bei 0,4% der Tiere erstmals den dritten Phänotyp, die Blutgruppe AB. Eine Studie mit 477 Katzen in Manchester, England, ergab eine Verteilung von 97% mit der Blutgruppe A und 3% mit der Blutgruppe B (Holmes, 1950). Eyquem et al. (1962) wiesen eine Verteilung von 85% A und 15% B bei 350 untersuchten Katzen in Paris, Frankreich, nach. Andere Untersuchungen zeigen, dass die Blutgruppe B bei einigen Rassekatzen häufiger vorkommt, wie z.B. bei der British Shorthair und Cornish und Devon Rex (Giger et al., 1991). Die sehr seltene Blutgruppe AB konnte nur bei Rassen nachgewiesen werden, bei denen auch die Blutgruppe B vorkommt. Sie wurde bisher bei den DSH, LSH, Abyssinier, Birma, British Shorthair, Norwegischen Waldkatze, Persern, Scottish Fold und Somalikatzen gefunden (Griot-Wenk et al., 1996).

In ihrer Studie konnten Auer und Bell (1981) außerdem nachweisen, dass die A- und B-Antigene auf den roten Blutzellen von Föten spätestens ab dem 38. Gestationstag vorhanden sind. Dies zeigt, dass es sich um echte Antigene handelt, und dass es keine Gewebe-Antigene sind, welche sich sekundär an die Erythrozyten heften, wie es z.B. bei den J-Antigenen der Rinder oder A-

Antigenen der Schweine der Fall ist.

Ähnlich wie beim Menschen werden die Blutgruppen bei Katzen durch Kohlenhydratstrukturen auf der Erythrozytenmembran bestimmt. Butler et al. (1991) wiesen durch dünn-schichtchromatografische Untersuchungen nach, dass zwei Glykolipide der Erythrozytenmembran die Blutgruppenantigene für Typ A und Typ B darstellen. Das dominierende Glykolipid der Erythrozytenmembran bei Katzen der Blutgruppe A ist NeuGc-NeuGc-Galactose-Glucose-Ceramid ([NeuGc]₂GD₃). NeuGc steht dabei für N-Glycolyl-Neuraminsäure, welche das Blutgruppenantigen A bestimmt. Bei Katzen der Blutgruppe B überwiegt das Glykolipid NeuAc-NeuAc-Galactose-Glucose-Ceramid ([NeuAc]₂GD₃), wobei NeuAc für N-Acetyl-Neuraminsäure steht. Katzen mit der Blutgruppe AB weisen beide Gruppen in gleichen Anteilen auf. Man nimmt an, dass das Enzym N-Acetyl-Neuraminsäure-Hydroxylase bei Katzen mit der Blutgruppe A die Umwandlung von N-Acetyl-Neuraminsäure in N-Glycolyl-Neuraminsäure bewirkt und Katzen mit der Blutgruppe B dieses Enzym fehlt (Butler et al., 1991; Andrews et al., 1992). Katzen mit der Blutgruppe AB besitzen möglicherweise eine Mutation dieses Enzyms.

Mit Hilfe genetischer Analysen wurden im felines Blutgruppensystem drei Allele, A, B und AB, identifiziert. Die Vererbung der Blutgruppenantigene erfolgt nach den Mendelschen Regeln, wobei das Allel A dominant gegenüber B ist. Der Genotyp der Blutgruppe A kann somit homozygot (A/A) oder heterozygot (A/B oder A/AB) sein, während alle Katzen mit der Blutgruppe B homozygot für das B-Allel (B/B) sind (Giger et al., 1991). Das Allel AB verhält sich rezessiv gegenüber Allel A und dominant gegenüber Allel B. Somit können Katzen mit der Blutgruppe AB ebenfalls homozygot (AB/AB) oder heterozygot (AB/B) sein (Griot-Wenk et al., 1996).

Man findet im Serum der Katzen natürliche Antikörper gegen das Antigen, welches sie nicht auf ihren Erythrozyten präsentieren (Auer und Bell, 1981). Fast alle Katzen der Blutgruppe B haben besonders hohe Titer an Anti-A-Hämagglutininen und Hämolysinen, welche für starke Unverträglichkeitsreaktionen bei Bluttransfusionen verantwortlich sind. Die Titer an Anti-B-Hämagglutininen und Hämolysinen von Katzen mit der Blutgruppe A sind niedriger, so dass Unverträglichkeitsreaktionen milder ausfallen können (Auer und Bell, 1983; Jain, 1993). Katzen der Blutgruppe AB besitzen keine natürlichen Antikörper und können bedenkenlos Blut von Katzen der Blutgruppe A oder B empfangen.

Das Vorkommen der natürlichen Antikörper ist auch bei der Zucht von Katzen zu berücksichtigen. Bei ungünstiger Paarung eines Muttertieres mit Blutgruppen-Typ-B mit einem

Typ-A-Vatertier kann bei den Welpen das Krankheitsbild der Neonatalen Isoerythrolyse auftreten. Das Muttertier überträgt dabei seine natürlichen Anti-A-Antikörper über das Kolostrum auf die Welpen. Bei Welpen, die die Blutgruppe A oder AB haben, kommt es somit durch die Aufnahme der maternalen Anti-A-Antikörper zur Neonatalen Isoerythrolyse. Bei der umgekehrten Paarung (Muttertier Typ A/Vatertier Typ B) kommt es nicht zu Symptomen, da der Anti-B-Titer eines Typ-A-Tieres niedrig ist (Giger et al., 1993).

2. Lektine und Lektin histochemie

2.1 Historisches

Im Jahre 1888 isolierte Herrmann Stillmark aus den Samen von *Ricinus communis*, einem Wolfsmilchgewächs, ein Protein, das er Rizin nannte, und welches die Fähigkeit besaß, Erythrozyten zu agglutinieren. Stillmark ging davon aus, dass das Rizin mit seinen agglutinierenden Eigenschaften für die Giftigkeit der Pflanze verantwortlich sei, was sich später aber nicht bestätigte. In den folgenden Jahren entdeckten Forscher immer mehr auch nichttoxische Proteine mit agglutinierender Wirkung in Extrakten von Samen bei fast allen Pflanzenfamilien, was zunächst zu der Bezeichnung „Phytohämagglutinine“ führte. Kobert, in dessen Institut Stillmark zu der Zeit arbeitete, erkannte, dass Rizin und andere pflanzliche Proteine dieser Art wie z.B. Abrin (aus *Abrus precatorius*) eine große Bedeutung haben und sorgte dafür, dass diese Substanzen in größeren Mengen für die Forschung hergestellt wurden. Dies nutzte Paul Ehrlich (1891) bei seinen Untersuchungen über das Immunsystem. Mit Hilfe dieser pflanzlichen Proteine konnte er wichtige immunologische Erkenntnisse gewinnen, vor allem im Bereich der Antikörperbildung und -spezifität und damit über die aktive und passive Immunisierung (Franz, 1990).

In den folgenden Jahren wurden weitere toxische und nichttoxische Phytagglutinine sowie als Hämagglutinine beschriebene Substanzen viraler und tierischer Herkunft entdeckt. Das Interesse an der Erforschung dieser heute als Lektine bekannten Gruppe von Proteinen stieg, als man ihre Zuckerspezifität entdeckte. Sumner und Howell machten im Jahre 1936 die Beobachtung, dass das Lektin Concanavalin A (aus *Canavalia ensiformis*) nicht nur Erythrozyten agglutiniert, es konnte auch Stärkegranula verklumpen sowie Mukoproteine und Glykogen präzipitieren. Gleichzeitig fanden sie heraus, dass sich die Hämagglutination durch den Zucker Sucrose (Saccharose) hemmen ließ. Sie folgerten erstmals daraus, dass Kohlenhydratgruppen den

Lektinen als Rezeptoren dienen könnten (Kocourek, 1986). Boyd und Reguera (1949) fanden bei Untersuchungen mit Extrakten aus dem Samen der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) und Blutproben unterschiedlicher Probanden heraus, dass die Agglutination der Erythrozyten unterschiedlich stark ausfiel, und dass die Stärke der Reaktion in Zusammenhang mit den Blutgruppen stand. Zu dem gleichen Ergebnis kam Renkonen, der 1948 ähnliche Versuche mit den Extrakten aus den Samen von 99 Spezies aus der Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*) machte. Somit war nachgewiesen, dass bestimmte Lektine eine Blutgruppenspezifität besitzen (Kocourek, 1986). Diese Entdeckungen und die weitere Erforschung der Lektine führten dazu, dass die Lektinhistochemie immer mehr an Bedeutung gewonnen hat (Gabius, 2009).

2.2 Definition der Lektine

Der Begriff Lektine leitet sich vom lateinischen Wort *legere* ab, das unter anderem „auswählen“ bedeutet. Er wurde 1954 von Boyd und Shapleigh eingeführt, die damit eine Klasse von Proteinen pflanzlicher Herkunft bezeichneten, die Zellen agglutinieren können und über antikörperähnliche Zuckerbindungseigenschaften verfügen. Seit dieser Zeit wurden viele ähnliche Substanzen in Pflanzen und auch Tieren gefunden, die zu der Einführung einer allgemeingültigen Definition führten. Goldstein et al. bezeichneten 1980 ein Lektin als ein kohlenhydratstrukturen bindendes Protein nicht immunogenen Ursprungs, welches Zellen agglutinieren und/oder Polysaccharide bzw. Glycokonjugate präzipitieren kann. Diese Definition wurde vom Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry übernommen (Dixon, 1981). Manche Autoren weisen außerdem darauf hin, dass Lektine die Kohlenhydratstrukturen, an die sie binden, biochemisch nicht verändern, also keine enzymatische Aktivität aufweisen (Franz, 1990; Rüdiger und Gabius, 2001).

Ursprünglich wurde der Begriff „Phytohmagglutinine“ verwendet, da Lektine lange Zeit nur aus pflanzlichen Geweben isoliert wurden und ihre blutagglutinierenden Eigenschaften im Vordergrund von Untersuchungen standen. Doch konnte sich diese Bezeichnung sowie Vorschläge vieler anderer Autoren nicht durchsetzen (Franz, 1990).

2.3 Struktur und Zuckerbindungseigenschaften

Ihre Eigenschaft Zellen zu agglutinieren und/oder Polysaccharide/Glycokonjugate zu präzipitieren, bedeutet, dass sie multivalent sind, d.h. mindestens zwei Zuckerbindungsstellen

besitzen. Ihre Zuckerspezifität wird durch das Monosaccharid bestimmt, welches durch Lektine verursachte Agglutination/Präzipitation hemmen kann. Der Hinweis, dass Lektine nicht immunogenen Ursprungs sind, dient zusätzlich der Abgrenzung von Antikörpern, die ebenfalls Zellen agglutinieren können (Sharon, 1987). Lektine werden aber nicht wie Antikörper auf einen antigenen Reiz hin gebildet, sondern sind ein normaler, ständig vorhandener Bestandteil von z.B. Pflanzensamen (Gabijs et al., 1988). Im Unterschied zu Antikörpern, die grundsätzlich einen ähnlichen Aufbau aufweisen, sind Lektine in ihrer Struktur sehr unterschiedlich und variieren in ihrer molekularen Größe, Aminosäuren-Zusammensetzung und dreidimensionalen Struktur (Kocourek, 1986). Das Molekulargewicht liegt etwa zwischen 30000 und 400000 Da und meist setzen sich Lektine aus 2–4 Untereinheiten zusammen. Manche verfügen jedoch über mehr als 20 Untereinheiten, wie z.B. das *Limulus polyphemus* (Horseshoe Crab) Lektin. Jede Untereinheit besitzt in der Regel eine Zuckerbindungsstelle. Mit wenigen Ausnahmen sind die Zuckerbindungsstellen der verschiedenen Untereinheiten eines Lektins identisch (Sharon, 1987). Die Bindung erfolgt in den meisten Fällen an die terminalen Glykosylgruppen der Polysaccharide und Glykoproteine. Viele Lektine tolerieren eine gewisse Variation am C-2-Atom des Zuckers den sie binden, Variationen am C-3- oder C-4-Atom werden dagegen weniger toleriert. Die Bindung der Lektine ist reversibel, und beteiligt sind neben Van-der-Waals-Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen vor allem Wasserstoffbrückenbindungen (Goldstein und Poretz, 1986).

Heute werden die meisten pflanzlichen und tierischen Lektine entsprechend ihrer Zuckerspezifität eingeteilt. Goldstein und Poretz nahmen 1986 folgende Kategorisierung vor:

Kategorie 1: **N-Acetyl-Glukosamin** (GlcNAc)-bindende Lektine:

In dieser Gruppe sind sehr verschiedenartige Lektine vertreten, die alle den botanischen Familien der *Solanaceae*, *Leguminosae* oder *Gramineae* angehören. Sie sind alle vorrangig spezifisch für GlcNAc oder seine β -1-4-gebundenen Oligomere.

Kategorie 2: **Galaktose** (Gal)- bzw. **N-Acetyl-Galaktosamin** (GalNAc)-bindende Lektine:

Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die ältesten bekannten Phyttagglutinine, wie Rizin (aus *Ricinus communis*) und Abrin (aus *Abrus precatorius*). Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich hier um Glykoproteine, die für ihre Zuckerbindung Metallionen wie Mn^{2+} oder Ca^{2+} benötigen.

Kategorie 3: L-Fukose (Fuc)-bindende Lektine:

Lektine dieser Gruppe wurden bisher aus sehr unterschiedlichen Quellen, wie Pflanzen, Pilzen und auch Tieren, isoliert. Das bekannteste Lektin dieser Kategorie ist das *Ulex europaeus* I-Agglutinin, UEA-I.

Kategorie 4: Mannose (Man)- bzw. Glukose (Glc)-bindende Lektine:

Hier sind vor allem Lektine aus Samen der Hülsefrüchtler (*Leguminosae*) vertreten, welche unter anderem durch ihre hohe Verfügbarkeit die mitunter am besten untersuchten Lektine sind. Sie lassen sich wiederum in zwei Gruppen einteilen: Die einen besitzen vier identische Untereinheiten, die anderen setzen sich aus zwei leichten (α) und zwei schweren (β) Ketten zusammen. Alle Lektine dieser Gruppe sind mitogen für Lymphozyten.

Kategorie 5: Oligosaccharide/Sialinsäure (OI/NANA)-bindende Lektine:

Die meisten Lektine dieser Gruppe stammen aus Invertebraten, nur wenige aus Pflanzen. Außerdem verfügen sie häufig über eine große Zahl von Untereinheiten.

Diese Kategorisierung von Goldstein und Poretz ist heute nicht mehr ganz aktuell. Neue Erkenntnisse lassen manche Lektine nicht streng zu einer der oben genannten Kategorien zuordnen. Neben ihrer Spezifität für Monosaccharide weisen die meisten Lektine auch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Affinität für verschiedene Oligosaccharide auf (Rüdiger und Gabius, 2009).

Tab. 2: Übersicht über die in der Untersuchung verwendeten Lektine

Abkürzung	Ausführliche Bezeichnung <i>lateinischer Name des Ursprungs</i>	Zuckerspezifität
GlcNAc		
WGA	Wheat germ Agglutinin <i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc Neu5Ac
WGA succ	Wheat germ Agglutinin succinyliert <i>Triticum vulgare</i>	βGlcNAc
GalNAc-/Galaktose		
GSA-I	Griffonia simplicifolia Agglutinin I <i>Griffonia simplicifolia</i>	GalNAc
PNA	Peanut Agglutinin <i>Arachis hypogaea</i>	Galaktose
RCA	Ricinus communis Agglutinin <i>Ricinus communis</i>	Galaktose
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin <i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc
SJA	Sophora japonica Agglutinin <i>Sophora japonica</i>	GalNAc
SBA	Soybean Agglutinin <i>Glycine max</i>	GalNAc
VAA	Viscum album Agglutinin <i>Viscum album</i>	Galaktose
SNA	Sambucus nigra Agglutinin <i>Sambucus nigra</i>	Galaktose/GalNAc
Fukose		
UEA-I	Ulex europaeus Agglutinin I <i>Ulex europaeus</i>	Fukose
Mannose-/Glukose		
Con A	Concanavalin A <i>Canavalia ensiformis</i>	Mannose, Glukose
LCA	Lens culinaris Agglutinin <i>Lens culinaris</i>	Mannose, Glukose
PSA	Pisum sativum Agglutinin <i>Pisum sativum</i>	Mannose, Glukose
Oligosaccharide (keine Monosaccharide als Liganden bekannt)		
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythro-Agglutinin <i>Phaseolus vulgaris</i>	bisected complex-type N-glycans
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leuco-Agglutinin <i>Phaseolus vulgaris</i>	tetra- and triantennary N-glycans with β6-branching
MAA-I	Maackia amurensis Agglutinin <i>Maackia amurensis</i>	Neu5Acα3Galβ4GlcNAc/ Glc, 3'-sulfation tolerated

2.4 Biologische Funktionen der Lektine

Die biologische Funktion pflanzlicher Lektine ist vielfältig und für viele Lektine bis heute nicht abschließend geklärt. Eine allgemeingültige Funktion kann ihnen wohl nicht zugeschrieben werden, da sie sich untereinander in zu vielen Aspekten unterscheiden, wie z.B. in ihrer vielfältigen Zuckerspezifität oder Struktur. Gegenwärtig teilt man deshalb ihre Funktionen zunächst in zwei Gruppen auf: zum einen unterscheidet man die Interaktion von Lektinen mit exogenen Liganden, also mit fremden Substanzen, die von Tieren, Pilzen oder Bakterien stammen, zum anderen die Interaktion der Lektine mit eigenen, internen Liganden der Pflanze (Rüdiger und Gabius, 2001). Zu den externen Aktivitäten pflanzlicher Lektine gehört beispielsweise der Schutz ihrer Samen vor Pilzen oder Fraßfeinden. Solche toxischen Lektine enthalten die Samen von *Ricinus communis* oder *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne). So führt der ungekochte Verzehr der Gartenbohne zu gastrointestinalen Beschwerden. Dieser toxische Effekt muss aber nicht bei allen Tierarten bzw. -klassen auftreten (Rüdiger und Gabius, 2009). Während das Lektin der Gartenbohne (PHA) bei allen Säugetieren zu Schäden im Verdauungstrakt führt, gibt es bei den Insekten unterschiedliche Reaktionen (Rüdiger und Gabius, 2001). Eine weitere externe Funktion soll die Beteiligung von Lektinen an der Fixierung stickstoffbindender Bakterien der Gattung *Rhizobium* an die Pflanzenwurzeln von Leguminosen sein (Franz, 1990).

Innerhalb der Pflanze können Lektine sehr spezifisch an bestimmte zelluläre Komponenten wie z.B. Speicherproteine binden. Sie sollen damit an der wasser- und raumsparenden Packung der Speicherproteine innerhalb von Proteinkörpern in Pflanzensamen beteiligt sein (Einhoff et al., 1986; Gabius et al., 1988).

Neben Lektinen pflanzlicher Herkunft sind auch Lektine mikrobieller Herkunft bekannt, die sich an Fimbrien und Pili von Bakterien befinden und für die Adhäsion der Mikroorganismen an ihre Zielzellen verantwortlich sind. Sie sind also von großer Bedeutung für den Ablauf einer Infektion. Durch Versuche konnte gezeigt werden, dass sich die Lektin-bedingte Adhäsion von Bakterien durch den jeweiligen, für das Lektin spezifischen Zucker blockieren lässt und Infektionen so unterbleiben (Gabius et al., 1988).

2.5 Lektin histochemie

Wie eine kurze Pubmed-Suche zeigt hat das Interesse an der Glykobiologie in der Medizin und Biologie in den letzten Jahren stark zugenommen, insbesondere im Zusammenhang mit der

Zellinteraktion und Zellkommunikation, rheumatoiden Erkrankungen und der Krebsforschung. Dabei gewann auch die Lektinchemie und -histochemie immer mehr an Bedeutung. Mittels der Lektinhistochemie kann die zelluläre Lokalisation von Glykokonjugaten wie Glykoproteinen, Glykolipiden etc. exakt studiert werden (Lindhorst, 2000). Sie kann dabei sowohl für licht- als auch elektronenmikroskopische Untersuchungen eingesetzt werden.

Mit Markern konjugierte Lektine stellen ein sehr nützliches Werkzeug für eine Charakterisierung und die Lokalisation von Glykokonjugaten dar. Es werden über 100 Lektine kommerziell vertrieben (Brooks et al., 1997). Annähernd alle sind in verschiedenen Untersuchungen an Tier und Mensch bereits mit klassischen Methoden der Lektinhistochemie zum Einsatz gekommen.

Bei der Lektinhistochemie werden Bindungen von Lektinen an bestimmte gewebsassoziierte Kohlenhydratreste durch einen geeigneten mikroskopisch sichtbaren Marker dargestellt. Zur Sichtbarmachung der Bindungen zwischen Lektin und Glykokonjugat kommen bei der Anwendung der sogenannten indirekten Methode Enzyme (enzymatische Umwandlung eines Chromogen-Substrates in ein im Lichtmikroskop gut sichtbares farbiges Endprodukt) oder fluoreszierende Marker, wie z.B. FITC oder Rhodamin, in Frage. Indirekte Methoden arbeiten mit markierten Antikörpern, die gegen das eingesetzte Lektin gerichtet sind, oder auch mit Vitamin H, also Biotin-konjugierten Lektinen, die über markiertes Streptavidin sichtbar gemacht werden. Auch die Verwendung Biotin-gekoppelter Antikörper ist dabei möglich. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität kann neben der Lektinfärbung eine Zuckerhemmung durchgeführt werden. Hierbei wird durch Zugabe des entsprechenden Mono- oder Oligosaccharids die Lektinbindung kompetitiv gehemmt. Es ist jedoch gelegentlich zu beobachten, dass durch ein bestimmtes Monosaccharid keine vollständige Hemmung zustande kommt. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass viele Lektine affiner mit Oligosacchariden als mit Monosacchariden reagieren (Brooks et al., 1997).

2.6 Bedeutung der Lektine für Untersuchungen am Blut und an Blutzellen

Schon die Isolierung des ersten Lektins im Jahre 1888 durch Hermann Stillmark stand im Zusammenhang mit Untersuchungen am Blut. Er wies nach, dass Rizin – ein Protein aus dem Samen von *Ricinus communis* – Erythrozyten agglutinieren konnte. Seit verschiedene Forscher (Boyd, 1945; Renkonen, 1948; Boyd und Reguera, 1949) die Blutgruppenspezifität einiger pflanzlicher Lektine entdeckten und untersuchten, waren sie ein wichtiger Bestandteil in der Erforschung der Blutgruppenserologie und Immunologie (Kocourek, 1986). Noch heute können

beim Menschen manche Lektine in der Blutgruppendiagnostik eingesetzt werden, wie etwa Lektine aus *Dolichos biflorus* (A₁), *Helix pomantia* (A) und *Vicia graminea* (N) (Franz, 1990).

Manche Lektine weisen auch eine Spezifität für Blutgruppen bei der Katze auf. So fanden Butler et al. (1991) heraus, dass das Lektin WGA aus *Triticum vulgare* eine starke Agglutination von Erythrozyten bei Katzen mit der Blutgruppe B hervorruft. Das Lektin reagiert mit N-Acetyl-Neuraminsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin. Butler et al. vermuteten also, dass sie eine Rolle bei den Blutgruppenantigenen spielen.

Dass man Lektine als diagnostisches Mittel einsetzen kann, um das Blut verschiedener Tierarten zu unterscheiden, ergaben bereits die Ergebnisse einer Studie von Bhalla et al. (1978).

Durch die Entdeckung, dass Lektine zuckerspezifisch sind, wurden sie vermehrt für die Erforschung und Lokalisation von Kohlenhydratresten verschiedener Glykokonjugate eingesetzt. So gelang mittels lektin histochemischer Untersuchungen an Thrombozyten von Hunden und Katzen die Identifizierung von bestimmten Glykoproteinen auf deren Oberfläche mit Hilfe des Einsatzes von Biotin-markierten Lektinen LCA, PSA WGA und PHA-L (Darbès et al., 1993).

Alle Blutzellen besitzen Kohlenhydratstrukturen auf ihrer Oberfläche. Bei Erythrozyten sind sie z.B. wichtig für die Blutgruppenspezifität. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle bei zellulären Erkennungs- und Adhäsionsprozessen und haben eine wichtige Funktion als Oberflächenantigen (siehe Blutgruppen). Kohlenhydrate sind Bestandteil von verschiedenen Glykokonjugaten wie Glykoproteinen oder Glykolipiden (Lindhorst, 2000). Die Struktur der Zuckermoleküle ist sehr vielfältig, daher besteht eine große Variabilität beim Aufbau von Oligosacchariden der Zellmembran. Trotz des komplexen Oberflächenmusters der Glykoproteine und Glykolipide sind nur relativ wenige Zucker vertreten, vor allem Glukose, Mannose, Fukose, Glukosamin, Galaktose und Sialinsäure (Nelson und Cox, 2009).

Sialinsäure befindet sich z.B. am Ende von Oligosaccharidketten auf Erythrozytenmembranen und schützt diese so vor dem Abbau in der Leber. Gealterte Erythrozyten verlieren jedoch die Sialinsäure, und nun freiliegende Galaktosereste werden in Hepatozyten über dort enthaltene Lektinmoleküle gebunden, und so die gealterten Erythrozyten aus dem zirkulierenden Blut entfernt (Nelson und Cox, 2009). Auch bei den Thrombozyten kommt es während des Alterungsvorgangs zu Veränderungen der Kohlenhydratstruktur auf der Zellmembran, welche von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) in Milz und Leber erkannt werden. Es kommt zur Phagozytose und zum Abbau der gealterten Thrombozyten (White, 1994).

Im Zusammenhang mit der Zellerkennung ist es von Bedeutung, dass auch Bakterien über Lektine verfügen. So entdeckte Deguid in den fünfziger Jahren, dass sich an den Pili oder

Fimbrien von Bakterien kohlenhydratbindende Moleküle befinden, die für die Adhäsion an Zellen des Wirtsorgans verantwortlich sind. Die Adhäsion kann durch spezifische Zucker gehemmt werden (Gabijs et al., 1988). Auch Viren besitzen solche Oberflächenlektine, mit denen sie an Wirtszellen binden und diese anschließend infizieren. Das Grippevirus beispielsweise bindet an die Sialinsäure der Erythrozyten (Lis und Sharon, 1993). Bakterielle Lektine können auch blutgruppenspezifisch sein und bevorzugt mit Antigenen bestimmter Blutgruppen reagieren. Das führt dazu, dass einerseits eine Infektion durch eine Blutgruppe begünstigt werden kann, andererseits bestimmte Blutgruppen einen gewissen Schutz vor Infektionen mit manchen Erregern bieten (Gabijs et al., 1988).

III Untersuchte Tiere und Methoden

1. Material

1.1 Tiere

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von insgesamt 26 klinisch gesunden Katzen entnommen. Es handelt sich dabei überwiegend um Katzen der Rasse Europäisch Kurzhaar und eine Perserkatze. Es wurde darauf geachtet, dass für die jeweiligen Untersuchungen möglichst Blutproben von Tieren beider Geschlechter und unterschiedlicher Altersgruppen verwendet wurden. Die Blutentnahme erfolgte ausschließlich für die Verwendung der Proben in dieser Arbeit. Für die meisten Tiere wurde ein kleines Blutbild im synlab.vet, Labor Augsburg, erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Von den einzelnen Blutproben wurden Blutaussstriche auf Super Frost[®] Objektträgern angefertigt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Tabelle 3 zeigt eine Aufstellung der Katzen mit Angaben zu Alter, Rasse, Geschlecht und der Verwendung ihrer Blutproben bei den einzelnen Untersuchungen.

Tab. 3: Übersicht über die Verwendung der Blutproben der Katzen

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter	LM	GHC	EM
1	EKH	mk	15	X	X	
2	EKH	wk	14	X	X	
3	EKH	wk	14	X	X	
4	EKH	wk	14		X	
5	EKH	mk	13	X	X	
6	EKH	mk	13	X	X	
7	EKH	wk	12	X	X	
8	EKH	mk	11	X	X	
9	EKH	wk	11		X	
10	EKH	mk	10	X	X	
11	Perser	wk	10	X	X	X
12	EKH	mk	10	X	X	
13	EKH	wk	10		X	
14	EKH	mk	10	X	X	
15	EKH	mk	5	X	X	
16	EKH	mk	3	X	X	X
17	EKH	wk	3	X	X	
18	EKH	mk	2	X	X	
19	EKH	mk	0,5	X	X	
20	EKH	mk	0,5	X	X	
21	EKH	mk	5			X
22	EKH	wk	8			X
23	EKH	wk	11			X
24	EKH	mk	5	X		
25	EKH	mk	5	X		
26	EKH	wk	3	X		

(EKH = Europäisch Kurzhaar, mk = männlich kastriert, wk = weiblich kastriert, LM = Lichtmikroskopie, GHC = Glykohistochemie, EM = Elektronenmikroskop)

1.2 Übersicht über die verwendeten Lektine

Die glykohistochemischen Untersuchungen wurden mit insgesamt 14 an FITC gekoppelten Lektinen (Linaris, Wertheim) durchgeführt. Die verwendeten Lektine, die deutsche Bezeichnung der Pflanzen, aus denen sie jeweils stammen, sowie ihre Zuckerspezifität können aus Tabelle 4 entnommen werden.

Tab. 4: Herkunft und Zuckerspezifität der Lektine

Abkürzung	Name	Herkunft <i>lateinischer Name</i> deutsche Bezeichnung	Zuckerspezifität
WGA	Wheat germ Agglutinin	<i>Triticum vulgare</i> Weizen (Keim)	GlcNAc Neu5Ac
WGA succ	Wheat germ Agglutinin succinyliert	<i>Triticum vulgare</i> Weizen (Keim)	βGlcNAc
GSA-I	Griffonia simplicifolia Agglutinin I	<i>Griffonia simplicifolia</i> Afrikanische Schwarzbohne	GalNAc
PNA	Peanut Agglutinin	<i>Arachis hypogaea</i> Erdnuss	Galaktose
RCA	Ricinus communis Agglutinin	<i>Ricinus communis</i> Rizinusbohne	Galaktose
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin	<i>Dolichos biflorus</i> Afrikanische Pferdebohne	GalNAc
SJA	Sophora japonica Agglutinin	<i>Sophora japonica</i> Japanischer Pagodenbaum	GalNAc
SBA	Soybean Agglutinin	<i>Glycine max</i> Sojabohne	GalNAc
UEA-I	Ulex europaeus Agglutinin I	<i>Ulex europaeus</i> Europäischer Stechginster	Fukose
Con A	Concanavalin A	<i>Canavalia ensiformis</i> JACK-Bohne, Schwertbohne	Mannose, Glukose
LCA	Lens culinaris Agglutinin	<i>Lens culinaris</i> Speise-Linse	Mannose, Glukose
PSA	Pisum sativum Agglutinin	<i>Pisum sativum</i> Gartenbohne	Mannose, Glukose
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythro- Agglutinin	<i>Phaseolus vulgaris</i> Rote Kidney-Bohne	bisected complex-type N- glycans
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leuco- Agglutinin	<i>Phaseolus vulgaris</i> Rote Kidney-Bohne	tetra- and triantennary N- glycans with β6-branching

Drei weitere Lektine, MAA-I (Biozol, Eching), SNA (Biozol, Eching) und VAA (Institut für physiologische Chemie, München) wurden im Rahmen der Streptavidin-Biotin-Methode angewendet und somit biotinyliert verwendet.

Die Herkunft dieser Lektine und ihre Zuckerspezifität sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Biotinylierte Lektine

Abkürzung	Name	Herkunft <i>lateinischer Name</i> deutsche Bezeichnung	Zuckerspezifität
MAA-I	Maackia amurensis Agglutinin	<i>Maackia amurensis</i> Asiatisches Gelbholz	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc/ Glc, 3'-sulfation tolerated
SNA	Sambucus nigra Agglutinin	<i>Sambucus nigra</i> Schwarzer Holunder	Galaktose/GalNAc
VAA	Viscum album Agglutinin	<i>Viscum album</i> Mistel	Galaktose

2. Methoden

2.1 Probeentnahme und Fixierung

Die Blutproben wurden bei jeder Katze aus der Vena cephalica entnommen und in EDTA Röhren gesammelt. Von den Blutproben wurden Ausstriche auf nicht beschichteten und entfetteten Objektträgern (Super Frost[®], Fa. Menzel) angefertigt und diese anschließend luftgetrocknet. Die luftgetrockneten Ausstriche wurden bei Zimmertemperatur und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden die luftgetrockneten Blutausstriche jeweils zehn Minuten in Methanol (Merck, Darmstadt) fixiert.

Für die Elektronenmikroskopie wurden Blutproben von fünf Katzen gesammelt und diese zunächst gemeinsam für 15 Minuten bei 2000 U/Min zentrifugiert. Der dabei entstandene Plasmaüberstand wurde vorsichtig abpipettiert, ohne den Leukozytensaum zu zerstören. Anschließend wurde das gleiche Volumen an frisch angesetzter Karnovsky-Gebrauchslösung dazugegeben. Es folgte eine Fixierung der überschichteten Probe für eine Stunde bei 4°C. Dabei

verfestigten sich der Leukozytensaum sowie die angrenzende Erythrozytenschicht. Um noch anhaftendes flüssiges Blut zu entfernen, wurde das Zellpellet in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,7) gespült. Das Pellet wurde über Nacht erneut in Karnovsky-Gebrauchslösung nachfixiert. Daraus wurden am nächsten Tag 1 mm³ große Blöcke geschnitten und diese dreimal in Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7,2) gewaschen. Zur Kontrastierung erfolgte eine Behandlung der Proben mit 1%igem Osmiumtetroxid und 1,5%igem Kaliumferrocyanid für zwei Stunden bei 4°C im Dunklen. Zuletzt wurden die Proben erneut dreimal für je 20 Minuten in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen.

2.2 Lichtmikroskopie

Zur histologischen Auswertung wurden Blutausstriche von insgesamt 20 Katzen mit vier Färbemethoden behandelt. Die gefärbten Ausstriche wurden mit einem Tropfen Eukitt®-Kunststoff eingedeckt und lichtmikroskopisch histologisch ausgewertet.

2.2.1 Färbung nach May-Grünwald

Die Färbung von Blutausstrichen nach May-Grünwald erfolgt mit eosinsaurem Methyleneblau. Dabei färben sich Zellkerne blau, die Granula der eosinophilen Granulozyten ziegelrot, die der basophilen Granulozyten tiefblau. Neutrophile Granula stellen sich als feine hellrote bis purpurfarbene Körnchen dar. Thrombozyten erscheinen blassblau, Erythrozyten hellrot.

Nachdem die luftgetrockneten Blutausstriche für 30 Minuten mit Methanol (Merck, Darmstadt) fixiert wurden, erfolgte die Färbung nach folgendem Protokoll:

1.	Auftropfen der unverdünnten Farbstofflösung (Merck, Darmstadt), Ausstrich gut bedecken	max. 3–5 min
2.	Verdünnen durch Zusatz der gleichen Menge Aqua dest.	5–10 min
3.	Abgießen der Färbelösung kurz in Aqua dest. eintauchen	
4.	Abpressen zwischen Filterpapier und lufttrocknen	

2.2.2 Färbung nach Giemsa

Die Stammlösung, mit der gefärbt wird, enthält Eosin, Methylenblau, Methylenazur und Methylviolett. Als Lösungsmittel werden Methanol und Glycerin zugesetzt. Zellkerne färben sich hier rotviolett, eosinophile Granula rötlich-rotbraun, basophile Granula blau und neutrophile Granula rotviolett. Das Protoplasma der Lymphozyten und Monozyten ist blau dargestellt. Erythrozyten erscheinen blassrötlich, Thrombozyten blau mit violetter Innenkörper, Zellkerne von Blutparasiten und Protozoen leuchtend rot.

Die luftgetrockneten Blutausstriche wurden 5–10 Minuten in Methanol fixiert. Unmittelbar vor der Färbung musste die Giemsa-Stammlösung (Merck, Darmstadt) zunächst verdünnt werden. Dazu wurden 10 mL gepuffertes Aqua dest. (pH 7) in ein Becherglas gegeben und unter ständigem Schwenken 0,3 mL der Giemsa-Stammlösung dazu getropft. Der verdünnte Farbstoff wurde sofort für die Färbung nach folgendem Protokoll verwendet:

1.	Auftropfen der verdünnten Farbstofflösung Ausstrich gut bedecken	30–45 min
2.	Abgießen der Färbelösung	
3.	Abspülen der Ausstriche mit gepuffertem Aqua dest. und lufttrocknen	

2.2.3 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Die Pappenheim-Färbung ist eine Kombination von May-Grünwald- und Giemsa-Färbung und wird im Allgemeinen für die Färbung von Blutausstrichen verwendet. Zellkerne färben sich rötlich-violett, die Granula der neutrophilen Granulozyten erscheinen bläulich-rosa bis bräunlich, eosinophile Granula bräunlich-orange bis ziegelrot, basophile Granula ultramarin mit Stich ins Violette. Das Zytoplasma der Lymphozyten stellt sich hellblau dar, Azurkörnchen in Lymphozyten und Monozyten sind purpurrot und in myeloischen Zellen violett. Die Erythrozyten färben sich rosa, ihre basophile Punktierung kräftig kobaltblau und polychrome Formen der Erythroblasten überwiegend bläulich.

Die luftgetrockneten Blutausstriche wurden unfixiert nach folgendem Protokoll gefärbt:

1.	Blutausstrich mit 20–30 Tropfen der unverdünnten May-Grünwald (Merck, Darmstadt) Färbelösung überschichten	3 min
2.	Die gleiche Menge Aqua dest. (pH 7) zufügen	1 min
3.	Sofortiges Abgießen der Färbelösung (nicht abspülen)	
4.	Überschichten mit verdünnter Giemsa-Lösung (0,3 mL Stammlösung auf 10 mL Aqua dest., pH 7)	15–20 min
5.	Abspülen mit Aqua dest. (pH 7)	
6.	Abpressen zwischen Filterpapier und lufttrocknen	

2.2.4 Diff-Quick

Zum Vergleich wurde noch eine Schnellfärbemethode, der sogenannte Diff-Quick (Labor +Technik, Berlin), durchgeführt. Er besteht aus drei gebrauchsfertigen Reagenzien:

1. Diff-Quick-Fixierlösung
2. Farblösung I (Diff-Quick Xanthen-Farbstoff)
3. Farblösung II (Diff-Quick Thiazin-Farbstoff)

Diese Reagenzien werden in drei Färbeküvetten gegeben und die Färbung der luftgetrockneten Blutausstriche folgendermaßen ausgeführt:

1.	Objektträger fünfmal je 1 Sekunde lang in die Fixierlösung eintauchen und abtropfen lassen
2.	Danach Objektträger fünfmal je 1 Sekunde lang in Farblösung I eintauchen und abtropfen lassen
3.	Anschließend Objektträger fünfmal je eine Sekunde in Farblösung II eintauchen und abtropfen lassen
4.	Objektträger mit Aqua dest. spülen
5.	Lufttrocknen lassen

2.3 Elektronenmikroskopie

Nach der Fixierung der Probe, die unter Punkt 2.1 bereits dargestellt wurde, erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90% je 30 Minuten, abs. Ethanol drei Mal 30 Minuten) und die schrittweise Einbettung in Epon (2 x 15 Minuten Propylenoxid (Merk, Darmstadt), 1 Stunde Propylenoxid-Epon-Gemisch 2:1, über Nacht Propylenoxid-Epon-Gemisch 1:1, 1 Stunde reines Epon). Anschließend wurden die Blöcke in Gelatine kapseln (Plannet, Wetzlar) eingebettet und bei 60°C über 24 Stunden polymerisiert.

Für eine erste Übersicht wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte an einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) angefertigt und mit Methylenblau gefärbt. Es folgte eine lichtmikroskopische Beurteilung, und von den Blöcken, auf denen genug Zellen vorhanden waren, wurden anschließend Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60 nm angefertigt. Diese wurden auf Kupfergrids (200 Mesh) aufgezogen und mit gesättigtem Uranylacetat und einer Bleizitratlösung nach Reynolds (1963) nachkontrastiert.

2.4 Glykohistochemie

2.4.1 FITC-markierte Lektine

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden die in Tabelle 4 aufgeführten, direkt an FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) gekoppelten Lektine verwendet. Es handelt sich bei dieser Methode um einen direkten Nachweis, da das Lektin, das an den spezifischen Zucker auf der Blutzelle bindet, direkt an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt ist.

Um auch die Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, erfolgte gleichzeitig eine Behandlung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (Roche, Mannheim), einem Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe.

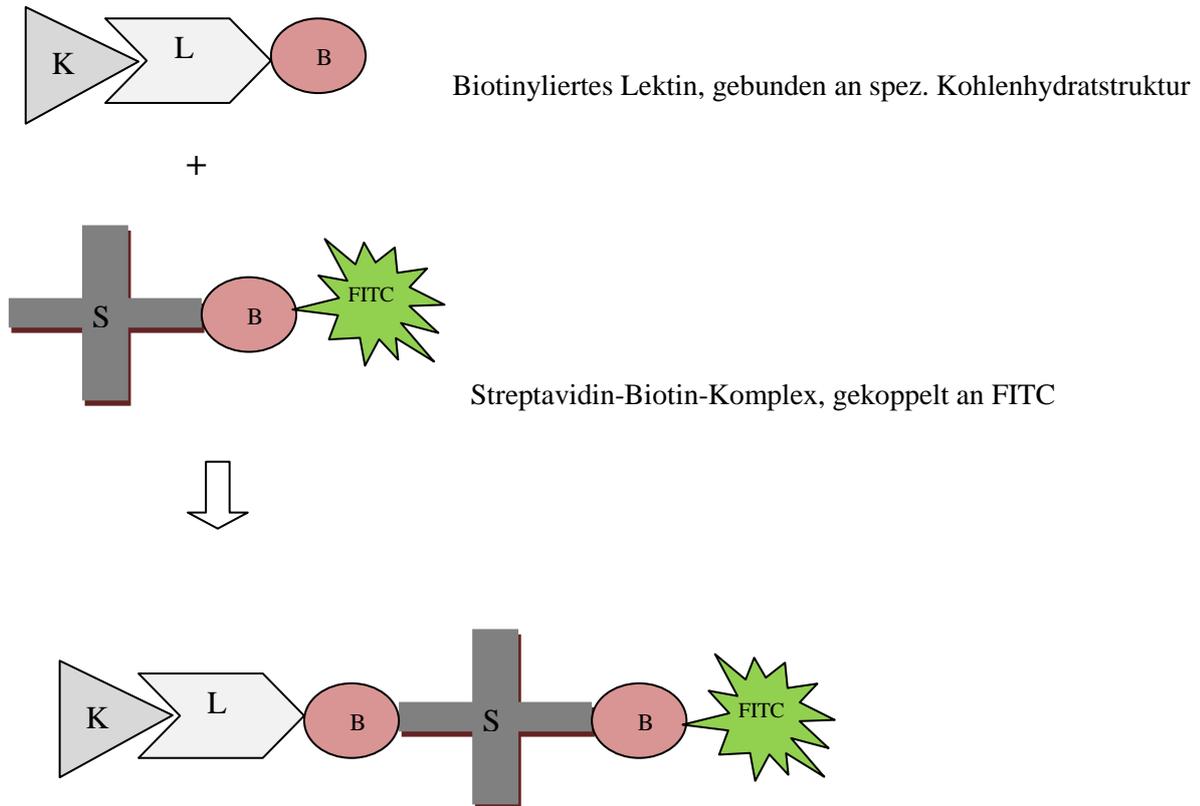
Es wurden je 20 Blutausrichthe auf die Bindungsfähigkeit des jeweiligen Lektins untersucht. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1.	Fixieren in Methanol	10 min
2.	Dreimaliges Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4–7,6)	je 5 min
3.	Bedecken der Blutausstriche mit je 300 μ L des FITC-markierten Lektins (10 μ g/mL PBS) Inkubation in feuchter Kammer unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur	60 min
4.	Dreimaliges Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4–7,6) unter Lichtausschluss	je 5 min
5.	Bedecken der Blutausstriche mit DAPI 1:7500 (Stammlösung 1mg/mL) unter Lichtausschluss	max. 10 min
6.	Zweimaliges Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4–7,6) unter Lichtausschluss	je 5 min
7.	Zweimaliges Waschen in Aqua dest. unter Lichtausschluss	je 5 min
8.	Eindeckeln mit PVA Mounting Medium (+DABCO)	
9.	Aufbewahrung bis zur Auswertung unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei 7°C	

2.4.2 Biotinylierte Lektine

Die Bindungsfähigkeit drei weiterer Lektine, die der Lektine MAA-1, SNA und VAA (siehe Tabelle 5), wurde mit der Streptavidin-Biotin-Complex-Methode (SABC-Methode) untersucht. Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin für Biotin. Streptavidin ist ein Protein, welches von Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* produziert wird und über vier Bindungsstellen für Biotin verfügt. Bei der durchgeführten Untersuchung wurde ein Streptavidin-Biotin-Komplex verwendet, der gleichzeitig mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt ist. Das zu untersuchende Lektin ist ebenfalls an ein Biotinmolekül gekoppelt. Das biotinylierte Lektin wird zu der zu untersuchenden Probe gegeben und bindet dort an seine spezifische Kohlenhydratstruktur. Gibt man nun den FITC-markierten Streptavidin-Biotin-Komplex dazu, bindet das Streptavidin mit hoher Affinität an das Biotinmolekül des Lektins. Über den FITC-markierten Komplex kann die Bindungsstelle so sichtbar gemacht werden.

Abb. 2: Schema der Streptavidin-Biotin-Methode



Für diese Untersuchung wurden pro Lektin zehn Blutausstriche nach folgendem Protokoll behandelt:

1.	Fixieren in Methanol (Merck, Darmstadt)	10 min
2.	Dreimaliges Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	je 5 min
3.	Objektträger vorsichtig trocknen und zur Reduzierung der Hintergrundfärbung mit Dako Protein Block Serum Free (Dako, Hamburg) bedecken (in feuchter Kammer bei Raumtemperatur)	10 min
4.	Objektträger wieder vorsichtig trocknen und mit je 300 µL des biotinylierten Lektins bedecken (MAL-1 und SNA 5µg/mL PBS, VAA 1 µg/mL PBS) Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur	60 min
5.	Dreimaliges Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	je 5 min
6.	Objektträger vorsichtig trocknen, je 300 µL des gelösten Streptavidin-/FITC-Komplexes (Dako, Hamburg) auftragen (Verdünnung 1:500) Inkubation in feuchter Kammer unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur	30 min
7.	Dreimaliges Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4) unter Lichtausschluss	je 5 min
8.	Bedecken der Blutausstriche mit DAPI 1:7500 (Stammlösung 1 mg/mL) unter Lichtausschluss	max. 10 min
9.	Zweimaliges Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4) unter Lichtausschluss	je 5 min
10.	Zweimaliges Waschen in Aqua dest. unter Lichtausschluss	je 5 min
11.	Eindeckeln mit PVA Mounting Medium (+DABCO)	
12.	Aufbewahrung bis zur Auswertung unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei 7°C	

2.4.3 Überprüfung der Zuckerspezifität (Zuckerhemmung)

Die Zuckerspezifität der Lektine, die deutlich positiv reagierten, wurde durch kompetitive Hemmung mit den jeweils korrespondierenden Zuckern überprüft.

Die Lektine wurden hierfür vor dem Auftragen auf die Blutausriche mit einer 0,4 M Lösung des entsprechenden Hemmzuckers für eine Stunde bzw. 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die Blutausriche wie im oben beschriebenen Protokoll zur Färbung mit FITC-markierten Lektinen behandelt, wobei das Lektin durch die Lektin-Hemmzucker-Lösung ersetzt wurde. Als Positivkontrolle wurde je ein Ausstrich mit dem reinen Lektin versehen. In der folgenden Tabelle werden die verwendeten Lektine und Hemmzucker sowie die verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten aufgeführt.

Tab. 6: Übersicht über die Hemmzucker

Lektin	Hemmstoff	Konzentration	Inkubationszeit
WGA	N-Acetyl-Glukosamin (Sigma Aldrich, Deisenhofen)	36,67 µg/mL	30 Minuten
WGAs	N-Acetyl-Glukosamin (Sigma Aldrich, Deisenhofen)	36,67 µg/mL	30 Minuten
Con A	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/mL	1 Stunde
LCA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/mL	1 Stunde
PSA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/mL	1 Stunde
GSA-I	N-Acetyl-Galaktosamin (Sigma Aldrich, Deisenhofen)	172,4 mg/mL	1 Stunde
PHA-E	Essigsäure (Roth, Karlsruhe)	24 µL/mL	1 Stunde

2.5 Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Blutausrichhe erfolgte mit einem Mikroskop (Aristoplan) der Fa. Leitz, Wetzlar. An das Mikroskop war eine Canon Powershot A95- Digitalkamera gekoppelt.

Die elektronenmikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgte an dem Transmissionselektronenmikroskop EM Zeiss 902 der Fa. Zeiss, Oberkochen.

Für die Auswertung der Präparate der glykohistochemischen Untersuchungen wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20) der Fa. Leitz, Wetzlar, angewendet.

IV Ergebnisse

1. Blutbilder der untersuchten Katzen

Die Ergebnisse der Blutbilder sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Bei den Leukozyten liegt der durchschnittliche Wert mit 13,3 G/L für alle untersuchten Tiere über dem maximalen Referenzwert von 11 G/L. Berücksichtigt man allerdings den Umstand, dass sich bei der Katze Stresssituationen, wie z.B. die Blutabnahme, auf die Gesamtleukozytenzahl im Blut auswirken, und zieht man somit den erhöhten maximalen Referenzwert von 18 G/L heran, befindet sich die Leukozytenzahl im Referenzbereich. Ein Unterschied zwischen allen weiblichen und allen männlichen Tieren konnte nicht festgestellt werden. Die höchsten Leukozytenwerte lassen sich bei den älteren Tieren feststellen. Dort liegt der Durchschnittswert bei den weiblichen Tieren mit 18,5 G/L leicht über dem maximalen Referenzwert. Bei den Tieren aus der jüngeren Altersgruppe sind die Leukozytenwerte mit durchschnittlich 17,3 G/L bei den männlichen Tieren deutlich höher als bei den weiblichen mit 8,6 G/L.

Tab. 7: Blutbilder der Katzen

	Leu G/L	Ery T/L	Häm g/L	Hkt L/L	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dL	Thr G/L
ältere Katzen (11 bis 15 Jahre)								
Katze 1	5,7	9,8	143	0,5	50,8	14,6	28,7	283
Katze 2	21,7	9,62	119	0,44	45,5	12,4	27,2	350
Katze 3	8,8	9,03	137	0,47	52	15,2	29,1	371
Katze 4	25,1	11,3	141	0,5	44,4	12,5	28,1	504
Katze 5	14,7	8,32	131	0,49	58,3	15,7	27	274
Katze 6	4,3	10,04	138	0,46	45,5	13,7	30,2	222
Katze 8	23,1	9,35	157	0,56	60,3	16,8	27,8	495

mittelalte Katzen (5 bis 10 Jahre)								
Katze 12	12,4	8,53	120	0,41	48,1	14,1	29,3	360
Katze 13	12,1	8,47	120	0,43	50,3	14,2	28,2	476
Katze 14	11,8	9,34	139	0,5	54	14,9	27,6	453
Katze 11	10,1	9,54	141	0,51	53	14,8	27,9	270
Katze 22	10,5	9,52	137	0,5	52,5	14,4	27,4	595
Katze 15	7,2	7,99	129	0,42	52,8	16,1	30,6	287
Katze 21	13,2	9,78	116	0,42	42,5	11,9	27,9	401
Katze 24	12,2	7	105	0,38	53,9	15	27,9	591
Katze 25	12,3	8,84	134	0,49	55,4	15,2	27,3	322
jüngere Katzen (0,5 bis 4 Jahre)								
Katze 17	9,1	10,46	149	0,52	49,2	14,2	28,9	293
Katze 26	8,2	8,83	134	0,48	54	15,2	28,1	334
Katze 18	11,3	8,38	123	0,47	56,4	14,7	26	285
Katze 16	16,9	9,68	145	0,51	53,1	15	28,2	287
Katze 19	19,1	8,94	123	0,46	51,7	13,8	26,6	453
Katze 20	21,8	8,62	116	0,41	47,7	13,5	28,2	531

(Leu = Leukozyten, Ery = Erythrozyten, Häm = Hämoglobin, Hkt = Hämatokrit, MCV = mean corpuscular volume, MCH = mean corpuscular haemoglobin, MCHC = mean corpuscular haemoglobin concentration, Thr = Thrombozyten)

2. Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung

2.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten haben relativ uneinheitliche Form und Größe. Der Durchmesser liegt im Durchschnitt bei 5,8 µm. Größenschwankungen zwischen 4 µm und 6 µm sind besonders dann zu beobachten, wenn es sich um einen dickeren Bereich des Ausstrichs handelt, d.h. die roten Blutzellen sehr dicht beieinander liegen. Am häufigsten sind neben runden bis ovalen Erythrozyten Zellen mit starker Einziehung der Oberfläche, die sogenannte „Stechapfelform“, zu finden. Die Erythrozyten sind kernlos, und enthalten keine Zellorganellen. Regelmäßig sieht man im Ausstrich auch die bei der Katze physiologische Geldrollenbildung der Erythrozyten, wie in Abbildung 3 dargestellt. Die Farbe des Zytoplasmas ist abhängig von der Art der Färbung die angewendet wurde:

- May-Grünwald: hellrot
- Giemsa: blassrötlich
- Pappenheim: rosarot
- Diff Quick: rosa

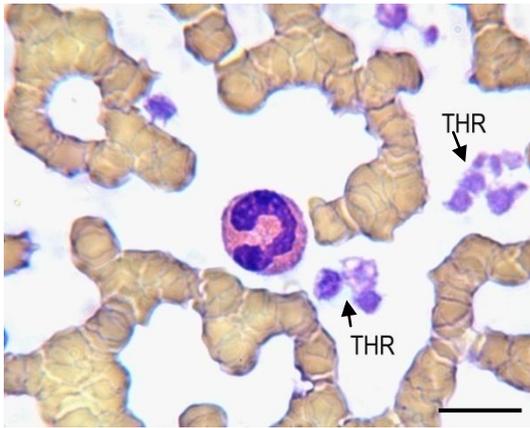


Abb. 3: Diff-Quick-Färbung
(Katze, w, 14 Jahre)
SB = 10 μm

Die hintereinander gelagerten Erythrozyten, die sogenannte Geldrollenbildung, ist gut zu erkennen. Neben den Erythrozyten und einigen Thrombozyten (THR) ist in der Bildmitte ein eosinophiler Granulozyt sichtbar.

2.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten sind kleine Zellfragmente mit einem mittleren Durchmesser von 2 μm bis 5 μm und unregelmäßiger Struktur. In der Regel sind sie scheibenförmig bis oval. Oft sind schmale Fortsätze zu erkennen. Sie besitzen keinen Zellkern, häufig ist aber eine zentrale Zone sichtbar die basophile Körnchen enthält, das sogenannte Granulomer. Dieses ist von einer schwach gefärbten Randzone, dem Hyalomer, umgeben. Vereinzelt findet man auch dort Granula. Oft sind die Thrombozyten zu Mikroaggregaten zusammengelagert. Farblich stellt sich das Zytoplasma bei den unterschiedlichen Färbemethoden wie folgt dar:

- May-Grünwald: blassblau
- Giemsa: lila, dunklerer Innenkörper
- Pappenheim: blau, violetter Innenkörper
- Diff Quick: kräftiges Lila

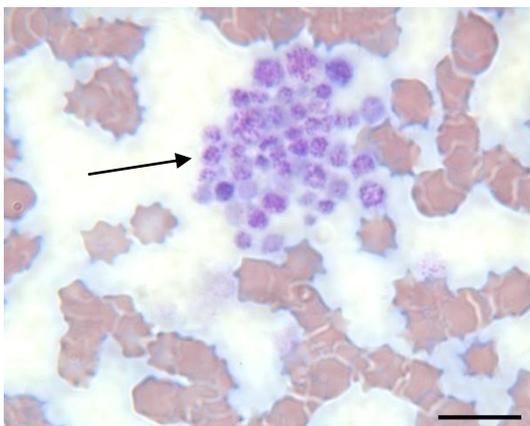


Abb. 4: Thrombozyten, Giemsa-Färbung,
(Katze, m, 5 Jahre)
SB = 10 μm

Unterschiedlich große Thrombozyten, die sich zu einem Mikroaggregat zusammengelagert haben (Pfeil).

2.3 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten haben eine runde Gestalt und sind im Mittel etwa 8–13 μm groß. Je nach der Form des Kernes können stabkernige und segmentkernige Granulozyten unterschieden werden. Die Kerne der stabkernigen Neutrophilen haben teilweise kleine Einbuchtungen, weisen jedoch keine Segmentierung auf und sind länglich und meist stark gebogen. Weitaus häufiger treten die segmentkernigen Neutrophilen auf. Ihr Kern ist zum Teil stark gelappt und weist meist zwei bis drei Segmente auf. Häufig ist gut zu erkennen, dass die einzelnen Kernabschnitte (= Segmente) durch fadenförmige Chromatinbrücken miteinander verbunden sind. Bei mehr als vier Segmenten spricht man von einer übersegmentierten Zelle. Die im Zytoplasma liegenden feinen neutrophilen Granula sind lichtmikroskopisch teilweise gerade noch erkennbar. Je nach Färbemethode färben sich Kern, Zytoplasma und Granula wie folgt:

- May-Grünwald: Zellkern: blau
Granula: feine hellrote bis violette Körnchen
Zytoplasma: hellblau
- Giemsa: Zellkern: blauviolett
Granula: braun-rötlich
Zytoplasma: bläulich-rosa
- Pappenheim: Zellkern: blauviolett
Granula: bläulich-rosa bis bräunlich
Zytoplasma: blaugrau
- Diff Quick: Zellkern: dunkelblau, violett
Granula: dunkellila
Zytoplasma: rosa-violett

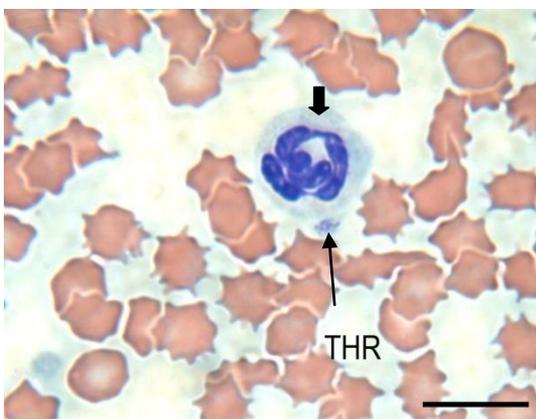


Abb. 5: Neutrophiler Granulozyt
May-Grünwald-Färbung
(Katze, m, 15 Jahre)
SB = 10 μm

Deutlich sichtbar ist die fadenförmige Verbindung zweier Segmente des Zellkerns. Im Zytoplasma sind die Granula gerade noch als feine hellrote Körnchen sichtbar (⬇).
THR = Thrombozyt

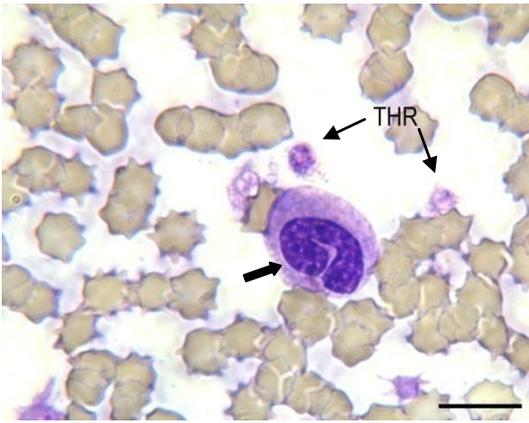


Abb. 6: Neutrophiler Granulozyt
Diff-Quick-Färbung
(Katze, m, 13 Jahre)
SB = 10 μ m

Ein stabkerniger neutrophiler Granulozyt. Im Zytoplasma sind feine Granulakörnchen sichtbar (Pfeil).
THR = Thrombozyt

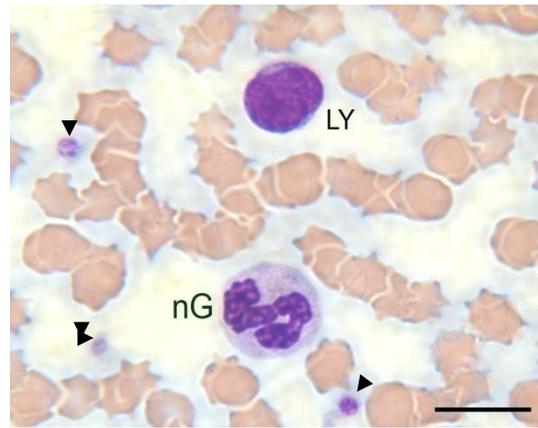


Abb. 7: Neutrophiler Granulozyt
Giemsa-Färbung
(Katze, m, 10 Jahre)
SB = 10 μ m

Neben dem neutrophilen Granulozyten (nG) sind ein großer Lymphozyt (LY) und einzelne Thrombozyten (▶) sichtbar. Die Geldrollenbildung der Erythrozyten ist bei Blutausstrichen der Katze normal.

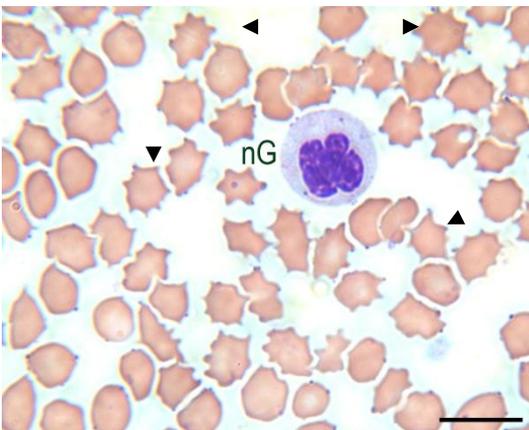


Abb. 8: Neutrophiler Granulozyt
Pappenheim-Färbung
(Katze, m, 15 Jahre)
SB = 10 μ m

Die Granula im Zytoplasma dieses neutrophilen Granulozyten (nG) sind kaum zu erkennen. Einige Erythrozyten weisen eine deutliche Stechapfelform auf (▶).

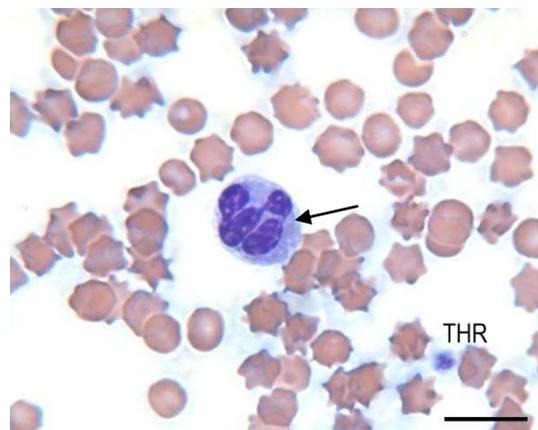


Abb. 9: Neutrophiler Granulozyt
May-Grünwald-Färbung
(Katze, m, 0,5 Jahre)
SB = 10 μ m

Ein neutrophiler Granulozyt mit deutlich mehrfach segmentiertem Zellkern (Pfeil).
THR = Thrombozyt

2.4 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten sind runde Zellen mit einem mittleren Durchmesser von 10–13 μm und einem meist hufeisenförmigen oder gelappten Zellkern. Sie treten gegenüber den neutrophilen Granulozyten in deutlich geringerer Anzahl auf, konnten aber in fast allen Blutausstrichen nachgewiesen werden. Kennzeichnend ist das Vorkommen zahlreicher kleiner, runder bis länglicher Granula, die das Zytoplasma nahezu vollständig ausfüllen und sich mit sauren Farbstoffen intensiv anfärben lassen. Die Strukturen der eosinophilen Granulozyten färben sich mit den verwendeten Methoden folgendermaßen an:

- May-Grünwald: Zellkern: blau
Granula: leuchtend ziegelrot
Zytoplasma: hellblau
- Giemsa: Zellkern: blauviolett
Granula: rötlich bis rotbraun
Zytoplasma: hellblau
- Pappenheim: Zellkern: blauviolett
Granula: rotbraun bis ziegelrot
Zytoplasma: blaugrau
- Diff Quick: Zellkern: dunkelblau, violett
Granula: rotbraun bis ziegelrot
Zytoplasma: blau

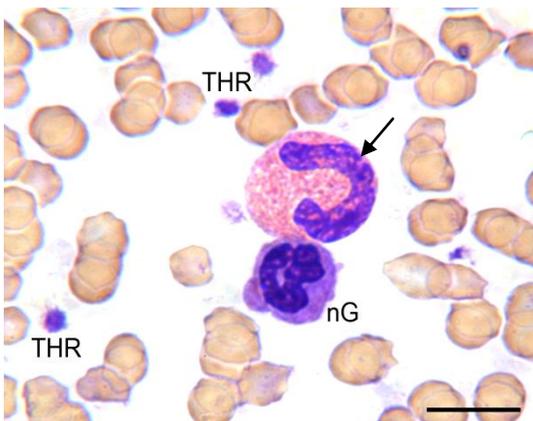


Abb. 10: Eosinophiler Granulozyt
Diff-Quick-Färbung
(Katze, m, 0,5 Jahre)
SB = 10 μm

Der blau gefärbte, hufeisenförmige Zellkern des eosinophilen Granulozyten wird zum Teil von den intensiv gefärbten Granula überdeckt (Pfeil).

nG = neutrophiler Granulozyt, THR = Thrombozyt

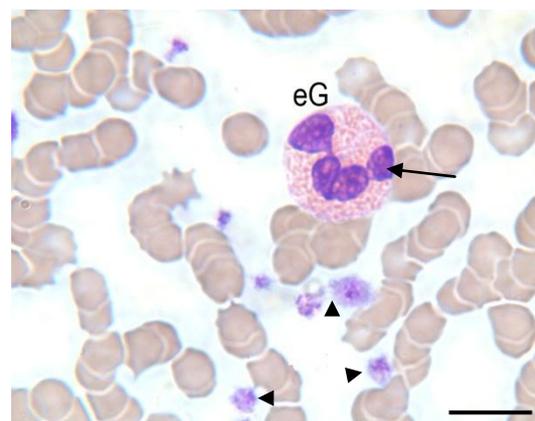


Abb. 11: Eosinophiler Granulozyt
Giemsa-Färbung
(Katze, w, 10 Jahre)
SB = 10 μm

Der Kern (Pfeil) dieses eosinophilen Granulozyten (eG) ist deutlich segmentiert. Thrombozyten (▶) unterschiedlicher Größe sind zu sehen.

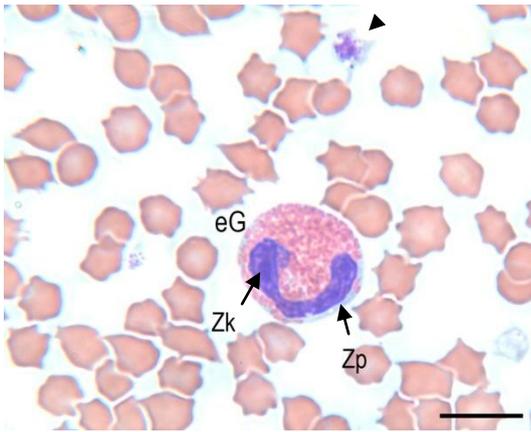


Abb. 12: Eosinophiler Granulozyt
May-Grünwald-Färbung
(Katze, m, 10 Jahre)
SB = 10 μ m

Die Granula füllen das Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (eG) nahezu vollständig aus. An einer Stelle ist zwischen dem Zellkern (Zk) und der Zellmembran ein schmaler Streifen hellblau gefärbten Zytoplasmas (Zp) sichtbar.

Zk = Zellkern, \blacktriangleright Thrombozyt

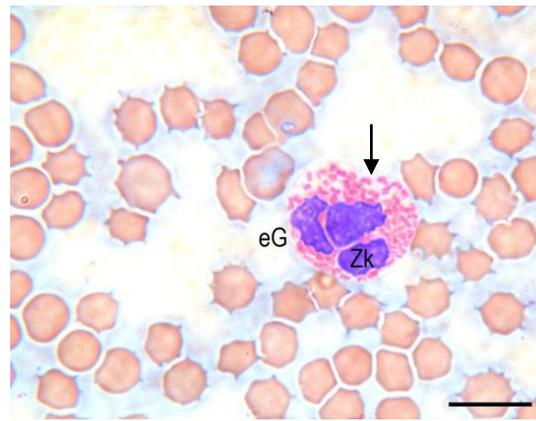


Abb. 13: Eosinophiler Granulozyt
Pappenheim-Färbung
(Katze, w, 11 Jahre)
SB = 10 μ m

Das Zytoplasma dieses eosinophilen Granulozyten (eG) ist nicht ganz so dicht mit Granula gefüllt, hier ist jedoch ihre teilweise leicht längliche Form zu erkennen (Pfeil).

Zk = Zellkern

2.5 Basophile Granulozyten

Ein basophiler Granulozyt war nur in einem Ausstrich zu finden. Es ist ebenfalls eine Zelle mit einer runden Form und einer Größe von etwa 10 μ m. Der Zellkern hat eine bohnenförmige Gestalt. Im Zytoplasma befinden sich die runden bis ovalen basophilen Granula, die zum Teil den Kern überdecken. Der basophile Granulozyt wurde in der May-Grünwald-Färbung gefunden. Für die Anfärbbarkeit der Strukturen liegt folgendes Ergebnis vor:

- May-Grünwald: Zellkern: blau
Granula: violett
Zytoplasma: blaugrau

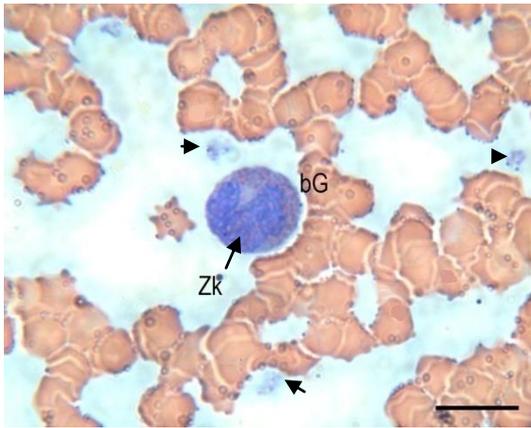


Abb. 14: Basophiler Granulozyt,
May-Grünwald-Färbung
(Katze, w, 14 Jahre)
SB = 10 μ m

Der Kern (Zk) dieses basophilen Granulozyten (bG) hat eine bohnenförmige Gestalt, und wird teilweise von den runden Granula überdeckt. Die Pfeile weisen auf Thrombozyten hin.

2.6 Monozyten

Die Monozyten sind mit bis zu 17 μ m Durchmesser die größten Zellen, die in den Blutausstrichen nur in geringer Anzahl gefunden wurden. Sie unterscheiden sich zum Teil erheblich in der Größe. Sie haben einen großen Kern, der nierenförmig oder unregelmäßig gelappt ist, aber nicht segmentiert erscheint. Meist liegt er exzentrisch und nimmt etwa die Hälfte der Zelle ein. Im Zytoplasma sind manchmal große zytoplasmatische Vakuolen sichtbar. Die einzelnen Strukturen der Monozyten stellen sich bei den verschiedenen Färbungen folgendermaßen dar:

- May-Grünwald: Zellkern: blau
Zytoplasma: hellblau
- Giemsa: Zellkern: rotviolett
Zytoplasma: blau
- Pappenheim: Zellkern: rotviolett
Zytoplasma: blaugrau
- Diff Quick: Zellkern: dunkelblau, violett
Zytoplasma: blau

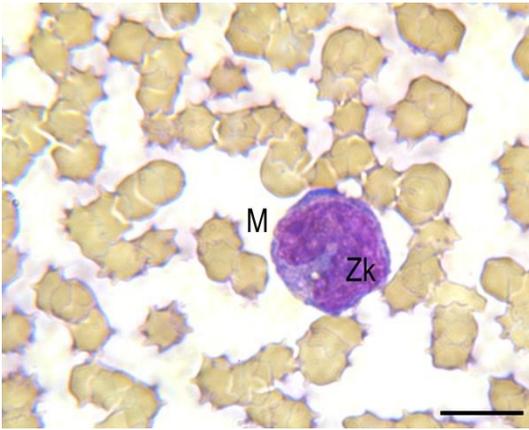


Abb. 15: Monozyt,
Diff-Quick-Färbung
(Katze, m, 13 Jahre)
SB = 10 μ m

Ein Monozyt (M) mit einem typischen hufeisenförmigen Kern (Zk), der einen Großteil der Zelle ausfüllt.

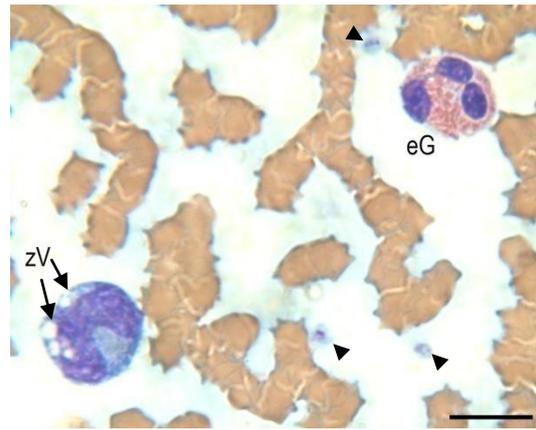


Abb. 16: Monozyt,
May-Grünwald-Färbung
(Katze, w, 3 Jahre)
SB = 10 μ m

Unten links ein Monozyt, mit mehreren zytoplasmatischen Vakuolen (zV). Oben rechts ein eosinophiler Granulozyt (eG) und einzelne Thrombozyten (▶).

2.7 Lymphozyten

In den Ausstrichen wurden kleine Lymphozyten mit einem Durchmesser von bis zu 8 μ m und große Lymphozyten mit einem Durchmesser von bis zu 15 μ m gefunden. Die kleinen Lymphozyten stellen den größeren Anteil dar. Beide Formen haben meist einen runden, chromatinreichen Kern, der von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben ist. Der Kern der großen Lymphozyten ist weniger kompakt und manchmal etwas egebuchtet. Folgende Ergebnisse zeigten die einzelnen Färbungen:

- May-Grünwald: Zellkern: blau
Zytoplasma: hellblau
- Giemsa: Zellkern: rotviolett
Zytoplasma: blau
- Pappenheim: Zellkern: rotviolett
Zytoplasma: blau
- Diff Quick: Zellkern: dunkelblau, violett
Zytoplasma: lila

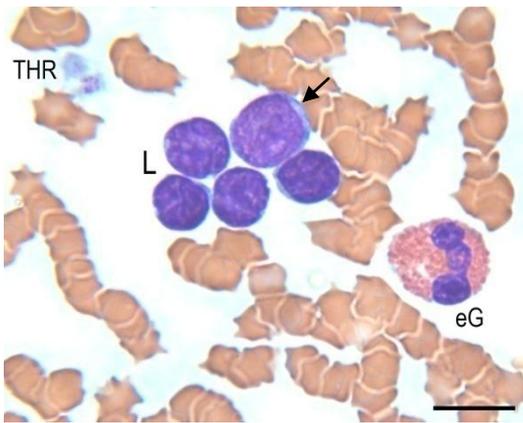


Abb. 17: Lymphozyten,
May-Grünwald-Färbung
(Katze, m, 10 Jahre)
SB = 10 μ m

Vier kleine und ein größerer Lymphozyt (L). Die Kerne sind rund und füllen das Zellinnere nahezu vollständig aus. Beim großen Lymphozyten ist ein schmaler Zytoplasmasaum zu erkennen (Pfeil).
THR = Thrombozyt, eG = eosinophiler Granulozyt

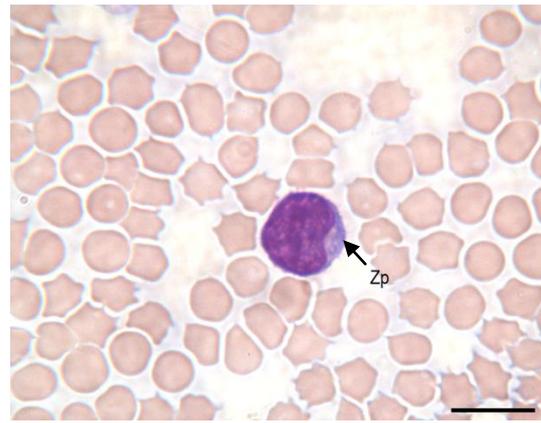


Abb. 18: Lymphozyt,
Giemsa-Färbung
(Katze, w, 14 Jahre)
SB = 10 μ m

Ein großer Lymphozyt mit einem leicht eingebuchteten Zellkern.
Zp = Zytoplasma

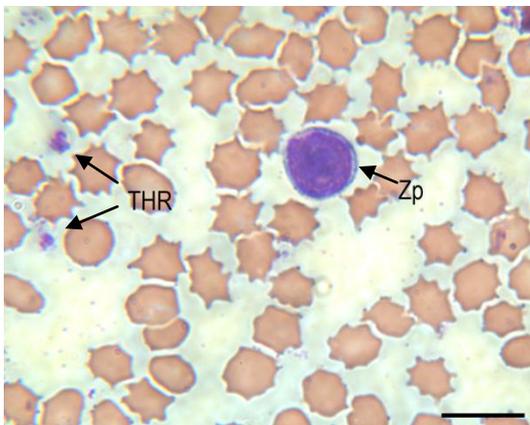


Abb. 19: Lymphozyt,
Pappenheim-Färbung
(Katze, m, 15 Jahre)
SB = 10 μ m

Ein Lymphozyt mit einem runden Zellkern und einem schmalen Zytoplasmasaum.
THR = Thrombozyt, Zp = Zytoplasma

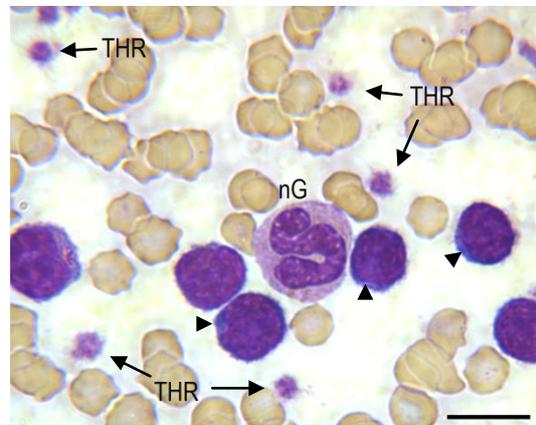


Abb. 20: Lymphozyten,
Diff-Quick-Färbung
(Katze, m, 0,5 Jahre)
SB = 10 μ m

Mehrere kleine Lymphozyten mit kräftig blau gefärbtem Zytoplasma (►). In der Bildmitte befindet sich ein leicht segmentierter neutrophiler Granulozyt (nG).
THR = Thrombozyt

Die Ergebnisse der vier Übersichtsfärbungen werden in Tab. 8 noch einmal zusammenfassend dargestellt:

	May-Grünwald	Giemsa	Pappenheim	Diff Quick
Erythrozyten				
Zytoplasma	hellrot	blassrötlich	rosarot	rosa
Thrombozyten				
Zytoplasma	blassblau	lila, dunklerer Innenkörper	blau, violetter Innenkörper	kräftiges Lila
Neutrophile Granulozyten				
Zellkern	blau	blauviolett	blauviolett	dunkelblau, violett
Zytoplasma	hellblau	bläulich-rosa	blaugrau	rosaviolett
Granula	hellrot, violett	rötlich	bläulich rosa bis bräunlich	dunkellila
Eosinophile Granulozyten				
Zellkern	blau	blauviolett	blauviolett	dunkelblau, violett
Zytoplasma	hellblau	hellblau	blaugrau	blau
Granula	leuchtend ziegelrot	rötlich bis rotbraun	rotbraun bis ziegelrot	rosarot
Basophile Granulozyten				
Zellkern	blau			
Zytoplasma	blaugrau			
Granula	violett			
Monozyten				
Zellkern	blau	violett	rotviolett	dunkelblau, violett
Zytoplasma	hellblau	blau	blaugrau	blau
Lymphozyten				
Zellkern	blauviolett	violett	rotviolett	dunkelblau, violett
Zytoplasma	blau	blau	blau	lila, blau

3. Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchung

3.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten sind die unauffälligsten Zellen unter dem Elektronenmikroskop. Sie weisen eine unregelmäßige, grundsätzlich aber runde bis ovale Form auf. Häufig scheint sich ihre Form der Kontur benachbarter Zellen anzupassen. Ihre Oberfläche erscheint glatt und weist keine Ausstülpungen oder Mikrovilli auf. Ihr Zytoplasma stellt sich dunkel homogen, und ohne das Vorkommen von Zellorganellen dar. Die hohe Elektronendichte des Zytoplasmas beruht auf den Eisenatomen des Hämoglobins, welches den größten Teil der Trockensubstanz der Erythrozyten ausmacht.

3.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind zahlreich vertreten. Sie sind in der Regel kleiner als die benachbarten Zellen. Im Zytoplasma sind Partikel unterschiedlicher Größe und Elektronendichte enthalten, man findet α -Granula, Lysosomen und Mitochondrien. Sehr kleine, stark elektronendichte Partikel von ca. 0,05 μm Größe, die oft zusammengelagert auftreten, stellen Glykogen-Partikel dar. Regelmäßig zu finden sind auch stark elektronendichte Granula, die sogenannten „dense bodies“. Teilweise sind Vesikel oder Vakuolen sichtbar, welche zum offenen kanalikulären System gehören.

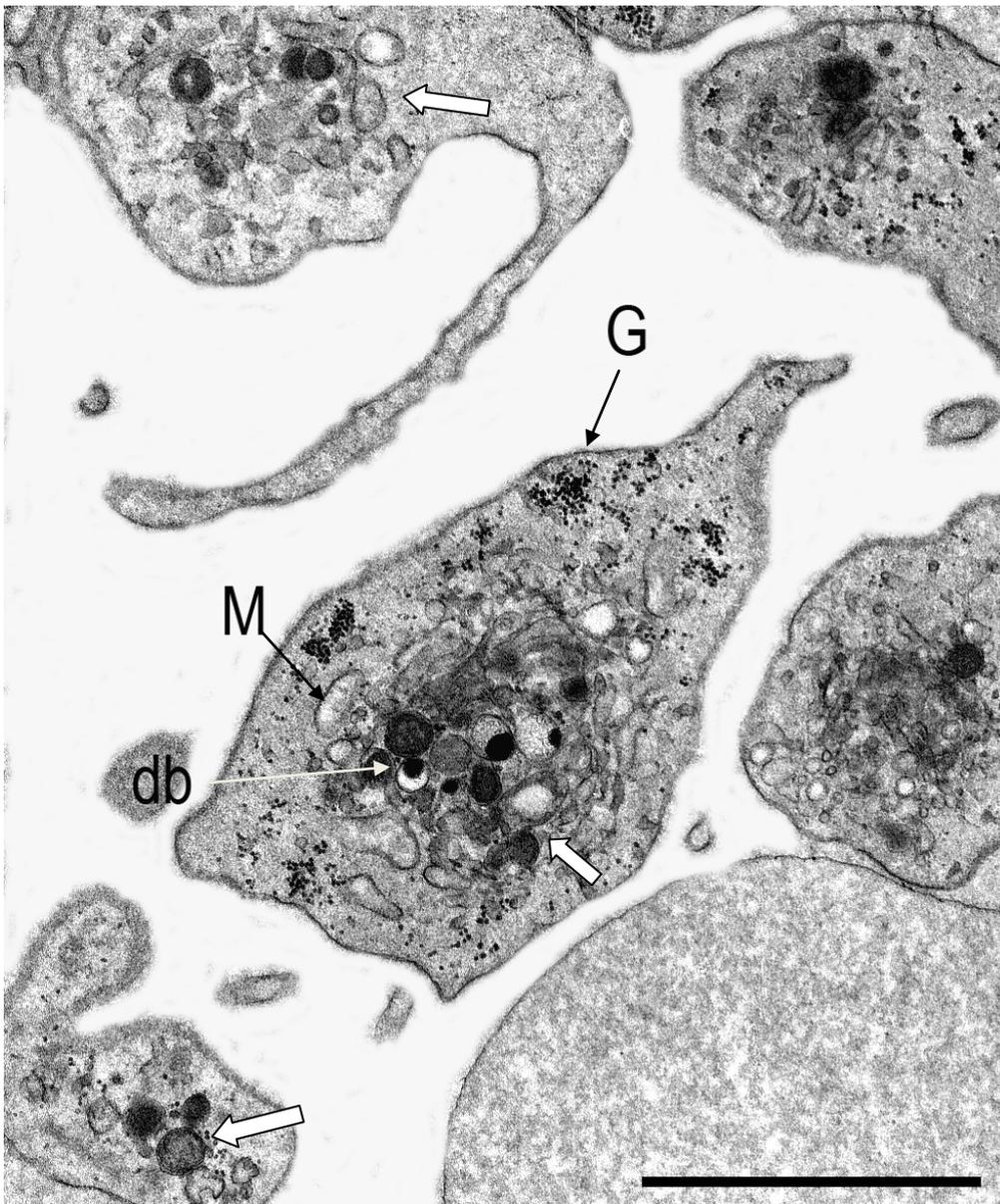


Abb. 21: Thrombozyten

Mehrere Thrombozyten mit sehr unregelmäßigen, pleomorphen Strukturen. Im Zytoplasma sind α -Granula unterschiedlicher Größe und Elektronendichte zu sehen (weiße Pfeile), ebenso Glykogen-Partikel (G), elektronendichte Granula (db) und vereinzelt Mitochondrien (M).
SB = 4 μ m

3.3 Neutrophile Granulozyten

Die Kerne der neutrophilen Granulozyten sind stark heterochromatisch. Euchromatin findet sich nur in den zentralen Arealen und ist von einer dicken Schicht Heterochromatin umgeben. Bei den meisten Zellen sind in der jeweiligen Schnittebene zwei bis drei Kernsegmente sichtbar. Die äußere Form der Neutrophilen ist insgesamt relativ unregelmäßig, tendenziell stellen die Zellen sich oval bis rund dar. Im Zytoplasma sind außer den zahlreichen Granula lediglich noch wenige Mitochondrien sichtbar. Golgi-Apparat und raues ER sind unscheinbar. Bei den Granula lassen sich größere und kleinere Granula unterscheiden, die eine runde bis ovale Form aufweisen. Die größeren sind teils homogen und elektronendicht, teils aber auch weniger elektronendicht mit kristallinen Strukturen. Manche scheinen gar kein elektronendichtes Material zu enthalten, sind sozusagen „leer“. Die kleineren Granula haben in der vorliegenden Vergrößerung eine homogene Innenstruktur. Sie stellen die sekundären Granula der Neutrophilen dar, sind aber ohne spezielle enzymhistochemische Untersuchungen nicht sicher von den primären Granula zu unterscheiden.

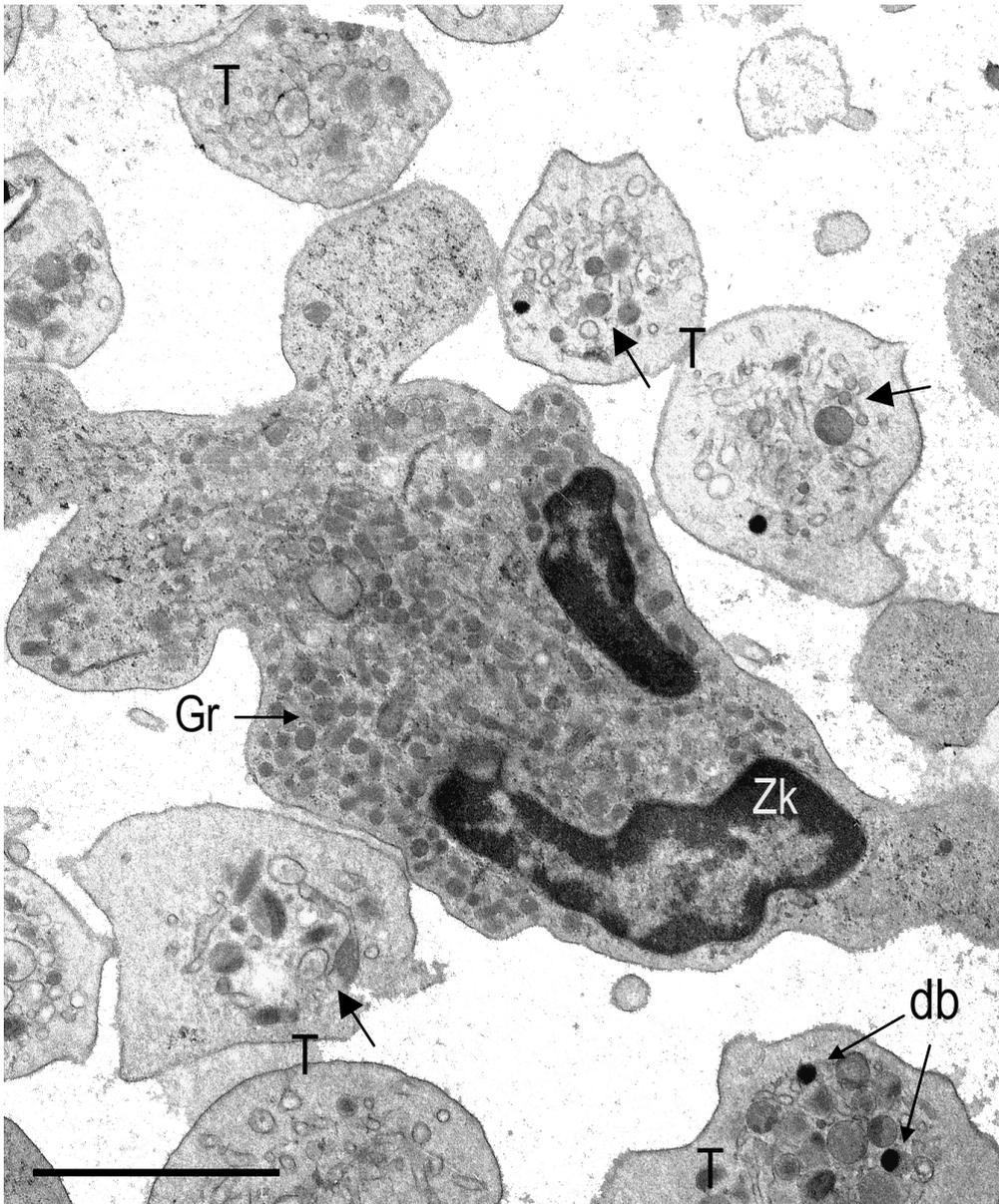


Abb. 22: Neutrophiler Granulozyt

Ein neutrophiler Granulozyt mit einer sehr unregelmäßigen äußeren Form. Vom Zellkern (Zk) sind in dieser Schnittebene zwei Segmente dargestellt. Im Zytoplasma sind zahlreiche runde bis ovale, homogen erscheinende Granula (Gr) sichtbar. Eine deutliche Unterscheidung in große und kleine, und somit primäre und sekundäre Granula ist nicht möglich. Umgeben ist der Neutrophile von mehreren Thrombozyten. In ihrem Zytoplasma sind unterschiedlich große und homogene Granula (Pfeile), und einige dense bodies (db) sichtbar.

T = Thrombozyt

SB = 4 μ m

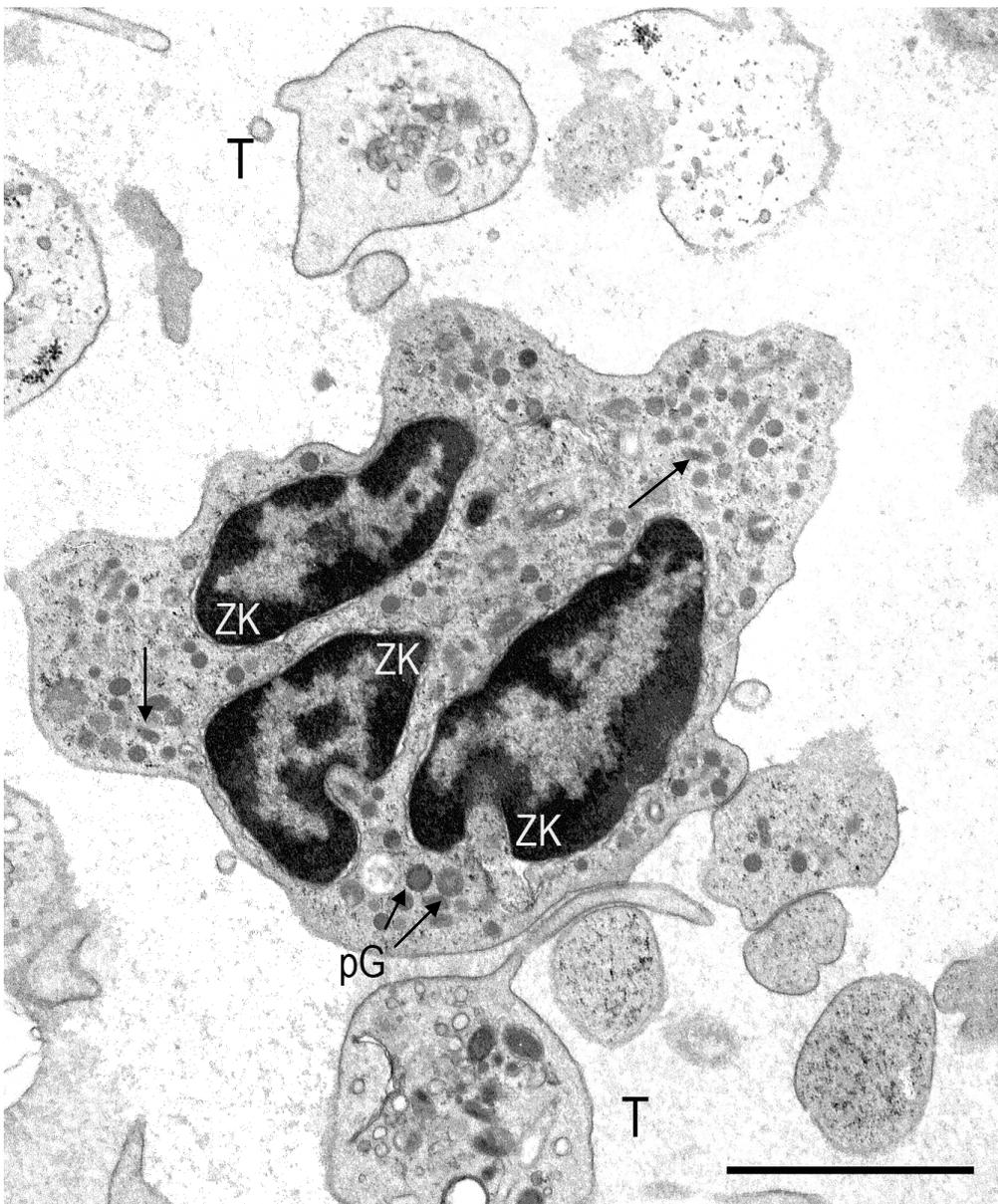


Abb. 23: Neutrophiler Granulozyt

Ein segmentierter neutrophiler Granulozyt. In allen drei Kernsegmenten liegt das verdichtete Heterochromatin peripher entlang der Zellkernmembran. In den zentralen Arealen findet sich das wenig elektronendichte Euchromatin. Im Zytoplasma sind zahlreiche Granula sichtbar. Bei einigen länglichen, hantelförmigen Granula könnte es sich um sekundäre Granula handeln (Pfeile).

T = Thrombozyt, ZK = Zellkern, pG = primäre Granula

SB = 4 μ m

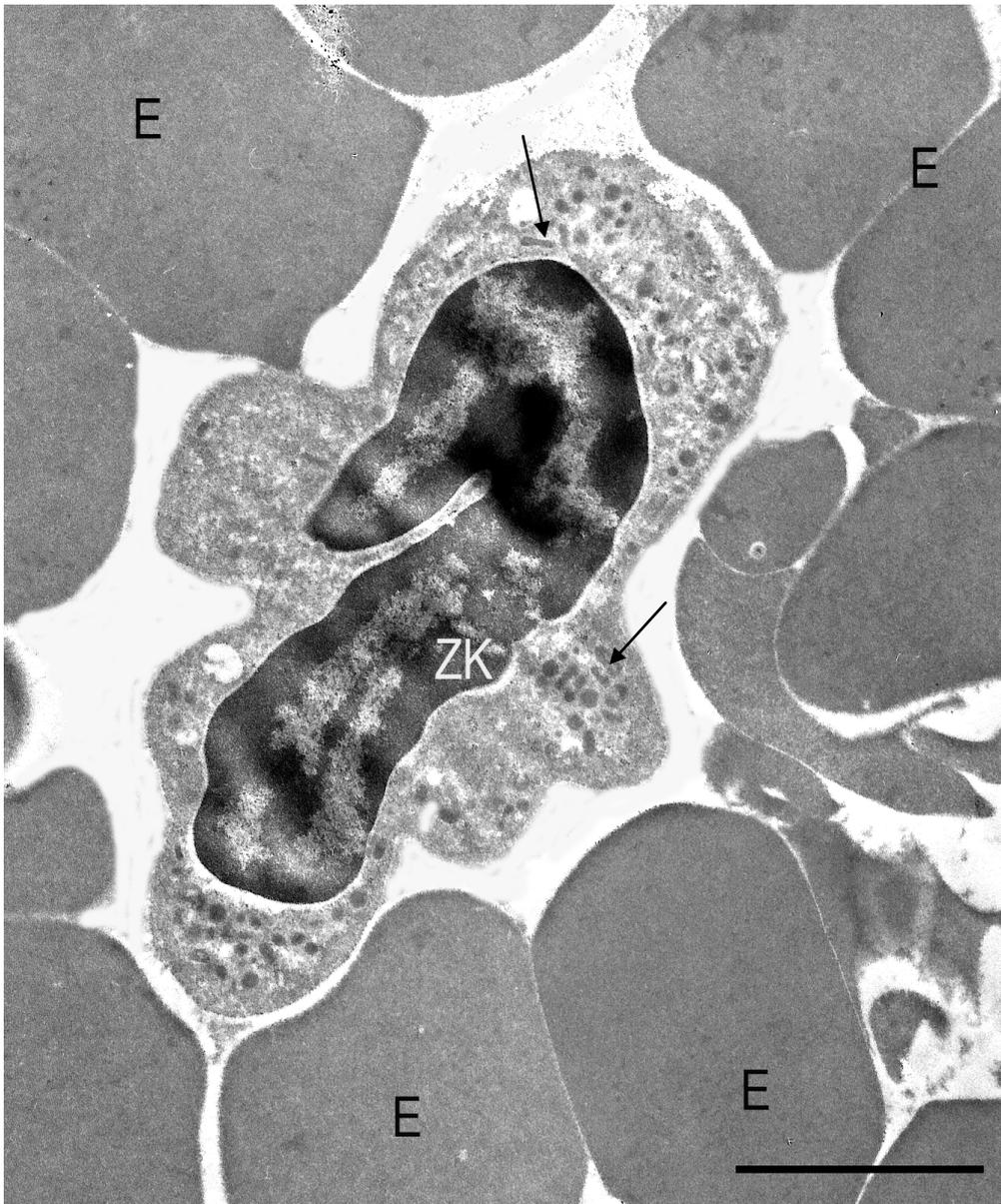


Abb. 24: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt

Ein stabkerniger neutrophiler Granulozyt, mit stark verdichtetem Kernchromatin. Im Zytoplasma sind relativ wenige runde, zum Teil auch hantelförmige Granula (Pfeile) zu sehen.

E = Erythrozyt, ZK = Zellkern

SB = 4 μm

3.4 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten haben eine runde bis ovale Form und eine unregelmäßige Oberfläche, die zum Teil kurze Pseudopodien ausbildet. Im elektronenmikroskopischen Bild können verschiedene Granulatypen unterschieden werden. Am häufigsten sind relativ große Granula, mit einer meist runden, ovalen, zum Teil auch länglichen Form und einer heterogenen Innenstruktur, wobei sich meist zwei Kompartimente unterscheiden lassen. Die Granula enthalten einen elektronendichten, kristalloiden Kern, der in seiner Dichte, Form und Größe variieren kann. Er stellt sich zum Teil ringförmig da, kann aber auch eine längliche Gestalt annehmen. Dieses Kristalloid wird von einer helleren, weniger elektronendichten Matrix umgeben. Vereinzelt Granula enthalten helle Vesikel, die von einem schmalen Rand von elektronendichtem Material umgeben sind. Daneben finden sich sehr viel kleinere, homogene Granula, die weniger zahlreich sind, keine Kristalloide enthalten und somit weniger elektronendicht erscheinen.

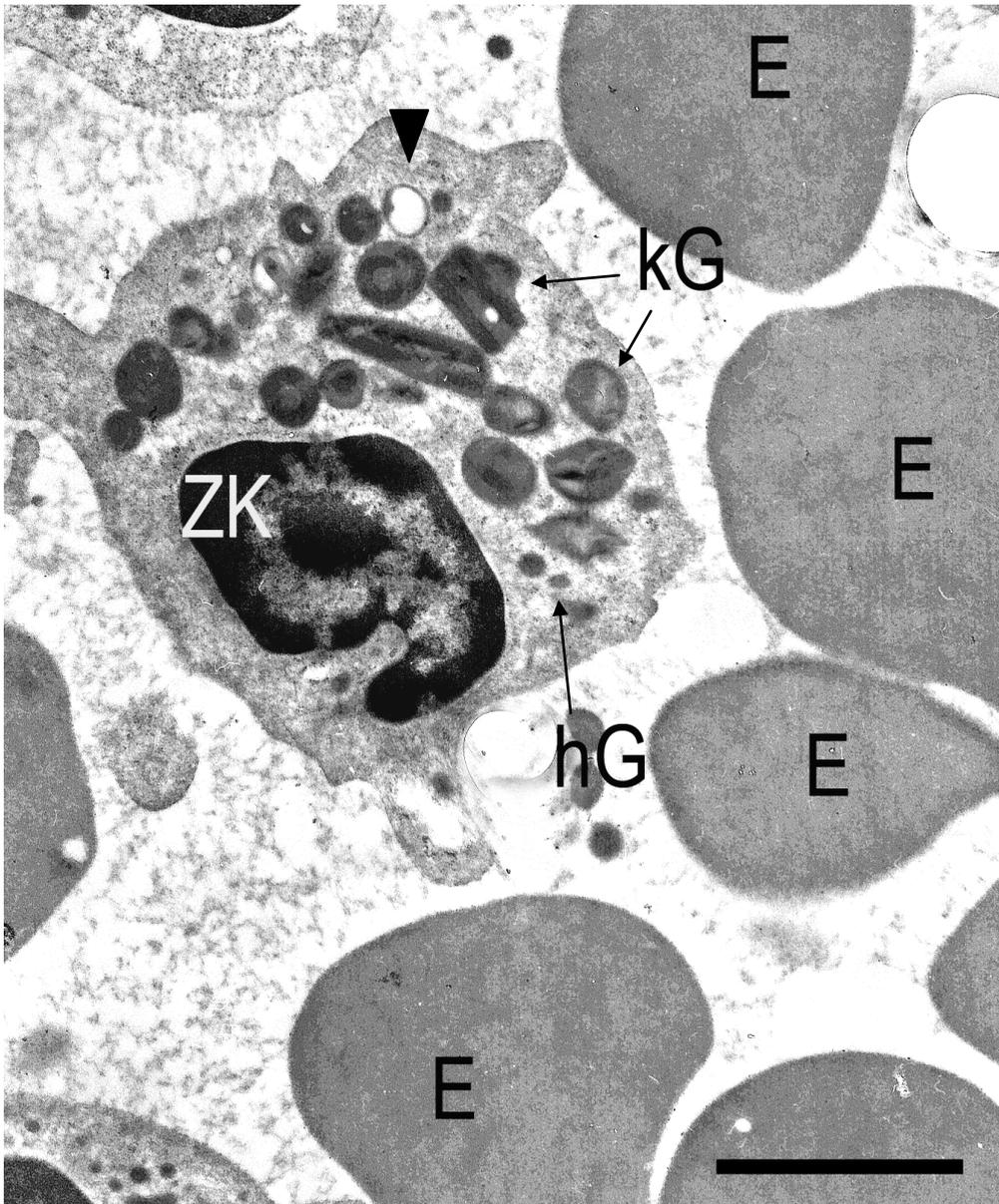


Abb. 25: Eosinophiler Granulozyt

Im Zytoplasma sind unterschiedliche Granula sichtbar: die typischen kristalloiden, runden oder länglichen Granula (kG), sehr viel kleinere Granula mit homogener Struktur (hG), und helle Vesikel, umgeben von einem schmalen Rand elektronendichten Materials (▶).

ZK = Zellkern, E = Erythrozyt

SB = 4 μm

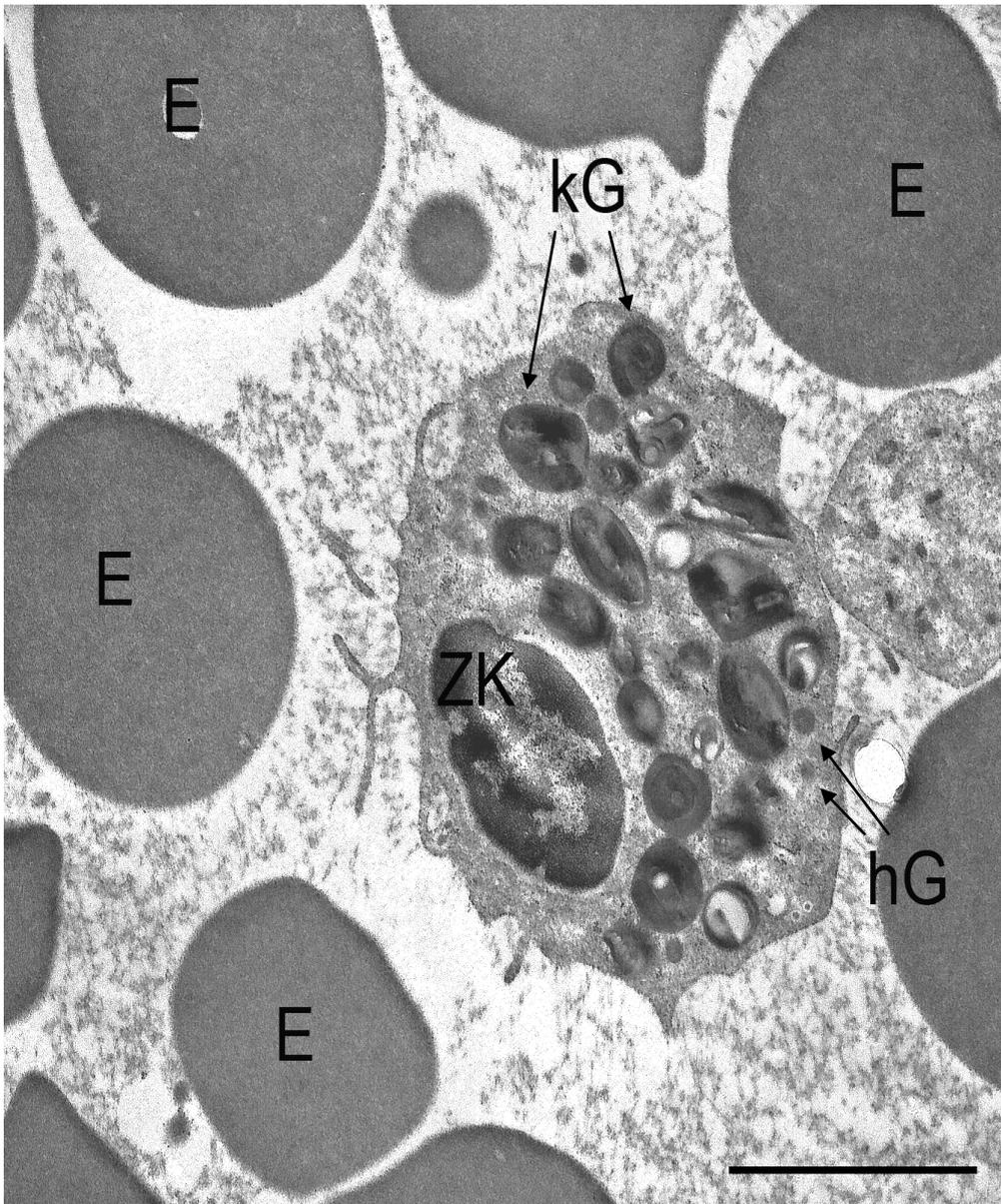


Abb. 26: Eosinophiler Granulozyt

Ein eosinophiler Granulozyt mit zahlreichen kristalloiden Granula (kG) unterschiedlicher Größe und Form. Ebenfalls sichtbar sind einige kleine, homogene Granula (hG).

ZK = Zellkern, E = Erythrozyt

SB = 4 μm

3.5 Basophile Granulozyten

In den untersuchten Proben konnten unter dem Elektronenmikroskop keine basophilen Granulozyten sicher nachgewiesen werden.

3.6 Monozyten

In der vorliegenden Arbeit konnten in den präparierten Elektronenmikroskopie-Proben Monozyten nicht sicher nachgewiesen, und somit nicht beschrieben werden.

3.7 Lymphozyten

Die Lymphozyten haben eine runde Form, mit einigen wenigen kurzen Mikrovilli auf ihrer Oberfläche. Sie besitzen einen großen Zellkern, der meist nahezu die gesamte Zelle ausfüllt. Der Kern erscheint wie im Lichtmikroskop rund, weist aber unter dem Elektronenmikroskop deutliche Einziehungen auf. Er besteht zu ca. 50% aus Euchromatin, das von einer breiten Zone von Heterochromatin umgeben wird. Teilweise sind auch größere heterochromatische Bereiche im zentralen Anteil des Zellkerns erkennbar. Im Unterschied zu lichtmikroskopischen Befunden ist nicht selten ein gut ausgebildeter Nucleolus zu sehen. Im überwiegend schmalen Zytoplasmasaum sind vor allem freie Ribosomen, die als kleine, dichte Partikel zu erkennen sind, und einzelne Mitochondrien zu finden.

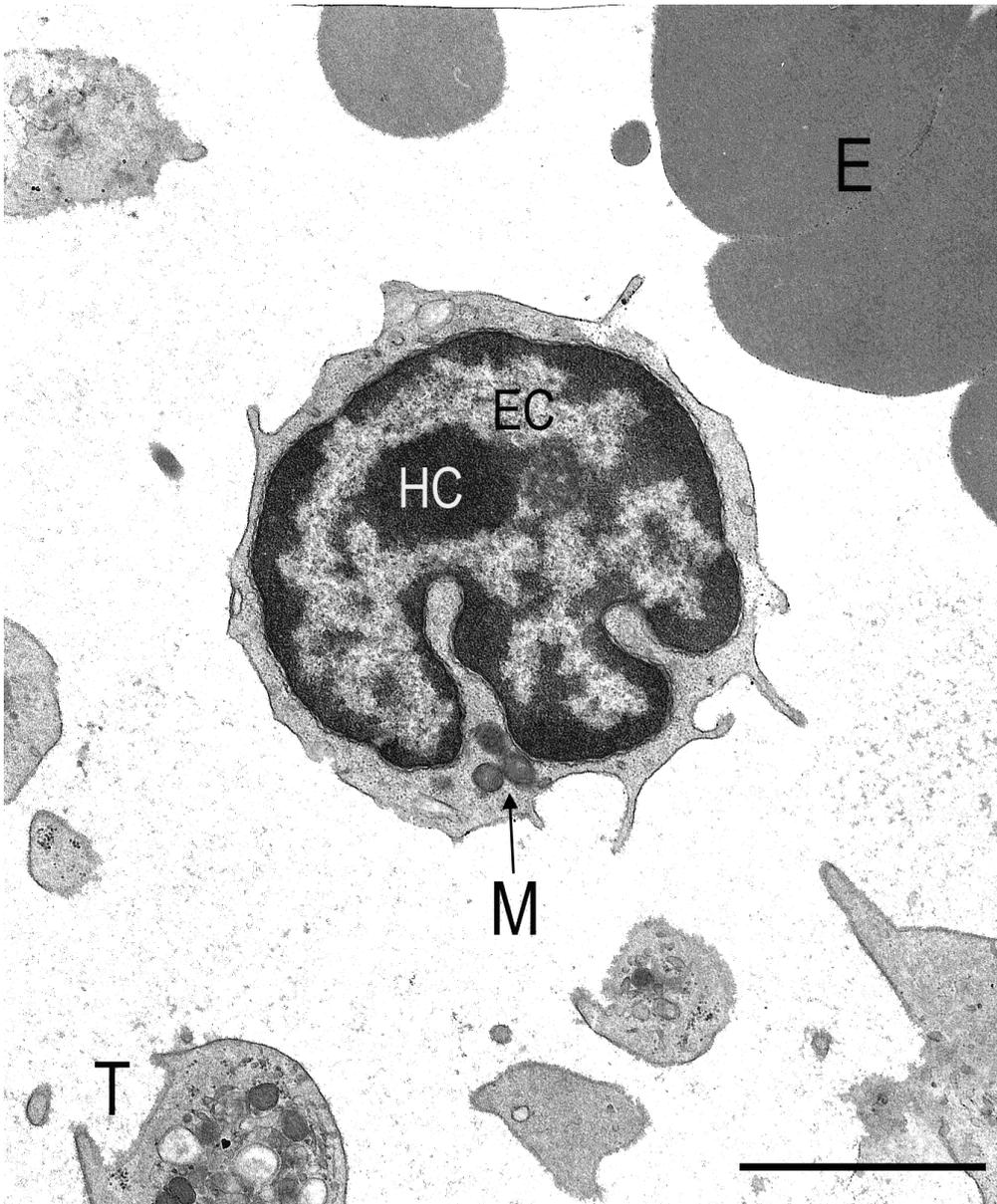


Abb. 27: Lymphozyt

Ein Lymphozyt, dessen Zytoplasma nahezu vollständig vom Zellkern ausgefüllt wird. Der Zellkern ist beinahe rund, mit zwei Einziehungen. Im Zytoplasma sind sehr kleine, dichte Partikel, die Ribosomen, und Mitochondrien (M) sichtbar. T = Thrombozyt, E = Erythrozyt, EC = Euchromatin, HC = Heterochromatin
SB = 4 μ m

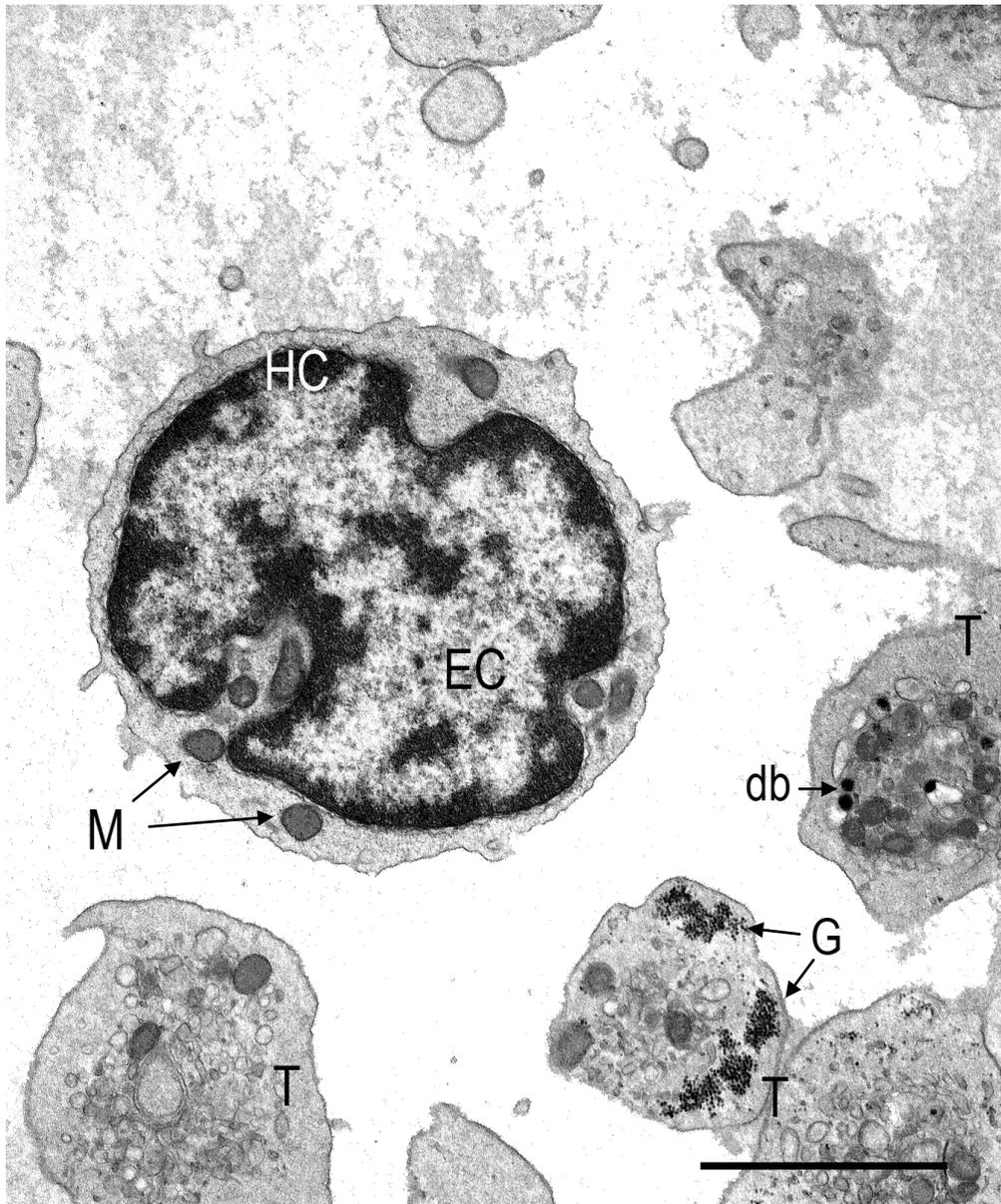


Abb. 28: Lymphozyt

Im Zytoplasma des Lymphozyten befinden sich mehrere Mitochondrien (M). Der Kern weist kleine Einziehungen auf und enthält vor allem entlang der Zellkernmembran verdichtetes Heterochromatin (HC). Der Euchromatinanteil (EC) überwiegt bei der hier dargestellten Zelle aber deutlich. Neben dem Lymphozyten sind mehrere Thrombozyten (T) sichtbar. Einer enthält größere Mengen Glykogen (G) im Zytoplasma, ein anderer mehrere dense bodies (db).
SB = 4 μ m

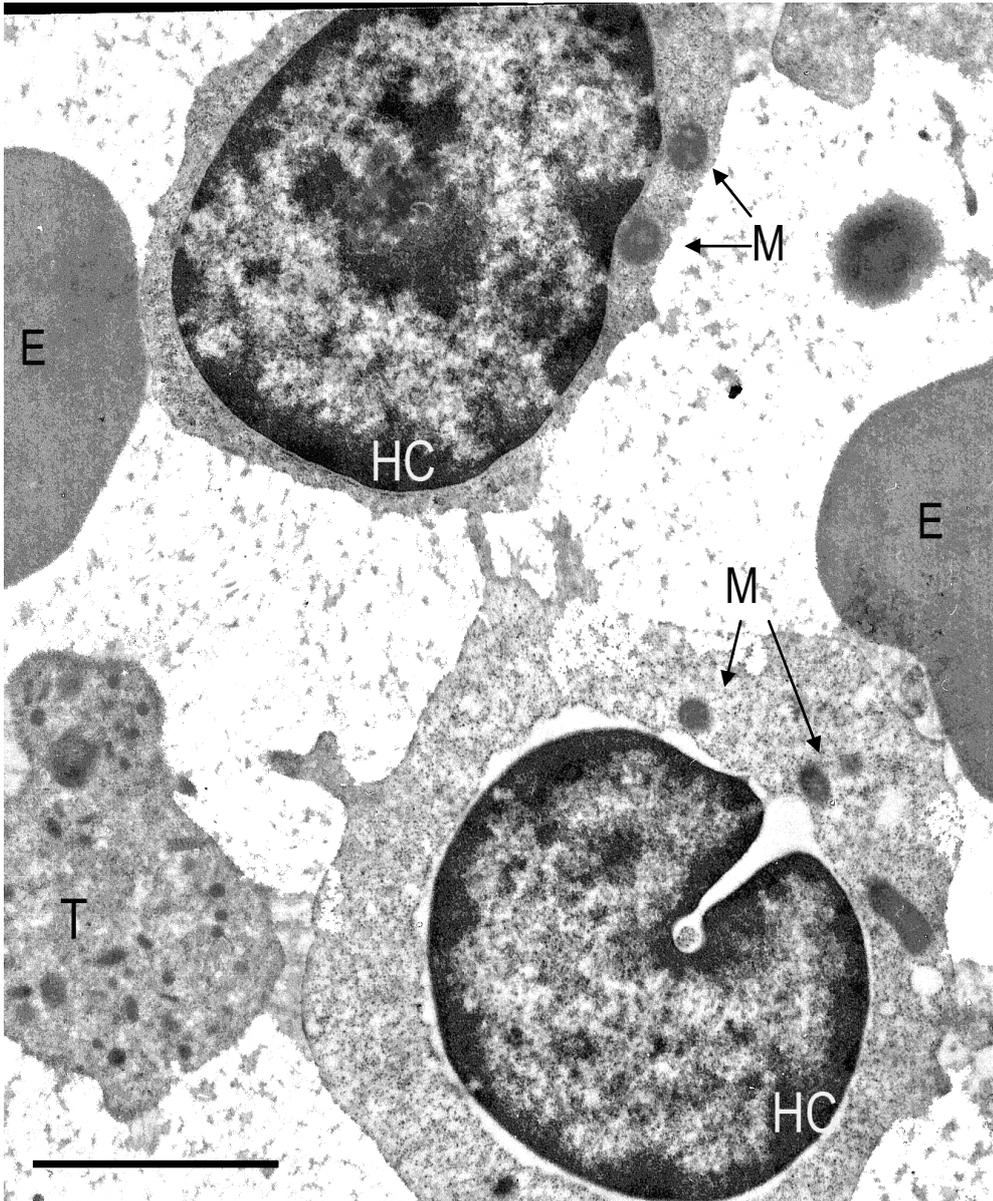


Abb. 29: Lymphozyten

Ein Lymphozyt (oben) mit schmalem, ein weiterer (unten) mit etwas breiterem Zytoplasmasaum. Beide enthalten zahlreiche Ribosomen (kleine elektronendichte Partikel) im Zytoplasma. Das Heterochromatin (HC) befindet sich hauptsächlich entlang der Zellkernmembran.

T = Thrombozyt, E = Erythrozyt, M = Mitochondrien

SB = 4 μm

4. Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchung

Bei den glykohistochemischen Untersuchungen wurde beurteilt, ob und an welche Blutzellen bzw. an welche Zellstrukturen das Lektin gebunden hatte. Bei einer positiven Reaktion wurde eine semiquantitative Bewertung in schwach positiv (+), deutlich positiv (++) und stark positiv (+++) vorgenommen. Jede Zellart die eine positive Reaktion aufwies, wurde über eine repräsentative Anzahl im Ausstrich ausgewertet und der Kategorie der Stärke der Reaktion zugeordnet, deren Vorkommen am häufigsten ermittelt werden konnte. Anschließend wurden die Ergebnisse für die einzelnen Tiere in einer Tabelle zusammengefasst, die eine Übersicht über die Reaktion der einzelnen Blutzellen und ihrer Strukturen mit dem jeweiligen Lektin gibt. Diese Übersichtstabellen werden im Folgenden zu jedem Lektin angegeben. Grundsätzlich wurden jeweils 20 Blutausstriche mit den FITC-gekoppelten Lektinen behandelt und jeweils 10 Blutausstriche mit den in dieser Arbeit verwendeten biotinylierten Lektinen. In manchen Fällen konnten jedoch nicht alle 20 Ausstriche ausgewertet werden, da ihre Qualität nicht ausreichend war. Auch wurden nicht in jedem Ausstrich immer alle Zellarten gefunden. Daher enthalten die Tabellen zusätzlich eine Angabe zur Anzahl der Präparate, die ausgewertet werden konnten. Die prozentualen Angaben zu den negativen bzw. positiven Reaktionen beziehen sich somit auf die Anzahl der tatsächlich ausgewerteten Blutausstriche.

4.1 Für GlcNAc/βGlcNAc spezifische Lektine

4.1.1 WGA – Wheat germ Agglutinin

Die Membran der Erythrozyten aller untersuchten Blutausstriche zeigt eine überwiegend schwache Reaktion mit dem Lektin WGA, während das Zytoplasma keine Bindung aufweist. Die Granula der Thrombozyten zeigen bei fast allen Tieren schwache bis deutliche Reaktionen mit WGA, das Zytoplasma reagiert überwiegend schwach mit dem Lektin und weist bei einem Drittel der Tiere gar keine Bindung auf. Ebenfalls eine lediglich schwach positive Reaktion zeigt die Zellmembran der Lymphozyten der meisten Tiere, und die Zellmembran der Monozyten auf. Die Granula der eosinophilen Granulozyten weisen in der Regel eine stark positive Reaktion auf. Weiterhin reagierten bei einem Großteil der Tiere die Granula der neutrophilen Granulozyten überwiegend schwach mit WGA, das Zytoplasma aber deutlich positiv. Basophile Granulozyten konnten in keinem der Ausstriche sicher identifiziert werden.

Tab. 9: Übersicht über die Bindung des Lektins WGA

WGA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
Erythrozyten					
Zellmembran	0	18 (94,7%)	1 (5,3%)	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Thrombozyten					
Zellmembran	6 (31,6%)	12 (63,1%)	1 (5,3%)	0	19 (95%)
Granula	1 (5,3%)	9 (47,4%)	9 (47,4%)	0	19 (95%)
Lymphozyten					
Zellmembran	3 (15,8%)	16 (84,2%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	0	3 (15,8%)	14 (73,7%)	2 (10,5%)	19 (95%)
Granula	0	14 (73,7%)	4 (21%)	1 (5,3%)	19 (95%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	12 (100%)	0	0	0	12 (60%)
Zytoplasma	1 (8,3%)	11 (91,7%)	0	0	12 (60%)
Granula	0	0	1 (8,3%)	11 (91,7%)	12 (60%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	0	1 (100%)	0	0	1 (5%)
Zytoplasma	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)

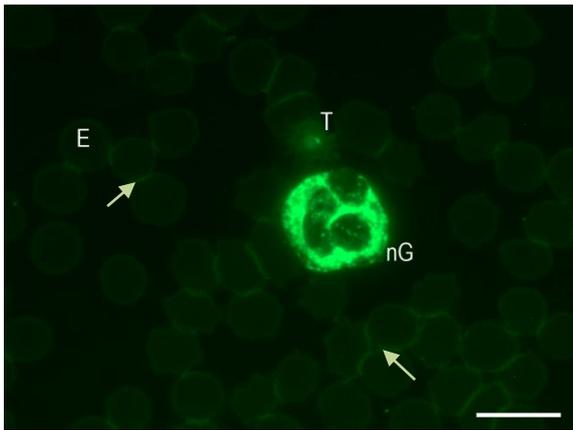


Abb. 30: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 10 Jahre),
WGA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (nG) weisen eine stark positive Reaktion auf. Auch die Granula des Thrombozyten (T) haben das Lektin gebunden, ebenso die Membran (Pfeile) der Erythrozyten (E).

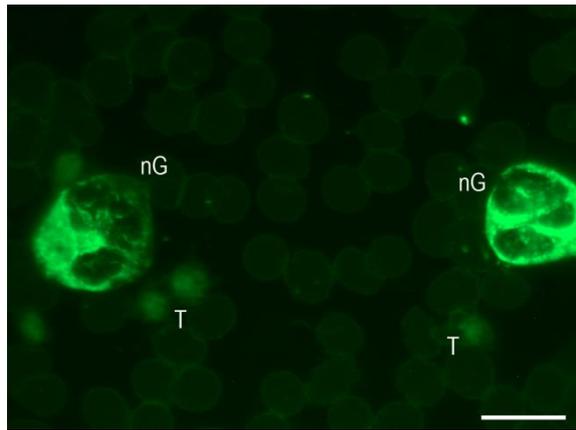


Abb. 31: Neutrophile Granulozyten
(Katze, w, 14 Jahre)
WGA-FITC
SB = 10 μ m

Zwei neutrophile Granulozyten (nG) mit starker Fluoreszenz der Granula. Die Granula der Thrombozyten (T) reagieren leicht positiv mit dem Lektin.

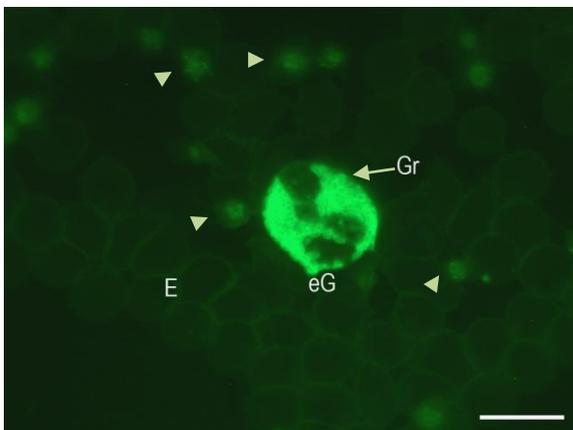


Abb. 32: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 5 Jahre)
WGA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten (eG) haben das Lektin gebunden. Ebenso eine deutlich positive Reaktion zeigen die Granula der Thrombozyten (Pfeile) sowie teilweise die Membran der Erythrozyten (E).

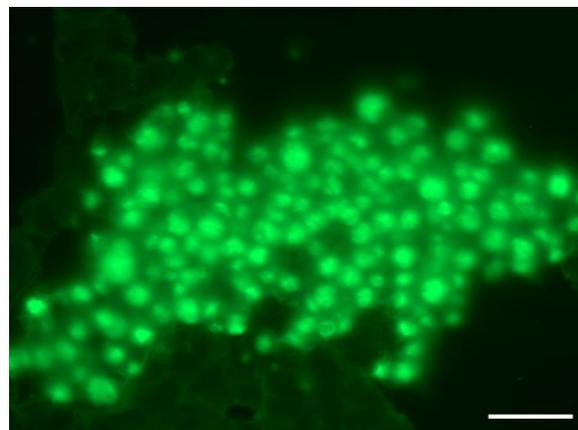


Abb. 33: Thrombozyten
(Katze, m, 13 Jahre)
WGA-FITC
SB = 10 μ m

Ein Thrombozytenaggregat mit deutlicher Bindung von WGA-FITC.

4.1.2 WGAs – Wheat germ Agglutinin succinyliert

Das Lektin WGAs zeigt ähnliche Bindungseigenschaften wie WGA. Bei fast allen Tieren reagierte auch hier die Zellmembran der Erythrozyten schwach positiv mit dem Lektin, nur in einem Ausstrich war das Ergebnis negativ. Die Zellmembran der Thrombozyten wies bei der Hälfte der Ausstriche keine Reaktion auf, die andere Hälfte zeigte eine schwache Bindung von WGAs. Die Granula der Thrombozyten reagierten überwiegend schwach, bei einigen Tieren auch deutlich positiv. Eine schwach positive Reaktion zeigte bei fast allen Tieren die Zellmembran der Lymphozyten, nur zwei Ausstriche waren negativ. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten reagierte bei den meisten Tieren schwach positiv mit WGAs, bei den übrigen deutlich positiv, während die Granula eine überwiegend deutliche bis zum Teil starke Bindung des Lektins aufwiesen. Die Granula der eosinophilen Granulozyten, die in vielen Ausstrichen gefunden wurden, zeigten ebenfalls eine hohe Affinität zu WGAs. Die meisten wiesen eine starke bis deutliche Reaktionen auf. Basophile Granulozyten und Monozyten konnten bei diesem Lektinnachweis nicht sicher identifiziert werden.

Tab. 10: Übersicht über die Bindung des Lektins WGAs

WGAs	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	1 (5%)	19 (95%)	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	10 (50%)	10 (50%)	0	0	20 (100%)
Granula	2 (10%)	13 (65%)	5 (25%)	0	20 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	2 (10,5%)	17 (89,5%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	0	17 (85%)	3 (15%)	0	20 (100%)
Granula	0	0	15 (75%)	5 (25%)	20 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	15 (100%)	0	0	0	15 (75%)
Zytoplasma	9 (60%)	6 (40%)	0	0	15 (75%)
Granula	0	1 (6,7%)	5 (33,3%)	9 (60%)	15 (75%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0

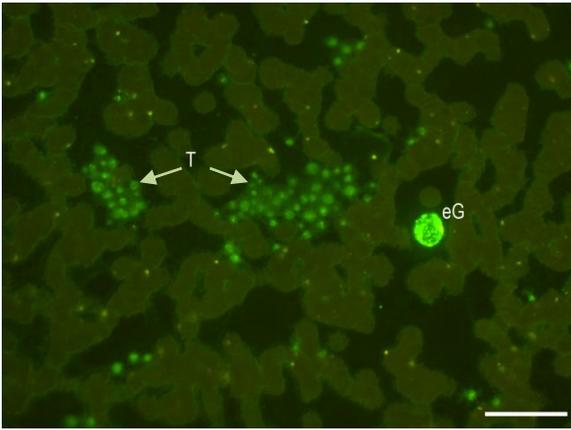


Abb. 34: Eosinophiler Granulozyt
(Katze)
WGAs-FITC
SB = 20 μ m

Ein eosinophiler Granulozyt (eG) und zwei Thrombozytenaggregate (T) mit deutlicher Fluoreszenz.

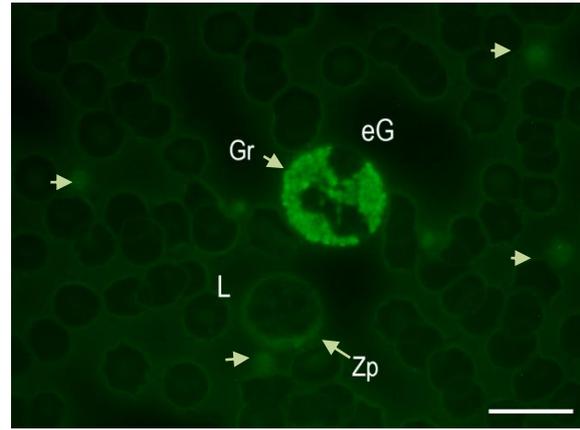


Abb. 35: Eosinophiler Granulozyt,
Lymphozyt, (Katze, m, 15 Jahre)
WGAs-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten (eG) haben das Lektin gebunden. Das Zytoplasma (Zp) des Lymphozyten (L) zeigt eine schwach positive Reaktion. Die einzelnen Pfeile weisen auf schwach positive Thrombozyten hin.

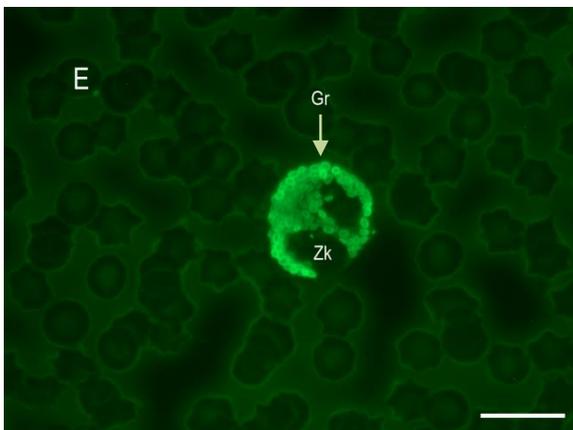


Abb. 36: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 13 Jahre)
WGAs-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des Eosinophilen zeigen eine stark positive Reaktion mit dem Lektin.
E = Erythrozyt, Zk = Zellkern

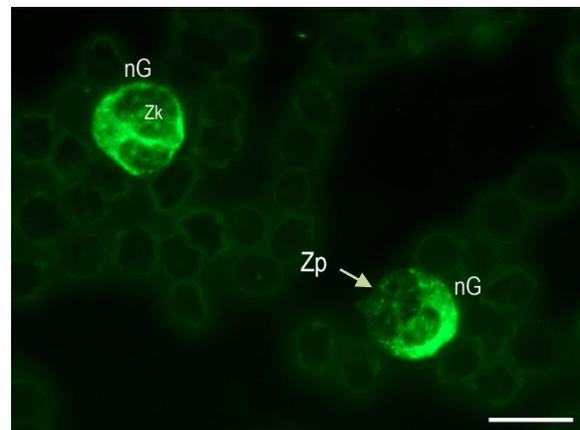


Abb. 37: Neutrophile Granulozyten
(Katze, m, 1 Jahr)
WGAs-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula der Neutrophilen (nG) zeigen eine deutliche, das Zytoplasma (Zp) eine schwach positive Reaktion.
Zk = Zellkern

4.2 Für GalNAc/Galaktose spezifische Lektine

4.2.1 GSA-I – *Griffonia simplicifolia* Agglutinin I

Sowohl die Zellmembran als auch das Zytoplasma der Erythrozyten reagierte bei nahezu allen Tieren negativ mit dem Lektin GSA-I. Lediglich bei einer Katze konnte in eine schwache Reaktion in der Zellmembran der roten Blutkörperchen nachgewiesen werden. Die Bindung von GSA-I an die Zellmembran und die Granula der Thrombozyten fiel bei einer Hälfte der Tiere schwach positiv aus, die andere Hälfte wies keine Bindung des Lektins auf. Auch die Zellmembran der Lymphozyten reagierte bei ca. der Hälfte der Tiere nur schwach positiv. Eine deutliche bis starke Bindung von GSA-I konnte in allen Ausstrichen an den Granula der neutrophilen Granulozyten beobachtet werden, das Zytoplasma dieser Zellen hingegen zeigte kaum eine Reaktion mit dem Lektin. In allen untersuchten Blutausstrichen waren eosinophile Granulozyten zu beobachten, deren Granula eine schwach positive Reaktion aufwiesen, in zwei Fällen war die Reaktion deutlich positiv. Die Granula basophiler Granulozyten zeigten eine leicht positive Reaktion mit GSA-I. In einigen Ausstrichen ließen sich Monozyten identifizieren, die überwiegend keine Bindung mit dem Lektin aufwiesen. Lediglich ihre Zellmembran zeigte gelegentlich eine schwach positive Reaktion.

Tab. 11: Übersicht über die Bindung des Lektins GSA-I

GSA-I	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	18 (94,7%)	1 (5,3%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Thrombozyten					
Zellmembran	10 (52,6%)	9 (47,4%)	0	0	19 (95%)
Granula	10 (52,6%)	9 (47,4%)	0	0	19 (95%)
Lymphozyten					
Zellmembran	9 (47,4%)	10 (52,6%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	14 (73,7%)	5 (26,3%)	0	0	19 (95%)
Granula	0	0	10 (52,6%)	9 (47,4%)	19 (95%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Granula	0	17 (89,5%)	2 (10,5%)	0	19 (95%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Zytoplasma	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Granula	0	1 (100%)	0	0	1 (5%)
Monozyten					
Zellmembran	4 (80%)	1 (20%)	0	0	5 (25%)
Zytoplasma	5 (100%)	0	0	0	5 (25%)

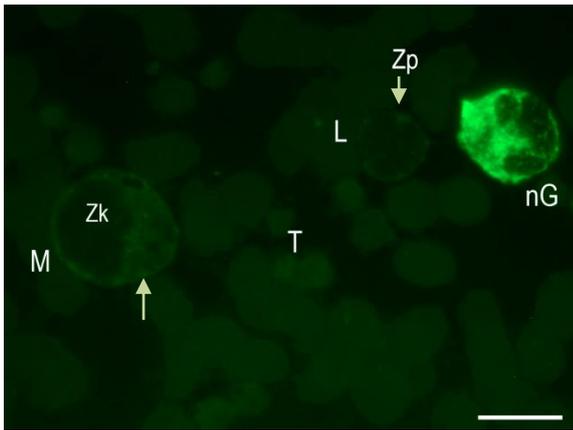


Abb. 38: Neutrophiler Granulozyt, Monozyt, Lymphozyt (Katze, w, 14 Jahre), GSA-I-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (nG) fluoreszieren deutlich. Das Zytoplasma (Zp) des Lymphozyten (L) lässt eine schwach positive Reaktion erkennen, ebenso die Zellmembran (Pfeil) des Monozyten (M).
T = Thrombozyt, Zk = Zellkern

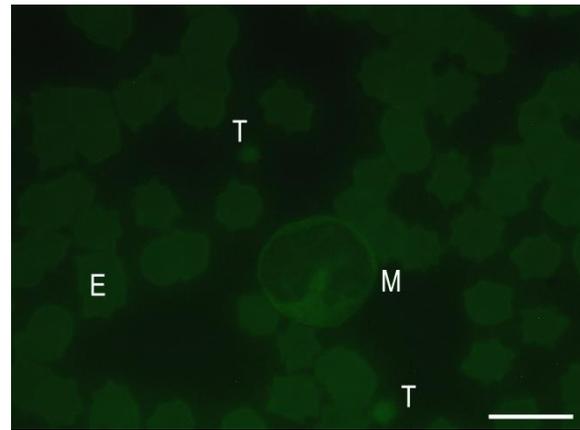


Abb. 39: Monozyt (Katze, m, 10 Jahre)
GSA-I-FITC
SB = 10 μ m

Keine der Blutzellen hat das Lektin gebunden.
M = Monozyt, T = Thrombozyt, E = Erythrozyt

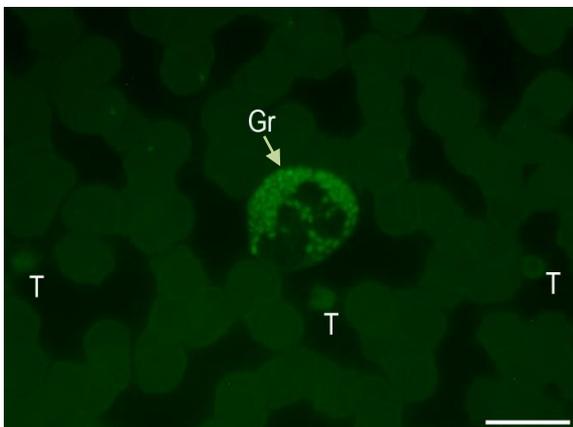


Abb. 40: Eosinophiler Granulozyt (Katze, w, 10 Jahre)
GSA-I-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des Eosinophilen zeigen eine schwach positive Reaktion mit dem Lektin.

T = Thrombozyt

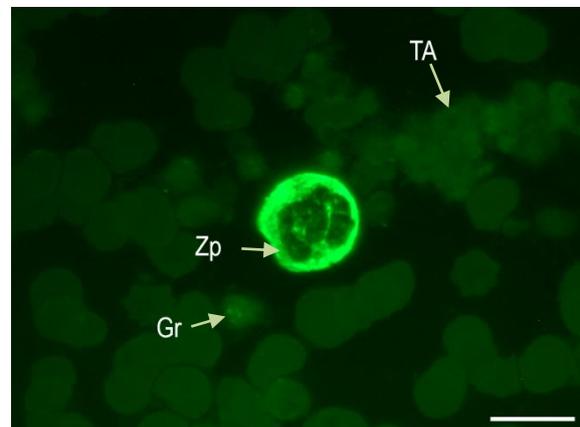


Abb. 41: Neutrophiler Granulozyt (Katze, w, 14 Jahre)
GSA-I-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula und das Zytoplasma (Zp) des neutrophilen Granulozyten haben das Lektin deutlich gebunden. Die Granula (Gr) eines einzelnen Thrombozyten weisen eine schwach positive Reaktion auf, während die Reaktion des Thrombozytenaggregates (TA) negativ ist.

4.2.2 PNA – Peanut Agglutinin

Die Zellmembran und das Zytoplasma der Erythrozyten und Lymphozyten wiesen bei den meisten Ausstrichen keine Bindung von PNA auf. Bei vier bzw. drei Katzen konnte eine schwach positive Reaktion der Erythrozyten- bzw. Lymphozytenzellmembran nachgewiesen werden. Die Zellmembran der Thrombozyten reagierte bei etwa zwei Drittel der Tiere schwach positiv mit PNA, die Granula hingegen wiesen bei den meisten Ausstrichen keine Reaktion auf. Nur bei wenigen Tieren band das Lektin dort schwach, einmal deutlich. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten zeigte bei den meisten Tieren eine unterschiedliche Reaktion, die überwiegend deutlich, zum Teil aber auch schwach oder stark positiv sein konnte. Das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten band PNA nur schwach. Bei den Granula der eosinophilen Granulozyten war meistens eine deutliche, zum Teil aber auch starke oder schwache Reaktion zu erkennen, während PNA an die Granula der neutrophilen Granulozyten nur schwach, in wenigen Fällen deutlich gebunden hat. Die wenigen Monozyten die in den Ausstrichen gefunden wurden, zeigten im Allgemeinen keine positive Reaktion mit PNA. Basophile Granulozyten konnten bei dieser Lektinfärbung nicht sicher identifiziert werden.

Tab. 12: Übersicht über die Bindung des Lektins PNA

PNA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
Erythrozyten					
Zellmembran	15 (79%)	4 (21%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Thrombozyten					
Zellmembran	6 (31,6%)	13 (68,4%)	0	0	19 (95%)
Granula	15 (78,9%)	3 (15,8%)	1 (5,3%)	0	19 (95%)
Lymphozyten					
Zellmembran	16 (84,2%)	3 (15,8%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	18 (94,7%)	1 (5,3%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	0	5 (26,3%)	10 (52,6%)	4 (21,1%)	19 (95%)
Granula	0	15 (78,9%)	4 (21,1%)	0	19 (95%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	16 (100%)	0	0	0	16 (80%)
Zytoplasma	1 (6,3%)	15 (93,7%)	0	0	16 (80%)
Granula	0	3 (18,7%)	10 (52,6%)	3 (18,7%)	16 (80%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0	0	3 (15%)
Zytoplasma	3 (100%)	0	0	0	3 (15%)

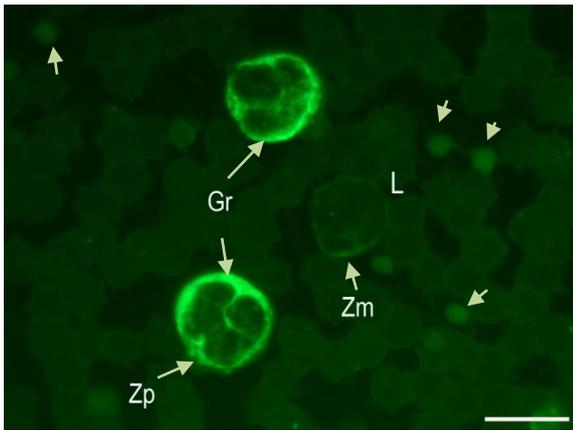


Abb. 42: Neutrophile Granulozyten,
Lymphozyt
(Katze, w, 14 Jahre), PNA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) und das Zytoplasma (Zp) der Neutrophilen haben das Lektin deutlich gebunden. Die Zellmembran (Zm) des Lymphozyten (L) zeigt eine leicht positive Reaktion, ebenso die Thrombozyten (Pfeile).

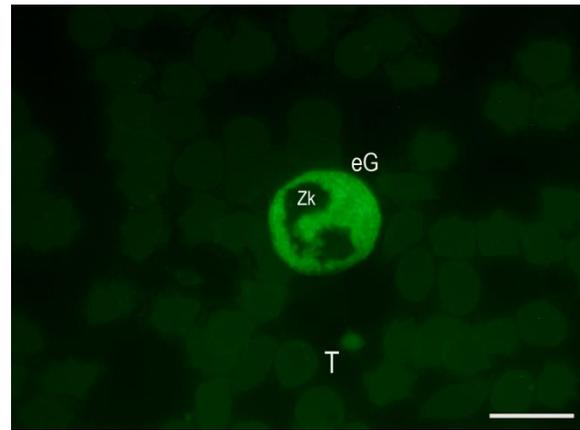


Abb. 43: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, w, 12 Jahre)
PNA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des Eosinophilen (eG) zeigen eine positive Reaktion mit dem Lektin. Die Erythrozyten sind negativ.
T = Thrombozyt, Zk = Zellkern

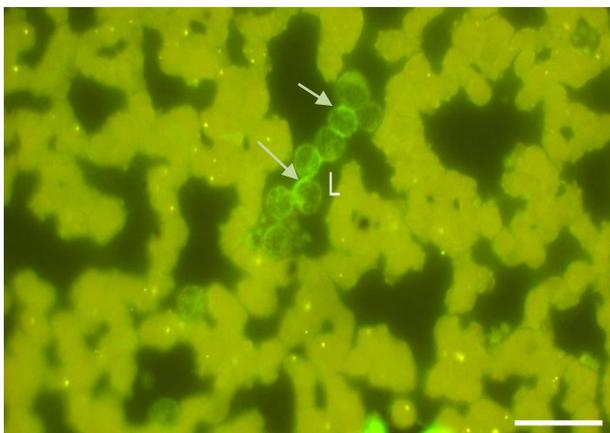


Abb. 44: Lymphozyten (Katze)
PNA-FITC
SB = 20 μ m

Mehrere Lymphozyten (L), die das Lektin an der Zellemembran gebunden haben (Pfeile).

4.2.3 RCA – *Ricinus communis* Agglutinin

Das Lektin RCA reagierte mit einer zum Teil deutlichen, bei vielen Tieren jedoch eher schwachen Bindung an die Zellmembran der Erythrozyten. Auch die Zellmembran der Thrombozyten zeigte in den meisten Fällen eine schwache Reaktion mit RCA. Die Granula in den Blutplättchen waren bei den meisten Tieren negativ, nur drei Ausstriche ließen eine schwache Bindung erkennen. Die Zellmembran der Lymphozyten wies bei etwas über der Hälfte der Katzen eine schwache Bindung auf. Die Granula der neutrophilen Granulozyten reagierten überwiegend deutlich bis stark mit RCA, ihr Zytoplasma hingegen gar nicht oder nur schwach. An die Granula der eosinophilen Granulozyten band das Lektin meist deutlich. Das Zytoplasma reagierte gar nicht, oder nur schwach. Monozyten wiesen keine Bindungsstellen für das Lektin auf.

Tab. 13: Übersicht über die Bindung des Lektins RCA

RCA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	0	14 (70%)	6 (30%)	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	2 (10%)	17 (85%)	1 (5%)	0	20 (100%)
Granula	17 (85%)	3 (15%)	0	0	20 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	8 (42,1%)	11 (57,9%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	9 (45%)	11 (55%)	0	0	20 (100%)
Granula	0	4 (20%)	8 (40%)	8 (40%)	20 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	9 (47,4%)	10 (52,6%)	0	0	19 (95%)
Granula	0	1 (5,3%)	16 (84,2%)	2 (10,5%)	19 (95%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Zytoplasma	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)

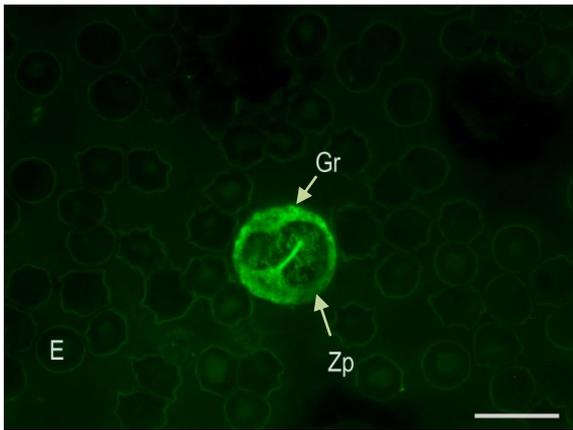


Abb. 45: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 10 Jahre)
RCA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) und das Zytoplasma (Zp) des stabkernigen Neutrophilen zeigen eine positive Reaktion mit dem Lektin. Auch die Zellmembran der Erythrozyten (E) hat das Lektin gebunden.

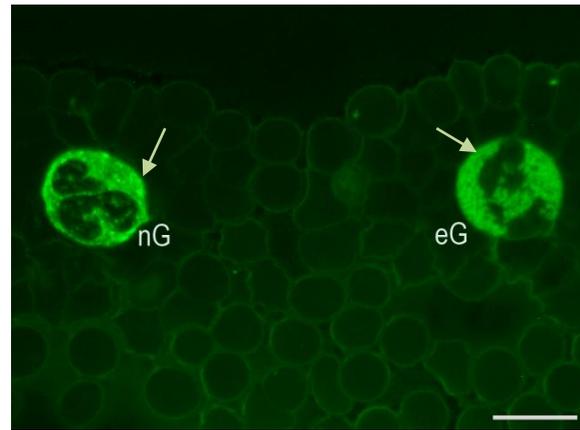


Abb. 46: Neutrophiler und eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 15 Jahre), RCA-FITC
SB = 10 μ m

Sowohl die Granula (Pfeile) des neutrophilen (nG) als auch des eosinophilen Granulozyten (eG) zeigen eine deutlich positive Reaktion mit RCA-FITC.

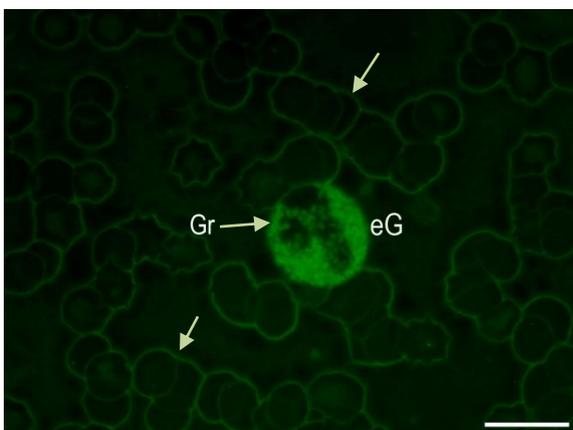


Abb. 47: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, w, 14 Jahre)
RCA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des Eosinophilen (eG) und die Zellmembran der Erythrozyten (Pfeile) haben deutlich das Lektin gebunden.

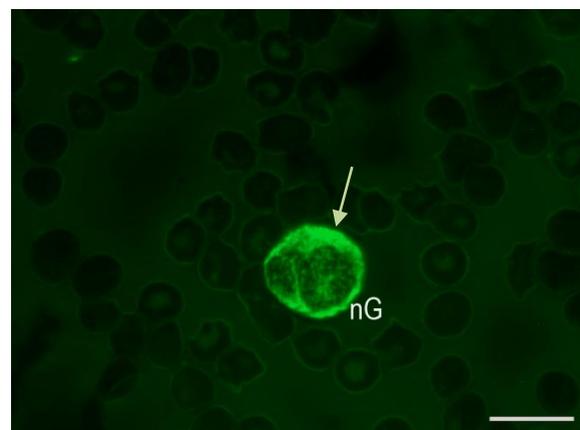


Abb. 48: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 0,5 Jahre)
RCA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Pfeil) des segmentkernigen Neutrophilen (nG) zeigen eine sehr stark positive Reaktion.

4.2.4 DBA – Dolichos biflorus Agglutinin

Die größte Affinität zu dem Lektin wiesen hier die Granula der eosinophilen Granulozyten auf. In den meisten Ausstrichen konnte eine deutlich positive Reaktion nachgewiesen werden, in einem Fall war sie stark positiv. Die Granula der neutrophilen Granulozyten reagierten bei den meisten Tieren schwach positiv. Bei den restlichen Zellen war die Bindung von DBA insgesamt eher schwach ausgeprägt. Zellmembran und Zytoplasma der Erythrozyten und Lymphozyten wiesen in der Regel keine Bindung auf oder zeigten in wenigen Fällen eine schwache Reaktion. Die Zellmembran der Thrombozyten war in den meisten Ausstrichen schwach positiv, in wenigen Fällen auch ihre Granula. Die Monozyten banden DBA nicht.

Tab. 14: Übersicht über die Bindung des Lektins DBA

DBA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	15 (75%)	4 (20%)	1 (5%)	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	6 (30%)	14 (70%)	0	0	20 (100%)
Granula	13 (65%)	7 (35%)	0	0	20 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	16 (80%)	4 (20%)	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	19 (95%)	1 (5%)	0	0	20 (100%)
Granula	2 (10%)	16 (80%)	2 (10%)	0	20 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	18 (90%)	2 (10%)	0	0	20 (100%)
Granula	0	3 (15%)	16 (80%)	1 (5%)	20 (100%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	2 (100%)	0	0	0	2 (10%)
Zytoplasma	2 (100%)	0	0	0	2 (10%)

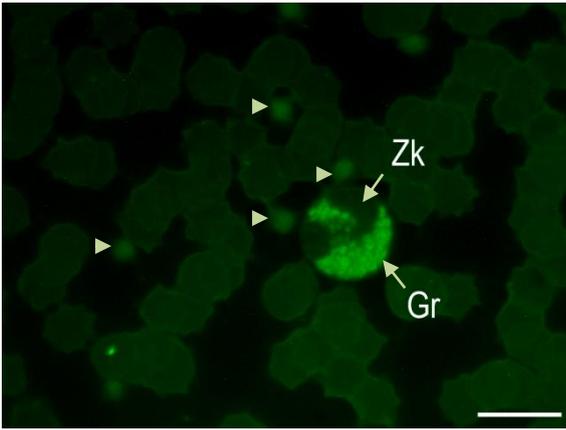


Abb. 49: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 10 Jahre)
DBA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des Eosinophilen binden DBA deutlich. Auch die Thrombozyten (Pfeile) reagieren mit diesem Lektin.
Zk = Zellkern des eosinophilen Granulozyten

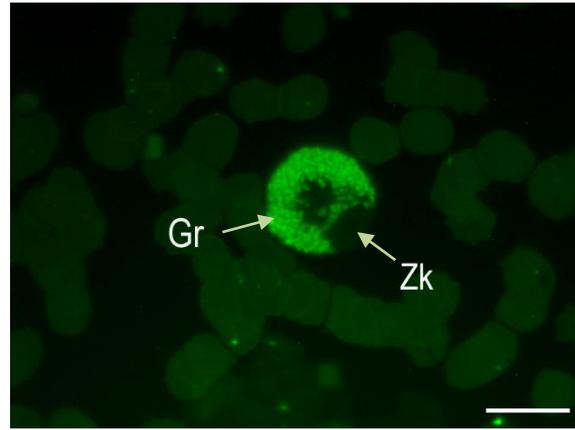


Abb. 50: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, w, 14 Jahre)
DBA-FITC
SB = 10 μ m

Deutlich positive Reaktion der Granula (Gr) des Eosinophilen. Die Erythrozyten weisen keine Bindungsstellen für das Lektin auf.
Zk = Zellkern

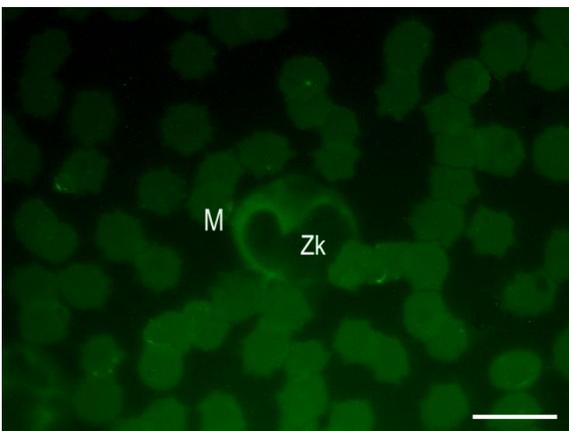


Abb. 51: Monozyt
(Katze, m, 13 Jahre)
DBA-FITC
SB = 10 μ m

Monozyten (M) und Erythrozyten zeigen keine Bindung von DBA-FITC.
Zk = Zellkern des Monozyten

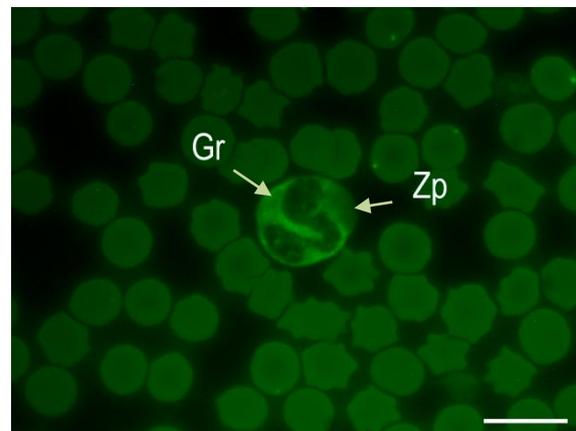


Abb. 52: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, w, 10 Jahre)
DBA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des neutrophilen Granulozyten zeigen zum Teil eine leicht positive Reaktion mit dem Lektin.
Zp = Zytoplasma des Neutrophilen

4.2.5 SJA – *Saphora japonica* Agglutinin

Dieses Lektin reagierte insgesamt nur mit sehr wenigen Zellen der untersuchten Blutausstriche. Lediglich die Granula der eosinophilen Granulozyten wiesen durchgehend bei allen Tieren eine positive Reaktion auf, in den meisten Fällen war sie schwach positiv, bei den übrigen deutlich positiv. Auch die Zellmembran der Thrombozyten zeigte in den meisten Ausstrichen eine schwach positive Reaktion mit SJA, wohingegen dies bei den Granula nur bei zwei Tieren der Fall war. Bei einem Drittel der Tiere konnte ebenfalls eine leicht positive Reaktion mit den Granula der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden, alle anderen Zellstrukturen und Blutzellen ließen keinerlei Bindung des Lektins erkennen.

Tab. 15: Übersicht über die Bindung des Lektins SJA

SJA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	6 (30%)	14 (70%)	0	0	20 (100%)
Granula	18 (90%)	2 (10%)	0	0	20 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Granula	14 (70%)	6 (30%)	0	0	20 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Granula	0	15 (75%)	5 (25%)	0	20 (100%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Zytoplasma	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Granula	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Monozyten					
Zellmembran	3 (100%)	0	0	0	3 (15%)
Zytoplasma	3 (100%)	0	0	0	3 (15%)

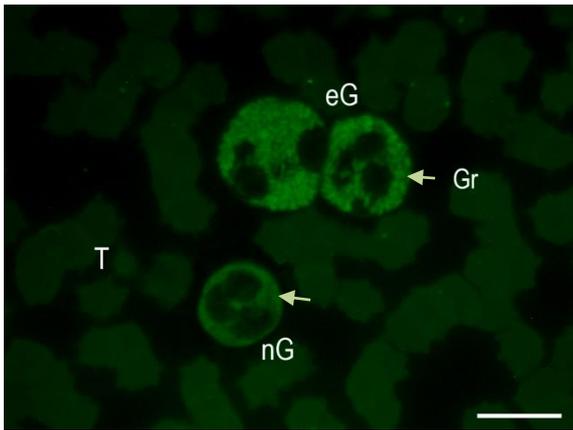


Abb. 53: 2 Eosinophile Granulozyten,
1 neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 13 Jahre), SJA-FITC
SB = 10 µm

Die Granula der Eosinophilen (eG) weisen eine leicht positive Reaktion auf. Auch einige Granula des Neutrophilen (nG) haben das Lektin gebunden (Pfeil).

T = Thrombozyt

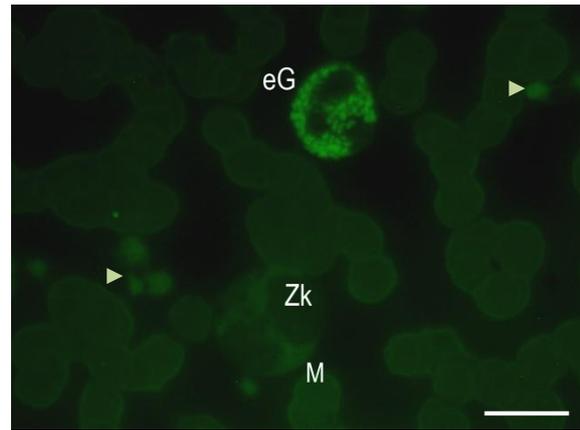


Abb. 54: Eosinophiler Granulozyt,
Monozyt
(Katze, w, 10 Jahre), SJA-FITC
SB = 10 µm

Ein eosinophiler Granulozyt (eG), dessen Granula das Lektin gebunden haben. Ein Monozyt (M) und Erythrozyten die nicht mit SJA reagiert haben.

Pfeile = Thrombozyten, Zk = Zellkern

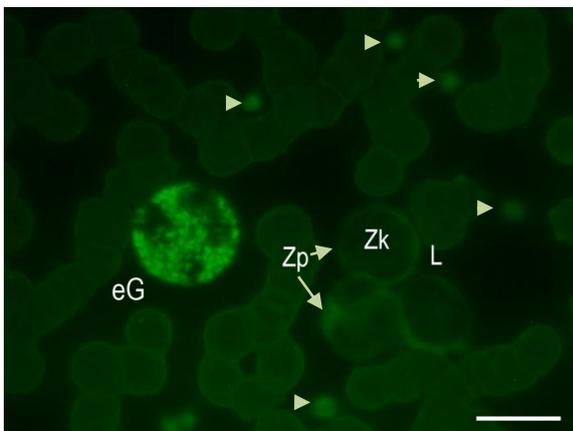


Abb. 55: Eosinophiler Granulozyt,
Lymphozyten
(Katze, w, 13 Jahre), SJA-FITC
SB = 10 µm

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (eG) haben das Lektin deutlich gebunden. Eine leicht positive Reaktion der Thrombozyten ist zu erkennen (Pfeile). Drei Lymphozyten (L) ohne Fluoreszenz.

Zk = Zellkern Lymphozyt, Zp = Zytoplasma Lymphozyten

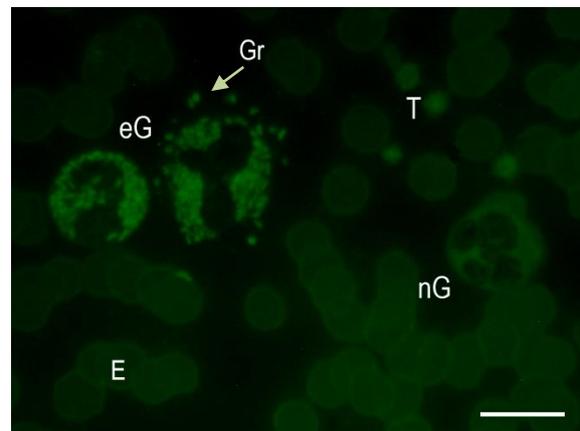


Abb. 56: Eosinophile Granulozyten,
neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 1 Jahr), SJA-FITC
SB = 10 µm

Zwei Eosinophile (eG), deren Granula (Gr) das Lektin gebunden haben. Die Thrombozyten (T) haben leicht positiv reagiert. Der Neutrophile (nG) und die Erythrozyten (E) zeigen keine Fluoreszenz.

4.2.6 SBA – Soybean Agglutinin

Bei diesem Lektin ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei SJA. Die Granula der eosinophilen Granulozyten aller untersuchten Tiere hatten das Lektin gebunden, in den meisten Fällen fiel die Reaktion schwach, bei drei Tieren deutlich positiv aus. Auch die Zellmembran der Thrombozyten zeigte in den meisten Ausstrichen eine schwach positive Reaktion, bei den Granula konnte dies nur in einem Ausstrich festgestellt werden. Ebenfalls konnte bei einem Drittel der Tiere eine schwach positive Bindung von SBA an die Granula der Neutrophilen festgestellt werden, darüber hinaus auch an die Zellmembran der Erythrozyten bei zwei weiteren Tieren. Alle anderen Strukturen und Blutzellen wiesen keine Reaktion mit dem Lektin auf.

Tab. 16: Übersicht über die Bindung des Lektins SBA

SBA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	18 (90%)	2 (10%)	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	7 (35%)	13 (65%)	0	0	20 (100%)
Granula	19 (95%)	1 (5%)	0	0	20 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Granula	14 (70%)	6 (30%)	0	0	20 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	18 (100%)	0	0	0	18 (90%)
Zytoplasma	18 (100%)	0	0	0	18 (90%)
Granula	0	15 (83,3%)	3 (16,7%)	0	18 (90%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Zytoplasma	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)

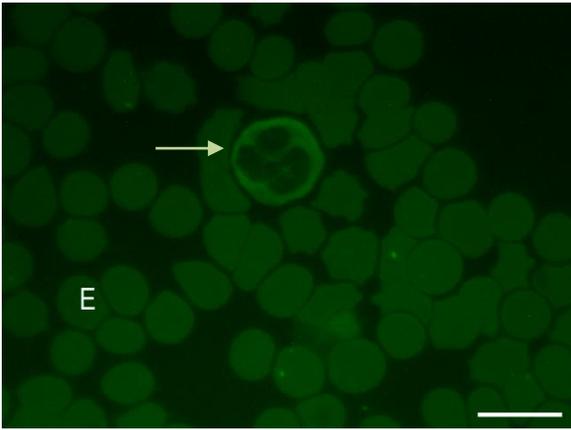


Abb. 57: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 15 Jahre)
SBA-FITC
SB = 10 μ m

Weder der neutrophile Granulozyt (Pfeil) noch die Erythrozyten (E) haben das Lektin in nennenswertem Umfang gebunden.

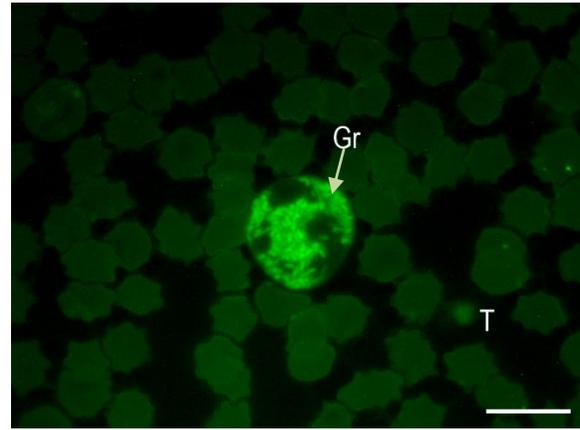


Abb. 58: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 15 Jahre)
SBA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des Eosinophilen zeigen eine deutlich positive Reaktion (Pfeil).
T = Thrombozyt

4.2.7 VAA – *Viscum album* Agglutinin

Dieses Lektin reagierte kaum mit den Blutzellen der untersuchten Ausstriche. Lediglich die Granula der neutrophilen Granulozyten zeigten bei fast der Hälfte der Tiere eine schwach positive, bei zwei Katzen eine deutlich positive Reaktion. Die Granula der eosinophilen Granulozyten wiesen in allen Ausstrichen eine schwach positive Reaktion auf.

Tab. 17: Übersicht über die Bindung des Lektins VAA

VAA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	8 (80%)	2 (20%)	0	0	10 (100%)
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Granula	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Granula	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)	0	10 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Granula	0	10 (100%)	0	0	10 (100%)
Basophile Granulozyten					
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	2 (100%)	0	0	0	2 (20%)
Zytoplasma	2 (100%)	0	0	0	2 (20%)

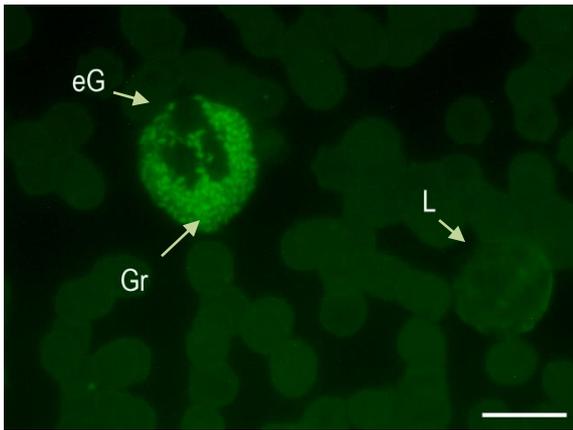


Abb. 59: Eosinophiler Granulozyt,
Lymphozyt
(Katze, w, 10 Jahre)
Inkubation mit biotinyliertem
VAA und Streptavidin-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des Eosinophilen (eG) zeigen eine deutlich positive Reaktion. Ein großer Lymphozyt (L) und die Erythrozyten haben das Lektin nicht gebunden.

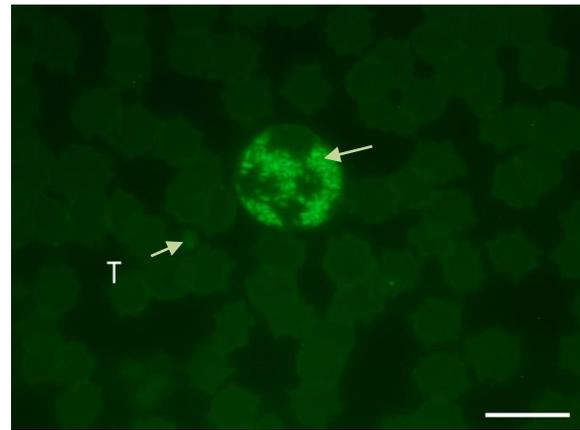


Abb. 60: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 5 Jahre)
Inkubation mit biotinyliertem
VAA und Streptavidin-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Pfeil) des Eosinophilen zeigen eine deutlich positive Reaktion.
T = Thrombozyt

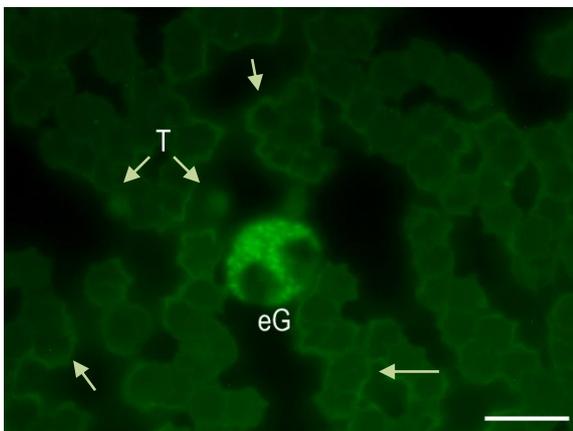


Abb. 61: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 2 Jahre)
Inkubation mit biotinyliertem
VAA und Streptavidin-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des Eosinophilen (eG) zeigen eine deutlich positive Reaktion. Hier hat auch die Zellmembran der Erythrozyten das Lektin gebunden (Pfeile).

T = Thrombozyten

4.2.8 SNA – Sambucus nigra Agglutinin

Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei dem Lektin MAA-I. Auch hier wiesen nur die Granula der eosinophilen Granulozyten bei fast allen Tieren eine Bindung auf, die sich in einer schwach positiven Reaktion äußerte. Auch die Zellmembranen der Erythrozyten und Thrombozyten reagierten bei ca. einem Drittel der Katzen schwach positiv mit SNA. Außerdem war in einem Ausstrich auch eine schwach positive Reaktion der Granula der neutrophilen Granulozyten zu beobachten. Alle anderen Zellstrukturen und Blutzellen wiesen keine Reaktion mit dem Lektin auf.

Tab. 18: Übersicht über die Bindung des Lektins SNA

SNA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	7 (70%)	3 (30%)	0	0	10 (100%)
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	7 (70%)	3 (30%)	0	0	10 (100%)
Granula	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Granula	9 (90%)	1 (10%)	0	0	10 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Granula	2 (20%)	8 (80%)	0	0	10 (100%)
Basophile Granulozyten					
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	3 (100%)	0	0	0	3 (30%)
Zytoplasma	3 (100%)	0	0	0	3 (30%)

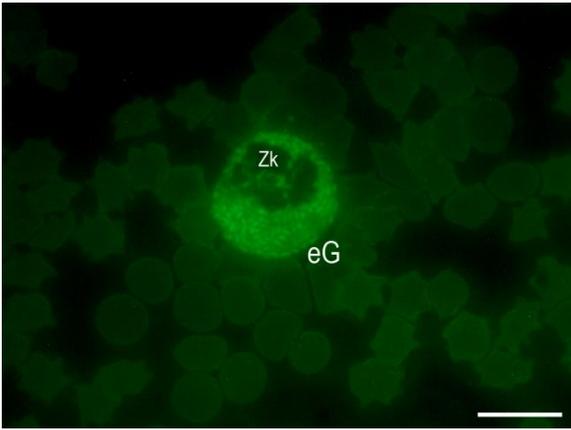


Abb. 62: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, w, 12 Jahre)
Inkubation mit biotinyliertem
SNA und Streptavidin-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Pfeil) des Eosinophilen (eG) zeigen eine positive Reaktion mit dem Lektin.

Zk = Zellkern des Eosinophilen

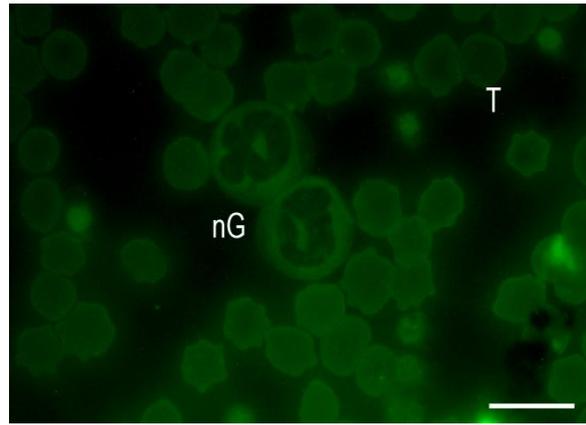


Abb. 63: Neutrophile Granulozyten
(Katze, m, 0,5 Jahre)
Inkubation mit biotinyliertem
SNA und Streptavidin-FITC
SB = 10 μ m

Die zwei Neutrophilen (nG) weisen keine Bindung von SNA auf. Die Thrombozyten (T) zeigen eine schwache Reaktion mit dem Lektin.

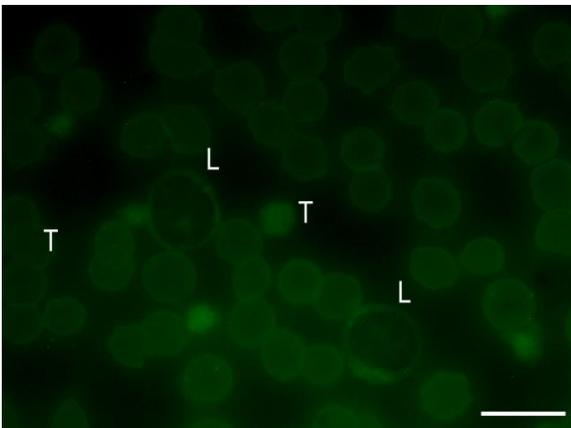


Abb. 64: Lymphozyten
(Katze, m, 0,5 Jahre)
Inkubation mit biotinyliertem
SNA und Streptavidin-FITC
SB = 10 μ m

Eine leicht positive Reaktion weisen nur die Thrombozyten (T) auf.

L = Lymphozyten

4.3 Für Fukose spezifische Lektine

4.3.1 UEA-I – Ulex europaeus Agglutinin

Für dieses Lektin wiesen nur wenige Zellen der untersuchten Blutaussstriche Bindungsstellen auf, die Reaktion fiel in diesen Fällen auch nur schwach positiv aus. Nur die Granula der eosinophilen Granulozyten zeigten in fast allen Ausstrichen eine schwach positive Reaktion mit UEA-I. Weitere Reaktionen sind der Tabelle 19 zu entnehmen.

Tab. 19: Übersicht über die Bindung des Lektins UEA-I

UEA-I	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	16 (84,2%)	3 (15,8%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Thrombozyten					
Zellmembran	11 (57,9%)	8 (42,1%)	0	0	19 (95%)
Granula	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Lymphozyten					
Zellmembran	17 (89,5%)	2 (10,5%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Granula	17 (89,5%)	2 (10,5%)	0	0	19 (95%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Granula	2 (10,5%)	17 (89,5%)	0	0	19 (95%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Zytoplasma	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)

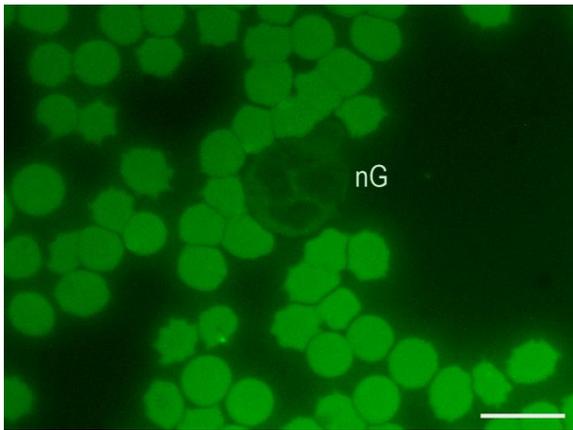


Abb. 65: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, w, 11 Jahre)
UEA-I-FITC
SB = 10 μ m

Weder Granulozyten noch Erythrozyten binden das FITC-markierte UEA-I. Die Erythrozyten weisen eine gewisse unspezifische Fluoreszenz auf.

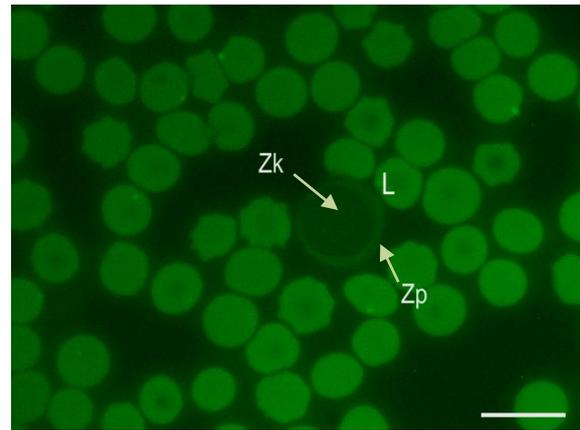


Abb. 66: Lymphozyt
(Katze, w, 10 Jahre)
UEA-I-FITC
SB = 10 μ m

Weder der Lymphozyt (L) noch die Erythrozyten haben mit dem Lektin reagiert. Zk = Zellkern des Lymphozyten, Zp = Zytoplasma des Lymphozyten

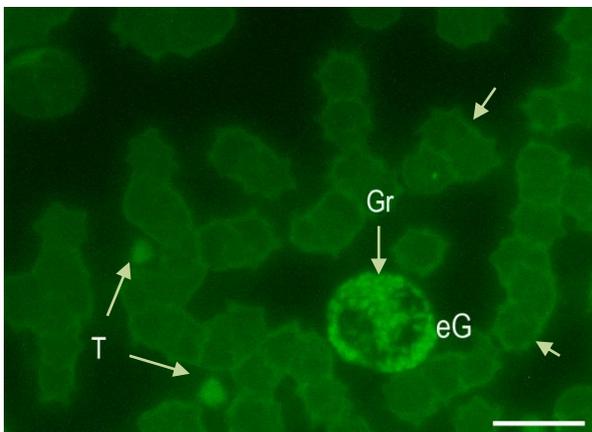


Abb. 67: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 5 Jahre)
UEA-I-FITC
SB = 10 μ m

Das Lektin hat an die Granula (Gr) des Eosinophilen (eG) und an die Thrombozyten (T) gebunden. Auch die Zellmembran der Erythrozyten lässt eine schwache Bindung erkennen (Pfeile).

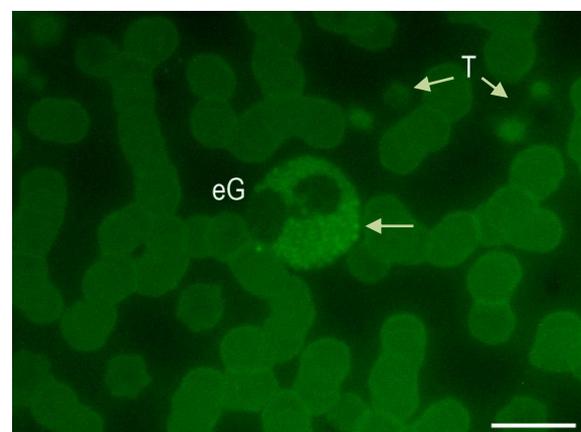


Abb. 68: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, w, 10 Jahre)
UEA-I-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Pfeil) des Eosinophilen (eG) zeigen eine leicht positive Reaktion. T = Thrombozyt (negativ)

4.4 Für Mannose/Glukose spezifische Lektine

4.4.1 Con A – Concanavalin A

Für dieses Lektin konnten Bindungsstellen bei verschiedenen Blutzellen nachgewiesen werden. Die Zellmembran der Erythrozyten zeigte bei allen Tieren eine schwach bis deutlich positive Reaktion. Die Zellmembran der Thrombozyten und Lymphozyten reagierte bei den meisten Tieren schwach positiv. Die Granula der eosinophilen Granulozyten zeigten überwiegend eine schwach positive Reaktion. Bei drei Vierteln der Tiere war die Reaktion der Granula der Neutrophilen mit Con A deutlich positiv, beim Rest reagierten sie zumindest schwach positiv. Monozyten wiesen keine Bindung des Lektins auf.

Tab. 20: Übersicht über die Bindung des Lektins Con A

Con A	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	0	11 (55%)	9 (45%)	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	4 (20%)	16 (80%)	0	0	20 (100%)
Granula	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	8 (40%)	12 (60%)	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	18 (90%)	2 (10%)	0	0	20 (100%)
Granula	0	5 (25%)	15 (75%)	0	20 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Granula	1 (5,3%)	15 (78,9%)	3 (15,8%)	0	19 (95%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Zytoplasma	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)

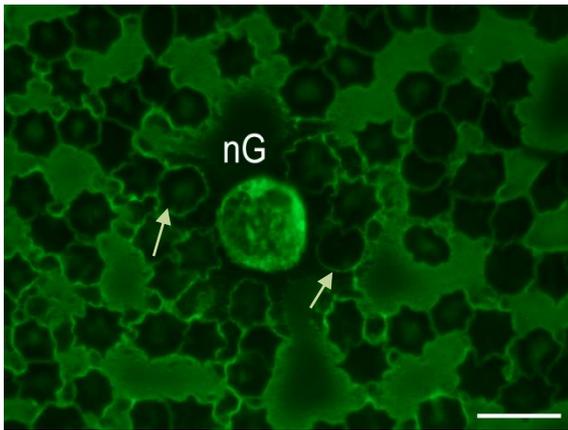


Abb. 69: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 10 Jahre)
Con A-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (nG) zeigen deutliche Fluoreszenz. Ebenso die Zellmembran der Erythrozyten (Pfeile) weist eine Bindung des Lektins auf.

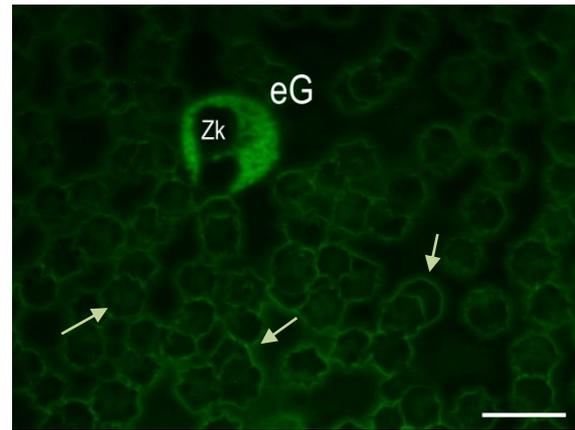


Abb. 70: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 2 Jahre)
Con A-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (eG) sowie die Zellmembran der Erythrozyten (Pfeile) weisen eine deutliche Bindung des Lektins auf.
Zk = Zellkern des Eosinophilen

4.4.2 LCA – Lens culinaris Agglutinin

Besonders auffällig war hier die starke Affinität der Granula der neutrophilen Granulozyten zu LCA. Bei den meisten Tieren reagierten sie deutlich mit dem Lektin, bei den restlichen war die Reaktion sogar stark positiv ausgeprägt. Die Granula der eosinophilen Granulozyten wiesen bei zwei Dritteln der Tiere eine schwach positive Reaktion auf, beim anderen Drittel erfolgte keine Bindung von LCA. Auch die Zellmembran der Lymphozyten zeigte bei etwa der Hälfte der Ausstriche keine Reaktion mit dem Lektin, die andere Hälfte wies eine schwach positive Reaktion auf. Die Zellmembran der Thrombozyten reagierte überwiegend schwach positiv. Die Granula der Thrombozyten zeigten eine unterschiedlich starke Bindung von LCA auf, die zwischen schwach und deutlich positiv variierte. Bei den Erythrozyten erfolgte bei den meisten Tieren eine Bindung von LCA an deren Zellmembran. Die Reaktion fiel überwiegend schwach, bei wenigen Tieren deutlich positiv aus. Monozyten zeigten keine Bindung von LCA.

Tab. 21: Übersicht über die Bindung des Lektins LCA

LCA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
Erythrozyten					
Zellmembran	2 (10%)	17 (85%)	1 (5%)	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	1 (5%)	19 (95%)	0	0	20 (100%)
Granula	4 (20%)	8 (40%)	8 (40%)	0	20 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	11 (55%)	9 (45%)	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Granula	0	0	12 (60%)	8 (40%)	20 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	18 (100%)	0	0	0	18 (90%)
Zytoplasma	18 (100%)	0	0	0	18 (90%)
Granula	6 (33,3%)	12 (66,6%)	0	0	18 (90%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	2 (100%)	0	0	0	2 (10%)
Zytoplasma	2 (100%)	0	0	0	2 (10%)

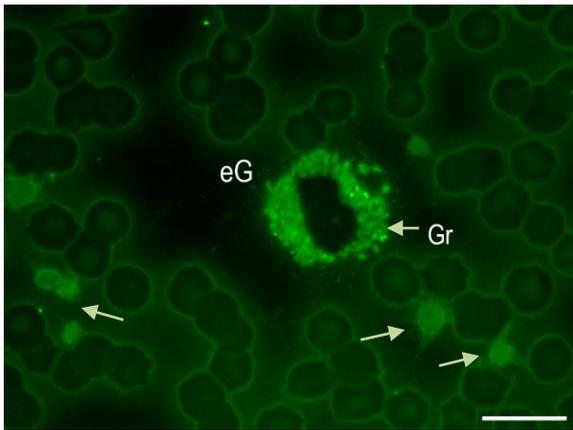


Abb. 71: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 0,5 Jahre)
LCA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des Eosinophilen (eG) zeigen eine deutliche Bindung von LCA-FITC. Auch die Thrombozyten (Pfeile) und die Zellmembranen der Erythrozyten zeigen eine positive Reaktion.

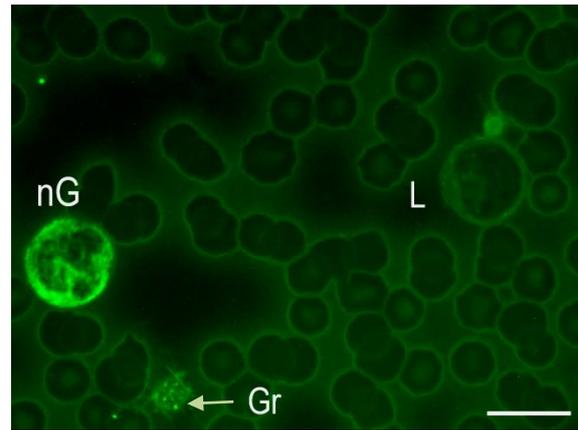


Abb. 72: Neutrophiler Granulozyt,
Lymphozyt
(Katze, m, 0,5 Jahre), LCA-FITC
SB = 10 μ m

Der Lymphozyt (L) weist keine Fluoreszenz auf. Das Lektin hat deutlich an die Granula des Neutrophilen (nG) sowie an die Granula (Gr) eines Thrombozyten gebunden.

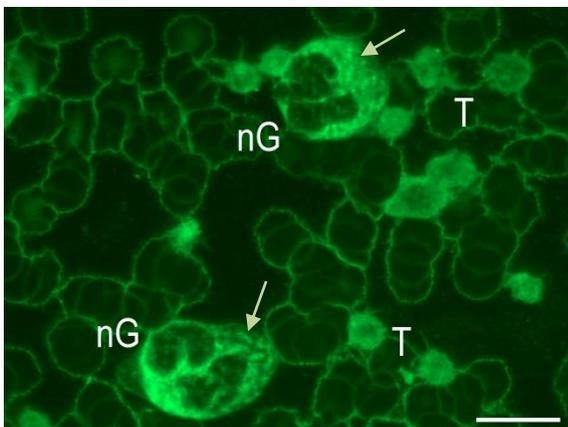


Abb. 73: Neutrophile Granulozyten
(Katze, w, 14 Jahre)
LCA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula der Neutrophilen (nG) weisen eine starke Bindung von LCA-FITC auf (Pfeile). Auch die Zellmembran der Erythrozyten hat deutlich positiv reagiert. Zellmembran und Granula der Thrombozyten (T) weisen ebenfalls Bindungsstellen auf.

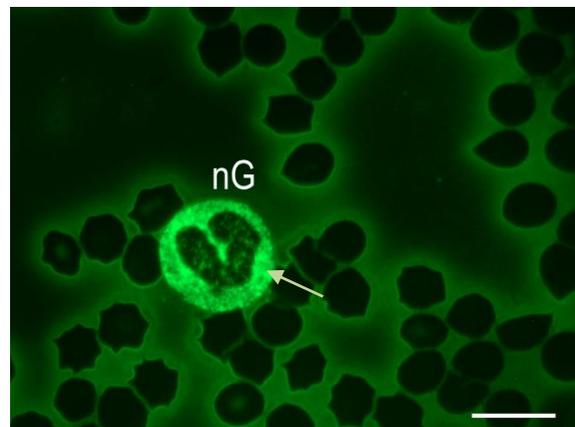


Abb. 74: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 10 Jahre)
LCA-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des stabkernigen Neutrophilen (nG) weisen eine starke Bindung des Lektins auf (Pfeil). Auch das Zytoplasma hat positiv reagiert.

4.4.3 PSA – *Pisum sativum* Agglutinin

Auch hier reagierten wieder die Granula der neutrophilen Granulozyten am deutlichsten mit dem Lektin. Bei über der Hälfte der Tiere fiel die Reaktion deutlich positiv aus, bei den übrigen sogar stark positiv. Bei ca. einem Drittel der Katzen konnte auch eine leicht positive Reaktion des Zytoplasmas der Neutrophilen mit PSA nachgewiesen werden. Bei allen Tieren fand eine Bindung von PSA an die Zellmembran der Thrombozyten statt, die Reaktion fiel in jedem Fall nur schwach positiv aus. Die Granula reagierten dagegen nur bei etwa der Hälfte schwach positiv. Weitere schwach positive Reaktionen mit PSA konnten außerdem bei den meisten Tieren an der Zellmembran der Erythrozyten, bei fast der Hälfte der Katzen an der Zellmembran der Lymphozyten und bei einigen wenigen an den Granula der Eosinophilen festgestellt werden. Weitere Bindungsstellen konnten nicht ausgemacht werden, auch die Monozyten waren immer negativ.

Tab. 22: Übersicht über die Bindung des Lektins PSA

PSA	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
Erythrozyten					
Zellmembran	4 (20%)	16 (80%)	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	0	20 (100%)	0	0	20 (100%)
Granula	11 (55%)	9 (45%)	0	0	20 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	12 (60%)	8 (40%)	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	14 (70%)	6 (30%)	0	0	20 (100%)
Granula	0	0	13 (65%)	7 (35%)	20 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Zytoplasma	20 (100%)	0	0	0	20 (100%)
Granula	16 (80%)	4 (20%)	0	0	20 (100%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	4 (100%)	0	0	0	4 (20%)
Zytoplasma	4 (100%)	0	0	0	4 (20%)

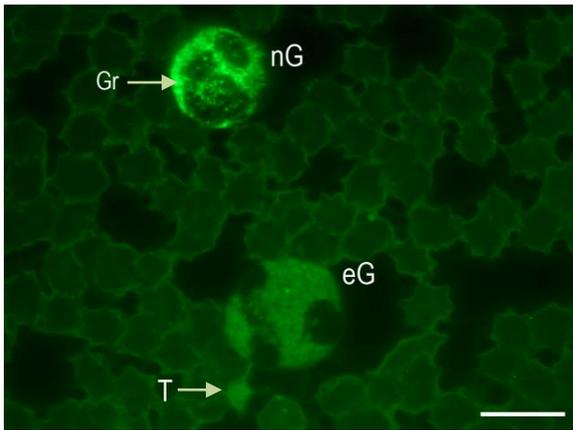


Abb. 75: Eosinophiler und neutrophiler Granulozyt (Katze, m, 13 Jahre), PSA-FITC
SB = 10 μm

Die Granula (Gr) des Neutrophilen (nG) zeigen eine stark positive Reaktion, auch die Zellmembran der Erythrozyten ist positiv. Der Eosinophile (eG) weist keine Bindungsstellen für das Lektin auf.
T = Thrombozyt

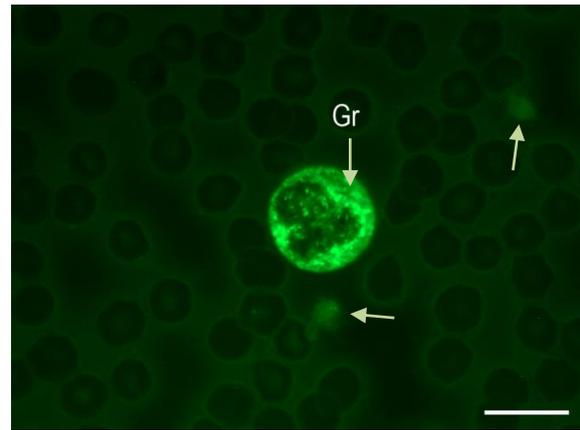


Abb. 76: Neutrophiler Granulozyt (Katze, m, 0,5 Jahre)
PSA-FITC
SB = 10 μm

Die Granula (Gr) des Neutrophilen zeigen eine starke Reaktion mit dem Lektin, auch das Zytoplasma ist positiv. Zellmembran und Granula der Thrombozyten haben das Lektin gebunden (einzelne Pfeile).

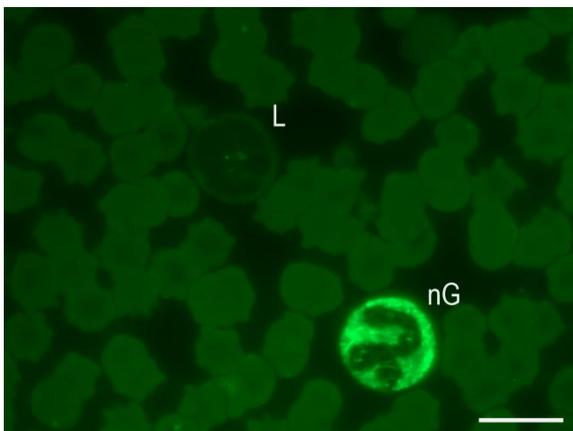


Abb. 77: Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt (Katze, m, 10 Jahre), PSA-FITC
SB = 10 μm

Granula und Zytoplasma des Neutrophilen (nG) haben das Lektin gebunden. Der Lymphozyt (L) und die Erythrozyten haben nicht mit dem Lektin reagiert.

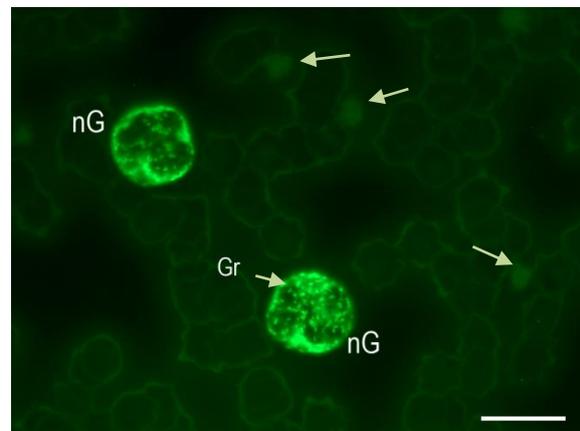


Abb. 78: Neutrophile Granulozyten (Katze, m, 10 Jahre)
PSA-FITC
SB = 10 μm

Deutlich sichtbar die positive Reaktion der Granula (Gr) der Neutrophilen (nG). Auch die Thrombozyten (Pfeile) und Zellmembran der Erythrozyten weisen eine schwach positive Reaktion auf.

4.5 Für Oligosaccharide spezifische Lektine

4.5.1 PHA-E – Phaseolus vulgaris Erythro-Agglutinin

Die stärkste Reaktion mit dem Lektin war hier bei den Granula der neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Bei den meisten Katzen fiel die Reaktion hier deutlich, bei etwa einem Drittel stark positiv aus. Auch das Zytoplasma der Neutrophilen reagierte bei ca. einem Drittel der Tiere schwach positiv mit PHA-E. Bei den meisten untersuchten Blutausstrichen war eine Bindung des Lektins an die Zellmembran der Erythrozyten zu beobachten, bei bei den meisten davon fiel die Reaktionen schwach, bei einigen wenigen deutlich positiv aus. Ein ähnliches Bild war bei der Zellmembran der Thrombozyten zu beachten, sie reagierte bei den meisten Katzen schwach und bei einigen wenigen deutlich positiv. Die Granula der Thrombozyten wiesen zum Teil eine schwach positive Reaktion auf. Weitere Bindungsstellen für PHA-E sind auch auf der Zellmembran der Lymphozyten vorhanden, diese reagierte bei den meisten Tieren schwach positiv. Auch die Granula der eosinophilen Granulozyten ließen in fast allen Fällen eine schwach positive Reaktion erkennen.

Tab. 23: Übersicht über die Bindung des Lektins PHA-E

PHA-E	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	3 (16,7%)	13 (72,2%)	2 (11,1%)	0	18 (90%)
Zytoplasma	18 (100%)	0	0	0	18 (90%)
Thrombozyten					
Zellmembran	1 (5,5%)	14 (77,8%)	3 (16,7%)	0	18 (90%)
Granula	10 (55,6%)	8 (44,4%)	0	0	18 (90%)
Lymphozyten					
Zellmembran	2 (11,1%)	16 (88,9%)	0	0	18 (90%)
Zytoplasma	16 (88,9%)	2 (11,1%)	0	0	18 (90%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	18 (100%)	0	0	0	18 (90%)
Zytoplasma	13 (72,2%)	5 (27,8%)	0	0	18 (90%)
Granula	0	1 (5,6%)	11 (61,1%)	6 (33,3%)	18 (90%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	17 (100%)	0	0	0	17 (85%)
Zytoplasma	17 (100%)	0	0	0	17 (85%)
Granula	1 (5,9%)	16 (94,1%)	0	0	17 (85%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	5 (100%)	0	0	0	5 (25%)
Zytoplasma	3 (60%)	2 (40%)	0	0	5 (25%)

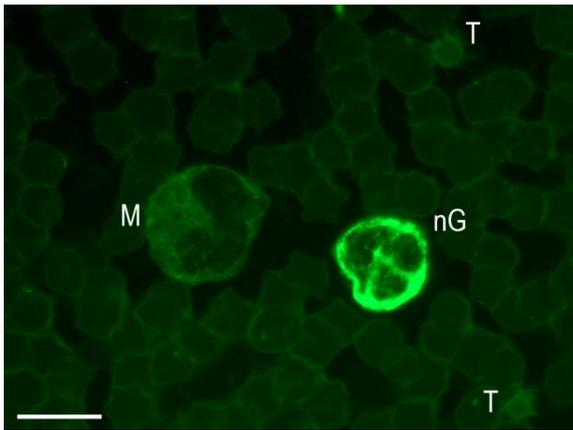


Abb. 79: Neutrophiler Granulozyt, Monozyt
(Katze, m, 10 Jahre)
PHA-E-FITC
SB = 10 μ m

Der Neutrophile (nG) hat stark positiv mit dem Lektin reagiert. Das Zytoplasma des Monozyten (M), die Zellmembranen der Thrombozyten (T) und Erythrozyten lassen eine schwach positive Reaktion erkennen.

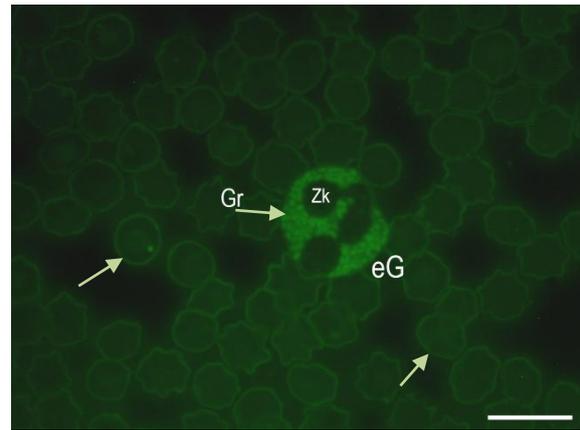


Abb. 80: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 13 Jahre)
PHA-E-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula (Gr) des Eosinophilen (eG), sowie die Zellmembran der Erythrozyten (Pfeile) haben das Lektin gebunden. Zk = Zellkern des Eosinophilen

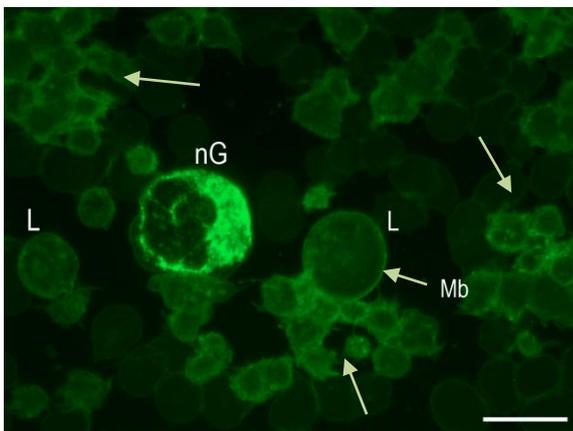


Abb. 81: Neutrophiler Granulozyt,
Lymphozyten
(Katze, w, 14 Jahre), PHA-E-FITC
SB = 10 μ m

Granula und Zytoplasma des Neutrophilen (nG) zeigen eine deutliche Reaktion mit PHA-E-FITC. Auch die Zellmembran (Mb) der Lymphozyten (L) zeigt eine positive Reaktion. Mehrere Thrombozytenaggregate (Pfeile) lassen eine Reaktion des Lektins sowohl mit der Zellmembran als auch einigen Granula erkennen.

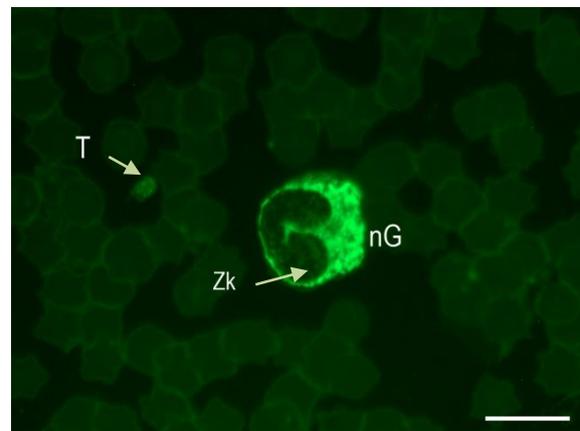


Abb. 82: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 10 Jahre)
PHA-E-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des stabkernigen neutrophilen Granulozyten (nG) reagieren stark positiv. Zellmembran und Granula des Thrombozyten (T) haben ebenfalls positiv mit dem Lektin reagiert.

Zk = Zellkern des Neutrophilen

4.5.2 PHA-L – *Phaseolus vulgaris* Leuco-Agglutinin

Deutliche und stark positive Reaktionen waren sowohl an den Granula der neutrophilen als auch der eosinophilen Granulozyten zu beobachten. Die Granula der Neutrophilen reagierten bei ca. der Hälfte der Tiere stark, bei etwa einem Drittel deutlich positiv. Bei den restlichen neutrophilen Granulozyten war nur eine schwach positive Reaktion sichtbar. Die Granula der Eosinophilen reagierten bei den meisten Tieren deutlich positiv mit dem Lektin, bei ca. einem Viertel der Blutausrichthe war die Reaktion schwach und beim Rest stark positiv ausgeprägt. Bindungsstellen für PHA-L waren auch an Strukturen der Thrombozyten vorhanden. So wiesen ihre Zellmembranen bei den meisten Tieren zumindest schwach positive Reaktionen auf, eine schwache Bindung des Lektins war auch bei einigen der Katzen an die Granula ihrer Thrombozyten zu beobachten. Die Zellmembran der Erythrozyten reagierte bei etwa der Hälfte der Blutausrichthe gar nicht mit dem Lektin, bei der anderen Hälfte fiel die Reaktion schwach positiv aus.

Tab. 24: Übersicht über die Bindung des Lektins PHA-L

PHA-L	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Erythrozyten					
Zellmembran	10 (52,6%)	9 (47,4%)	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Thrombozyten					
Zellmembran	3 (15,8%)	15 (78,9%)	1 (5,3%)	0	19 (95%)
Granula	14 (73,7%)	5 (26,3%)	0	0	19 (95%)
Lymphozyten					
Zellmembran	7 (38,9%)	11 (61,1%)	0	0	18 (90%)
Zytoplasma	18 (100%)	0	0	0	18 (90%)
Neutrophile Granulozyten					
Zellmembran	19 (100%)	0	0	0	19 (95%)
Zytoplasma	12 (63,2%)	7 (36,8%)	0	0	19 (95%)
Granula	0	3 (15,8%)	7 (36,8%)	9 (47,4%)	19 (95%)
Eosinophile Granulozyten					
Zellmembran	18 (100%)	0	0	0	18 (90%)
Zytoplasma	15 (83,3%)	3 (16,7%)	0	0	18 (90%)
Granula	0	4 (22,2%)	12 (66,7%)	2 (11,1%)	18 (90%)
Basophile Granulozyten					
Zellmembran					0
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)
Zytoplasma	1 (100%)	0	0	0	1 (5%)

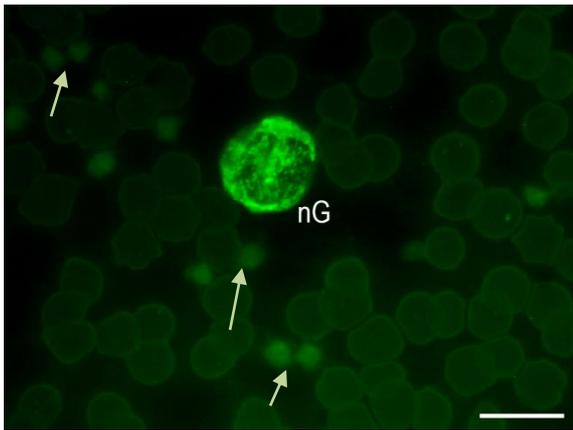


Abb. 83: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 0,5 Jahre)
PHA-L-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des Neutrophilen (nG) haben positiv reagiert. Ebenfalls haben die Zellmembranen der Erythrozyten und die Thrombozyten (Pfeile) das Lektin gebunden.

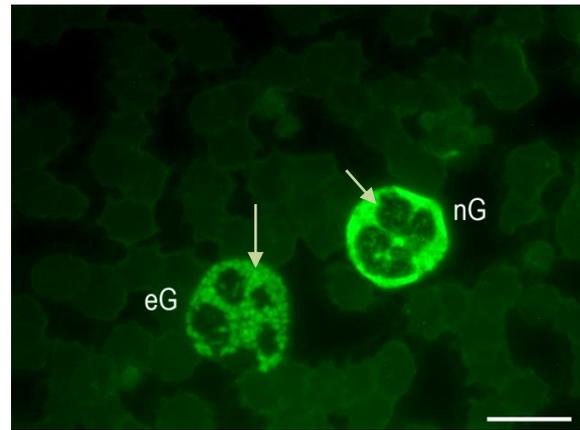


Abb. 84: Neutrophiler und eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 15 Jahre), PHA-L-FITC
SB = 10 μ m

Hier haben lediglich die Granula des Neutrophilen (nG) und des Eosinophilen (eG) das Lektin gebunden (Pfeile). Dabei fällt die Reaktion bei dem neutrophilen Granulozyten stärker aus.

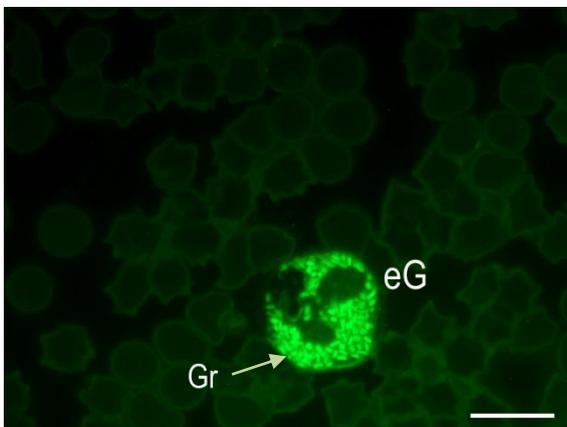


Abb. 85: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, w, 12 Jahre)
PHA-L-FITC
SB = 10 μ m

Bei diesem Eosinophilen (eG) fällt die Reaktion mit dem PHA-L-FITC stark positiv aus. Auch die Zellmembran der Erythrozyten hat das Lektin gebunden.
Gr = Granula des Eosinophilen

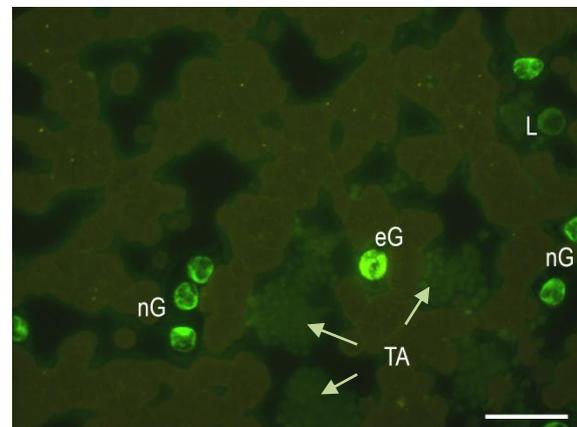


Abb. 86: Blutzellen Katze
PHA-L-FITC
SB = 20 μ m

Mehrere neutrophile Granulozyten (nG) und ein eosinophiler Granulozyt (eG) sind sichtbar, die das Lektin gebunden haben.
TA = Thrombozytenaggregat,
L = Lymphozyt

4.5.3 MAA-I – *Maackia amurensis* Agglutinin

Die Blutzellen der untersuchten Tiere wiesen kaum Bindungsstellen für dieses Lektin auf. Lediglich die Granula der eosinophilen Granulozyten haben bei fast allen Tieren das Lektin gebunden, wobei die Reaktion in jedem Fall schwach positiv ausfiel. Darüber hinaus war noch bei ca. einem Drittel der Tiere eine schwach positive Reaktion an der Zellmembran der Erythrozyten und Thrombozyten sichtbar, alle anderen Zellstrukturen und Blutzellen wiesen keine Reaktion mit MAA-I auf.

Tab. 25: Übersicht über die Bindung des Lektins MAA-I

MAA-I	Stärke der Reaktion				Präparate mit Zellen
	negativ n (%)	+	++	+++	
Erythrozyten					
Zellmembran	7 (70%)	3 (30%)	0	0	10 (100%)
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Thrombozyten					
Zellmembran	7 (70%)	3 (30%)	0	0	10 (100%)
Granula	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Lymphozyten					
Zellmembran	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Neutrophile Granulozyten					
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Granula	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Eosinophile Granulozyten					
Zytoplasma	10 (100%)	0	0	0	10 (100%)
Granula	1 (10%)	9 (90%)	0	0	10 (100%)
Basophile Granulozyten					
Zytoplasma					0
Granula					0
Monozyten					
Zellmembran	3 (100%)	0	0	0	3 (30%)
Zytoplasma	3 (100%)	0	0	0	3 (30%)

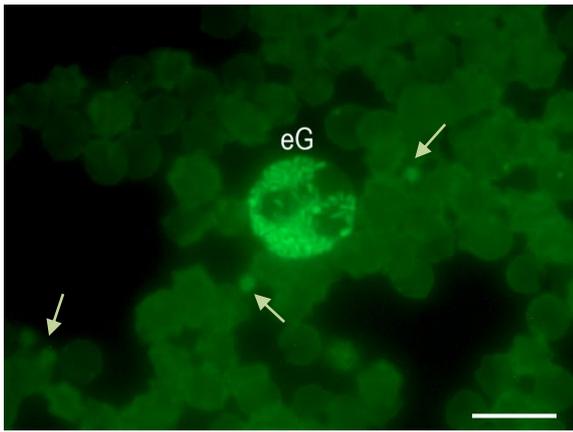


Abb. 87: Eosinophiler Granulozyt
(Katze, m, 0,5 Jahre)
Inkubation mit biotinyliertem
MAA-I und Streptavidin-FITC
SB = 10 μ m

Die Granula des Eosinophilen (eG) haben das Lektin deutlich gebunden. Die Thrombozyten (Pfeile) und Erythrozyten zeigen eine leicht positive Reaktion.

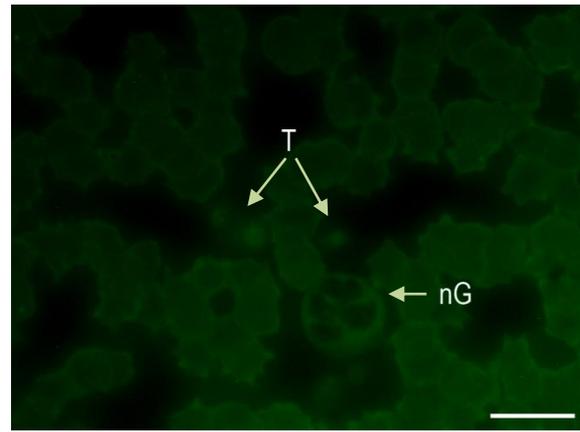


Abb. 88: Neutrophiler Granulozyt
(Katze, m, 15 Jahre)
Inkubation mit biotinyliertem
MAA-I und Streptavidin-FITC
SB = 10 μ m

Bei dem Neutrophilen (nG) ist keine spezifische Fluoreszenz zu erkennen. Bei Erythrozyten und Thrombozyten (T) ist zum Teil eine leicht positive Reaktion zu erkennen.

4.6 Zuckerhemmung

Für die Lektine WGA, WGAs, Con A, LCA, PSA, PHA-E und GSA-I, welche die stärksten Reaktionen mit den Blutzellen hervorgerufen haben, wurde ein Hemmzuckertest durchgeführt, um ihre Zuckerspezifität zu überprüfen. Vor dem Auftragen auf die Blutausrüche wurden die Lektine mit dem jeweils für sie spezifischen Kohlenhydrat vorbehandelt.

Der Test verlief in jedem Fall positiv, d.h. nach der Vorbehandlung mit dem Zucker fielen die positiven Reaktionen mit den Blutzellen bei jedem Lektin deutlich schwächer aus als bei den vorausgegangenen Untersuchungen. Die Kohlenhydrate haben somit die Rezeptoren der Lektine besetzt, so dass eine Bindung an die Blutzellen nicht mehr möglich war.

V Diskussion

Die vorliegende Arbeit legt den Schwerpunkt auf den lektin histochemisch und ultrastrukturell erfassbaren Aufbau der Blutzellen der Katze. Für die verschiedenen Untersuchungen wurden Blutproben von insgesamt 26 klinisch gesunden Katzen (11 weiblich kastriert, 15 männlich kastriert) verwendet. Es erfolgte eine Unterteilung in drei Altersgruppen: jüngere Tiere bis 5 Jahre, mittelalte Tiere von 5–10 Jahre und ältere Katzen ab 11 Jahre. Eventuell rassebedingte Unterschiede konnten nicht untersucht werden, da es sich bis auf eine Perserkatze ausschließlich um Katzen der Rasse Europäisch Kurzhaar handelt.

1. Blutbild

Die Auswertung der Blutbilder ergab, dass bei den meisten Tieren, unabhängig von Alter und Geschlecht, gegenüber den üblichen Referenzwerten ein leicht erhöhter Leukozytenwert vorlag. Dies kann bei Katzen jedoch in der Regel als physiologische Leukozytose angesehen werden, da sie sehr stark auf äußere Beeinflussungen reagieren (Schalm, 1965). Besonders bei der Blutabnahme kommt es durch Aufregung und Stress zu einer Erhöhung des Blutdrucks, und dadurch gelangen Leukozyten aus dem marginalen Zellpool in den Blutstrom. Der Prozentsatz der Leukozyten im marginalen Zellpool ist bei der Katze bis zu 70% höher als bei anderen Spezies (Prasse et al., 1973).

Die Angaben einiger Autoren (Schalm, 1965; Jain, 1993; Clinkenbeard und Meinkoth, 2000), dass männliche Tiere etwas höhere Erythrozyten- und Hämoglobinwerte haben, konnte nicht bestätigt werden. Während die Zahl der Erythrozyten bei den weiblichen Tieren in allen Altersgruppen sogar etwas höher war, gab es beim Hämoglobin kaum einen Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die untersuchten Blutparameter der beiden jüngsten Tiere, die zum Zeitpunkt der Blutabnahme 6 Monate alt waren, lagen mit Ausnahme der Gesamtleukozytenzahl, die erhöht war, im Referenzbereich für erwachsene Tiere. Dies bestätigt, dass sich die niedrigere Erythrozytenzahl, und somit auch die niedrigere Hämoglobinkonzentration, die bei neugeborenen Katzen vorliegt, im ersten Lebenshalbjahr an die Werte adulter Tiere angleicht (Windle et al., 1940; Jain, 1993; Kraft et al., 2005).

2. Lichtmikroskopie

Für die konventionelle lichtmikroskopische Untersuchung wurden vier Färbemethoden

angewandt, und zwar die Färbung nach May-Grünwald, Giemsa, Pappenheim und die Diff-Quick-Färbung. Die Farblösungen enthalten saure und basische Farbstoffe (z.B. Eosin und Methylblau), die entsprechend an azidophile, basische und neutrophile Strukturen binden. Die verschiedenen Zellbestandteile können so aufgrund ihres färberischen Verhaltens unterschieden werden.

Wie bei fast allen Säugetieren haben die Erythrozyten der Katze eine mehr oder weniger bikonkave Scheibenform und sind kernlos. Eine Ausnahme stellen die Erythrozyten der Cameliden dar, welche oval sind. Erythrozyten anderer Wirbeltiere, die der Vögel, Amphibien, Reptilien und Fische, sind oval und kernhaltig (Jain, 1993). Während Hunderythrozyten lichtmikroskopisch eine deutliche Abflachung aufweisen, besteht diese bei Pferden und Katzen oft nur andeutungsweise. Die bei dieser Untersuchung ermittelte durchschnittliche Größe der Erythrozyten von 5,8 μm entspricht den Angaben in der Fachliteratur (Jain, 1993; Kraft et al., 2005). Die in manchen Fällen beobachtete uneinheitliche Größe der Erythrozyten im selben Ausstrich, die sogenannte Anisozytose, ist im geringen Umfang bei einigen Tierarten physiologisch. Während die Erythrozyten von Hunden und Pferden kaum in ihrer Größe variieren, weisen die anderen Tierarten eine leichte Anisozytose auf (Hees und Tschudi, 1990; Jain, 1993). Relativ häufig waren in den untersuchten Ausstrichen Erythrozyten mit mäßigen bis starken Einziehungen der Oberfläche vertreten. Diese sogenannte Stechapfelform entsteht, wenn das Präparat nach Anfertigung des Ausstrichs zu langsam getrocknet ist (Kraft et al., 2005). Die Geldrollenbildung, also die Aneinanderlagerung benachbarter Erythrozyten ist besonders ausgeprägt bei Pferden und Schweinen, gefolgt von Katzen und anderen Tierarten, während sie bei Wiederkäuern nicht vorkommt (Jain, 1993). Bei gesunden Katzen können im Blut Retikulozyten nachgewiesen werden. Diese sind unter dem Lichtmikroskop jedoch nur durch bestimmte Färbemethoden darstellbar. Am häufigsten wird Brilliantkresylblau verwendet, welches die Substantia reticulogranulofilamentosa als Zellorganellreste kernhaltiger Vorstufen anfärbt (Bessis, 1977). Mit der gleichen Färbemethode lassen sich auch die sogenannten Heinz-Innenkörper darstellen, die eine Degenerationsform des Hämoglobins sind. Während sie bei anderen Tierarten immer pathologisch sind, können Erythrozyten gesunder Feliden einige Heinz-Innenkörper aufweisen. Man nimmt an, dass Katzenerythrozyten einerseits empfindlicher gegenüber Oxidantien reagieren und andererseits die Katzenmilz nicht in der Lage ist, Erythrozyten mit Heinz-Innenkörpern vollständig aus dem Blut zu entfernen (Christopher et al., 1990; Jain, 1993). Ansonsten ist ihr Vorkommen auf Milzfunktionsstörungen oder die

Einwirkung von Oxidantien (z.B. Benzocain, Phenylhydrazin), Vitamin-K-Behandlungen oder Intoxikationen mit Zwiebelinhaltsstoffen zurückzuführen und resultieren in einer hämolytischen Anämie (Jain, 1993).

Die Thrombozyten sind ebenfalls kernlos und variieren in ihrer Größe und Form. In der Regel sind sie, wie Thrombozyten anderer Haussäugetiere, scheibenförmig bis oval und haben einen Durchmesser von 2–5 µm. Dies liess sich auch in meinen Untersuchungen bestätigen. In manchen Ausstrichen waren aber auch deutlich größere Thrombozyten zu finden, was bei der Katze nicht ungewöhnlich ist (Jain, 1986; Mischke, 2005). Die Granula waren besonders gut mit der Giemsa-Färbung darzustellen. Oft haben sich die Thrombozyten in Aggregaten zusammengelagert, auch dies ist eine häufige Erscheinung vor allem bei Katzen (Hart und Nolte, 1991). Wie beim Menschen könnte durch die Verwendung von Zitratblut diese Aggregationsneigung vermindert werden (Moritz und Hoffmann, 1997).

Die segmentkernigen neutrophilen Granulozyten waren in deutlich höherer Anzahl zu finden als ihre unmittelbare Vorstufe, die stabkernigen Neutrophilen. Ebenso bestätigt hat sich, dass die Neutrophilen, wie bei Pferd und Hund, mit 50–70% den größten Anteil der gesamten Leukozyten bilden (Liebich, 2004). Ein vermehrtes Vorkommen von jugendlichen stabkernigen Neutrophilen wird als Neutrophilie mit Kernlinksverschiebung bezeichnet. Sie tritt vor allem bei akuten bakteriellen Infektionskrankheiten und eitrigen Entzündungen in Körperhöhlen auf (Kraft et al., 2005). Die felines Neutrophilen ähneln morphologisch denen anderer Haussäugetiere. Es sind runde Zellen mit einem Durchmesser von 8–13 µm. Der Zellkern der segmentkernigen Neutrophilen ist gelappt und weist meist zwei bis drei Segmente auf. In vielen Ausstrichen konnte man sehen, dass diese Segmente häufig über einen schmalen Chromatinsteg verbunden sind (Bertram, 1985). Die sehr kleinen azurophilen Granula im Zytoplasma waren lichtmikroskopisch bei den von mir verwendeten vier Übersichtsfärbungen am besten bei der Diff-Quick- und Giemsa-Färbung zu erkennen.

Eosinophile Granulozyten treten nur in geringer Anzahl im Blut auf. Der relative Leukozytenanteil wird für Katzen mit 2–12% angegeben (Jain, 1993). Trotz des geringen Vorkommens konnten bei meinen Untersuchungen in fast allen Ausstrichen Eosinophile nachgewiesen werden. In allen vier Färbungen stellen sich die runden, durchschnittlich 10–13 µm großen Zellen sehr auffällig, mit intensiv blau oder blauviolett gefärbtem Kern und kräftig oder leuchtend rot gefärbten Granula dar. Der Zellkern ist wie bei anderen Tierarten meist gelappt oder hat zwei, selten auch mehr Segmente (Jain, 1993). Bei einigen Zellkernen war deutlich die Verbindung zweier Segmente über einen schmalen Chromatinsteg sichtbar. Die

Granula variieren tierartlich dagegen in Form, Größe und Anzahl. Die der Katze haben typischerweise eine längliche, stäbchenförmige Gestalt und können so zahlreich vorhanden sein, dass sie teilweise den Zellkern verdecken (Schalm, 1965; Bainton, 1995). Pferde besitzen die größten Granula. Sie sind rund und können auch hier in großer Anzahl im Zytoplasma vorkommen, so dass sie über den Zellrand hinausragen und den Eosinophilen so eine Maulbeerform verleihen (Hees und Tschudi, 1990). Bei Hunden variieren die Granula in Größe und Anzahl, außerdem befinden sich im Zytoplasma der Eosinophilen häufig Vakuolen (Jain, 1986).

Basophile Granulozyten sind bei den meisten Haussäugetieren mit einem Anteil von 0,5% der zirkulierenden Leukozyten sehr selten, bei der Katze häufig noch seltener (Schalm, 1965). Lediglich bei Kaninchen können sie regelmäßig mit einem relativen Leukozytenanteil von 8–10% im Blut nachgewiesen werden (Jain, 1993). Bei nicht absolut optimaler Färbung können die Granula von Basophilen außerdem mit denen der Eosinophilen verwechselt werden (Kraft et al., 2005). Außerdem sind die basophilen Granula wasserlöslich und dürften daher häufig im wässrigen Färbemilieu verloren gegangen sein. Deshalb konnten in allen von mir untersuchten Ausstrichen nur wenige Zellen sicher als basophile Granulozyten identifiziert werden. Wie schon in früheren Untersuchungen beschrieben (Bessis, 1977; Jain, 1993), stellte sich der bohnenförmige Zellkern der runden Zellen in der May-Grünwald-Färbung blau dar, die kleinen, runden Granula haben einen violetten Farbton angenommen. Bei den anderen von mir eingesetzten Routinefärbungen konnte ich keine basophilen Granulozyten mit Sicherheit identifizieren. Mit anderen Farbstoffen, wie Toluidinblau oder Methylenblau, könnte man die Granula metachromatisch anfärben, d.h. der ursprünglich violette Farbton würde sich ins Rötliche verändern (Bessis, 1977). Basophile Granulozyten der Feliden können im Gegensatz zu anderen Tierarten einige größere, dunkler gefärbte Granula enthalten. Es wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um noch nicht voll ausgereifte Formen handelt, da bei Katzen die Vorläuferzellen der Basophilen im Knochenmark zwei unterschiedliche Typen von Granula enthalten können (Jain, 1986). Bei myeloproliferativen und myelodysplastischen Erkrankungen können die basophilen Granula in Form und Anzahl verändert sein. So findet man z.B. bei Individuen mit dem Chédiak-Higashi-Syndrom, einer Erbkrankheit, die bisher bei Menschen, Nerzen, Rindern und Katzen nachgewiesen wurde, atypische, vergrößerte, stark vakuolisierte Granula. Auch die Granula anderer Zellarten sind betroffen und erscheinen stark vergrößert (Davis et al., 1971).

Die größten Zellen in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Blutausstrichen waren die

Monozyten. Die regelmäßig runden Zellen wiesen Durchmesser von bis zu 17 μm auf. Sie waren in geringer Zahl vorhanden, ihr Vorkommen wird in der Literatur auch nur mit einer Anzahl von 0–4% der weißen Blutkörperchen angegeben (Kraft et al., 2005). Die blau bis violett gefärbten Zellkerne wiesen unterschiedliche Formen auf, in der Regel hatten sie eine nieren- oder hufeisenförmige Gestalt. Sie lagen meist exzentrisch in der Zelle (Jain, 1993). Bei allen vier Färbemethoden, die angewandt wurden, färbte sich das Zytoplasma typischerweise deutlich blau. Die Basophilie ist auf das Vorhandensein von größeren Mengen von rauem endoplasmatischem Retikulum und Polyribosomen im Zytoplasma zurückzuführen (Jain, 1986). Lediglich bei der Pappenheim-Färbung färbte sich das Zytoplasma eher blaugrau und erschien dadurch etwas blasser. Charakteristisch für die Monozyten sind außerdem unterschiedlich große Vakuolen im Zytoplasma (Bain, 1995). Azurophile Granula, die von einigen Autoren im Zytoplasma beschrieben wurden (Bessis, 1977; Jain, 1993) konnten von mir unter dem Lichtmikroskop nicht dargestellt werden.

Die Lymphozyten konnten, wie von Wilkins (1974) beschrieben, lichtmikroskopisch in kleine und große Lymphozyten unterteilt werden. Sehr viel häufiger waren in den untersuchten Ausstrichen kleine Lymphozyten mit einem Durchmesser von 5–8 μm zu finden. In geringerer Anzahl waren bis zu 15 μm große Lymphozyten vorhanden. Eine Unterteilung in kleine, mittelgroße und große Lymphozyten, wie sie z.B. Liebich (2004) für Haussäugetiere beschreibt, scheint für die Katze nicht sinnvoll zu sein, da offensichtlich zwei Populationen mit einem ziemlich genau definierten Größenbereich vorkommen. Der Zellkern der Lymphozyten ist normalerweise rund und füllt nahezu die ganze Zelle aus, so dass nur ein schmaler Zytoplasmasaum sichtbar ist (Schalm, 1965). Das Kernchromatin färbte sich bei allen vier Färbemethoden stark blau bis violett an. Bei den größeren Lymphozyten stellte sich der Zytoplasmasaum oft etwas breiter dar, und die Kerne waren meist weniger stark gefärbt. Das Zytoplasma färbte sich deutlich blau bis hellblau, bei der May-Grünwald-Färbung erschien es meist etwas blasser. Die Zytoplasmabasophilie korreliert dabei mit dem Gehalt an RNA, das heißt mit der Menge an endoplasmatischem Retikulum, Polyribosomen und Ribosomen im Zytoplasma (Bain, 1995). Obwohl Lymphozyten definitionsgemäß zu den Agranulozyten gehören, können sie kleine, azurophile Granula enthalten. Diese kommen häufig in den Lymphozyten von Rindern vor (Jain, 1993), waren in den hier untersuchten Präparaten der Katzen aber nicht nachweisbar. Große Lymphozyten können unter Umständen, vor allem bei Rindern, mit Monozyten verwechselt werden. Die Unterscheidung von T- und B-Lymphozyten ist mit konventionellen Färbungen lichtmikroskopisch nicht möglich. Nur

mit Hilfe immunhistochemischer Methoden können unterschiedliche, spezifische Oberflächenmoleküle (CD-Antigene) dargestellt werden (Wilson, 1991), die eine solche Unterscheidung erlauben.

3. Elektronenmikroskopie

Lichtmikroskopisch können mit speziell angefärbten Präparaten bestimmte morphologische Merkmale der Blutzellen sichtbar gemacht und die Zellen so unterschieden werden. Diese Merkmale beinhalten allerdings nur größere Strukturen wie den Zellkern und Granula bis zu einer Größe von etwa 0,2 μm . Um auch andere Strukturen und Zellorganellen sichtbar zu machen, muss die Elektronenmikroskopie angewandt werden, die bereits zu einem wichtigen Bestandteil in der Diagnostik von Blutzellen und ihren Veränderungen geworden ist. So kann mit Hilfe der ultrastrukturellen Untersuchung von Leukozyten beispielsweise der Befall mit Viren nachgewiesen werden. Auch die spezielle Diagnose von Leukämien kann elektronenmikroskopisch sehr viel differenzierter erfolgen (Steffens, 2000).

Gesunde, unveränderte Erythrozyten stellen sich elektronenmikroskopisch unauffällig dar, da diese Zellen kernlos sind und auch sonst keine Zellorganellen enthalten. Das Zytoplasma erscheint homogen und dunkel. Die hohe Elektronendichte beruht auf den Eisenatomen des Hämoglobins, welches 95% der Trockensubstanz der Erythrozyten ausmacht (Bessis, 1977; Liebich, 2004). Retikulozyten, die in geringer Anzahl im peripheren Blut gesunder Katzen vorkommen können, waren in den von mir untersuchten Ultradünnschnitten nicht vorhanden. Diese direkte Vorstufe der Erythrozyten enthält noch Reste von Zellorganellen (Mitochondrien, Ribosomen), die netzartig verklumpt im Zytoplasma liegen (Jain, 1993) und sich elektronenmikroskopisch darstellen ließen (Bessis, 1977).

Im Zellinneren der Thrombozyten befinden sich verschiedene Zellorganellen, die sich elektronenmikroskopisch darstellen lassen. Am zahlreichsten waren die α -Granula, die den lichtmikroskopisch sichtbaren Granula entsprechen. Sie sind rund oder oval und unterschiedlich elektronendicht. Sie stellen mit 80–200 nm die größten Organellen der Thrombozyten dar (Harrison und Cramer, 1993). Neben den α -Granula konnte ich auch regelmäßig elektronendichte Granula, die sogenannten „dense bodies“ nachweisen. Vereinzelt waren schmale, ovale Mitochondrien im Zytoplasma vorhanden (Bessis, 1973). Einige Thrombozyten enthielten größere Mengen von Glykogen, welche sich als sehr kleine schwarze Granula darstellen. Sie lagen meist in Ansammlungen vor, waren aber auch

vereinzelt im Zytoplasma vorhanden. Andere Thrombozyten enthielten dagegen keine Glykogenpartikel. Die Kanäle des offenen kanalikulären Systems, von dem die Thrombozyten durchzogen werden, erscheinen je nach Schnittrichtung als Vesikel oder Vakuolen. Das innere tubuläre System (Jain, 1993) konnte in meinen Präparaten nicht sicher identifiziert werden. Ultrastrukturelle Unterschiede feliner Thrombozyten zu Blutplättchen anderer Tierarten oder des Menschen sind in der Literatur kaum beschrieben. Lediglich die Thrombozyten der Rinder haben typischerweise große α -Granula und besitzen kein offenes kanalikuläres System (Smith, 1989; Bitzmann, 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede oder Besonderheiten in den untersuchten felinen Thrombozyten verifiziert werden.

Elektronenmikroskopisch lassen sich im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten zahlreiche Granula darstellen. Ward et al. (1972) beschreiben das Vorkommen von zwei Typen von Granula in den Neutrophilen von Katzen. Zum einen runde bis ovale, 150–300 nm große, primäre bzw. azurophile Granula. Diese erscheinen meist homogen und gekörnt, gelegentlich mit kristallinen Strukturen. Zum anderen kleinere, spezifische bzw. sekundäre Granula, die rund, oval oder hantelförmig sind. In ihrer runden Form haben sie einen Durchmesser von 100–200 nm, die hantelförmigen eine Länge von bis zu 400 nm. Ihre Struktur beschreiben Ward et al. als homogen und gekörnt, oder sie besitzen ein netzartiges Muster. In den von mir untersuchten Neutrophilen konnte eine deutliche Unterscheidung zwischen primären und sekundären Granula nicht getroffen werden. Die Granula stellten sich in der Regel homogen dar, bei einigen etwas größeren Granula waren manchmal unterschiedlich elektronendichte Bereiche sichtbar, die den bei Ward et al. beschriebenen kristallinen Strukturen der primären Granula entsprechen könnten. Manche in meiner Dissertationsarbeit beobachteten Granula hatte eine deutliche hantelförmige Gestalt, so dass es sich hierbei um das Vorliegen von sekundären Granula handeln könnte. Auch Ward et al. weisen darauf hin, dass die Unterscheidung beider Granulatypen schwerfällt, vor allem, wenn sich die Größe der sekundären Granula der Größe der primären annähert. Eine sichere Unterscheidung ist möglicherweise mit Hilfe enzymhistochemischer und zytochemischer Methoden möglich. Durch eine spezielle Färbemethode entdeckten Fittschen et al. (1988a) bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen einen dritten Granulatyp im Blut der Katzen, der Peroxidase, saure Phosphatase und vicinale Glycole enthält. Ein dritter Granulatyp in dieser Zusammensetzung konnte bei Neutrophilen von Menschen, Kaninchen und anderen Spezies nicht nachgewiesen werden. Abgesehen von den Granula sind im Zytoplasma der Neutrophilen nur wenige Zellorganellen enthalten. Neben Glykogenpartikeln finden sich

vereinzelt Mitochondrien. Juvenile neutrophile Granulozyten mit einem noch nicht segmentierten Kern, sogenannte stabkernige neutrophile Granulozyten, sind seltener als die reifen, segmentkernigen neutrophilen Granulozyten zu finden. Bei den meisten in dieser Arbeit untersuchten segmentkernigen neutrophilen Granulozyten waren in der jeweiligen Schnittebene zwei bis drei Kernsegmente sichtbar. Beide Formen wiesen deutlich heterochromatische Kerne auf, wobei sich das hellere Euchromatin vor allem im Zentrum des Zellkerns befindet. Das dominierende, dunklere Heterochromatin befindet sich um das Zentrum herum, entlang der Zellkernmembran. Ein vermehrter Euchromatingehalt wurde im Falle gewisser Infektionen beschrieben (Steffens, 2000), konnte aber in meinen Untersuchungen an gesunden Katzen nicht beobachtet werden.

Die eosinophilen Granulozyten sind zwar nach den Neutrophilen die zweithäufigsten Granulozyten beim Haussäugetier, treten mit ihrem relativen Leukozytenanteil von 2–10% jedoch nur in geringer Anzahl im peripheren Blut auf. Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Der Zellkern der Eosinophilen ist meist doppelt gelappt, wie auch von Steffens (2000) schon beschrieben wurde. Bei den von mir elektronenmikroskopisch untersuchten felines Eosinophilen war in der Schnittebene jeweils nur ein Kernsegment sichtbar. Ihr Zytoplasma kann größere und klarer definierte Mitochondrien und Golgi-Apparate enthalten als Basophile oder Neutrophile. Auch Ribosomen, Glykogenpartikel und Zisternen des endoplasmatischen Retikulums kommen vor. Wie schon im Lichtmikroskop können auch im Elektronenmikroskop die eosinophilen Granulozyten eindeutig anhand ihrer zahlreichen spezifischen Granula identifiziert werden. Die Granula sind mit 700 nm (Ward et al., 1972) deutlich größer als die der neutrophilen Granulozyten. Ihre Gestalt ist oval, rund oder länglich, das Innere hat stets eine heterogene Struktur. Die länglichen Granula entsprechen den lichtmikroskopisch sichtbaren, stäbchenförmigen Granula. Die großen runden Granula stellen wahrscheinlich den Querschnitt durch die längliche Form dar. Diese Form ist einzigartig bei der Katze. Je nach Schnittebene enthalten die Granula einen länglichen oder runden, unterschiedlich elektronendichten Kern, der von einer weniger elektronendichten Matrix umgeben ist. Ward et al. beschreiben den Kern als kristalline Struktur, die aus konzentrischen Ringen aufgebaut ist (1972). Diese Beobachtung konnte ich bei der mir vorliegenden Vergrößerung der Zellen nicht machen. Diese kristalloide Struktur weisen die spezifischen Granula der Eosinophilen von Katzen, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten und Menschen auf. Die Granula von Nerzen und Kühen sind dagegen homogen, während bei Pferden und Hunden beide Formen auftreten können (Bainton, 1995). Die

kleineren, bis 150 nm großen primären Granula stellen sich rund oder hantelförmig dar und besitzen eine homogene Innenstruktur. Sie ähneln somit morphologisch den sekundären Granula der Neutrophilen. Ein weiterer Granulatyp der von Dvorak et al. (1992) beschrieben wurde, die sogenannten Mikrogranula bzw. vesikulotubuläre Strukturen, konnten in der vorliegenden Vergrößerung ebenfalls nicht eindeutig identifiziert werden. Diese sind spezifisch für Eosinophile und erscheinen rund, C-förmig oder länglich und sind für den Transport von Proteinen vom Ort ihrer Synthese zu den spezifischen Granula zuständig (Young, 2000).

Basophile Granulozyten, die bei der Katze nur gelegentlich im peripheren Blut auftreten, waren in den von mir untersuchten Präparaten elektronenmikroskopisch nicht nachweisbar. In höherer Anzahl kommen basophile Granulozyten physiologischerweise bei einigen Vogelarten, Reptilien, aber auch bei einigen Säugern, wie dem Kaninchen vor (Steffens, 2000). Außerdem ist eine optimale Fixierung zur sicheren Identifizierung nötig, da die Granula der Basophilen relativ leicht wasserlöslich sind, und ihr Inhalt bei den umfangreichen Präparationsschritten für die ultrastrukturelle Untersuchung leicht verloren geht oder verändert wird. Solch veränderte Basophile könnten dann mit degranulierten Neutrophilen oder Eosinophilen verwechselt werden (Dvorak, 1998). Ward et al. (1972) beschreiben bei ihren ultrastrukturellen Untersuchungen feliner Granulozyten 300–400 nm lange Mitochondrien im Zytoplasma von basophilen Granulozyten, ebenso einige Ribosomen und Glykogenpartikel. Die bis zu 700 nm großen, ovalen spezifischen Granula der Katze haben (bei optimaler Fixierung) eine homogene, netz- oder lamellenförmige Matrix, durch die sie sich eindeutig von den kristalloiden eosinophilen Granulozyten unterscheiden lassen. Die bereits erwähnte Wasserlöslichkeit einiger Granulakomponenten kann jedoch dazu führen, dass Vakuolen oder weniger elektronendichte Bereiche in den Granula entstehen. Neben den großen Granula beschreiben Ward et al. auch hier wieder kleinere, bis 200 nm lange, homogene, runde oder hantelförmige Granula. Der Kern kann segmentiert oder nierenförmig sein, je nach Schnittebene sind ein bis drei Segmente sichtbar (Steffens, 2000).

Auch Monozyten waren in den von mir untersuchten Präparaten nicht vorhanden. Laut Beschreibungen in der Literatur haben sie im peripheren Blut meist eine runde bis ovale Form, können diese jedoch verändern, wenn sie in das Gewebe einwandern, um sich dort zu Makrophagen zu entwickeln (Steffens, 2000). Ihr Zellkern kann sehr variable Formen annehmen. Er ist relativ groß, unregelmäßig und nicht segmentiert. Häufig erscheint er nieren- oder hufeisenförmig. Das Kernchromatin ist typischerweise diffus oder netzförmig und kann

kondensierte Bereiche aufweisen. Elektronenmikroskopische Darstellungen lassen Mikrovilli-ähnliche Ausstülpungen auf der Zelloberfläche erkennen. Ebenfalls nur elektronenmikroskopisch sichtbar sind kleine, lysosomale, homogene Granula, die aus dem Golgi-Apparat entstehen. Sie sind positiv für saure Phosphatase und Arylsulfatase, können aber entweder Peroxidase positiv oder negativ sein (Jain, 1986). Im Zytoplasma der Monozyten findet man außerdem raues endoplasmatisches Retikulum, wenige Ribosomen und Mitochondrien. Charakteristisch für Monozyten sind die unterschiedlich großen Vakuolen im Zytoplasma, die sich meist in der Peripherie der Zelle befinden (Hees und Tschudi, 1990). Für den Menschen wurde beschrieben, dass es sich bei den Vakuolen meist um Artefakte handelt, dass sie aber auch mit einer erhöhten Phagozytoseaktivität bei einigen Erkrankungen in Zusammenhang zu bringen sind (Church und Levi-Schaffer, 1997). Tierartige ultrastrukturelle Unterschiede der Monozyten sind in der Literatur nicht beschrieben.

Bei den Lymphozyten können ultrastrukturell kleine und große Formen unterschieden werden, wobei die kleinen Lymphozyten, wie beim Hund, häufiger vorkommen. Bei Rindern treten regelmäßig größere Lymphozyten auf (Jain, 1993). Eine Unterscheidung von B- und T-Lymphozyten ist allerdings in der Regel auch mit dem Elektronenmikroskop nicht möglich. Lediglich aktivierte B-Lymphozyten, die sich bereits zu Plasmazellen transformieren, besitzen bestimmte Merkmale anhand derer man sie als B-Zellenabkömmlinge identifizieren kann (Steffens, 2000). Kleine und große Lymphozyten sind runde Zellen, häufig mit kurzen Mikrovilli auf der Oberfläche. Sie unterscheiden sich hauptsächlich im Verhältnis ihrer Zytoplasmamenge zur Größe des Zellkernes. Kleine Lymphozyten besitzen einen runden Zellkern, oft mit flachen Einziehungen, der nahezu das gesamte Zellinnere ausfüllt. Das Heterochromatin liegt der Zellkernmembran an, ist z.T. auch verstreut im Inneren des Zellkerns. Es verbleibt ein schmaler Zytoplasmasaum um den Kern, in dem hauptsächlich Ribosomen und Mitochondrien sichtbar sind. Andere Zellorganellen wie der Golgi-Apparat – endoplasmatisches Retikulum und kleine Granula können ebenfalls gelegentlich vorkommen (Jain, 1986) – konnten bei dieser Arbeit aber nicht immer sicher identifiziert werden. Die größeren Lymphozyten haben ebenfalls einen runden Zellkern, das Zytoplasma enthält die gleichen Zellorganellen, aber der Zytoplasmasaum ist in der Regel breiter. Plasmazellen, die nach Antigenstimulation aus B-Lymphozyten entstehen, konnten in den untersuchten Präparaten nicht identifiziert werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Ultrastruktur durch das vermehrte Vorkommen von rauem endoplasmatischem Retikulum im Zytoplasma. Auch die

Mitochondrien sind zahlreicher. Der Zellkern liegt exzentrisch, und das Heterochromatin ist grobschollig, klumpig oder weist eine Radspeichenstruktur auf (Bain, 1995).

4. Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden insgesamt 17 Lektine verwendet, um Zuckerstrukturen der Blutzellen näher zu bestimmen. 14 davon, nämlich die Lektine WGA, WGAs, GSA-I, PNA, RCA, DBA, SJA, SBA, UEA-I, Con A, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L, wurden mit dem direkt gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) verwendet. Die übrigen drei Lektine, VAA, MAA-I und SNA wurden mit der Streptavidin-Biotin-Complex-Methode angewendet. Um die Blutzellen leichter voneinander unterscheiden zu können, wurde bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen gleichzeitig eine Färbung des Zellkerns mit DAPI durchgeführt.

Die Zellmembranen der Erythrozyten der Katzen wiesen in der Regel deutlich positive Reaktionen mit den Lektinen WGA, WGAs, RCA, Con A, LCA, PSA und PHA-E auf. Nur schwach positiv reagierten die Erythrozyten meist nur weniger Tiere mit den Lektinen GSA-I, PNA, DBA, SBA, VAA, UEA-I, PHA-L, MAA-I und SNA. Bei keinem Tier erfolgte die Bindung des Lektins SJA. Aus dem Bindungsverhalten der Lektine lässt sich schließen, dass die Erythrozyten der Katze in größerer Menge GlcNAc-/Neu5Ac-, β GlcNAc-, Mannose- und Glukosereste enthalten. GalNAc-, Galaktose- und Fukosereste sowie komplexe Kohlenhydratstrukturen kommen dagegen in geringeren Mengen vor. Die Verwendung von Lektinen zur Charakterisierung von Blutzellen hat eine lange Geschichte. Noch ehe Lektine als solche und ihre Zuckerspezifität bekannt waren, entdeckte Stillmark 1888, dass ein Extrakt des afrikanischen Wunderbaumes (castor bean) die Erythrozyten verschiedener Tierarten agglutinieren konnte. Heute ist bekannt, dass dafür das Lektin *Ricinus communis* agglutinin (RCA) verantwortlich ist. In den folgenden Jahren wurden Lektine häufiger für Agglutinationstests von Erythrozyten sowohl beim Menschen als auch bei Tieren verwendet. So machten Sumner und Howell 1936 die Beobachtung, dass Con A, das Lektin der Schwertbohne, die Erythrozyten von Pferden, Hunden, Katzen, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten agglutinierte. Erythrozyten von Menschen und Rindern agglutinierten nicht mit Con A. Die Agglutination lässt darauf schließen, dass das Lektin an seinen spezifischen Zucker gebunden hat, und dass dieser somit auf der Membran der Erythrozyten vorkommt. Con A ist spezifisch für Mannose und Glukose. Dies wird durch die deutlich positiven Reaktionen der Erythrozyten mit Con A bei meinen Untersuchungen bestätigt. Butler et al.

(1991) führten Agglutinationstests von Katzenerythrozyten mit 11 verschiedenen Lektinen durch, um zu untersuchen, ob sich Blutgruppenantigene mit deren Hilfe bestimmen und sich so die Blutgruppen A, B und AB der Katze unterscheiden lassen. Die unterschiedlichen Reaktionsmuster ließen sie vermuten, dass Einzeltiere individuelle Kohlenhydratstrukturen auf ihrer Erythrozytenoberfläche haben. Es ist bekannt, dass feline Erythrozyten über Sialinsäure-Epitope verfügen, dies konnte in der vorliegenden Dissertationsarbeit durch die Bindung des Lektins WGA bestätigt werden. Butler et al. (1991) fanden weiter heraus, dass das Lektin WGA, welches an N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetylneuraminsäure bindet, stark mit den Erythrozyten von Katzen mit der Blutgruppe B reagierte, die Erythrozyten von Katzen mit der Blutgruppe A aber nicht agglutinierte. Dieses Ergebnis wurde auch von anderen Untersuchern bestätigt (Andrews et al., 1992), so dass WGA seither bei der Blutgruppenbestimmung der Katze eingesetzt wird (Griot-Wenk et al., 1993 und 1996). Bei meinen Untersuchungen reagierten die Erythrozyten mit dem Lektin WGA bei 18 Tieren schwach positiv, bei einem deutlich positiv. Da die Blutgruppe B bei Katzen sehr selten vorkommt, kann man allerdings nicht davon ausgehen, dass alle untersuchten Tiere die Blutgruppe B haben. Aufgrund der lediglich schwach positiven Reaktion ist es wahrscheinlicher, dass Katzen mit der Blutgruppe A sehr viel geringere Mengen an N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetylneuraminsäure auf ihrer Erythrozytenmembran besitzen und eine Reaktion mit dem Lektin deshalb sehr viel schwächer ausfällt. Darüber hinaus lassen sich die Ergebnisse von reinen Agglutinationstests anderer Arbeitsgruppen aufgrund des unterschiedlichen experimentellen Ansatzes nicht unmittelbar auf die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit übertragen. Weitere Lektine, die Butler et al. (1991) in ihrer Studie verwendeten und die auch ich eingesetzt habe, waren Con A und PNA. Con A agglutinierte bei der Arbeit von Butler et al. (1991) die Erythrozyten aller untersuchten Katzen, PNA reagierte gar nicht. Auch dieses Ergebnis deckt sich weitgehend mit meinen Untersuchungen. Während Con A durchweg deutlich positive Reaktionen hervorrief, wiesen die Erythrozyten eine Bindung von PNA nur bei 20% der Katzen auf. Auch Griot-Wenk et al. (1993) verwendeten für einen Hämagglutinationstest die Lektine WGA, RCA, Con A, PNA, DBA und SJA. WGA reagierte stark mit Erythrozyten von Katzen mit der Blutgruppe B und AB und nur schwach bei Katzen der Blutgruppe A. Ebenfalls positiv reagierten die Erythrozyten mit den Lektinen RCA und Con A, keine Bindung erfolgte bei ihnen mit PNA, DBA und SJA. Bei meinen Untersuchungen reagierten die Erythrozyten mit den Lektinen WGA, RCA und Con A ebenfalls zu 100% schwach bis deutlich positiv. Bei PNA und DBA war aber zumindest bei 25% der Tiere eine Bindung des Lektins zu erkennen, SJA reagierte

dagegen ebenfalls negativ.

Bei den Thrombozyten konnte eine überwiegend schwach bis deutlich positive Reaktion mit den Lektinen WGA, WGAs, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L festgestellt werden. Nur schwach positive Reaktionen zeigten die Lektine GSA-I, PNA, RCA, DBA, SJA, SBA und Con A. Keine Bindung an die Thrombozyten fand durch das Lektin VAA statt. Die Lektine UEA-I, MAA-I und SNA reagierten lediglich mit max. 40% der Thrombozytenmembranen schwach positiv, wohingegen überhaupt keine Bindung an die Granula stattfand. Diese Ergebnisse lassen auf das Vorhandensein von GlcNAc/Neu5Ac-, β GlcNAc-, Mannose- und Glukoseresten sowie den für PHA-E und PHA-L spezifischen Oligosacchariden schließen. In geringeren Mengen kommen auch GalNAc und Galaktose vor. Fukose ist den Ergebnissen nach hingegen nur in sehr geringen Konzentrationen in der Membran vorhanden. Dieses Ergebnis deckt sich zum Teil mit der Untersuchung von Darbès et al. (1993), die die Bindung von LCA, PSA, WGA und PHA-L an Hunde- und Katzenthrombozyten nachwies. Sie weisen darauf hin, dass LCA an das Glykoprotein GP IIb in der Membran von Thrombozyten des Menschen bindet. Da LCA und PSA die gleiche Kohlenhydratspezifität besitzen und auch beide Lektine bei ihrer Untersuchung positiv mit den Thrombozyten beider Tierarten reagierten, schlussfolgerten sie daraus, dass auch diese das GP IIb in der Membran exprimieren. Positiv reagierte ebenfalls PHA-L sowohl mit den Thrombozyten von Hunden als auch von Katzen. WGA zeigte bei ihnen, im Gegensatz zu der vorliegenden Untersuchung, keine Reaktion mit feline Thrombozyten, sondern nur mit Blutplättchen der Caniden. Ebenfalls keine Bindung bei beiden Tierarten beschreiben sie für die Lektine PNA, SBA, Con A, UEA-I, DBA und RCA. Auch dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen meiner Untersuchung. Für diese Lektine konnten (bis auf UEA-I) von mir überwiegend schwach positive Reaktionen mit den Thrombozyten nachgewiesen werden.

Positive Bindungsreaktionen mit verschiedenen Lektinen, z.T. mit sehr starker Fluoreszenz, waren bei den neutrophilen Granulozyten besonders im Bereich der Granula zu beobachten. Zu in der Regel deutlich bis stark positiven Reaktionen kam es dabei mit den Lektinen WGA, WGAs, GSA-I, RCA, Con A, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L. Ebenfalls in den meisten Fällen positiv, jedoch in etwas schwächerer Ausprägung, verlief die Reaktion mit den Lektinen PNA, DBA und VAA. Die Lektine SJA, SBA, UEA-I und SNA wiesen dagegen meist gar keine Bindung an die Granula auf. Nur bei 10–30% der Katzen konnte eine schwach positive Reaktion der Granula festgestellt werden. Die Reaktion mit dem Lektin MAA-I verlief vollständig negativ. Das Zytoplasma der Neutrophilen reagierte meist weniger deutlich

oder gar nicht mit den Lektinen. Eine deutliche Bindung war nur bei den Lektinen WGA, WGAs, PNA und RCA nachzuweisen. Die Reaktionen mit den Lektinen SJA, SBA, VAA, UEA-I, LCA, MAA-I und SNA waren negativ, die Lektine GSA-I, DBA, Con A, PSA, PHA-E und PHA-L reagierten bei 5–40% der Tiere schwach positiv mit dem Zytoplasma. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei sehr starker Fluoreszenz der Granulozyten die Fluoreszenz des Zytoplasmas schwer zu beurteilen war. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Granula der neutrophilen Granulozyten der Katze größere Mengen der Kohlenhydrate GlcNAc/Neu5Ac, β GlcNAc, Mannose, Glukose und die für PHA-E und PHA-L spezifischen Oligosaccharide enthalten. Fukose scheint hingegen kaum vorzukommen. Die Beurteilung des Vorkommens von GalNAc und Galaktose ist dagegen etwas differenzierter zu betrachten. Die Reaktionen mit den für diese Kohlenhydrate spezifischen Lektinen fielen bei GSA-I, PNA und RCA z.T. sehr stark positiv aus. Im Gegensatz dazu waren nur schwache bzw. gar keine Bindungen der Lektine DBA, SJA, SNA, SBA und VAA nachzuweisen. Die Ursachen dafür sind weitgehend unklar.

Für die eosinophilen Granulozyten konnte in der vorliegenden Arbeit bei einigen Tieren eine schwach positive Reaktion des Zytoplasmas mit den Lektinen WGA, WGAs, PNA, RCA, DBA und PHA-L beobachtet werden; ausgeprägter waren die Reaktionen der Granula. Die Lektine WGA, WGAs, PNA, RCA, DBA und PHA-L riefen bei nahezu allen Tieren deutlich bis stark positive Reaktionen mit den Granula hervor. Ebenfalls positiv, allerdings meist nur mit schwacher Ausprägung, reagierten die Granula aller Tiere mit den Lektinen GSA-I, SJA, SBA und VAA. Zu sowohl positiven als auch negativen Reaktionen der eosinophilen Granula kam es mit den Lektinen UEA-I, Con A, LCA, PSA, PHA-E, MAA-I und SNA. Bis auf das Lektin PSA überwog mit 66–95% die schwach positive Reaktion der Lektine. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Granula der eosinophilen Granulozyten in größeren Mengen die Kohlenhydrate GlcNAc/Neu5Ac, β GlcNAc, GalNAc, Galaktose und für PHA-L spezifische Oligosaccharide enthalten. In geringeren Mengen scheinen sie Fukose, Mannose, Glukose und andere komplexe Kohlenhydratstrukturen zu exprimieren.

Basophile Granulozyten, die bei der Katze nur sehr selten im peripheren Blut vorkommen, konnten in den untersuchten Ausstrichen nicht sicher identifiziert werden. Eine Aussage über ihre Kohlenhydratstruktur ist somit nicht möglich.

Insgesamt waren in allen untersuchten Blutaussstrichen nur sehr wenige Monozyten zu finden. Die geringe Anzahl an Zellen, die ausgewertet werden konnte, lässt eine eindeutige Beurteilung nicht zu. Bei den meisten Lektinen konnte keine Bindung des Lektins festgestellt

werden. Lediglich bei jeweils einem Tier wurde eine schwach positive Reaktion der Monozyten mit den Lektinen WGA, GSL und PNA beobachtet.

Die Lymphozyten reagierten bei den meisten Tieren positiv mit den Lektinen WGA, WGAs, GSA-I, RCA, Con A, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L. Bei nur 10–20% der Katzen konnte auch eine Bindung der Lektine PNA, DBA und UEA-I festgestellt werden. Bei keinem Tier erfolgte eine Reaktion mit den Lektinen SJA, SBA, VAA, SNA und MAA-I. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auf der Oberfläche der Lymphozyten bei Katzen regelmäßig die Kohlenhydrate GlcNAc/Neu5Ac, β GlcNAc, Mannose, Glukose und für PHA-E und PHA-L spezifische komplexe Kohlenhydratstrukturen vorhanden sind. Seltener kommen auch GalNAc-, Galaktose-, und Fukosereste vor. Es ist aber auch möglich, dass die Kohlenhydrate größtenteils durch Sialinsäure maskiert sind, und dass manche Lektine deshalb nicht oder nur schwach binden konnten. Newman und Boss (1980) untersuchten die Lymphozyten von Mäusen auf die Bindungsfähigkeit von PNA. Sie beobachteten, dass die Vorläuferzellen sowohl von B- als auch T-Lymphozyten positiv mit dem Lektin reagierten, während die reifen Lymphozyten kaum bzw. keine Bindung des Lektins aufwiesen. Erst nach Behandlung mit Neuraminidase, welche Sialinsäure von Glykoproteinen abspaltet, wiesen die reifen T-Lymphozyten eine Bindung von PNA auf, während die reifen B-Lymphozyten weiterhin negativ blieben. Daraus lässt sich schließen, dass der PNA-Rezeptor während der Reifung der T-Lymphozyten von Sialinsäure maskiert wird, während die B-Lymphozyten diesen Rezeptor vollständig verlieren. Zu diesem Ergebnis kamen auch Brown und Williams (1982) bei ihren Untersuchungen mit Lymphozyten von Ratten und Mäusen. Zusätzlich fanden Sie heraus, dass das Lektin SBA an reife B-Lymphozyten bindet. Das auch im Rahmen dieser Untersuchung festgestellte unterschiedliche Bindungsverhalten ist darauf zurückzuführen, dass SBA spezifisch für terminales N-Acetyl-Galaktosamin ist, PNA für Galaktose β 1 \rightarrow 3 D N-Acetyl-Galaktosamin (Brown und Williams, 1982). Bei den Lymphozyten des Menschen weisen nach Behandlung mit Neuraminidase sowohl die reifen B- als auch T-Zellen eine Bindung von PNA auf (Newman et al., 1978). Bei Hühnern wiederum binden alle Formen der Lymphozyten das Lektin PNA (Rose und Malchiodi, 1981). Ob sich auch bei der Katze reife von unreifen bzw. B- von T-Lymphozyten mit Hilfe der Lektine PNA und SBA unterscheiden lassen, müsste durch entsprechende weiterführende Untersuchungen geprüft werden.

Abschließend bleibt anzumerken, dass das Ergebnis der glykohistochemischen Untersuchungen durch verschiedene weitere Faktoren beeinflusst werden kann. Die erfolgte

Auswertung der Ergebnisse, d.h. die Beurteilung der Intensität der Fluoreszenz, beruht auf z.T. subjektiven Bewertungen und Erfahrungen des Untersuchers. Auch bei der Zuckerspezifität muss beachtet werden, dass einzelne Lektine Variationen am C-2-Atom desjenigen Zuckers, den sie binden, tolerieren – andere nicht. Dies kann dazu führen, dass Lektine, die eigentlich über die gleiche Zuckerspezifität verfügen, unterschiedliche Bindungsverhalten aufweisen (Goldstein und Poretz, 1986). Auch binden manche Lektine mit unterschiedlicher Affinität an mehrere Kohlenhydrate. So gibt es für Lektine die mit hoher Affinität an spezifische Monosachharide binden meist auch potente Oligosaccharide (Rüdiger und Gabius, 2009). Bei dem Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten ist außerdem zu beachten, dass die Methoden der lektinhistochemischen Untersuchungen z.T. voneinander abweichen, so dass dies ein möglicher Grund für unterschiedliche Ergebnisse bei den Arbeiten von verschiedenen Autoren sein kann.

VI Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung der Blutzellen von Katzen durchgeführt. Zusätzlich wurden erstmals im größeren Umfang glykohistochemische Methoden angewandt, um die Kohlenhydratstrukturen auf den einzelnen Blutzellen näher zu bestimmen. Es wurde das Blut von insgesamt 26 klinisch gesunden, männlichen und weiblichen Katzen unterschiedlichen Alters untersucht. Für die Lichtmikroskopie erfolgte die Färbung der Blutausrichungen nach May-Grünwald, Giemsa, Pappenheim und die Diff-Quick-Färbung. Mit allen vier Färbemethoden konnten gute Ergebnisse erzielt, und die verschiedenen Blutzellen sicher identifiziert werden. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der felines Blutzellen ließen sich besonders die Eosinophilen durch ihre Granula leicht von anderen Zellen abgrenzen. Ultrastrukturell wird ihre heterogene Innenstruktur sichtbar. Der kristalloide Kern variiert dabei in seiner Dichte, Form und Größe. Eine ultrastrukturelle Beurteilung von basophilen Granulozyten war aufgrund ihrer geringen Zahl nicht möglich.

Glykohistochemisch wurden die felines Blutzellen mit den FITC-gekoppelten Lektinen WGA, WGAs, GSA-I, PNA, RCA, DBA, SJA, SBA, UEA-I, Con A, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L, sowie den biotinylierten Lektinen VAA-I, MAA-I und SNA untersucht.

Die Erythrozyten wiesen positive Reaktionen mit den Lektinen WGA, WGAs, RCA, Con A, LCA, PSA und PHA-E auf. Die Thrombozyten reagierten am deutlichsten mit den Lektinen WGA, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L. Die felines neutrophilen Granulozyten wiesen von allen Blutzellen die stärksten Bindungsreaktionen mit den Lektinen, vor allem im Bereich ihrer Granula, auf. Die deutlichsten Reaktionen wurden durch die Lektine WGA, WGAs, GSA-I, RCA, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L hervorgerufen. Ebenfalls vor allem im Bereich der Granula wiesen die eosinophilen Granulozyten Bindungsstellen für die Lektine WGA, WGAs, PNA, RCA, DBA und PHA-L auf. Lymphozyten reagierten dagegen mit keinem der Lektine besonders deutlich. Lediglich schwach positive Reaktionen konnten für die Lektine WGA, WGAs, GSA-I, RCA, Con A, LCA, PSA, PHA-E und PHA-L nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Bindungsreaktionen lassen allgemein auf ein regelmäßiges Vorkommen von GlcNAc/Neu5Ac-, β GlcNAc-, Mannose- und Glukoseresten und bestimmter komplexer Kohlenhydratstrukturen auf der Blutzelloberfläche und den Granula der Katze schließen. In geringerer Menge, aber regelmäßig vor allem bei neutrophilen und eosinophilen Granulozyten lassen sich GalNAc- und Galaktosereste nachweisen. Fukose scheint dagegen kaum

vorhanden zu sein. Das für diesen Zucker spezifische Lektin UEA-I reagierte lediglich mit den Granula der eosinophilen Granulozyten und vereinzelt mit den Thrombozyten schwach positiv. Weder bei den lichtmikroskopischen noch bei den glykohistochemischen Untersuchungen konnten Unterschiede der Blutzellen in Abhängigkeit vom Alter oder Geschlecht der untersuchten Katzen festgestellt werden.

VII Summary

Ultrastructural and glycohistochemical studies of feline blood cells

The aim of this thesis was the light- and electron-microscopical characterization of feline blood cells. In addition, a panel of lectins was applied for the first time to determine carbohydrate residues on the surface of the respective blood cells in more detail. The blood of 26 clinically healthy, male and female cats of different age was examined. The following conventional staining methods were applied: May-Grünwald, Giemsa, Pappenheim and Diff-Quick. Good results could be achieved with all four staining methods and the different blood cells could be precisely identified. Using transmission electron microscopy, eosinophils were easily delineated from other cells because of their characteristic granules which appear heterogeneous at the ultrastructural level. Their crystalloid core varies in density, size and shape. Glycohistochemically, the feline blood cells were examined with the FITC-labeled lectins WGA, WGAs, GSA-I, PNA, RCA, DBA, SJA, SBA, UEA-I, Con A, LCA, PSA, PHA-E, PHA-L, and the biotin-labeled lectins VAA-I, MAA-I and SNA. Erythrocytes showed positive reactions with the lectins WGA, WGAs, RCA, Con A, LCA, PSA and PHA-E. Platelets reacted most conspicuously with the lectins WGA, LCA, PSA, PHA-E and PHA-L. Of all the blood cells, the feline neutrophils showed the strongest positive staining reactions with several lectins, especially concerning their granules. Strongest reactions resulted after incubation with the lectins WGA, WGAs, GSA-I, RCA, LCA, PSA, PHA-E and PHA-L. Eosinophils showed distinct binding of several lectins in their granules (WGA, WGAs, PNA, RCA, DBA und PHA-L). In contrast, the lymphocytes showed no strong binding of any of the lectins applied. Only a weak positive reaction could be detected for the lectins WGA, WGAs, GSA-I, RCA, Con A, LCA, PSA, PHA-E and PHA-L.

The labeling pattern of the used lectins suggests that the carbohydrate residues GlcNAc/Neu5Ac, β GlcNAc, mannose, glucose and specific complex-carbohydrate-structures appear regularly on the surface or granules of feline blood cells. GalNAc and galactose can be detected in less amount but regularly in neutrophils and eosinophils. Usually no binding of fucose specific lectins occurred. UEA-I showed only a weak positive reaction in the granules of the eosinophils and occasionally with some platelets.

In my investigation no differences of the morphology or histochemistry of the feline blood cells was found in relation to sex or age of the cats studied.

VIII Literaturverzeichnis

ABBAS, A.K., MURPHY, K.M. und SHER, A. (1996):

Functional diversity of helper T lymphocytes

Nature 383, S. 787-793

ALEXANDER, W.S. (1998):

Cytokines in hematopoiesis

International Review of Immunology 16, S. 651-682

ALLEGREZZA-GIULIETTIS, A., SERRETTI, R., BECCERICA, E., MUTI, S., FERRETTI, G. und CERVINI, C. (1991):

Platelet release products modulate some aspects of polymorphnuclear leucocyte activation

Journal of Cell Biochemistry 47, S. 242-250

ALSAKER, R.D., LABER, J., STEVENS, J. und PERMAN, V. (1977):

A comparison of polychromasia and reticulocyte counts in assessing erythrocytic regenerative response in the cat

Journal of the American Veterinary Association, 170 (1), S. 39-41

ANDREWS, G.A., CHAVEY, P.S., SMITH, J.E. und RICH, L. (1992):

N-Glycolylneuraminic acid and N-Acetylneuraminic acid define feline blood group A and B antigens

Blood 79 (9), S. 2485-2491

ARNAOUT, M.A. (1990):

Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18

Blood 75, S. 1037-1050

ARNHOLD, J., FURTMÜLLER, P.G., REGELSBERGER, G., OBINGER, C. (2001):

Redox properties of the couple compound I/ native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase

European Journal of Biochemistry 268, S. 5142-5148

AUER, L., BELL, K. (1981):

The AB blood group system of cats

Animal Blood Groups and Biochemical Genetics 12, S. 287-297

AUER, L., BELL, K. (1983):

Transfusion reactions in cats due to AB blood group incompatibility

Research of Veterinary Science 35, S. 145-152

BAIN, B. J. (1995):

Blood cells, A Practical guide

Blackwell Science Ltd., London

- BAINTON, D.F. (1995):
Morphology of neutrophils, eosinophils and basophils
In: BEUTLER, E., LICHTMAN, M.A., COLLER, B.S. und KIPPS, T. (Hrsg.): *Williams Hematology*
New York: McGraw-Hill, S. 753-765
- BANCHEREAU, J. und STEINMAN, R.M., (1998):
Dendritic cells and the control of immunity
Nature 392, S. 245-251
- BELL, K. (1983):
The blood groups of domestic animals
In: AGAR, A.S. und BOARD, P.G. (Hrsg.): *Red blood cells of domestic mammals*
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, S. 137-164
- BENNET, V. und STENBUCK, P. (1980):
Association between anykrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane
Journal of Biology Chemistry 255, S. 6424
- BERTRAM, T.A. (1985):
Neutrophilic leucocyte structure and function in domestic animals
Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine 30, S. 91-129
- BESSIS, M. (1977):
Blood smears reinterpreted
Springer- Verlag, Berlin – Heidelberg – New York
- BHALLA, V., GAUR, V. und BHATIA, K. (1978):
Lectin studies
Vox Sanguinis 35, S. 241-247
- BITZMANN, DANIELA (2009):
Ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchungen am Blut des Rindes
Dissertation, LMU München
- BOEHMER, H. von (1988):
The developmental biology of T lymphocytes
Annual Review of Immunology 6, S. 309-326
- BOKOCH, G.M. (1995)
Chemoattractant signaling and leukocyte activation
Blood 86 (5), 1649-1660
- BOYD, W.C. und E. SHAPLEIGH (1954):
Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins)
Science 119, 419

BRECHER, G. (1949):

New methylene blue as a reticulocyte stain

American Journal of Clinical Pathology 19, S. 895-896

BRETSCHER, M. (1972):

Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes

Nature 236, S. 11-12

BROOKS, S. A., LEATHEM, A.J. und SCHUMACHER, U. (1997):

Lectin Histochemistry, a Concise Practical Handbook

Bios Scientific Publishers, S. 8-12, 16-17, 45-98

BROWN, E. (1997):

Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation

Seminars in Hematology 34, S. 319-326

BROWN, W.R.A. und WILLIAMS, A.F. (1982):

Lymphocyte cell surface glycoproteins which bind to soybean and peanut lectins

Immunology 46, S. 713-726

BRUMMENDORF, T.H., DRAGOWSKA, W., ZIJLMANS, J.M., THORNBURY, G., LANSDORP, P.M. (1998):

Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells

Journal of Experimental Medicine 188 (6), S. 1117-1224

BUTLER, M., ANDREWS, G.A., SMITH, J.E. und CHAVEY, P.S. (1991):

Thin layer chromatography of erythrocyte membrane glycolipids from type A and B cats

Comparative Haematology International 1, S. 196-199

BUTLER, M., ANDREWS, G.A. und SMITH, J.E. (1991):

Reactivity of lectins with feline erythrocytes

Comparative Haematology International 1, S. 217-219

BUTTERWORTH, A.E. und DAVID, J.R. (1981):

Eosinophil function

New England Journal of Medicine 304, S. 154-156

CALAMAI, E.G. und SPITNAGEL, J. K. (1982):

Characterization of rat polymorphonuclear leukocyte subcellular granules

Laboratory Investigation 46, 597-604

CARTWRIGHT, G.E., ATHENS, J.W., WINTROBE, M.M. (1964):

Analytic Review: The kinetics of granulopoiesis in normal man

Blood 24 (6), S. 780-803

CASAL, M.L., JEZYK, P.F. und GIGER, U. (1996):

Transfer of colostral antibodies from queens to neonatal kittens

American Journal of Veterinary Research 57, S. 1653-1658

- CHRISTIAN, J.A. (2000):
Red Blood Cell Survival and Destruction
In: FELDMANN, B.F., ZINKL, J.G. und JAIN, N.C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*
Lippincott Williams & Wilkins, S. 117-124
- CHRISTOPHER, M.M., WHITE, J.G. und EATON, J.W. (1990):
Erythrocyte pathology and mechanisms of Heinz body-mediated hemolysis in cats
Veterinary Pathology 27, S. 299-310
- CHUNG, J.B., SILVERMAN, M. und MONROE, J.G. (2003):
Transitional B cells: step by step towards immune competence
Trends in Immunology 24, S. 343-349
- CHURCH, M.K. und LEVI-SCHAFFER, F. (1997):
The human mast cell
Journal of Allergy and Clinical Immunology 99, S. 155-160
- CLINKENBEARD, K.D. und MEINKOTH, J.H. (2000):
Normal Hematology of the Cat
In: FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*
Lippincott Williams & Wilkins, S. 1064-1068
- CORASH, L., COSTA, J.L., SHAFER, B., DONLON, J.A., MURPHY, D. (1984):
Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations: III. Density-dependent differences in subcellular constituents
Blood 64, S. 185-193
- COSTA, J.J., WELLER, P.F. und GALLI, S.J. (1997):
The cells of the allergic response: mast cells, basophils and eosinophils
Journal of the American Medical Association 278, S. 1815-1822
- CRAMER, E.M. (1999):
Megakaryocyte structure and function
Current Opinion in Hematology 6, 354-361
- DARBES, J., COLBATZKY, F., MINKUS, G. und HERMANN, W. (1993):
Demonstration of feline and canine platelet glycoproteins by immuno- and lectin histochemistry
Histochemistry 100, S. 83-91
- DAVIS, W.C., SPICER, S.S., GREEN, W.B. und PADGETT, G.A. (1971):
Ultrastructure of cells in bone marrow and peripheral blood on normal mink with the homologue of the Chediak-Higashi trait of humans: II. cytoplasmic granules in eosinophils, basophils, mononuclear cells and platelets
American Journal of Pathology, S. 411-432

DAY, M.J. (2000):

Biology of Lymphocytes and Plasma Cells

In: FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*

Lippincott Williams & Wilkins, S.240-246

DIXON, H. (1981):

Defining a lectin

Nature 292, S. 192

DVORAK, A.M. und MONAHAN, R.A. (1985):

Guinea pig bone marrow basophilopoiesis

Jornal of Experimental Pathology 2, S. 13-24

DVORAK, A.M., ACKERMANN, S.J. und WELLER, P.F. (1991):

Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils

In: HARRIS, J.R. (Hrsg.): *Blood cell biochemistry*

New York: Plenum Press, Vol. 2, S. 237-344

DVORAK, A.M. (1998):

Cell biology of the basophil

International Review of Cytology 180, S. 87-236

EATON, D.L., DE SAUVAGE, F.J. (1995):

Thrombopoietin and the humoral regulation of thrombocytopoiesis

Current Opinion in Hematology 2, 167-171

EBBE, S., YEE, T., CARPENTER, D., PHALEN, E. (1988):

Megakaryocytes increase in size within ploidy groups in response to the stimulus of thrombocytopenia

Experimental Hematology 16, 55-61

EINHOFF, W., FLEISCHMANN, G., FREIER, T., KUMMER, H. und RÜDIGER, H. (1986):

Interactions between lectins and other components of leguminous protein bodies

Biological Chemistry Hoppe-Seyler 367, S. 15-25

ENERBÄCK, L. (1997):

The differentiation and maturation of inflammatory cells involved in the allergic response: mast cells and basophils

Allergy 52; S. 4-10

EYQUEM, A., PODLIACHOUK, L. und MILOT, P. (1962):

Blood groups in chimpanzees, horses, sheep, pigs and other mammals

Annals of the New York Academy of Sciences 97 (1), S. 320-328

FITTSCHEN, C., PARMLEY, R.T. und AUSTIN, R.L. (1988a):

Ultrastructural cytochemistry of complex carbohydrates in developing feline neutrophils

The American Journal of Anatomy 181, S. 149-162

- FITTSCHEN, C., PARMLEY, R.T., BISHOP, S.P. und WILLIAMS, J.C. (1988b):
Morphometry of feline neutrophil granule genesis
The American Journal of Anatomy 181, S. 195-202
- FLYNN, J.N., HANLON, L. und JARRETT, O. (2000):
Feline leukaemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes
Immunology 101, S. 120-125
- FRANZ, H. (1990):
100 Jahre Lektinforschung – eine Bilanz
Naturwissenschaften 77 (3), S. 103-109
- GABIUS, H.J., RÜDIGER, H. und UHLENBRUCK, G. (1988):
Lektine
Spektrum der Wissenschaft, 50-60
- GALLAGHER, J.T. (1984)
Carbohydrate-binding properties of lectins: A possible approach to lectin nomenclature and classification
Bioscience Reports 4, 621-632
- GASPER, P. W. (2000):
The hemopoietic system
In: FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*
Lippincott Williams & Wilkins, S. 63-68
- GENTRY, P.A. (1992):
The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair
Journal of Comparative Pathology 107, S. 243-270
- GIGER, U., BÜCHELER, J. und PATTERSON, D.F. (1991):
Frequency and inheritance of A and B blood types in feline breeds of the United States
Journal of Heredity 82, 15-20
- GILMORE, C.E, GILMORE, V.H. und JONES, T.C. (1964):
Bone marrow and peripheral blood of cats: technique and normal values
Pathologica Veterinaria 1, 18-40
- GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. (1980):
What should be called a lectin?
Nature 285, S. 66
- GOLDSTEIN, I.J. und PORETZ, R.D. (1986):
Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins
In: I.E. LIENER, I.E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I.J. (Hrsg.): *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*
Academic Press, Orlando, San Diego, 33-247

GRINDEM, C. B. (1989):

Bone marrow biopsy and evaluation

Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 19, 669-696

GRIOT-WENK, M.E., PAHLSSON, P., CHISHOLM-CHAIT, A., SPITALNIK, P.F. und SPITALNIK, S.L. (1993):

Biochemical characterization of the feline AB blood group system

Animal Genetics 24, 401-407

GRIOT-WENK, M.E., CALLAN, M.B., CASAL, M.L., CHISHOLM-CHAIT, A., SPITALNIK, P.F., SPITALNIK, S.L., PATTERSON, D.F. und GIGER, U. (1996):

Blood type AB in the feline AB blood group system

American Journal of Veterinary Research 57, 1438-1442

HAARER, M. und GRÜNBAUM, E.-G. (1993):

Zur Blutgruppendiagnostik bei der Katze

Tierärztliche Praxis 21, 339-343

HALL, R.L. (1994):

Interpreting the leukogram

In: AUGUST, J.R. (Hrsg.): *Consultations in feline internal medicine*

WB Saunders, Philadelphia

HARRISON, P. und CRAMER, E.M. (1993):

Platelet alpha-granules

Blood Review 7, S. 52-62

HART, S. und NOLTE, I. (1991):

Zur Thrombozytenaggregation bei der Katze

Tierärztliche Praxis 19, S. 413-418

HARVATH, L. (1991):

Neutrophil chemotactic factors

Experientia Suppl. 59, S. 35

HEES, H. und TSCHUDI, P. (1990):

Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere

Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg

HOFFMANN-FEZER, G., MORTELBAUER, W., HARTMANN, K., MYSLIWETZ, J., THEFELD, S., BEER, B., THUM, I. und KRAFT, W. (1996):

Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus

Journal of Veterinary Science 61, S. 222-226

HOLMES, R. (1950):

Blood groups in cats

Journal of Physiology 111 (Suppl), S. 61P

HOLMES, R. (1953):

The occurrence of blood groups in cats

Journal of Experimental Biology 30, S. 355-357

JACKSON, C.W. (1989):

Animal models with inherited hematopoietic abnormalities as tools to study thrombopoiesis

Blood Cells 15, S. 237

JACOBSON, L.O., GOLDWASSER, E., FRIED, W. et al. (1957):

Role of the kidney in erythropoiesis

Nature 179, S. 633-634

JAIN, N.C. (1986):

Schalm's Veterinary Hematology, S. 676-730

Lea & Febiger, Philadelphia

JAIN, N. C. (1993):

Essentials of Veterinary Hematology

Lea & Febiger, Philadelphia

KASPERS, B. und GÖBEL, T. (2009):

Erworbene Abwehrmechanismen

In: ENGELHARDT, W. von (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*

Enke Verlag, Stuttgart, S. 226-236

KAY, J.E. (1991):

Mechanisms of T lymphocyte activation

Immunology Letters 29, S. 51-54

KLEBANOFF, S.J., LOCKSLEY, R.M., JORG, E.C. und ROSEN, H. (1982):

Oxidative response of phagocytes to parasite invasion

In: *Cytopathology of Parasitic Diseases*, Ciba Foundation Symposium (Pitman, London) 99, S. 92-112

KLEBANOFF, S.J. und CLARK, R.A. (1978):

The neutrophils: Function and Clinical disorders

North-Holland: Amsterdam, New York, Oxford

KOCOUREK, J. (1986):

Historical Background

In: LIENER, I.E., SHARON, N. und GOLDSTEIN, I.J. (Hrsg.):

The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine

Academic Press, Orlando, San Diego, S. 1-32

KRAFT, W., DÜRR, U. M. , FÜRLI, M., BOSTEDT, H., HEINRITZI, K. (2005):

Hämatologie

In: KRAFT, W. und DÜRR, U. M. (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*

Schattauer, Stuttgart, New York, S. 49-92

- LATIMER, K.S. (1995):
Leucocytes in health and disease
In: ETTINGER, S.J., FELDMANN, E.C. (Hrsg.): *Textbook of veterinary internal medicine*
WB Saunders, Philadelphia
- LEBIEN, T.W. und TEDDER, T.F. (2008):
B lymphocytes: how they develop and function
Blood 112, S. 1570-1580
- LEHRER, R.I. und GANZ, T. (1995):
Biochemistry and function of monocytes and macrophages
In: BEUTLER, E., LICHTMANN, M.A., COLER, B.S., KIPPS, T.J. (Hrsg.): *Williams hematology*
McGraw-Hill, New York, S. 869-873
- LEVEN, R. M. (2000):
Megakaryocytes
In: FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*.
Lippincott Williams & Wilkins, S. 443-447
- LIEBICH, H.-G. (2004):
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere
Schattauer, Stuttgart, 4. Auflage
- LIN, D.S. und BOWMAN, D.D. (1992):
Macrophage functions in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus and Toxoplasma gondii
Veterinary Immunology and Immunopathology 33, S. 69-78
- LINDHORST, T.K. (2000):
Wenn Zucker-Attrappen Bakterien zum Narren halten
Spektrum der Wissenschaft, März, 16-21
- LIS, H. und SHARON, N. (1993):
Kohlenhydrate und Zellerkennung
Spektrum der Wissenschaft 3, S. 66-76
- LONG, M.W. (1999):
Thrombopoietin stimulation of hematopoietic stem/progenitor cells
Current Opinion in Hematology 6, 159-16
- MARONE, G., CASOLARO, V., PATELLA, V., FLORIO, G. und TRIGGIANI, M. (1997):
Molecular and cellular biology of mast cells and basophils
International Archives of Allergy and Immunology 114, S. 207-217
- McEWEN, B.J. (1992):
Eosinophils: a review
Veterinary Research Communications 16, S. 11-44

- McLENNAN, I.C.M., GULBRANSON-JUDGE, A., et al. (1997):
The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop
Immunological Reviews 156, S. 53-66
- METCALF, D. (1989):
The molecular control of cell division, differentiation, commitment and maturation in hematopoietic cells
Nature 339, 27-30
- METCALF, D. (1991):
Control of granulocytes and macrophage: molecular, cellular, and clinical aspects
Nature 254, S. 529-533
- MEYERS, K.M. (1985):
Pathobiology of animal platelets
Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine 30, S. 131-165
- MIYAZAKI, H. und KATO, T. (1999):
Thrombopoetin: biology and clinical potentials
International Journal of Hematology 70, 216-225
- MISCHKE, R. (2003):
Praktische Hämatologie bei Hund und Katze
Schlütersche, Hannover, S. 11-56
- MORITZ, A. und HOFFMANN, C. (1997):
Thrombozytenzählung bei der Katze
Tierärztliche Praxis 25, S. 695-700
- MÜLLER, T.J. und MORRISON, M. (1981):
Glycoconnectin (PAS 2), a membrane attachment site for the human erythrocyte cytoskeleton
Progress in Clinical Biological Research 56, S. 95-112
- NASH, G.B., MEISELMANN, H.J. (1981):
Red cell ageing: changes in deformability and other possible determinants of in vivo survival
Microcirculation 1 (3), S. 255-284
- NELSON, D. und COX, M. (2009):
Lehninger Biochemie
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, S. 334-342
- NEWMAN, R.A., UHLENBRUCK, G., SCHUMACHER, K., VAN MIL, A. und KARDUCK, D. (1978):
Interaction of peanut agglutinin with human lymphocytes. Binding properties and topology of the receptor site
Zeitschrift für Immunitätsforschung 154, S. 451-462

NEWMAN, R.A. und BOSS, M.A. (1980):

Expression of binding sites for peanut agglutinin during murine B lymphocyte differentiation
Immunology 40, S. 193-200

NOROL, F., VITRAT, N., CRAMER, E., GUICHARD, J., BURSTEIN, S.A.,
VAINCHENKER, W. und DEBILI, N. (1998):

Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells
Blood 91, 830-843

ORLIC, D., BODINE, D.M. (1994):

What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up!

Blood 84, S. 3991-3994

PORTER, D.L., GOLDBERG, M.A. (1994):

Physiology of erythropoietin production
Seminars in Hematology 31, S. 112-121

PRASSE, K.W., SEAGRAVE, R.C., KAEBERLE, M.L. und RAMSEY, F.K. (1973):

A model of granulopoiesis in cats
Laboratory Investigation 28, 292-299

PRESENTY, B., JERUSHALMY, Z., BEN-BASSAT, M. und PERK, K. (1980):

Genesis, ultrastructure and cytochemical study of the cat eosinophil
The Anatomical Record 196, S. 119-127

REAGAN, W.J., VAP, L.M. und WEISER, M.G. (1992):

Flow cytometric analysis of feline reticulocytes
Veterinary Pathology 29, S. 503-508

REINES, B.P. (2000):

Ontogeny of the Hemopoietic System

In: FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*

Lippincott Williams & Wilkins, S. 63-68

ROSE, M.L. und MALCHIODI, F. (1981):

Binding of peanut lectin to thymic cortex and germinal centres of lymphoid tissue
Immunology 42, S. 583-591

RÜDIGER, H. und GABIUS, H-J. (2001):

Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications
Glycoconjugate Journal 18: S. 589-613

RÜDIGER, H. und GABIUS, H-J. (2009):

Plant lectins

In: GABIUS, H-J. (Hrsg.): *The sugar code*
Wiley-VCH, S. 301-315

RÜSSE, I. (1998):

Herz- und Kreislaufsystem

In: RÜSSE, I. und SINOWATZ, F. (Hrsg.): *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg: S. 221-246

RUGGERI, Z.M. (1994):

New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation

Seminars in Hematology 31, S. 229-239

SCARBOROUGH, R.A. (1930):

The blood picture of normal laboratory animals

Yale Journal of Biology and Medicine 3, S. 276 -282

SCHALM, O.W. (1965):

Veterinary Hematology

Lea & Febiger, Philadelphia

SCOTT, M.A. und STOCKHAM, S.L. (2000):

Basophils and Mast Cells

In: FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*

Lippincott Williams & Wilkins, S. 308-317

SHAPIRO-SHELEF, M. und CALAME, K. (2005):

Regulation of plasma-cell development

Nature Reviews Immunology 5, S. 230-242

SHARON, N. (1987):

Lectins: An overview

In: K. OLDEN und J.B. PARENT (Hrsg.): *Vertebrate Lectins*

Van Nostrand Reinhold Advanced Cell Biology Series, New York, S. 27-45

SHOTTON, D.M., BURKE, B.E. und BRANTON, D. (1979):

The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies.

Journal of Molecular Biology 131, S. 303-329

SINOWATZ, F. (2000):

Blut, Knochenmark und lymphatisches System

In: HEES, H. und SINOWATZ, F. (Hrsg.): *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*

Deutscher Ärzte Verlag, 3. Auflage: S. 205-251

SMITH, C.M., BURRIS, S.M., WEISS, D.J. et al. (1989):

Comparison of bovine and human platelet deformability, using micropipette elastimetry

American Journal of Veterinary Research 50, S. 34

SMITH, G.S. und LUMSDEN, J.H. (1983)

Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing

Veterinary Immunology Immunopathology 4, 177-236

SMITH, J.E. (1987):

Erythrocyte membrane: structure, function and pathophysiology

Veterinary Pathology 24, S. 471

STECK, T.L. (1974):

The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review.

Journal of Cell Biology 62, S. 1-19

STEFFENS, W.L. (2000):

Ultrastructural Features of Leukocytes

In: FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*

Lippincott Williams & Wilkins, S. 326-336

STICKLE, J.E. (1996):

The neutrophil. Function, disorders, and testing

Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 26, S. 1013-1021

STIEGER, K., PALOS, H. und GIGER, U. (2005):

Comparison of various blood-typing methods for the feline AB blood group system

American Journal of Veterinary Research 66, 1393-1399

STILLMARK, H. (1888):

Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen

Dorpat, Univ., Diss.

TERRY, R.W., BAINTON, D.F. und FARQUHAR, M.G. (1969):

Formation and structure of specific granules in basophilic leukocytes of the guinea pig

Laboratory Investigation 21, S. 65-76

TIEDEMANN, K. und vanOOYEN, B. (1978):

Prenatal hematopoiesis and blood characteristics of the cat

Anatomy and Embryology 153, S. 243-267

TILL, J.E. und McCULLOCH, E.A. (1961):

A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells

Radiation Research 14, S. 213-219

WALSH, G.M. (2001):

Eosinophile granule proteins and their role in disease

Current Opinion in Hematology 8, S. 28-33

WAUGH, R.E., NARLA, M., JACKSON, C.W., MUELLER, T.J., SUZUKI, T. und DALE, G. (1992):

Rheological properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red cell age

Blood 79 (5), S.1351-1358

WEISS, L. (1967):

The histophysiology of bone marrow

Clinical Orthopaedics 52, S. 13-23

WELLER, P.F. (1994):

Eosinophils: structure and functions

Current Opinion in Immunology 6, S. 85-90

WELLER, P.F., LIM, K., WAN, H-C., DVORAK, A.M., WONG, D.T., CRUIKSHANK, W.W., KORNFELD, H. und CENTER, D.M. (1996):

Role of the eosinophil in allergic reactions

European Respiratory Journal 9 (suppl 2), S. 109-115

WHITE, J.G. (1994):

Anatomy and structural organization of the platelet

In: COLMAN, R.W., HIRSH, J., MARDER, V.J. und SALZMANN, E.W. (Hrsg.):

Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice

JB Lippincott Company, Philadelphia, S. 397-507

WILKINS, R.J. (1974):

Morphologic features of feline peripheral blood lymphocytes

Journal of the American Animal Hospital Association 10, S. 362-366

WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J. et al. (1990):

Hematology

McGraw-Hill, New York

WILSON, C.B. (1991):

The ontogeny of T lymphocyte maturation and function

The Journal of Pediatrics 118, S. S4-S9

WINDLE, W.F., SWEET, M. und WHITEHEAD, W.H. (1940):

Some aspects of prenatal and postnatal development of the blood in the cat

The Anatomical Record 78, S. 321-332

WOODMAN, D.D. (1992):

Erythropoietin

Comparative Hematology International 2, S. 1

YEAGLE, P. (1992):

The structure of Biological Membranes

CRC Press, Inc, London

YOUNG, K.M., MORIELLO, K.A. und PEICKERT, H. (1997):

Characterization of eosinophil progenitor cells in feline bone marrow

American Journal of Veterinary Research 58, S. 348-353

YOUNG, K.M. (2000):

Eosinophils

In: FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*

Lippincott Williams & Wilkins, S. 297-307

IX Anhang

1. a. Abkürzungsverzeichnis Lektine

Con A	Concanavalin A
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
GSA-I	Griffonia simplicifolia Agglutinin I
LCA	Lens culinaris Agglutinin
MAA-I	Maackia amurensis Agglutinin I
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythro-Agglutinin
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leuco-Agglutinin
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RCA	Ricinus communis Agglutinin
SBA	Soybean Agglutinin
SJA	Saphora japonica Agglutinin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
UEA-I	Ulex europaeus Agglutinin I
VAA	Viscum album Agglutinin
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGA succ	Wheat germ Agglutinin succinyliert

b. Abkürzungsverzeichnis allgemein

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
BFU-E	burst-forming unit erythrocyte
BFU-MK	burst-forming unit megacaryocyte
Ca	Calcium
CD	cluster of differentiation
CFU-B	colony-forming unit B-lymphocyte
CFU-Ba	colony-forming unit basophil
CFU-E	colony forming unit erythrocyte
CFU-Eo	colony-forming unit eosinophil
CFU-G	colony-forming unit granulocyte
CFU-GEMM	colony-forming unit granulocyte erythrocyte monocyte macrophage
CFU-GM	colony-forming unit granulocyte macrophage
CFU-L	colony-forming unit lymphocyte
CFU-M	colony-forming unit monocyte
CFU-MK	colony-forming unit megacaryocyte
CFU-S	colony-forming unit spleen
CFU-T	colony-forming unit T-lymphocyte
CSF	colony stimulating factor
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

db	dense bodies
DNA	desoxyribonucleic acid
DSH	Domestic Shorthair
E	Erythrozyt
EC	Euchromatin
ECF-A	eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis
ECP	eosinophil cationic protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eG	eosinophiler Granulozyt
EKH	Europäisch Kurzhaar
EM	Elektronenmikroskop
EPO	Eosinophile Peroxidase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ery	Erythrozyt
Fe	Eisen
FeLV	Felines Leukämievirus
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FIV	Felines Immundefizienz Virus
G	Granula
GalNAc	N-Acetyl-Glukosamin
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GHC	Glykohistochemie
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
Häm	Hämoglobin
HC	Heterochromatin
hG	hyaline Granula
HI-Virus	Humanes Immundefizienz Virus
Hkt	Hämatokrit
HSC	haematopoietic stem cells
IL	Interleukin
K	Kalium
kG	kristalline Granula
KH	Kohlenhydrate
Leu	Leukozyten
LGL	large granular lymphocytes
LM	Lichtmikroskop
Ly	Lymphozyten
M	Monozyt
MBP	major basic protein
MCH	mean corpuscular haemoglobin
MCHC	mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	mean corpuscular volume
Mg	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
Mk	männlich kastriert
MPO	Myeloperoxidase
MPS	mononukleäres Phagozytensystem

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nG	neutrophiler Granulozyt
[NeuAc] ₂ GD ₃	N-Acetyl-Neuraminsäure-Galaktose-Glukose-Ceramid
[NeuGc] ₂ GD ₃	N-Glykolyl-Neuraminsäure-Galaktose-Glukose-Ceramid
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PBS	phosphate buffered saline
pG	primäre Granula
PMN	polymorphnuclear leucocytes
PVA	Polyvinylacetat
SABC	Streptavidin-Biotin-Complex
SCF	stem cell factor
SI-Einheit	Système international d`unités
Tab.	Tabelle
TCR	T-cell receptor
Thr	Thrombozyt
VTS	vesikulotubuläre Strukturen
wk	weiblich kastriert
Zp	Zytoplasma
zV	zytoplasmatische Vakuole
Zk	Zellkern

2. Gebrauchslösungen

Lichtmikroskopie

Giemsa-Lösung

Giemsa-Stammlösung ¹	0,3 mL
Aqua dest.	ad 10 mL

Elektronenmikroskopie

Fixierlösung nach Karnovsky

10% Paraformaldehyd-Lösung:

Paraformaldehyd ¹	10 g
Aqua dest.	ad 100 mL
NaOH 0,1 M ¹	bis zu 6 Tropfen

Karnovsky-Stammlösung:

Paraformaldehyd-Lösung	20 mL
Cacodylat-Puffer 0,2 M	50 mL
Kalziumchlorid, wasserfrei ²	0,05 g

Karnovsky-Gebrauchslösung:	
Karnovsky-Stammlösung	10 mL
Glutaraldehyd, 25% ³	1,37 mL

Kontrastierungslösung

Osmiumtetroxid-Lösung, 2%:	
Osmiumtetroxid, 4%ig ⁴	2 mL
Cacodylat-Puffer 0,1 M	2 mL

Kaliumferrocyanid-Lösung, 3%:	
Kaliumferrocyanid ⁵	0,3 g
Cacodylat-Puffer 0,1 M	ad 10 mL

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

Cacodylat-Puffer

Lösung A:	
Cacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ³	8,56 g
Aqua dest.	ad 200 mL

Lösung B:	
HCl 0,2 M ¹	

Cacodylat-Puffer 0,2 M, pH 7,2:	
Lösung A	50 mL
Lösung B	4,2 mL
Aqua dest.	ad 100 mL

Cacodylat-Puffer 0,1 M, pH 7,2:	
Cacodylat-Puffer 0,2 M	50 mL
Aqua dest.	50 mL

Epon

Poly/bed 812 ⁴	16 mL
DDSA ⁴	10 mL
NMA ⁴	9 mL
DMP-30 ⁴	0,3- 0,5 mL

Bleicitratlösung nach Reynolds:

Natriumcitrat Stammlösung:

Natriumcitrat $\text{Na}_3 (\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ¹	35,7 g
Aqua dest.	ad 100 mL

Bleinitrat Stammlösung:

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

Bleicitrat-Lösung:

Aqua dest.	16 mL
Natriumcitrat Stock	3 mL
Bleinitrat Stock	2 mL
NaOH 1 M ¹	4 mL
Aqua dest.	ad 100 mL

GlykohochemiePBS-Puffer, pH 7,4

NaCl ¹	42,5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ¹	6,35 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ¹	1,95 g
Aqua dest.	ad 5 L
pH auf 7,4 einstellen	

Acetat-Puffer, pH 5

Natriumacetat-Lösung 0,1 M:

Natriumacetat ⁶	8,2 g
Aqua dest.	1000 mL

Essigsäure 0,1 M:

Essigsäure ⁷	5,8 mL
Aqua dest.	1000 mL

Die Natriumacetat-Lösung 0,1 M und die Essigsäure 0,1 M werden im Verhältnis 141:59 gemischt.

¹ Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

² Serva, Heidelberg

³ Agar Scientific LTD, Essex, England

⁴ Polysciences Inc., Warrington, USA

⁵ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

⁶ Agar Aids, Essex, England

⁷ Roth, Karlsruhe

3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Referenzbereiche einiger Blutwerte der Katze.....	4
Tab. 2:	Übersicht über die Kategorisierung der in der Untersuchung verwendeten Lektine.....	43
Tab. 3:	Übersicht über die Verwendung der Blutproben der Katzen.....	49
Tab. 4:	Herkunft und Zuckerspezifität der Lektine.....	50
Tab. 5:	Biotinylierte Lektine.....	51
Tab. 6:	Übersicht über die Hemmzucker.....	59
Tab. 7:	Blutbilder der Katzen.....	61
Tab. 8:	Ergebnisse Übersichtsfärbungen.....	71
Tab. 9:	Übersicht über die Bindung des Lektins WGA.....	86
Tab. 10:	Übersicht über die Bindung des Lektins WGAs.....	89
Tab. 11:	Übersicht über die Bindung des Lektins GSA-I.....	92
Tab. 12:	Übersicht über die Bindung des Lektins PNA.....	95
Tab. 13:	Übersicht über die Bindung des Lektins RCA.....	98
Tab. 14:	Übersicht über die Bindung des Lektins DBA.....	101
Tab. 15:	Übersicht über die Bindung des Lektins SJA.....	104
Tab. 16:	Übersicht über die Bindung des Lektins SBA.....	107
Tab. 17:	Übersicht über die Bindung des Lektins VAA.....	109
Tab. 18:	Übersicht über die Bindung des Lektins SNA.....	111
Tab. 19:	Übersicht über die Bindung des Lektins UEA-I.....	114
Tab. 20:	Übersicht über die Bindung des Lektins Con A.....	117
Tab. 21:	Übersicht über die Bindung des Lektins LCA.....	119
Tab. 22:	Übersicht über die Bindung des Lektins PSA.....	122
Tab. 23:	Übersicht über die Bindung des Lektins PHA-E.....	125
Tab. 24:	Übersicht über die Bindung des Lektins PHA-L.....	128
Tab. 25:	Übersicht über die Bindung des Lektins MAA-I.....	130

4. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Übersicht über die Zusammensetzung des Blutes.....	3
Abb. 2:	Schema der Streptavidin-Biotin-Methode.....	57
Abb. 3:	Übersicht Diff-Quick-Färbung.....	63
Abb. 4:	Thrombozyten, Giemsa-Färbung.....	63
Abb. 5:	Neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.....	64
Abb. 6:	Neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung.....	65
Abb. 7:	Neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.....	65
Abb. 8:	Neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.....	65
Abb. 9:	Neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.....	65
Abb. 10:	Eosinophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung.....	66
Abb. 11:	Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.....	66
Abb. 12:	Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.....	67
Abb. 13:	Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.....	67
Abb. 14:	Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.....	68

Abb. 15:	Monozyt, Diff-Quick-Färbung	69
Abb. 16:	Monozyt, May-Grünwald-Färbung,	69
Abb. 17:	Lymphozyten, May-Grünwald-Färbung	70
Abb. 18:	Lymphozyt, Giemsa-Färbung	70
Abb. 19:	Lymphozyt, Pappenheim-Färbung	70
Abb. 20:	Lymphozyten, Diff-Quick-Färbung	70
Abb. 21:	Thrombozyten, EM	73
Abb. 22:	Neutrophiler Granulozyt, EM	75
Abb. 23:	Neutrophiler Granulozyt, EM	76
Abb. 24:	Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, EM	77
Abb. 25:	Eosinophiler Granulozyt, EM	79
Abb. 26:	Eosinophiler Granulozyt, EM	80
Abb. 27:	Lymphozyt, EM	82
Abb. 28:	Lymphozyt, EM	83
Abb. 29:	Lymphozyten, EM.....	84
Abb. 30:	Neutrophiler Granulozyt, WGA.....	87
Abb. 31:	Neutrophile Granulozyten, WGA	87
Abb. 32:	Eosinophiler Granulozyt, WGA.....	87
Abb. 33:	Thrombozyten, WGA.....	87
Abb. 34:	Eosinophiler Granulozyt, WGAs	90
Abb. 35:	Eosinophiler Granulozyt, WGAs	90
Abb. 36:	Eosinophiler Granulozyt, WGAs	90
Abb. 37:	Neutrophile Granulozyten, WGAs.....	90
Abb. 38:	Neutrophiler Granulozyt, Monozyt, Lymphozyt, GSA-I.....	93
Abb. 39:	Monozyt, GSA-I.....	93
Abb. 40:	Eosinophiler Granulozyt, GSA-I.....	93
Abb. 41:	Neutrophiler Granulozyt, GSA-I.....	93
Abb. 42:	Neutrophile Granulozyten, Lymphozyt, PNA	96
Abb. 43:	Eosinophiler Granulozyt, PNA	96
Abb. 44:	Lymphozyten, PNA	96
Abb. 45:	Neutrophiler Granulozyt, RCA	99
Abb. 46:	Neutrophiler und eosinophiler Granulozyt, RCA	99
Abb. 47:	Eosinophiler Granulozyt, RCA	99
Abb. 48:	Neutrophiler Granulozyt, RCA	99
Abb. 49:	Eosinophiler Granulozyt, DBA.....	102
Abb. 50:	Eosinophiler Granulozyt, DBA.....	102
Abb. 51:	Monozyt, DBA.....	102
Abb. 52:	Neutrophiler Granulozyt, DBA.....	102
Abb. 53:	Eosinophile Granulozyten, neutrophiler Granulozyt, SJA.....	105
Abb. 54:	Eosinophiler Granulozyt, Monozyt, SJA	105
Abb. 55:	Eosinophiler Granulozyt, Lymphozyten, SJA	105
Abb. 56:	Eosinophile Granulozyten, neutrophiler Granulozyt, SJA.....	105
Abb. 57:	Neutrophiler Granulozyt, SBA	108
Abb. 58:	Eosinophiler Granulozyt, SBA	108
Abb. 59:	Eosinophiler Granulozyt, Lymphozyt, VAA	110
Abb. 60:	Eosinophiler Granulozyt, VAA.....	110
Abb. 61:	Eosinophiler Granulozyt, VAA.....	110
Abb. 62:	Eosinophiler Granulozyt, SNA	112
Abb. 63:	Neutrophile Granulozyten, SNA.....	112
Abb. 64:	Lymphozyten, SNA	112

Abb. 65:	Neutrophiler Granulozyt, UEA-I	115
Abb. 66:	Lymphozyt, UEA-I	115
Abb. 67:	Eosinophiler Granulozyt, UEA-I	115
Abb. 68:	Eosinophiler Granulozyt, UEA-I	115
Abb. 69:	Neutrophiler Granulozyt, Con A.....	118
Abb. 70:	Eosinophiler Granulozyt, Con A.....	118
Abb. 71:	Eosinophiler Granulozyt, LCA	120
Abb. 72:	Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt, LCA.....	120
Abb. 73:	Neutrophile Granulozyten, LCA.....	120
Abb. 74:	Neutrophiler Granulozyt, LCA	120
Abb. 75:	Eosinophiler und neutrophiler Granulozyt, PSA	123
Abb. 76:	Neutrophiler Granulozyt, PSA	123
Abb. 77:	Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyt, PSA	123
Abb. 78:	Neutrophile Granulozyten, PSA.....	123
Abb. 79:	Neutrophiler Granulozyt, Monozyt, PHA-E.....	126
Abb. 80:	Eosinophiler Granulozyt, PHA-E.....	126
Abb. 81:	Neutrophiler Granulozyt, Lymphozyten, PHA-E	126
Abb. 82:	Neutrophiler Granulozyt, PHA-E.....	126
Abb. 83:	Neutrophiler Granulozyt, PHA-L.....	129
Abb. 84:	Neutrophiler und eosinophiler Granulozyt, PHA-L.....	129
Abb. 85:	Eosinophiler Granulozyt, PHA-L.....	129
Abb. 86:	Blutzellen, PHA-L.....	129
Abb. 87:	Eosinophiler Granulozyt, MAA-I	131
Abb. 88:	Neutrophiler Granulozyt, MAA-I	131

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die fachliche Betreuung und stets freundliche Unterstützung.

Ich danke den Mitarbeitern des Institutes für Tieranatomie II für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Laborarbeit. Ein besonderer Dank gilt Frau C. Neumüller für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen und dafür, dass sie jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin bedanke ich mich bei Loui Morgott und Eva Brückmann. Beide waren mir bei der Probensammlung eine große Hilfe. Loui hat mich außerdem zu dieser Arbeit ermutigt, und ohne die liebe Eva hätte besonders die Laborarbeit nur halb so viel Spaß gemacht!

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinen allerliebsten Schwestern für ihre Anteilnahme und Unterstützung während der gesamten Zeit. Barbara danke ich besonders für das Korrekturlesen und Astrid für die Hilfe beim Summary. Ebenso bedanke ich mich bei Ralf Räuchle für seine Geduld und Rücksichtnahme.

