

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

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

**Ultrastrukturelle und histochemische
Untersuchungen am Blut des bovinen Kalbes
während der prä- und postnatalen
Entwicklung**

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

von
Caroline Margarethe Angela
Zauter-Preißinger
aus Nürnberg

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

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

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Förster

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Übersicht zum Blut des Rindes.....	2
1.1. Aufgaben und Zusammensetzung des Blutes	2
1.2. Spezielle Hämatologie des Rindes	3
1.3. Rassen und Altersunterschiede in der Hämatologie des Rindes.....	4
1.4. Blutgruppen des Rindes.....	6
2. Charakterisierung und Entstehung der einzelnen Blutzellen	8
2.1. Erythrozyten	8
2.1.1. Allgemeines	8
2.1.2. Erythropoese	8
2.1.3. Morphologie und Kinetik	9
2.1.4. Aufgaben	9
2.2. Thrombozyten.....	9
2.2.1. Allgemeines	9
2.2.2. Thrombopoese	10
2.2.3. Morphologie	10
2.2.4. Zytochemische Eigenschaften	11
2.2.5. Aufgaben	11
2.3. Lymphozyten	12
2.3.1. Allgemeines	12
2.3.2. Lymphopoese.....	12
2.3.3. Morphologie	12
2.3.4. Zytochemische Eigenschaften	13
2.3.5. Aufgaben	13
2.4. Neutrophile Granulozyten	14
2.4.1. Allgemeines	14
2.4.2. Neutrophile Granulopoese.....	14
2.4.3. Morphologie	15
2.4.4. Zytochemische Eigenschaften	15
2.4.5. Aufgaben	16
2.5. Eosinophile Granulozyten	17

2.5.1. Allgemeines	17
2.5.2. Eosinophile Granulopoese	17
2.5.3. Morphologie	17
2.5.4. Zytochemische Eigenschaften	18
2.5.5. Aufgaben	18
2.6. Basophile Granulozyten	18
2.6.1. Allgemeines	18
2.6.2. Basophile Granulopoese	18
2.6.3. Morphologie	19
2.6.4. Zytochemische Eigenschaften	19
2.6.5. Aufgaben	19
2.7. Monozyten	19
2.7.1. Allgemeines	19
2.7.2. Monozytopoese	20
2.7.3. Morphologie	20
2.7.4. Zytochemische Eigenschaften	20
2.7.5. Aufgaben	20
3. Glykohistochemie.....	22
3.1. Lektine	22
3.1.1. Definition und Entstehung des Begriffs Lektin	22
3.1.2. Struktur und Einteilung	22
3.1.3. Funktion und Anwendung	24
3.2. Zuckerstrukturen auf den bovinen Blutzellen	24
3.3. Lektinbindungsstellen der bovinen Blutzellen	25
4. Immunzytochemie	26
4.1. CD- Antikörper	26
4.1.1. Definition und Anwendung	26
4.1.2. Technik	26
4.1.3. Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten.....	27
4.1.4. Altersunterschiede und Entwicklung des Immunsystems	27
4.2. Zytoskelett	28
4.2.1. Definition und Funktion	28
4.2.2. Zusammensetzung	28
4.2.3. Technik	29

4.2.4.	Zytoskelett der Erythrozyten	29
4.2.5.	Zytoskelett der Thrombozyten.....	30
4.2.6.	Zytoskelett der Leukozyten	31
5.	Enzymhistochemie	33
5.1.	Definition und Anwendung der Enzymhistochemie	33
5.2.	Technik	33
5.2.1.	Allgemein	33
5.2.2.	Peroxidasen.....	34
5.2.3.	Phosphatasen	34
5.2.4.	Esterasen.....	35
5.2.5.	β -Glucuronidase.....	36
5.3.	Enzyme der bovinen Blutzellen.....	36
III.	MATERIAL UND METHODEN	38
1.	Untersuchungsmaterial	38
2.	Lichtmikroskopie.....	41
2.1.	Diff-Quick-Färbung.....	41
2.2.	Giemsa-Färbung	41
2.3.	May-Grünwald-Färbung.....	42
2.4.	Panoptische Färbung nach Pappenheim	42
2.5.	Alcianblau-Färbung	43
2.6.	Toluidinblau-Färbung der basophilen Granulozyten nach Undritz.....	44
2.7.	Sirius Red-Färbung.....	44
2.8.	PAS-Färbung	45
3.	Elektronenmikroskopie.....	46
4.	Glykohochemie.....	47
4.1.	FITC-markierte Lektine.....	47
4.2.	Hemmzucker.....	49
4.3.	Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	50
4.4.	Biotinylierte Lektine.....	51
5.	Immunzytochemie	53
6.	Zytoskelett	55
6.1.	Phalloidin-TRITC	55

6.2. Myosin	56
6.3. Vimentin	57
6.4. Panzytokeratin	57
6.5. Tubulin.....	58
7. Enzymhistochemie	59
7.1. Peroxidase.....	59
7.2. Alkalische Phosphatase	60
7.3. Saure Phosphatase	61
7.4. Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase	62
7.5. α -Naphthyl-Acetat-Esterase	63
7.6. Naphthol-AS-Acetat-Esterase	64
7.7. β -Glucuronidase.....	65
8. Auswertungen	65
IV. ERGEBNISSE	66
1. Blutbilder der verwendeten Kälber und Feten.....	66
2. Konventionelle lichtmikroskopische Untersuchungen.....	68
2.1. Erythrozyten	68
2.1.1. Pränatal	68
2.1.2. Postnatal.....	69
2.2. Thrombozyten.....	69
2.2.1. Pränatal	69
2.2.2. Postnatal.....	70
2.3. Lymphozyten	71
2.3.1. Pränatal	71
2.3.2. Postnatal.....	72
2.4. Neutrophile Granulozyten	74
2.4.1. Pränatal	74
2.4.2. Postnatal.....	76
2.5. Eosinophile Granulozyten	78
2.5.1. Pränatal	78
2.5.2. Postnatal.....	79
2.6. Basophile Granulozyten	80
2.6.1. Pränatal	80

2.6.2. Postnatal.....	81
2.7. Monozyten.....	82
2.7.1. Pränatal.....	82
2.7.2. Postnatal.....	84
3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	85
3.1. Erythrozyten.....	85
3.1.1. Pränatal.....	85
3.1.2. Postnatal.....	86
3.2. Thrombozyten.....	87
3.2.1. Pränatal.....	87
3.2.2. Postnatal.....	88
3.3. Lymphozyten.....	90
3.3.1. Pränatal.....	90
3.3.2. Postnatal.....	91
3.4. Neutrophile Granulozyten.....	92
3.4.1. Pränatal.....	92
3.4.2. Postnatal.....	94
3.5. Eosinophile Granulozyten.....	95
3.5.1. Pränatal.....	95
3.5.2. Postnatal.....	95
3.6. Basophile Granulozyten.....	96
3.6.1. Pränatal.....	96
3.6.2. Postnatal.....	96
3.7. Monozyten.....	97
3.7.1. Pränatal.....	97
3.7.2. Postnatal.....	97
4. Glykohistochemische Untersuchungen.....	99
4.1. Glukose/Mannose spezifische Lektine.....	99
4.1.1. Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA-FITC).....	99
4.1.1.1. Pränatal.....	99
4.1.1.2. Postnatal.....	101
4.1.2. Bindung von Lens culinaris Agglutinin (LCA-FITC).....	103
4.1.2.1. Pränatal.....	103
4.1.2.2. Postnatal.....	105

4.1.3. Bindung von <i>Pisum sativum</i> Agglutinin (PSA-FITC)	107
4.1.3.1. Pränatal	107
4.1.3.2. Postnatal.....	109
4.2. Galaktose spezifische Lektine	112
4.2.1. Bindung von Peanut Agglutinin (PNA-FITC).....	112
4.2.1.1. Pränatal	112
4.2.1.2. Postnatal.....	115
4.2.2. Bindung von <i>Ricinus communis</i> Agglutinin (RCA-FITC)	119
4.2.2.1. Pränatal	119
4.2.2.2. Postnatal.....	123
4.2.3. Bindung von <i>Viscum album</i> Agglutinin (VAA-Biotin).....	126
4.2.3.1. Pränatal	126
4.2.3.2. Postnatal.....	128
4.3. N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure spezifische Lektine.....	131
4.3.1. Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA-FITC)	131
4.3.1.1. Pränatal	131
4.3.1.2. Postnatal.....	133
4.3.2. Bindung von succinyliertem Wheat germ Agglutinin (WGAs-FITC).....	135
4.3.2.1. Pränatal	135
4.3.2.2. Postnatal.....	137
4.4. N-Acetyl-Galaktosamin spezifische Lektine.....	140
4.4.1. Bindung von <i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin (GSL-1-FITC)	140
4.4.1.1. Pränatal	140
4.4.1.2. Postnatal.....	142
4.4.2. Bindung von <i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin (DBA-FITC)	144
4.4.2.1. Pränatal	144
4.4.2.2. Postnatal.....	146
4.4.3. Bindung von <i>Sophora japonica</i> Agglutinin (SJA-FITC).....	148
4.4.3.1. Pränatal	148
4.4.3.2. Postnatal.....	151
4.5. N-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose spezifische Lektine.....	155
4.5.1. Bindung von Soybean Agglutinin (SBA-FITC).....	155
4.5.1.1. Pränatal	155
4.5.1.2. Postnatal.....	157
4.5.2. Bindung von <i>Sambucus niger</i> Agglutinin (SNA-Biotin)	159

4.5.2.1. Pränatal	159
4.5.2.2. Postnatal.....	161
4.6. Fukose spezifische Lektine.....	164
4.6.1. Bindung von Ulex europaeus Agglutinin 1 (UEA-1-FITC).....	164
4.6.1.1. Pränatal	164
4.6.1.2. Postnatal.....	165
4.7. Oligosaccharid spezifische Lektine	168
4.7.1. Bindung von Maackia amurensis Agglutinin (MAA-Biotin).....	168
4.7.1.1. Pränatal	168
4.7.1.2. Postnatal.....	170
4.7.2. Bindung von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E-FITC).....	172
4.7.2.1. Pränatal	172
4.7.2.2. Postnatal.....	174
4.7.3. Bindung von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L-FITC).....	176
4.7.3.1. Pränatal	176
4.7.3.2. Postnatal.....	178
4.8. Ergebnisse der Zuckerhemmung	181
4.9. Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase	181
5. Immunzytochemische Untersuchungen.....	182
5.1. Bindung der CD4-Antikörper	182
5.1.1. Pränatal	182
5.1.2. Postnatal.....	183
5.2. Bindung der CD8-Antikörper	185
5.2.1. Pränatal	185
5.2.2. Postnatal.....	187
6. Untersuchungen zum Zytoskelett.....	190
6.1. Aktinnachweis mit Phalloidin-TRITC.....	190
6.1.1. Pränatal	190
6.1.2. Postnatal.....	192
6.2. Immunhistochemischer Nachweis von Myosin.....	194
6.2.1. Pränatal	194
6.2.2. Postnatal.....	197
6.3. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin.....	200
6.3.1. Pränatal	200

6.3.2. Postnatal.....	202
6.4. Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin.....	204
6.4.1. Pränatal.....	204
6.4.2. Postnatal.....	204
6.5. Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin.....	204
6.5.1. Pränatal.....	204
6.5.2. Postnatal.....	206
7. Enzymhistochemische Untersuchungen.....	208
7.1. Peroxidase.....	208
7.1.1. Pränatal.....	208
7.1.2. Postnatal.....	209
7.2. Alkalische Phosphatase.....	210
7.2.1. Pränatal.....	210
7.2.2. Postnatal.....	211
7.3. Saure Phosphatase.....	212
7.3.1. Pränatal.....	212
7.3.2. Postnatal.....	212
7.4. Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase.....	214
7.4.1. Pränatal.....	214
7.4.2. Postnatal.....	216
7.5. α -Naphthyl-Acetat-Esterase.....	217
7.5.1. Pränatal.....	217
7.5.2. Postnatal.....	219
7.6. Naphthol-AS-Acetat-Esterase.....	220
7.6.1. Pränatal.....	220
7.6.2. Postnatal.....	222
7.7. β -Glucuronidase.....	223
7.7.1. Pränatal.....	223
7.7.2. Postnatal.....	224
V. DISKUSSION.....	226
1. Blutproben.....	226
2. Lichtmikroskopie.....	227
3. Elektronenmikroskopie.....	230

4. Glykohistochemie.....	232
5. Immunzytochemie	235
6. Zytoskelett	235
7. Enzymhistochemie	237
VI. ZUSAMMENFASSUNG	240
VII. SUMMARY	242
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	244
IX. ANHANG	252
1. Abbildungsverzeichnis	252
2. Tabellenverzeichnis	258
3. Verzeichnis der Gebrauchslösungen.....	261
X. DANKSAGUNG	266

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Antigen
ABC	Avidin- Biotin- Technik
α G	alpha-Granula
Ak	Akanthozyt
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
B	Biotin
BaG	Basophiler Granulozyt
BE	Basophiler Erythroblast
BPA	Bauhinia purpurea Agglutinin
Ca	Calcium
CD	Cluster of differentiation
CFU- GM	Colony- forming- unit Granulozyten Monozyten
Cl	Chlor
ConA	Concanavalin Agglutinin
CRD	Carbohydrate recognition domain
Cu	Kupfer
DB	dense bodies
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
Dk	Dakryozyt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTS	Dense tubular system
EB	Erythroblast
EC	Euchromatin
ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
ECP	Eosinophil cationic protein
EDN	Eosinophil derived neurotoxin
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EHC	Enzymhistochemie
EM	Elektronenmikroskopie
EOG	Eosinophiler Granulozyt
EoPM	Eosinophiler Promyelozyt
EPO	Eosinophil peroxidase
eR	endoplasmatisches Retikulum
Ery	Erythrozyten
F	Filament
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Full length
G- CSF	Granulozyte colony stimulating factor
Gal	Galektin
GALT	Milz und Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
gG	große Granula
GHC	Glykohistochemie
Gly	Glykogen
gLZ	großer Lymphozyt
Gm	Granulomer
GM- CSF	Granulozyte- makrophage- colony- stimulating- factor

Gr	Granula
GRAN	Granulozyt
GSL	Griffonia simplicifolia Agglutinin
Hb	Hämoglobin
HbA	Hämoglobin A
HbB	Hämoglobin B
HbE	embryonales Hämoglobin
HbF	fetales Hämoglobin
HC	Heterochromatin
HCl	Salzsäure
HPA	Helix pomatia Agglutinin
Htk	Hämatokrit
Hy	Hyalomer
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IZC	Immunzytochemie
kLZ	kleiner Lymphozyt
L	Lektin
LAA	Laburnum alpinum Agglutinin
LB	Lymphoblast
LBA	Lima bean Agglutinin
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LEU	Leukozyten
LM	Lichtmikroskopie
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
LYM	Lymphozyten
LZ	Lymphozyt
M	Mitochondrien
M- CSF	Makrophagen stimulierender Faktor
MAA	Maakia amurensis Agglutinin
MB	Myeloblast
MBP	Major basic protein
MO	Monozyten
MPA	Maclura pomifera Agglutinin
MPO	Myeloperoxidase
MPS	Mononukleares phagozytierendes System
My	Myelozyt
NG	Neutrophiler Granulozyt
NK	Natural Killer
NM	Neuraminidase
OCS	Offenes kanalikuläres System
OT	Objektträger
PAP	Peroxidase- Anti- Peroxidase
PAS	Periodic acid schiff
Pb	Blei
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Proerythroblast
pG	primäre Granula
PHA- E	Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro

PHA- L	Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuko
PNA	Peanut Agglutinin
POX	Peroxidase
Ps	Pseudopodien
PSA	Pisum sativum Agglutinin
PWM	Pokeweed mitogen
RCA	Ricinus communis Agglutinin
SB	Schwarzer Balken
SBA	Soybean Agglutinin
sG	spezifische Granula
SJA	Sophora japonica Agglutinin
skNG	Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
SP	Saure Phosphatase
SRS- A	Slow reacting substance of anaphylaxis
SSL	Scheitel- Steiß- Länge
STA	Solanum tuberosum Agglutinin
stNG	Stabkerniger neutrophiler Granulozyt
Strept	Streptavidin
TCR	T- Zell- Rezeptor
TF	Thomsen Friedenreich
Thr	Thrombozyt
TR	Truncated
TRITC	Tetramethylrhodamine B isothiocyanate
UEA	Ulex europaeus Agglutinin
V	Vakuole
VAA	Viscum album Agglutinin
WB	Weißer Balken
WC	Workshop cluster
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
ZK	Zellkern
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZP	Zytoplasma
ZSK	Zytoskelett

I. EINLEITUNG

Die Domestikation unserer heutigen Hausrinder begann bereits vor ca. 8500 Jahren. Schon im alten Ägypten wurden Rinder zur Milch- und Fleischgewinnung genutzt. Mittlerweile sind über 800 Hausrinderrassen bekannt, die je nach Zucht und Haltung als Fleisch- und Milchlieferanten dienen. Durch den steigenden Rindfleisch- und Milchkonsum hat sich die Kälberzucht und -haltung intensiviert, was die Jungtiere immer anfälliger für Krankheiten macht. Trotz vorbeugender Maßnahmen wie Impfungen, Optimierung der Haltung (Kälberglu), spezielle Fütterung und der Verankerung entsprechender Maßnahmen im Tierschutzgesetz (Kälberhaltungsverordnung) treten immer wieder neue, noch unbekannte Krankheitsbilder auf: So beispielsweise die bovine neonatale Panzytopenie, das sog. „Blutschwitzen“ der Kälber, dessen Ätiologie und Pathogenese trotz der wirtschaftlichen Schäden noch weitgehend ungeklärt sind. Während die Blutzellen des adulten Rindes in den letzten Jahren mit modernen morphologischen Verfahren gut charakterisiert werden konnten, liegen über die zellulären Bestandteile des Blutes von Kälbern und Feten nur bruchstückhafte Ergebnisse vor.

Ziel meiner Arbeit ist die systematische Untersuchung der Blutzellen des bovinen Fetus und Kalbes mit immunzytochemischen, glykohistochemischen, enzymhistochemischen und ultrastrukturellen Methoden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Übersicht zum Blut des Rindes

1.1. Aufgaben und Zusammensetzung des Blutes

Das Blut kann als flüssiges Gewebe aufgefasst werden, das die verschiedenen Teile des Körpers verbindet (Sinowatz und Hees, 2000). Das Blutvolumen der meisten Säugetiere beträgt etwa 7 bis 8% des Körpergewichts (Hees und Tschudi, 1990). Das Blut besteht aus einem flüssigem Anteil, dem Blutplasma und den darin suspendierenden Zellen, den Blutkörperchen (Sinowatz und Hees, 2000). Das Plasma besteht zum größten Teil aus Wasser. Des Weiteren enthält es Plasmaproteine, Kohlenhydrate, Fette, Enzyme und Hormone sowie anorganische Salze (Kraft, 2005). Normalerweise beträgt der Anteil des Plasmas ca. 55% und der der Blutkörperchen 45% des gesamten Blutvolumens (Sinowatz und Hees, 2000). Es können 3 verschiedenen Arten von Blutzellen unterschieden werden: Erythrozyten (rote Blutzellen), Leukozyten (weiße Blutzellen) und Thrombozyten (Blutplättchen) (Brown, 1998). Die Leukozyten können weiter in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten unterteilt werden, wobei eine weitere Differenzierung der Granulozyten in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten routinemäßig möglich ist (Sinowatz und Hees, 2000).

Zu den Aufgaben des Blutes gehören Gastransport zwischen Lunge und Gewebe, Transport von Nährstoffen, Metaboliten, Stoffwechselprodukten, Hormonen, Wärme sowie Abwehrfunktion, Koagulation, Aufrechterhaltung der Homöostase und des Blutdruckes (Gassmann und Lutz, 2010).

Folgende Abbildung zeigt die Zusammensetzung des Blutes in der Übersicht

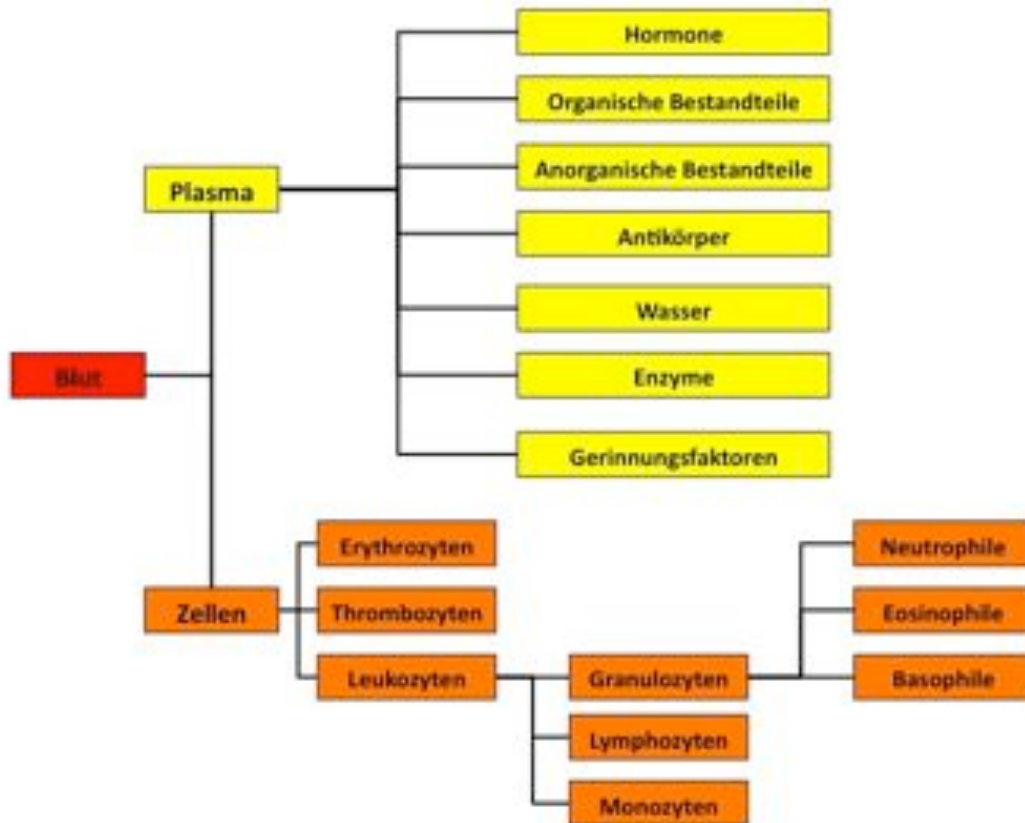


Abbildung 1: Zusammensetzung des Blutes

1.2. Spezielle Hämatologie des Rindes

In der Hämatologie können zwei verschiedene Blutbilder voneinander unterschieden werden: Das granulozytäre Blutbild (Mensch, Pferd, Hund, Katze), bei dem mehr als 50% der Leukozyten Granulozyten sind, und das lymphozytäre Blutbild (Wiederkäuer, Schweine, Huhn, Ratte, Maus, Kaninchen), bei dem mehr als 50% der Leukozyten aus Lymphozyten bestehen (Gassmann und Lutz, 2010). Nicht nur zwischen den verschiedenen Rassen und Altersstufen (siehe Punkt 1.3) gibt es Unterschiede im roten und weißen Blutbild, sondern auch Einflüsse wie geographische Lage, Klima, Geschlecht, Geburtshilfe und Laktation nehmen Einfluss auf das Blutbild. Rinder, die in höheren Lagen gehalten werden, weisen eine höhere Anzahl an roten Blutzellen auf (Jain, 1993). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Hämoglobin, die Leukozyten und die eosinophilen Granulozyten im Sommer höhere Werte als im Winter aufweisen. Im Winter jedoch sind die Erythrozyten, die Basophilen und die Monozyten vermehrt vorhanden (Haider und Siddiqui, 1989). In subtropischen Gegenden weisen die Rinder andere Werte für neutrophile Granulozyten und Lymphozyten auf als in den gemäßigten Klimazonen. So steigt der Lymphozytenwert in den Subtropen auf 61% der Gesamtleukozyten an, wogegen der Wert der Neutrophilen auf 21% sinkt (Cooper, 1974). Bullen zeigen beim Vergleich mit gleichaltrigen Kühen stets eine höhere Anzahl an roten Blutzellen (Kramer, 2000). Kälber, die durch einen Kaiserschnitt auf die Welt gebracht werden, zeigen ein fast gleiches Neutrophilen-Lymphozyten-Verhältnis wie erwachsene Rinder. Die Neutrophilie bei normal geborenen Kälbern wird mit dem Stress und der Cortisolausschüttung bei der Geburt in Zusammenhang gebracht (Tennant et al., 1973). Laktierende Kühe zeigen eine niedrigere Anzahl weißer Blutzellen als nicht laktierende Kühe (Kramer, 2000).

Abbildung 2 zeigt die Entwicklung des Neutrophilen:Lymphozytenverhältnis des Kalbes während der Neonatalperiode

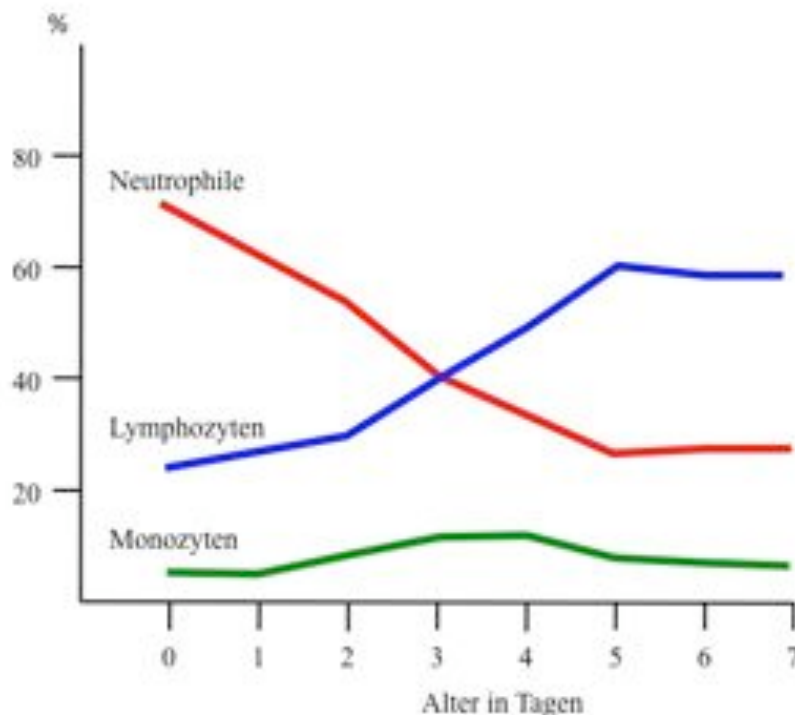


Abbildung 2: Entwicklung des Neutrophilen:Lymphozytenverhältnis (Tennant et al., 1973)

1.3. Rassen und Altersunterschiede in der Hämatologie des Rindes

Bei der genaueren Untersuchung des Rinderblutes können Unterschiede in Rasse, Alter, Geschlecht und Haltung beobachtet werden. Im Hinblick auf die Zucht konnte bei den Fleischrassen ein höherer roter Blutzellgehalt festgestellt werden als bei den Milchrasen (Kramer, 2000). Eine wichtige Rolle spielt auch das Alter des Tieres. Grundsätzlich können bei der Entwicklung vom Fetus zum Kalb große Veränderungen im roten sowie im weißen Blutbild dokumentiert werden. Während der fetalen Entwicklung kann ein deutlicher Anstieg an Erythrozyten beobachtet werden. Vom Tag 120 bis 231 der Gravidität steigt die Zahl von ca. 3,84 Mio/ml auf mehr als 8,29 Mio/ml (Hubbert und Hollen, 1971). Während der ersten 24 Stunden nach der Geburt kommt es zu einem starken Abfall der Gesamterythrozyten, dem Hämoglobin und dem Hämatokrit (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992). Diese Werte erreichen den tiefsten Wert im Alter von einer Woche und bleiben dann im ersten Lebensmonat konstant niedrig (Tennant et al., 1973). Bei Fleischrassen sind diese Werte bei der Geburt höher als bei Milchrasen. Nach ca. 3 Wochen passen sie sich, bis auf das Hämoglobin (Hb), dessen Wert bei Fleischrassen immer höher als bei Milchrasen ist, den Werten der Milchrasen an (Adams et al., 1992). Im zweiten Lebensmonat beginnt ein Anstieg der Erythrozytenwerte, welcher seinen Höhepunkt im Alter von 12 Wochen erreicht, um dann durch erneuten langsamen Abfall seinen Normalwert im Alter von 25-28 Wochen zu erreichen (Tennant et al., 1973). Im Blut des Fetus sind mit ca. 11% besonders viele Retikulozyten zu finden (Hubbert und Hollen, 1971). In der ersten Lebenswoche machen sie noch 0,14%-0,45% der Erythrozyten aus. Nach 7 Tagen geht der Wert dann auf unter 0,04% zurück, danach sind Retikulozyten nur sehr selten zu finden (Tennant et al., 1973). Anisozytose bei den roten Blutkörperchen ist bei neugeborenen Kälbern ein sehr häufiges Bild (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992). Anisozytose beschreibt das Vorhandensein unterschiedlich großer Erythrozyten im Blutausschlag (Pschyrembel, 2004). Die Leukozyten vermehren sich stark im Laufe der fetalen Entwicklung: Ihre Zahl beträgt am 120ten Tag der Gravidität noch ca. 2,108/ μ l, bei Geburt sind es dann ca. 6,775/ μ l. Von den Gesamtleukozyten sind bei Geburt ca. 2,067/ μ l Neutrophile (Hubbert und Hollen, 1971). Während der Geburt kommt es zu einem extremen Anstieg der Leukozytenanzahl, der dann innerhalb der ersten zwei Tage post natum wieder signifikant abfällt. Dieser anfängliche Anstieg und folgende Abfall hängt mit dem Anstieg der Neutrophilen zum Zeitpunkt der Geburt zusammen. Die extrem hohen Werte zum Zeitpunkt der Geburt werden mit dem hohen Cortisolspiegel im Blut in Zusammenhang gebracht (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992). Kälber, die durch einen Kaiserschnitt auf die Welt gebracht wurden, zeigten weit weniger hohe Werte als Kälber, die per vias naturales zur Welt kamen (Adams et al., 1992). In den ersten 12 Stunden bis 12 Tage nach der Geburt sinken die Cortisolwerte und damit auch die Anzahl der neutrophilen Granulozyten wieder ab (Adams et al., 1992). Die Lymphozyten sind zum Zeitpunkt der Geburt weniger zahlreich als die Neutrophilen. Ihre Zahl nimmt dann deutlich zu, bis sie nach zwei Wochen die vorherrschenden weißen Blutzellen sind (Tennant et al., 1973) (Kramer, 2000). Einen großen Unterschied gibt es hier jedoch bei den Milchrindern. In Studien konnte gezeigt werden, dass diese ihre Lymphozytenanzahl schon während der ersten 2 Tage nach der Geburt verdoppeln (Adams et al., 1992). Bei Kälbern unter 24 Stunden konnte man zu 70% stabförmige, jugendliche neutrophile Granulozyten finden, welche aber nach 48 Stunden nur noch 47% der Gesamtleukozyten ausmachten und nach 3 Wochen auf 11% absanken (Adams et al., 1992). Tennant et al. (1973) beschreibt sogar nur noch 0,3% stabförmige neutrophile Granulozyten nach der ersten Lebenswoche. Der weibliche Fetus hat im allgemeinen mehr jugendliche Neutrophile als der männliche (Hubbert und Hollen, 1971). Die eosinophilen Granulozyten nehmen während der Gravidität zu. Um den 180. Tag der Gravidität finden sich ca. 35/ μ l Blut, was dann zur Geburt hin auf einen Wert über 220/ μ l Blut steigt (Hubbert und Hollen, 1971).

Eosinophile und basophile Granulozyten sind bei neugeborenen Kälbern sehr selten zu finden und machen nie mehr als 1% der Leukozyten aus (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992). Während der gesamten fetalen Entwicklung übersteigen die Monozyten nie einen Wert von 100/ μ l Blut (Hubbert und Hollen, 1971). Ihr Wert fällt während der ersten 24 Stunden ab, steigt aber dann nach 3 Wochen auf bleibende Normalwerte (Adams et al., 1992). Jungrinder haben bis zu einem Alter von 3 Jahren höhere Leukozytenzahlen als ältere Rinder (Stöber und Gründer, 1990). Auch beim Hämoglobin sind Unterschiede zwischen Fetus und adultem Rind zu finden. Im Rinderembryo bis 10 mm SSL besteht der Blutfarbstoff aus embryonalem Hämoglobin (HbE). Er unterscheidet sich vom fetalen (HbF) und dem des erwachsenen Rindes (HbA und HbB) deutlich. Bis 20 mm SSL sind HbE und HbF nachweisbar (Rüsse, 1991). Folgende Tabellen zeigen die physiologischen Blutwerte des neugeborenen Kalbes während der ersten 24 Stunden und die physiologischen Werte des Fetus von Tag 100-120 und von Tag 231 bis zur Geburt.

Tabelle 1: Physiologische Blutwerte des neugeborenen Kalbes vom Zeitpunkt der Geburt bis 24 Stunden danach

		EINHEIT	TENDENZ IM ZEITRAUM VON 24Std
ROTES BLUTBILD			
Erythrozyten	7,35-7,93	$\times 10^6/\mu$ l	↓
Hämatokrit	34,8-39,2	%	Zuerst ↑ danach ↓
Hämoglobin	10,8-11,3	g/dl	↓
MCV	47,5-49,5	fl	Zuerst ↑ danach ↓
MCHC	29,4-31,2	%	↑
Retikulozyten			
Prozentualer Anteil	0,1-0,3	%	↑
WEIßES BLUTBILD			
Gesamtzahl der Leukozyten	10,3-12,0	$\times 10^3/\mu$ l	↓
Neutrophile Granulozyten			
Gesamtzahl	ca. 8,5	$\times 10^3/\mu$ l	↓
Stabkernige			
Prozentualer Anteil	ca.70	%	↓
Segmentkernige			
Prozentualer Anteil	-	-	-
Lymphozyten			
Gesamtzahl	2,5-3	$\times 10^3/\mu$ l	↑
Prozentualer Anteil	ca. 25	%	↑
Neutrophile : Lymphozyten	2,8		↓
Eosinophile Granulozyten			
Gesamtzahl	-	-	-
Prozentualer Anteil	< 1	%	↓
Basophile Granulozyten			
Gesamtzahl	-	-	-
Prozentualer Anteil	-	-	-
Monozyten			
Gesamtzahl	0,25-0,5		↓
Prozentualer Anteil	3	%	↑
Thrombozyten			
Gesamtzahl	-	-	-

Tabelle 2: Physiologische Werte des Fetus am Tage 100-120 und 231-Geburt (Hubbert und Hollen, 1971)

	100-120 Tage	231- Geburt	EINHEIT
ROTES BLUTBILD			
Erythrozyten gesamt	3,84 ± 0,35	8,29 ± 0,5	x10 ⁶ /µl
Hämatokrit	37,03 ± 1,93	42,71 ± 2,73	%
Hämoglobin	12,57 ± 0,69	14,90 ± 0,97	g/dl
Retikulozyten	9,2 ± 1,0	0 ± 1,4	%
Kernhaltige Rote Blutzellen	6,536 ± 712	352 ± 1,007	pro µl
WEIßES BLUTBILD			
Gesamtzahl der Leukozyten	8,643 ± 871	7,127 ± 1,232	pro µl
Neutrophile Granulozyten			
Stabkernige	117 ± 55	92 ± 78	pro µl
Segmentkernige	85 ± 145	2,067 ± 204	pro µl
Lymphozyten	1,508 ± 389	4,235 ± 550	pro µl
Eosinophile Granulozyten	20 ± 31	242 ± 43	pro µl
Basophile Granulozyten	-	-	-
Monozyten	86 ± 24	105 ± 34	pro µl
Juvenile Granulozyten	292 ± 67	0 ± 94	pro µl

1.4. Blutgruppen des Rindes

Die Bestimmung der Blutgruppen bei Rindern ist bei der Erkennung von Krankheiten wie dem Freemartin-Syndrom und bei Vaterschaftsnachweisen von Bedeutung (Humble, 1954) (Bouw, 1977). Bei der Bluttransfusion spielen die Blutgruppen beim Rind eine deutlich geringere Rolle als beim Menschen (Bouw, 1977). Am bedeutendsten ist die Bestimmung der Blutgruppen bei der Identifizierung wichtiger, wirtschaftlich bedeutsamer Zuchtmerkmale. Einige von ihnen sind mit bestimmten Blutgruppen gekoppelt (Rocha et al., 1998a) (Rocha et al., 1998b) (Thomsen et al., 2002). Rocha et al. (1998) wiesen einen Zusammenhang zwischen der L-Blutgruppe und der Milchproduktion und Milchzusammensetzung nach. Des Weiteren korrelieren die Blutgruppen B und S mit dem Milchfettgehalt und die Blutgruppe C mit dem Rumpfwinkel (Rocha et al., 1998a).

Beim Rind können die Blutgruppen in 11 Gruppen eingeteilt werden. Jede Gruppe enthält eine unterschiedliche Anzahl an Blutgruppenfaktoren (Stormont, 1962) (Penedo, 2000). Die Faktoren werden mit Großbuchstaben des Alphabets bezeichnet, und zwar in der Reihenfolge, in der sie entdeckt wurden. Später, als die Buchstaben zur Klassifizierung nicht mehr ausreichten, wurde den Buchstaben ein Strichzeichen hinzugefügt. Die Buchstaben A` und A`` haben also nichts miteinander zu tun. Große Buchstaben mit tiefgestellten Indexzahlen sind jedoch serologisch verwandte Faktoren oder Untergruppen (Schmid und Buschmann, 1985). Manche Autoren beschreiben noch ein weiteres System, das N`- System. Bei dem Blutgruppen-Faktor N` sind sich die Autoren uneinig, ob dieser zu dem F-System gehört oder selbst ein eigenständiges N`-System bildet (Stormont, 1962) (Penedo, 2000) (Thomsen et al., 2002).

Die Blutgruppen können mittels Hämolyse, Agglutination oder Coombs-Test ermittelt werden, wobei beim Rind meist der Hämolysetest angewendet wird (Penedo, 2000). Um die Blutgruppe eines Rindes zu bestimmen, werden heutzutage in der Regel kommerziell hergestellte Antiseren verwendet (Stormont, 1962) (Bouw, 1977).

Während des embryonalen und fetalen Wachstums unterliegen die Blutgruppenantigene einem pränatalen Reifungsprozess. Fetale Blutzellen reagieren weniger stark mit Isoantikörpern, was

besonders für Faktor H' gilt, der seine volle Ausbildung erst sechs Monate nach der Geburt erreicht. Forscher fanden heraus, dass sich die Membran der Erythrozyten beim Fetus und seiner Mutter nicht simultan entwickelt, da sie sich in ihrer Reaktivität gegenüber Isoantikörpern und Lektinen unterscheidet (Schmid und Buschmann, 1985).

In folgender Tabelle sind die Blutgruppen des Rindes zusammengefasst.

Tabelle 3: Blutgruppen beim Rind (nach Schmid und Buschmann, 1985)

BLUTGRUPPENSYSTEME	BLUTGRUPPENFAKTOREN
A	A ₁ ; A ₂ ; D; H; Z' ; a
B	B ₁ ; B ₂ ; G ₁ ; G ₂ ; G ₃ ; K; I ₁ ; I ₂ ; O ₁ ; O ₂ ; O ₃ ; O _x ; P ₁ ; P ₂ ; Q; T ₁ ; T ₂ ; Y ₁ ; Y ₂ ; A' ₁ ; A' ₂ ; B' ; D' ; E' ₁ ; E' ₂ ; E' ₃ ; E' ₄ ; F' ; G' ; I' ₁ ; I' ₂ ; J' ₁ ; J' ₂ ; K' ; O' ; P' ; Q' ; Y' ; A'' ; B'' ; D'' ; G'' ; I'' ; b
C	C ₁ ; C ₂ ; C ₃ ; R ₁ ; R ₂ ; W; X ₁ ; X ₂ ; X ₃ ; E; C' ; L' ; X' ; C'' ; c
F	F ₁ ; F ₂ ; V ₁ ; V ₂
J	J ₁ ; J ₂ ; j
L	L
M	M ₁ ; M ₂ ; M' ; m
S	S' ; S'' ; H' ; H'' ; U; U' ; U' ₂ ; s
Z	Z ₁ ; Z ₂ ; z
N'	N' ; n'
R'	R' ₁ ; R' ₂ ; S' ₁ ; S' ₂
T'	T' ₁ ; T' ₂ ; t

2. Charakterisierung und Entstehung der einzelnen Blutzellen

2.1. Erythrozyten

2.1.1. Allgemeines

Die Anzahl der Erythrozyten im Blut des Rindes ist abhängig von Alter, Geschlecht, Rasse und Haltung. Weiterhin führen Muskelaktivität (Training) und reduzierter Sauerstoff im arteriellen Blut, z.B. durch Haltung in größerer Höhe, zu einer Erhöhung der Erythrozytenzahl (Hees und Tschudi, 1990). Der durchschnittliche Wert der roten Blutzellen beträgt $5-10 \times 10^{12}/l$ Blut. Die Erythrozyten machen zahlenmäßig über 99% der zellulären Bestandteile aus, die Leukozyten nur 1% (Gassmann und Lutz, 2010).

2.1.2. Erythropoese

Wie alle Blutzellen haben auch die Erythrozyten eine mesodermale Herkunft. Sie stammen von einer pluripotenten Stammzelle ab, welche die Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung hat (Gassmann und Lutz, 2010). Bereits während der frühembryonalen Entwicklung werden die ersten erythroiden Vorläuferzellen, die sog. Erythroblasten, gebildet, die embryonales Hämoglobin enthalten. Beim sich entwickelnden Fetus verlagert sich die Erythropoese vorwiegend in die Leber, z.T. auch in die Milz (Hepato-lienale Phase der Blutbildung). Ungefähr ab Mitte der Trächtigkeit wird die Blutbildung dann endgültig ins rote Knochenmark verlagert, wo dann die Erythropoese zeitlebens stattfindet (Gassmann und Lutz, 2010). Mit zunehmenden Alter verlagert sich der Hauptbildungsort vom Knochenmark der großen Röhrenknochen auf das der Rippen, später auf das des Sternums und zuletzt auf das der Wirbel- und Beckenknochen (Gassmann und Lutz, 2010). Die unipotente Stammzelle der Erythrozyten wird auch als „Erythropoetin Responsive Cell“ bezeichnet, da sie durch das Hormon Erythropoetin zur Teilung stimuliert wird (Sinowatz und Hees, 2000). Im Zuge der Erythropoese durchlaufen die Zellen die Stadien des Proerythroblasten (Syn: Pronormoblast, Rubriblast), basophilen Erythroblasten (Syn: basophiler Normoblast), polychromatischen Erythroblast (Syn: polychromatischer Normoblast), azidophilen Erythroblast (Normoblast), Retikulozyt, um schließlich zum Erythrozyten zu werden (Sinowatz und Hees, 2000). Der Proerythroblast ist die größte Zelle (10-20 μm) der Erythropoese und hat gegenüber anderen Blasten einen gröber strukturierten Kern mit einem oder zwei Nukleoli. Das Zytoplasma ist nicht granuliert und von tiefblauer Farbe. Die peri- bzw. paranukleäre Aufhellung weist auf einen sehr aktiven Golgi-Apparat hin (Kraft, 2005). Die basophilen Erythroblasten liegen in Gruppen um Retikulumzellen bzw. Makrophagen („Ammenzellen“) angeordnet, die den Erythroblasten das für die Hämoglobinsynthese notwendige Eisen liefern (Sinowatz und Hees, 2000). Durch den steigenden Hämoglobingehalt und die abnehmende Ribosomenzahl wird das ursprüngliche basophile Zytoplasma polychromatisch und schließlich azidophil (Sinowatz und Hees, 2000). Aus der letzten kernhaltigen Erythrozytenvorstufe, dem polychromatischen Erythroblasten, entsteht durch Denukleation (Auflösung und Ausstoßung des Zellkerns) der Retikulozyt. Im Zytoplasma dieser Zellen findet man typische netz- oder knäuelartige Strukturen, welche basophil reagieren. Es handelt sich um RNA-haltiges Material. Innerhalb weniger Tage reift der Retikulozyt zum fertigen Erythrozyten heran, indem die letzten basophilen Strukturen verschwinden (Hees und Tschudi, 1990).

Die Erythropoese im Knochenmark unterliegt einer fein abgestimmten Regulierung. So hat Blutverlust eine verstärkte Neubildung von Erythrozyten zur Folge. Auch ein längerer Aufenthalt in größeren Höhenlagen führt zur Stimulierung der Erythrozytenneubildung, da der Organismus einen verminderten Sauerstoffpartialdruck durch eine Vermehrung der

zirkulierenden Erythrozyten ausgleicht (Sinowatz und Hees, 2000). Die gesamte Entwicklung vom Proerythroblasten bis zum Retikulozyten dauert 4-5 Tage (Sinowatz und Hees, 2000).

2.1.3. Morphologie und Kinetik

Reife rote Blutkörperchen (Erythrozyten) sind runde, für den Gastransport hochspezialisierte Blutzellen, die bei den meisten Säugetieren im Querschnitt eine bikonkave Scheibenform aufweisen. Diese Form erlaubt ein sehr großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, was wiederum einen schnellen Gasaustausch über die Erythrozytenmembran gewährleistet (Gassmann und Lutz, 2010). Die Erythrozyten haben eine 7,5 nm dicke Zellmembran, die glatt verläuft und den leicht viskösen Inhalt umschließt (Sinowatz und Hees, 2000). Dieser Inhalt besteht aus 33-37% Hämoglobin, zu etwa aus 1% Enzymen und zu ca. 65% aus Wasser (Sinowatz und Hees, 2000). Die Erythrozyten der Säuger sind kernlos (Gassmann und Lutz, 2010). Sie bestehen aus dem Stützgerüst oder Stroma und aus dem Blutfarbstoff Hämoglobin (Kraft, 2005). Der reife Erythrozyt kann sich nicht mehr teilen und ist nicht mehr zur Proteinsynthese fähig. Die Zellmembran trägt Rezeptoren, deren Kohlenhydratreste die Blutgruppenmerkmale bestimmen. Die Beobachtung von Erythrozyten in Kapillaren macht deutlich, dass sie sich während der Passage der Gefäße stark verformen können (Sinowatz und Hees, 2000). Die Formelastizität ist auf ein Netzwerk von Proteinen an der inneren Seite der Zellmembran zurückzuführen, das als Membranskelett bezeichnet wird (Sinowatz und Hees, 2000).

Die Erythrozyten des adulten Rindes haben einen Durchmesser von 5-6 µm, eine bikonkave Form und eine durchschnittliche Lebensdauer von 130-160 Tagen. Eine leichte bis mittelgradige Anisozytose ist charakteristisch für die normalen Erythrozyten des Rindes (Kramer, 2000). Anisozytose ist auch nicht ungewöhnlich bei gesunden Kälbern (Kramer, 2000). Geldrollenbildung kann bei Rindern physiologischerweise nicht beobachtet werden (Jain, 1993). Bei den jungen Erythrozyten des Rindes können im Zytoplasma kleine blaue Punkte auftreten. Dies wird als „basophile Tüpfelung“ bezeichnet und tritt verstärkt bei vermehrter Bildung von Erythrozyten als Reaktion auf eine Anämie auf (Jain, 1993).

2.1.4. Aufgaben

Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der Gastransport im Körper. Wirbeltiere, die einen hohen Energieumsatz und daher auch hohen Sauerstoffbedarf haben, müssen das sauerstofftransportierende Hämoglobin in den Erythrozyten „verpacken“ (Gassmann und Lutz, 2010). Der Transport kann nur erfolgen, wenn die Erythrozyten intakt sind und sie ausreichend Hämoglobin enthalten (Kraft, 2005). Wie auch der Mensch hat das Rind drei verschiedene Hämoglobinarten. Das embryonale Hämoglobin (HbE) ersetzt das fetale Hämoglobin (HbF) schon früh während der Entwicklung des Fetus im Uterus. Die Umwandlung vom embryonalen Hämoglobin zu dem dritten Typ, dem adulten Hämoglobin (HbA), beginnt ebenfalls bereits im Uterus und kann bis Monate nach der Geburt andauern (Kramer, 2000).

2.2. Thrombozyten

2.2.1. Allgemeines

Die Anzahl der Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, im Blut des Rindes beträgt 100.000 bis 800.000/µl Blut. Unter unseren Haussäugetieren hat das Pferd die niedrigste Anzahl an Thrombozyten, das Rind die höchste (Jain, 1993). Die durchschnittliche Lebensdauer eines Rinderthrombozyten beträgt ca. 10 Tage (Kramer, 2000). Bei Kühen im Geschlechtszyklus kann die Anzahl der Blutplättchen verändert sein (Jain, 1993).

2.2.2. Thrombopoese

Die Bildung der Blutplättchen erfolgt durch die Knochenmarkriesenzellen, die Megakaryozyten (Sinowatz und Hees, 2000). Die Megakaryozytopoese und die Thrombopoese werden durch die Menge an Blutplättchen beeinflusst. Thrombozytopenie hat eine stimulierende Wirkung, wohingegen eine Thrombozytosis eine hemmende Wirkung zur Folge hat. Die Blutplättchenproduktion wird spezifisch durch Thrombopoietin kontrolliert (Jain, 1993). Am Anfang der Entwicklungsreihe steht der Megakaryoblast, eine kugelförmige bis ovale Zelle mit einem Durchmesser von 25-35 μm (Hees und Tschudi, 1990). Ihr Zellkern ist groß, oval oder nierenförmig und weist zahlreiche Nukleolen auf. Das Zytoplasma enthält viele freie Ribosomen und erscheint deswegen basophil (Sinowatz und Hees, 2000). Im Gegensatz zu anderen Entwicklungsreihen nehmen die Knochenmarkszellen der Thrombozytopoese gegenüber ihren jeweiligen Vorläuferzellen an Größe zu (Hees und Tschudi, 1990).

Die nächste Zelle in der Reihe ist der Promegakaryozyt. Er hat einen Durchmesser von 25 bis 50 μm und besitzt mehr als vier Kerne oder einen großen Kern, der eingekerbt oder mehrfach gelappt ist. Grobe Heterochromatinbereiche überdecken oft die Nucleoli (Hees und Tschudi, 1990).

Der Megakaryozyt ist die größte Zelle der Entwicklungsreihe. Sein Durchmesser beträgt 100 μm und mehr (Hees und Tschudi, 1990). Blutplättchen entstehen dadurch, dass die Plasmamembran der Megakaryozyten zisternenartige Einstülpungen („Demarkationsmembranen“) ausbildet (Sinowatz und Hees, 2000). Die reifen Megakaryozyten verlassen das Knochenmark und gelangen ins Blut. Bei diesem Vorgang und bei der Passage der Megakaryozyten durch die Pulmonalarterien zerfallen die Zellen in die Thrombozyten, wobei bis zu 1000 Plättchen pro Megakaryozyt entstehen können (Kaspers und Göbel, 2010). Laut Jain (1993), Hees und Tschudi (1990) kann ein reifer Megakaryozyt innerhalb von 3 bis 12 Stunden 2000 bis 8000 Thrombozyten produzieren. Nach dem Zerfall des Zytoplasmas in zahlreiche Thrombozyten geht auch der Kern des Megakaryozyten zugrunde und wird von Makrophagen und Retikulumzellen des Knochenmarks phagozytiert (Sinowatz und Hees, 2000). Die Produktion von Blutplättchen aus neuen Megakaryozyten dauert ca. 3 bis 4 Tage (Jain, 1993).

2.2.3. Morphologie

Die Thrombozyten des Rindes besitzen einen Durchmesser von ca. 6 μm und eine Dicke von 1,8 μm (Meyers et al., 1982). Sie sind flache, meist rundlich bis ovale, unregelmäßig geformte Zytoplasmascheibchen (Hees und Tschudi, 1990). Betrachtet man die Blutplättchen im Blutausschlag unter dem Lichtmikroskop, so erkennt man eine zentrale Zone, die basophile Körnchen enthält, das Granulomer. Dieses wird von einer hellen Zone umgeben, die sich nach innen an die Zellmembran anschließt, dem Hyalomer (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Obwohl sie beim Säuger keinen Kern besitzen und sich auch nicht mehr teilen können, haben Thrombozyten zahlreiche Charakteristika ganzer Zellen. So besitzen sie Mitochondrien, ein glattes endoplasmatisches Retikulum, einen Golgi-Apparat zur Proteinsynthese sowie zahlreiche Granula (Kaspers und Göbel, 2010). Untersucht man die Ultrastruktur der Thrombozyten mit cytochemischen Methoden, so erkennt man, dass die Zellmembran reich an asymmetrisch verteilten Phospholipiden ist. Die Außenseite der Zellmembran ist mit einer 20 bis 50 nm dicken Schicht amorphen Materials bedeckt, die man Glykokalix nennt. Diese besteht vorwiegend aus Glykoproteinen und spielt bei Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten eine wichtige Rolle (Hees und Tschudi, 1990). Im Hyalomer findet man einen zirkulär angeordneten Komplex aus Mikrotubuli und Mikrofilamenten, welcher die Funktion des Zytoskeletts übernimmt (Brown, 1998). Im zentralen Bereich, dem

Granulomer oder auch Chromomer, liegen die Zellorganellen wie Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen, dense bodies, α -Granula und einige Glykogenpartikel (Hees und Tschudi, 1990). Hier befinden sich auch die Granula der Thrombozyten. Es gibt zwei vorherrschende Arten von Granula, die α -Granula und dense-Granula oder auch „dense bodies“ genannt (Meyers et al., 1982). Neben diesen beiden Arten von Granula kann ab und zu noch eine große membranumgrenzte Granula gefunden werden (Meyers et al., 1982). Die α -Granula des Rindes sind größer als die des Menschen, die Anzahl an Granula ist jedoch geringer pro Zelle (Du Plessis et al., 1996). Vergleicht man die Anzahl von α -Granula und „dense bodies“ in den Blutplättchen des Rindes, so dominieren die α -Granula. Sie besitzen des weiteren einen homogenen Inhalt, der von einer klar definierten Membran umgeben ist (Meyers et al., 1982). Die α -Granula des Rindes sind elektronendichter als die des Menschen und können in Größe und Form variieren (Du Plessis et al., 1996). Die „dense bodies“ sind rund und haben einen extrem elektronendichten Kern oder Körper, der auf einer Seite der Granula zu finden ist (Meyers et al., 1982). Die Thrombozyten des Menschen haben auf ihrer Oberfläche deutliche Einbuchtungen, welche die Öffnungen des sog. „offenen kanalikulären Systems“ (OCS) darstellen. Diese Einbuchtungen fehlen bei den Blutplättchen des Rindes (Du Plessis et al., 1996). Dieses OCS findet sich auch bei den Thrombozyten des Schweines, der Ratte, des Wales, des Pferdes und des Kaninchens (White, 1987). Neben dem OCS gibt es noch ein weiteres kanalikuläres System, das „dense tubular system“ (DTS), welches bei Rinderthrombozyten vollständig entwickelt ist (White, 1987).

2.2.4. Zytochemische Eigenschaften

„Dense Bodies“ enthalten verschiedene Adeninnucleotide, Serotonin, anorganische Phosphate und Calcium (Kaspers und Göbel, 2010). Zu den Inhaltsstoffen, die in der α -Granula gespeichert werden, zählen Proteine wie u.a. Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin, Wachstumsfaktoren, Fibrinogen, Faktor V und VIII, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor und Thrombospondin (Sinowatz und Hees, 2000) (Kaspers und Göbel, 2010). Die Lysosomen enthalten verschiedene saure Hydrolasen (Kaspers und Göbel, 2010). Megakaryozyten und Thrombozyten weisen eine hohe Aktivität für saure Phosphatase auf (Raskin und Valenciano, 2000). Im DTS ist eine thrombozytenspezifische Peroxidase zu finden (Jain, 1993). Diese Peroxidase kann man auch im endoplasmatischen Retikulum und in der Membran der Kerne der Megakaryozyten finden (Raskin und Valenciano, 2000).

2.2.5. Aufgaben

Die Thrombozyten dienen der Blutgerinnung (Liebich, 1999) (Sinowatz und Hees, 2000) (Kaspers und Göbel, 2010). Im Bereich von Gefäßverletzungen lagern sich die Blutplättchen innerhalb von Sekunden an die freigelegten Bindegewebsstrukturen an (Kaspers und Göbel, 2010). Durch Ausstülpfen der Fortsätze (Pseudopodien) haften die Thrombozyten im veränderten Bereich an und agglutinieren (Sinowatz und Hees, 2000). Diese Anhaftung von Blutplättchen an einen Gefäßdefekt wird auch Thrombozytenadhäsion genannt, welche durch den von-Willebrand-Faktor vermittelt wird. Bei der Plättchenaggregation werden die Inhaltsstoffe der Granula freigesetzt und damit für die Hämostase verfügbar (Kaspers und Göbel, 2010). Das Serotonin der Thrombozyten wirkt lokal vasokonstriktorisch und unterstützt die Aggregation der Blutplättchen (Sinowatz und Hees, 2000).

2.3. Lymphozyten

2.3.1. Allgemeines

Wie bereits erwähnt besitzt das Rind ein lymphozytäres Blutbild (Kraft, 2005). Schon im fetalen Zustand bestehen mehr als 50% der Leukozyten aus Lymphozyten (Gassmann und Lutz, 2010). Zum Zeitpunkt der Geburt finden sich weniger Lymphozyten als Granulozyten im Blut des Kalbes. Bis zum dritten Lebensmonat aber machen die Lymphozyten 70-80% der gesamten Leukozyten aus (Kramer, 2000). Innerhalb der ersten Lebensjahre erreicht die Anzahl der Lymphozyten dann einen konstanten Normalwert von durchschnittlich 4.500/ μ l Blut (Jain, 1993). Nach einigen Jahren kann wieder ein leichter Abfall der Gesamtlymphozyten beobachtet werden (Kramer, 2000). Rinderlymphozyten besitzen einen Durchmesser von 8 bis 15 μ m (Kramer, 2000) und können nach Größe und immunologischer Funktion unterteilt werden, was in Punkt 2.3.3 näher beschrieben wird.

2.3.2. Lymphopoese

Lymphozyten werden im Knochenmark, in lymphatischen Organen, wie Thymus, Lymphknoten, Milz und darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT), welches die Tonsillen und die Peyer'schen Platten beinhaltet, gebildet (Jain, 1993). Immunologisch können verschiedene Arten von Lymphozyten unterschieden werden, die nach ihren Oberflächenantigenen eingeteilt werden: B-Zell-, T-Zell- und Null-Zell-Lymphozyten (Kraft, 2005). Bei ihrer Entwicklung verlassen die unreifen Lymphozyten das Knochenmark über das Blut und wandern in den Cortex des Thymus ein, wo sie ihre Oberflächenrezeptoren erhalten (Brown, 1998). Diese Vorläuferzelle wird auch Lymphoblast genannt. Lichtmikroskopisch besitzt der Lymphoblast einen runden, gelegentlich leicht eingebuchteten Kern, der fein strukturiertes Chromatin und ein bis zwei Nukleoli enthält (Kraft, 2005). Nach Verlassen des Thymus erreicht der Lymphoblast die sekundären lymphatischen Organe wie Milz, Lymphknoten und andere lymphatische Gewebe wie Peyer'sche Platten und Tonsillen, um hier zum endgültigen T-Lymphozyten heran zu reifen (Jain, 1993) (Brown, 1998). Die Vorläuferzellen der B-Lymphozyten verbleiben zuerst im Knochenmark, um dann direkt in die sekundären lymphatischen Organe zu wandern (Brown, 1998). Aus dem B-Lymphozyten entwickeln sich später die Plasmazellen (Kraft, 2005).

2.3.3. Morphologie

Grundsätzlich kann man zwei verschiedene Arten von Lymphozyten unterscheiden: Kleine Lymphozyten und große Lymphozyten (Hees und Tschudi, 1990) (Brown, 1998) (Sinowatz und Hees, 2000) (Kraft, 2005). John W. Kramer (2000) beschreibt noch ein dritte Form, den mittleren Lymphozyten (Kramer, 2000). Die Unterscheidung von T- und B-Lymphozyten ist durch immunzytochemische Methoden möglich, mit denen die Oberflächenstrukturen der Zellmembran, vor allem die CD-Antigene, bestimmt werden (Sinowatz und Hees, 2000). Kleine Lymphozyten haben einen Durchmesser von 6,5-9 μ m und sind die weitaus überwiegende Lymphozytenform im Blut (Sinowatz und Hees, 2000). Es sind kugelförmige Zellen, deren Oberfläche glatt ist oder kurze, unregelmäßig geformte Mikrovilli aufweist (Hees und Tschudi, 1990). Der runde chromatinreiche Kern färbt sich mit basischen Farbstoffen sehr intensiv an, so dass der Nucleolus nur elektronenmikroskopisch sichtbar ist (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Die geringe Menge an Zytoplasma und die hohe Dichte an Chromatin könnte darauf hindeuten, dass der kleine Lymphozyt metabolisch weniger aktiv ist als die anderen beiden Formen (Kramer, 2000). Der mittlere Lymphozyt des Rindes besitzt

einen größeren, runden, evtl. auch eingedrückten Kern, in dem die gleiche Menge an Chromatin auf eine größere Fläche verteilt ist. Auch die Menge an Zytoplasma ist größer und umgibt den exzentrisch liegenden Kern (Kramer, 2000). Beim Rind können manche große Lymphozyten einen nierenförmigen oder geteilten Zellkern aufweisen (Jain, 1993). Der Kern ist weniger kompakt (Sinowatz und Hees, 2000), liegt zentral und färbt sich heller an als der des mittleren Lymphozyten (Kramer, 2000). Manche großen Lymphozyten sind nur schwer von Monozyten zu unterscheiden (Jain, 1993). Wie auch bei Monozyten färbt sich das Zytoplasma blau bis grau an und enthält manchmal kleine Vakuolen (Jain, 1993). Lymphozyten besitzen eine geringe amöboide Beweglichkeit, phagozytieren nicht und besitzen kaum Lysosomen. Sie sind keine Endzellen und können somit nach Stimulation weiter transformiert werden (Sinowatz und Hees, 2000). Die Lebenszeit der Lymphozyten variiert von Stunden bis zu Jahren (Hees und Tschudi, 1990).

2.3.4. Zytochemische Eigenschaften

Lymphozyten lassen sich nicht mit Sudanschwarz anfärben, sind Peroxidase negativ und weisen auch keine positive Reaktion beim Chloracetat-Esterase Nachweis auf. In den Neutrophilen der meisten Spezies kann man alkalische Phosphatase Aktivität nachweisen, nicht aber in Lymphozyten. Manche T-Lymphozyten weisen eine nicht-spezifische-Esterase Aktivität auf (Jain, 1993). Die Lymphozyten von Rind, Hund, Pferd und Schaf weisen eine leicht positive Reaktion bei der PAS (Periodic acid Schiff)-Färbung auf (Raskin und Valenciano, 2000). Des Weiteren beinhalten Lymphozyten viele lysosomale, saure hydrolytische Enzyme wie z.B.: saure Phosphatase und β -Glucuronidase und Enzyme für die Purin- und Pyrimidin-Synthese (Jain, 1993).

2.3.5. Aufgaben

Lymphozyten sind die Träger immunologischer Abwehrfunktionen (Hees und Tschudi, 1990). Die T- und B-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptorproteine, mit denen sie Antigene erkennen und binden können. Die beiden Zellen unterscheiden sich jedoch in ihrer Immunantwort. Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität wichtig, wohingegen die T-Lymphozyten die zelluläre Immunität vermitteln (Jain, 1993) (Sinowatz und Hees, 2000). Bei den T-Lymphozyten kann man verschiedene Subpopulationen unterscheiden. Nach Antigenkontakt an der Zelloberfläche wandeln sich die T-Zellen in zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen, T-Unterdrückerzellen, T-Gedächtniszellen und natürliche Killer T-Zellen (Liebich, 1999). Die T-Helferzellen spielen bei der humoralen Immunantwort eine Rolle, indem zuerst ein Antigen an einen Makrophagen gebunden wird. Die T-Helferzelle erkennt das Antigen und stimuliert die B-Lymphozyten zur Umwandlung in eine Plasmazelle und zur Antikörperproduktion (Jain, 1993) (Sinowatz und Hees, 2000). Des Weiteren gibt es noch die zytotoxischen T-Zellen, T-Suppressorzellen und T-Gedächtniszellen. Erstere können gewisse Zielzellen zerstören, die T-Suppressorzellen verhindern eine übermäßige Immunreaktion und letztere sind in der Lage, auch nach längerer Zeit ein Antigen wieder zu erkennen (Sinowatz und Hees, 2000).

2.4. Neutrophile Granulozyten

2.4.1. Allgemeines

Neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle im Abwehrsystem des Organismus (Smith, 2000). Die drei verschiedenen Arten von Granulozyten werden anhand der Färbeeigenschaften ihrer Granula benannt. Eosinophile Granulozyten besitzen azidophile Granula, die sich mit Eosin rot anfärben, basophile Granulozyten besitzen basophile Granula, die sich lila anfärben und neutrophile Granulozyten besitzen weder azidophile noch basophile Granula, weswegen sie auch „Heterophile“ genannt werden (Brown, 1998). Die Granula der neutrophilen Granulozyten werden durch saure oder basische Farbstoffe nicht angefärbt. In den ersten Lebenswochen des Kalbes ist der neutrophile Granulozyt die dominierende Zelle im Blut, nach 2 Wochen sind jedoch mehr Lymphozyten vorhanden (Kramer, 2000). Wenn man das Rind mit anderen Tierarten vergleicht, bei denen die Neutrophilen den Großteil der Leukozyten ausmachen, so erkennt man, dass nur 25% der Gesamtleukozyten neutrophile Granulozyten sind (Paape et al., 2003).

2.4.2. Neutrophile Granulopoese

In neueren Studien konnte bewiesen werden, dass die Entstehung eines neutrophilen Granulozyten bei einem gesunden Kalb ca. 5,77 Tage dauert. Im Blut konnten diese Blutzellen nach ca. 7,01 Tagen nachgewiesen werden (Paape et al., 2003). Granulozyten bleiben nur kurze Zeit im Blut. Sie wandern bald ins Bindegewebe, wo sie ihre restliche Lebenszeit von ca. einer Woche verbringen (Sinowatz und Hees, 2000). Die gemeinsame Stammform aller Granulozyten ist der Myeloblast. Er kann sich wie sein Nachfolger, der Promyelozyt, noch mitotisch teilen (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Der Myeloblast hat etwa eine Größe von 10-15 µm (Sinowatz und Hees, 2000), hat einen runden Kern, fein getüpfeltes Chromatin, einen oder mehrere Nucleoli und eine leichtes basophiles Zytoplasma (Smith, 2000). Die nächste Stufe ist der Promyelozyt, der eine Größe von ca. 20 µm aufweist (Sinowatz und Hees, 2000). Eines der wichtigsten Charakteristika dieser beiden Entwicklungsstadien ist die Ausbildung unspezifischer oder auch primärer Azurgranula (Sinowatz und Hees, 2000) (Kraft, 2005). Diese Granula haben einen Durchmesser von ca. 0,4 µm und nehmen während der Reifung der Zelle ab. Sie entstehen durch die Verschmelzung kleinerer, durch den Golgi-Apparat gebildeter Vesikel und sind Peroxidase-positiv (Kraft, 2005). Das Zytoplasma des Promyelozyten ist leicht basophil gefärbt (Smith, 2000). Die nächste Entwicklungsstufe ist der Myelozyt. Er ist die letzte Zelle der Granulozytenreihe, die sich noch mitotisch teilen kann (Sinowatz und Hees, 2000). Sobald es zur Umwandlung vom Promyelozyten zum Myelozyten kommt, treten auch die sekundären oder auch spezifischen Granula in Erscheinung. Mit einem Durchmesser von ca. 0,3 µm sind diese Granula kleiner als die der Vorstufen (Smith, 2000). Auch diese Granula werden unabhängig von den primären Granula durch den Golgi-Apparat gebildet (Kraft, 2005). Das anfangs basophile Zytoplasma des Myelozyten wird durch den Verlust von Ribosomen zunehmend azidophil. Es lassen sich bereits neutrophile, eosinophile und basophile Vorstufen differenzieren, obwohl die Granula noch unreif sind (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Im Stadium des Metamyelozyten haben die Granula der drei Zelltypen bereits ihre charakteristische Färbung (Hees und Tschudi, 1990). Der Zellkern verkleinert sich während der Entwicklung und wird schließlich im Stadium des Metamyelozyten nieren- oder stabförmig (Sinowatz und Hees, 2000). Aus dem Metamyelozyt wird dann der junge, stabkernige Granulozyt, aus welchem dann durch Einschnürungen wiederum der segmentkernige Granulozyt wird (Sinowatz und Hees, 2000). Bereits die jugendlichen oder stabkernigen Granulozyten können das Knochenmark verlassen, bleiben aber meist noch am Entstehungsort,

bis sie vollständig herangereift sind (Hees und Tschudi, 1990).

2.4.3. Morphologie

Neutrophile Granulozyten sind relativ große Zellen und haben einen Durchmesser von ca. 10-15 μm (Smith, 2000). Der Kern ist meist stark gelappt und besteht bei den reifen Formen aus 2 bis 4, meist jedoch aus 3 Segmenten (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Die Segmente werden durch feine Chromatinbrücken zusammengehalten (Sinowatz und Hees, 2000). Nur sehr selten kann man im Blut des Rindes auch stabförmige Neutrophile finden. Der Kern der unreifen Neutrophilen ist meist wie ein Hufeisen geformt und ist nicht gelappt. Um als stabförmiger, neutrophiler Granulozyt klassifiziert zu werden, müssen mindestens 60% der Kernseiten parallel zueinander verlaufen (Paape et al., 2003). Das Zytoplasma enthält je nach Tierart 2 oder 3 Arten von Granula, einen zentral gelegenen Golgi-Apparat, wenig endoplasmatisches Retikulum und wenig Mitochondrien (Smith, 2000). Bei weiblichen Tieren verschiedener Spezies kann man an den Kernen einen trommelschlegelähnlichen Kernanhang finden (Hees und Tschudi, 1990). Dieser kleine ovale Lappen, auch „drum stick“ genannt, mit einer Größe von 1,5 μm , ist mit dem Hauptlappen durch eine feine Chromatinfaser verbunden und enthält den inaktiven, verklumpten Teil des zweiten X-Chromosoms (Hees und Tschudi, 1990) (Brown, 1998). Die meisten Tierarten haben zwei verschiedene Arten von Granula im Zytoplasma, die primären oder azurophilen und die sekundären oder spezifischen (Hees und Tschudi, 1990). Rinder, Schafe und Ziegen haben jedoch noch eine dritte Form von Granula, die dem Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten sein eosinophiles Zytoplasma verleihen (Kramer, 2000). Die azurophilen oder primären Granula sind Peroxidase-positiv und sind rund oder länglich geformt. Bei den Peroxidase-negativen Granula, die meist rund geformt sind, können nun zwei Formen voneinander unterschieden werden: die großen Granula mit einem Durchmesser von 0,4-0,5 μm und die kleinen Granula mit einem Durchmesser von 0,15-0,3 μm (Gennaro et al., 1983). Die großen Granula sind von einer lockeren, glatten Membran umgeben und enthalten eine blasse, homogene Matrix, die in frühen Formen einen zentralen Kern enthält (Gennaro et al., 1983) (Baggiolini et al., 1985). Die kleinen Granula besitzen einen elektronendichteren Inhalt (Gennaro et al., 1983).

2.4.4. Zytochemische Eigenschaften

Die Granula der neutrophilen Granulozyten weisen spezielle zytochemische Eigenschaften auf. Sie lassen sich mit Sudanschwarz anfärben und zeigen genau wie die primären Granula eine positive Reaktion beim Nachweis von Chloracetat-Esterase (Raskin und Valenciano, 2000). Die Granula leiten sich von Lysosomen ab, membranumhüllte Bläschen, welche hydrolytische Enzyme enthalten (Hees und Tschudi, 1990). Wie bereits unter 2.4.3. erwähnt, besitzen die primären oder azurophilen Granula einen hohen Gehalt an Peroxidase. Diese wirkt in Gegenwart von Hydrogenperoxid und Halogenionen bakterizid (Paape et al., 2003). Kälber im Alter von 1-3 Monaten weisen eine geringere Peroxidaseaktivität auf als adulte Rinder (Kampen et al., 2005). Des Weiteren enthalten die primären Granula saure Hydrolasen, basische Proteine, saure Glykosaminoglykane und neutrale Proteinase (Gennaro et al., 1983) (Sinowatz und Hees, 2000). Lysozyme, die eine wichtige Rolle in der azurophilen Granula anderer Spezies spielen, können bei Rindern, Schafen und Ziegen nicht gefunden werden (Kramer, 2000) (Paape et al., 2003). Die großen Granula, welche wie die spezifischen Granula Peroxidase-negativ sind, erscheinen zuerst im Stadium der Myelozyten und enthalten den Großteil der antimikrobiellen Proteine (Paape et al., 2003). Sie enthalten β -Defensive, Lactoferrin und eine Reihe kationischer Proteine, genannt Bactenecine. β -Defensive sind Peptide, die gegen viele gram-positive, gram-negative, anaerobe Bakterien, Pilze und Viren wirken (Paape et al., 2003). Lactoferrin bindet

Eisen, das für das Wachstum vieler Keime notwendig ist (Sinowatz und Hees, 2000) und unterdrückt auch die Produktion von neuen Neutrophilen (Brown, 1998). Bis jetzt konnten zwei verschiedene Bactenecine identifiziert werden, Bac7 und Bac5. Beide können durch die äußere und innere Membran von E.coli Bakterien gelangen und diese zerstören (Paape et al., 2003). Die sekundären Granula sind Peroxidase-negativ, enthalten Lactoferrin, alkalische Phosphatase und ein Protein namens Cobalophilin (Jain, 1993) (Paape et al., 2003). Cobalophilin bindet Vitamin B12, welches die Mikroorganismen für ihre DNA-Replikation benötigen (Sinowatz und Hees, 2000). Von ortständigen Fibroblasten und Makrophagen werden Zytokine freigesetzt, die für die Bildung und Reifung von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark notwendig sind. Diese Zytokine (Stammzellfaktor, Interleukine, Koloniestimulierender Faktor, G-CSF etc.) wirken sowohl auf die Zellen der Granulopoese als auch auf die ausdifferenzierten Granulozyten ein (Sinowatz und Hees, 2000).

2.4.5. Aufgaben

Die Neutrophilen spielen eine wichtige Rolle im Abwehrsystem des Körpers. Die Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht darin, eindringende Mikroorganismen zu phagozytieren und zu zerstören (Roth, 1981). Die Phagozytosefähigkeit ist bei diesen Zellen besonders ausgeprägt, deshalb werden sie auch Mikrophagen genannt (Hees und Tschudi, 1990). Als Antwort auf eine Infektion im Körper wandern die Neutrophilen vom Blut in das betroffene Gewebe ein (Brown, 1998). Die Granulozyten sind amöboid beweglich und können auf bestimmte Reize hin, z.B. Bakterien oder deren Zerfallsprodukte, die Blutkapillaren und die postkapillären Venolen durchwandern und in das Gewebe auswandern (Sinowatz und Hees, 2000). Hierbei spielt der mehrfach gelappte Kern eine große Rolle, der eine schnelle Migration zwischen den endothelialen Zellen erlaubt. Makrophagen hingegen besitzen einen hufeisenförmigen Kern, der die Migration durch das Endothel schwieriger gestaltet (Paape et al., 2003). Das Auswandern der neutrophilen Granulozyten entlang eines chemotaktischen Gradienten ist ausschlaggebend für das spätere Erreichen des Entzündungsortes und wird auch Chemotaxis genannt (Paape et al., 2003). Chemotaktische Substanzen sind z.B. Prostaglandine, Komplementfaktoren, Leukotriene, Interleukine etc. (Jain, 1993) (Paape et al., 2003). Bevor es dann zur Phagozytose der fremden Partikel kommen kann, müssen sich an diese erst Immunglobuline oder Komplementfaktoren binden (Jain, 1993). Da die neutrophilen Granulozyten auch sekretorisch aktive Zellen sind, können sie bei Kontakt mit dem phagozytosefähigen Material ihre Granula auch nach außen abgeben und dieses extrazellulär verdauen (Sinowatz und Hees, 2000). „Respiratory burst“ ist ein weiterer Weg der Neutrophilen, um Fremdkörper zu eliminieren. Die sich in der Zellmembran befindende NADPH-Oxidase produziert verschiedene Sauerstoffmetaboliten und zusätzlich katalysiert die Peroxidase der primären Granula die Bildung von Hypochlorit aus H_2O_2 und Cl^- . Durch diese Stoffe werden die Mikroorganismen durch Oxidation getötet (Roth, 1981) (Jain, 1993) (Paape et al., 2003). Sobald die Neutrophilen in das betroffene Gewebe einwandern, kommt es gleichzeitig zur Stimulation des Knochenmarks. Zusätzliche neutrophile Granulozyten werden in die Blutbahn entlassen und es kommt zu einer Leukozytose mit vermehrt stabkernigen Granulozyten, auch „Linksverschiebung“ genannt (Brown, 1998) (Sinowatz und Hees, 2000). Allgemein gibt es drei verschiedene „Pools“ für neutrophile Granulozyten im Organismus: den Speicherpool, welcher im roten Knochenmark lokalisiert ist und die Peripherie über 8-10 Tage mit reifen neutrophilen Granulozyten versorgen kann; den zirkulierenden Pool, welcher die Granulozyten in der Blutbahn ausmacht und den Marginalpool, der die Zellen umfasst, die am Endothel von Kapillaren und postkapillären Venolen adhären (Sinowatz und Hees, 2000).

2.5. Eosinophile Granulozyten

2.5.1. Allgemeines

Die Bezeichnung „eosinophile Granulozyten“ geht auf Paul Ehrlich zurück, welcher ihre hohe Affinität zu sauren Farbstoffen wie Eosin entdeckte (Young, 2000). Ihre Anzahl im Blut des adulten Rindes macht ca. 9% der Gesamtleukozyten aus (Jain, 1993). Ab einem Alter von 6 Monaten bis zum erwachsenen Rind verdoppeln gesunde parasitenfreie Kälber ihre Anzahl an Eosinophilen im Blut (Kramer, 2000).

2.5.2. Eosinophile Granulopoese

Wie schon unter Punkt 2.4.2 beschrieben, entwickeln sich die Granulozyten aus den Myeloblasten im Knochenmark (Sinowatz und Hees, 2000). Bei dieser Zellreihe kommt es ebenfalls auf der Stufe der Promyelozyten zur Ausbildung primärer Granula. Diese Form geht dann direkt in die sekundären, spezifischen Granula über, welche azurophil sind und sich in May-Grünwald oder Giemsa Färbung rot anfärben (Kraft, 2005). Im Stadium des Promyelozyten ist der eosinophile Granulozyt zum ersten Mal morphologisch von den anderen Granulozytenformen zu unterscheiden (Young, 2000). Die Entwicklung wird durch aus T-Zell stammenden Zytokinen, Interleukin 3, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Interleukin 5 unterstützt (Young, 2000).

2.5.3. Morphologie

Die eosinophilen Granulozyten sind mit einem Durchmesser von 10-15 µm die größten Granulozyten (Hees und Tschudi, 1990). Ihre Lebensdauer beträgt 8-12 Tage im Gewebe und wenige Minuten bis 4 Stunden im Blut (Sinowatz und Hees, 2000) (Kraft, 2005). Sie sind durch das Vorkommen relativ großer Granula charakterisiert, welche sich mit sauren Farbstoffen intensiv anfärben lassen (Sinowatz und Hees, 2000). Unter den Tierarten zeigen sich Unterschiede in der Größe der Granula. So haben Pferde die größten Granula, während bei den Wiederkäuern die kleinsten zu finden sind (Hees und Tschudi, 1990). Der hufeisen- oder hantelförmige, manchmal auch zweigelappte Kern ist oft durch die zahlreichen, kleinen, einheitlich runden Granula bedeckt (Kramer, 2000) (Sinowatz und Hees, 2000). Betrachtet man die Granula unter dem Elektronenmikroskop, so kann man bei vielen Spezies eine homogene Matrix (Externum) von einer kristalloiden Innenstruktur (Internum) unterscheiden (Sinowatz und Hees, 2000). Das Rind weist eine homogene Granula auf, wohingegen z.B. die Katze kristalline Granula besitzt (Young, 2000). Die spezifischen Granula enthalten vier verschiedene Proteine: Major basic protein (MBP), Eosinophile Peroxidase (EPO), Eosinophil cationic protein (ECP) und Eosinophil-derived neurotoxin (EDN). MBP macht über 50% der Proteine aus und schützt die Eosinophilen während des Transportes vor den argininreichen basischen Proteinen, welche zytotoxisch wirken. Die antibakterielle Wirkung von EPO wird noch diskutiert. ECP beschädigt Membranen von Parasiten, indem es durch einen kolloid-osmotischen Prozess die transmembranen Poren verändert. EDN beschädigt Nervenfasern, hat aber keine zytotoxische Wirkung auf Parasiten (Young, 2000). Eosinophile Granulozyten der meisten Tierarten enthalten Proteine in ihrer Granula, welche die sog. „slow-reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A) erzeugen, auch bekannt als Sulfidopeptid-Leukotriene. Den Eosinophilen des Rinderblutes fehlen diese Leukotriene (Freiburghaus und Jörg, 1990). Eosinophile synthetisieren unter anderem Zytokine, Proteoglykane, Vitamin-B-bindende Proteine und zahlreiche Enzyme, wie z. B. Kollagenase, Histaminase, Phospholipase D und nicht-spezifische Esterase. Bei manchen Tierarten, unter anderem auch beim Rind, findet sich in der Plasmamembran die alkalische Phosphatase (Jain, 1993) (Young, 2000). Den eosinophilen

Granulozyten fehlen jedoch die bakteriziden Stoffe Lysosym, Lactoferrin und Phagozytin (Young, 2000).

2.5.4. Zytochemische Eigenschaften

Eosinophile Granulozyten sind generell Chloracetat-Esterase-negativ. Bei Pferden und Wiederkäuern kann eine unspezifische-Esterase-Aktivität nachgewiesen werden, welche dem Hund und der Katze fehlt. Sie zeigen eine positive Reaktion beim Nachweis von Peroxidase, wobei dieses Enzym in der Matrix der großen Granula gefunden werden kann, nicht aber im kristallinen Kern. Des Weiteren lassen sich eosinophile Granulozyten mit Sudanschwarz anfärben (Raskin und Valenciano, 2000).

2.5.5. Aufgaben

Die Eosinophilen spielen eine große Rolle bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie z.B. Allergien, bronchialem Asthma und Infektion mit Parasiten (Freiburghaus und Jörg, 1990). Phagozytosefähigkeit und Beweglichkeit sind geringer ausgeprägt als bei den neutrophilen Granulozyten (Hees und Tschudi, 1990). Sie spielen aber keine größere Rolle bei der Phagozytose von Bakterien (Sinowatz und Hees, 2000). Die eosinophilen Granulozyten werden von Antigenen, Antigen-Antikörper-Komplexen, heterologen Gammaglobulinen, Fibrin und Histamin chemotaktisch angezogen (Kraft, 2005). Indem sie die stark entzündlich wirkenden Produkte der Mastzellen, das Histamin und das Leukotrien C enzymatisch inaktivieren und mit Prostaglandin E1 und E2 die Freisetzung von Mastzellgranula hemmen, wirken sie dämpfend auf entzündliche Reaktionen (Sinowatz und Hees, 2000). Des Weiteren können auch die Eosinophilen die Inhaltsstoffe ihrer Granula nach außen abgeben, um z.B. Parasiten abzutöten (Kaspers und Göbel, 2010). Das Einwandern in das betroffene Gewebe geschieht relativ schnell nach einer Infektion. Das ist auch der Grund, weshalb man nur in einem sehr kurzen Zeitraum eine Bluteosinophilie feststellen kann (Kraft, 2005).

2.6. Basophile Granulozyten

2.6.1. Allgemeines

Basophile Granulozyten und Mastzellen wurden zum ersten Mal von Paul Ehrlich Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben (Scott und Stockham, 2000). Sie sind mit 0,3-1% die am seltensten vorkommende Form der Granulozyten (Sinowatz und Hees, 2000). Bei neugeborenen Kälbern sind sie, wahrscheinlich aufgrund des hohen Cortisolspiegel während der Geburt, meist nicht zu finden (Adams et al., 1992).

2.6.2. Basophile Granulopoese

Die Entwicklung der basophilen Granulozyten läuft parallel zu der Entwicklung der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Theml et al., 2002) (Kraft, 2005). Ihre Entwicklung von der Reifung bis zur Entlassung in das Blut dauert ca. 2,5 Tage (Scott und Stockham, 2000). Nach dem Stadium des Promyelozyten kommt es zur Bildung des basophilen Myelozyten. Danach bildet sich der basophile Metamyelozyt, bis zuletzt der endgültige basophile Granulozyt entsteht (Sinowatz und Hees, 2000). Die Basophilen sind frühestens ab der Promyelozytenstufe durch ihre großen, schwarzvioletten Granula von anderen Blutzellen abgrenzbar (Theml et al., 2002). Das Wachstum und die Differenzierung der Basophilen wird hauptsächlich durch Interleukin 3 gesteuert (Scott und Stockham, 2000).

2.6.3. Morphologie

Der Durchmesser der basophilen Granulozyten beträgt 8-11 µm (Hees und Tschudi, 1990). Ihre Verweildauer im Blut beträgt ca. 6 Stunden, im Gewebe können sie sich bis zu 24 Stunden aufhalten (Sinowatz und Hees, 2000). Sie enthalten in großer Zahl basophile, blauschwarze Granula, mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm, die den mehrfach gelappten Kern weitgehend überdecken können (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Der Kern ist gelappt (Jain, 1993). Die Granula enthalten, so wie die der Mastzellen, Heparin, Histamin und zinkhaltige Proteine (Sinowatz und Hees, 2000). Sie sind die einzigen Zellen der Säugetiere, die Histamin synthetisieren können (Scott und Stockham, 2000). Die basophilen Granula sind im Wasser leicht löslich und hinterlassen dann blaßrosa gefärbte Vakuolen (Theml et al., 2002). Je nach Tierart ist der tatsächliche Inhalt der Granula unterschiedlich (Hees und Tschudi, 1990). Die Basophilen besitzen des weiteren membranständige Rezeptoren für Immunglobulin E, welche bei allergischen Erkrankungen eine Rolle spielen (Sinowatz und Hees, 2000). Die sog. Gewebsbasophilen oder Gewebsmastzellen, welche nicht im Blut zu finden sind, sind nahe Verwandte der basophilen Granulozyten, die große basophile Granula und einen runden Kern aufweisen (Theml et al., 2002).

2.6.4. Zytochemische Eigenschaften

Basophile können mit Toluidinblau und Naphthol-AS-D-Choloracetat-Esterase nachgewiesen werden (Jain, 1993). Sie weisen keine Peroxidaseaktivität auf und lassen sich nicht mit Sudanschwarz anfärben. Mit Alcianblau, welches sulfatierte Mukosubstanzen färbt, lassen sich die Granula der Basophilen anfärben (Raskin und Valenciano, 2000).

2.6.5. Aufgaben

Die Funktion der basophilen Granulozyten und der Gewebsmastzellen liegt vor allem in einer Freisetzung von kreislaufregulierenden Substanzen wie Histamin, Serotonin und Heparin. Diese Gewebshormone steigern die Gefäßpermeabilität am Ort verschiedener lokaler Antigeneinwirkungen und regulieren damit den Zustrom der übrigen Entzündungszellen (Theml et al., 2002). Durch Freisetzung bestimmter chemotaktischer Stoffe sind sie in der Lage, eosinophile Granulozyten anzulocken (Jain, 1993). Wie andere Granulozyten sind die Basophilen auch amöboid beweglich, ihre Beweglichkeit und Phagozytosefähigkeit ist jedoch relativ gering (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Kommt es zu einer Bindung von Antikörpern an die membranständigen Ig-E Rezeptoren, dann werden die Granula und damit auch das Histamin und Heparin schlagartig freigesetzt (Kraft, 2005) (Sinowatz und Hees, 2000). Die Folge der Histaminfreisetzung ist eine Vasodilatation mit Flüssigkeitsaustritt aus den Blutgefäßen. Es entsteht ein Ödem. Das Heparin übt eine Schutzwirkung gegen die disseminierte, intravasale Gerinnung aus (Kraft, 2005). Unter pathologischen Bedingungen treten die basophilen Granulozyten bei allergischen Reaktionen der Haut, der Schleimhäute und der Atemwege vermehrt auf (Sinowatz und Hees, 2000).

2.7. Monozyten

2.7.1. Allgemeines

Monozyten und Gewebsmakrophagen werden zu dem mononukleären Phagozytensystem zusammengefasst (Bienzle, 2000). Normalerweise machen sie beim Rind 3% der Gesamtleukozytenzahl aus. Ihr Zahl ist zum Zeitpunkt der Geburt am geringsten und erreicht den Normalwert erst nach 3 Wochen (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992).

2.7.2. Monozytopoese

Granulozyten und Monozyten stammen von der gleichen Progenitorzelle im Knochenmark ab, der Colony-forming-unit Granulozyten Monozyten (CFU-GM) (Bienzle, 2000). Die erste lichtmikroskopisch und im Knochenmark erkennbare Zelle der monozytären Reihe ist der Monoblast. Innerhalb von nur 5-50 Stunden kommt es über das Stadium des Promonozyten zur Reifung zum Monozyten (Kraft, 2005). Monoblasten sind runde Zellen mit einem runden Zellkern, der von einem schmalen Band an basophilem Zytoplasma umgeben ist. Der Kern ist deutlich basophil (Al-Izzi et al., 1982). Der Promonozyt enthält einen gefalteten Kern. Sein Chromatin erscheint klumpenförmig und sein Zytoplasma ist weniger basophil als das des vorangehenden Entwicklungsstadiums (Al-Izzi et al., 1982). Der Monozyt hat einen hufeisenförmigen Kern, ist nur leicht basophil und beinhaltet wenig geklumptes Chromatin. Das Zytoplasma färbt sich grau-blau und enthält Vakuolen und Granula (Al-Izzi et al., 1982). Die Zytokine, die den Monozyten zur weiteren Entwicklung und Funktion anregen, sind Interleukin 3 (IL3), Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) und Makrophagen stimulierender Faktor (M-CSF) (Bienzle, 2000). Die Monozyten können sich zu Makrophagen bzw. zu verschiedenen anderen Zelltypen des mononukleären, phagozytierenden Systems (MPS), wie z.B. Osteoklasten, weiter differenzieren (Sinowatz und Hees, 2000).

2.7.3. Morphologie

Die Monozyten des Wiederkäuers besitzen einen Durchmesser von 13-19 µm (Kramer, 2000). Sie sind die größten Zellen unter den weißen Blutzellen (Sinowatz und Hees, 2000). Einmal im Rinderblut angelangt, überleben die Monozyten dort 20-23 Stunden (Bienzle, 2000). Sie besitzen eine unregelmäßige Kontur, einen großen, meist zweilappigen Kern, der ein diffuses Chromatinmuster aufweist, und ein graues Zytoplasma mit feinen, kleinen, pinkfarbenen bis eosinophilen Granula (Kramer, 2000) (Bienzle, 2000). Mehrere unregelmäßig geformte Vakuolen sind im Zytoplasma zu finden (Kramer, 2000). Im Elektronenmikroskop erkennt man flache Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums, zahlreiche Mitochondrien und Ribosomen, die im Zytoplasma verteilt sind (Hees und Tschudi, 1990) (Bienzle, 2000). Im inaktiven Zustand ist die Oberfläche glatt, im aktiven bilden sich zusätzlich zahlreiche, kugelige und fingerförmige Ausstülpungen (Hees und Tschudi, 1990). Die Monozyten weisen eine gute Beweglichkeit und Phagozytosefähigkeit auf (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Nach dem Verlassen des Knochenmarks zirkulieren sie 1-2 Tage im Blut, bevor sie dann ins Bindegewebe einwandern (Hees und Tschudi, 1990).

2.7.4. Zytochemische Eigenschaften

Rindermonozyten zeigen eine schwache positive Reaktion beim Nachweis von saurer Phosphatase, Chloracetat-Esterase und bei der Färbung mit Sudan-Schwarz (Bienzle, 2000). Die saure Phosphatase Aktivität steigt jedoch mit der Entwicklung zum Makrophagen (Raskin und Valenciano, 2000). Des Weiteren zeigen sie keine Reaktion beim Nachweis von alkalischer Phosphatase und Peroxidase. Eine deutlich positive Reaktion zeigen sie beim Nachweis nichtspezifischer Esterase (Bienzle, 2000).

2.7.5. Aufgaben

Monozyten gehören zu dem mononukleären Phagozytosesystem (MPS), zu dem auch die Monozytenvorstufen im Knochenmark, die Makrophagen im Gewebe und verschiedene Zelltypen, die sich von den Monozyten ableiten, gehören (Sinowatz und Hees, 2000). Monozyten erhalten ihre metabolische Energie durch Glykolyse. Sie sind amöboid beweglich und folgen chemotaktischen Signalen (Bienzle, 2000). Unter anderem besitzen Monozyten des

Rindes Rezeptoren für IgG Fc und C3, welche der Anheftung und Aufnahme von Partikeln dienen (Birmingham und Jeska, 1980). Die Monozyten im Blut stellen Vorstufen für Gewebsmakrophagen dar (Jain, 1993). Sobald durch eine Infektion ein höherer Bedarf an Gewebsmakrophagen besteht, kommt es zu einem Anstieg der Monozyten im Blut (Al-Izzi et al., 1982). Monozyten phagozytieren Antigene, deren Spaltprodukte wiederum von T-Helferzellen erkannt werden. Somit dienen die Monozyten auch der Aktivierung und Regulation der spezifischen Abwehr (Jain, 1993). Es gibt jedoch auch Mikroorganismen, die in Makrophagen überleben können, z. B. Mykobakterien, Leishmanien, *Listera monozytogenes* und *Cryptococcus neoformans* (Bienzle, 2000).

3. Glykohistochemie

3.1. Lektine

3.1.1. Definition und Entstehung des Begriffs Lektin

Lektine sind Kohlenhydrat bindende Proteine. Ihrem Liganden fehlt es an enzymatischer Aktivität und sie unterscheiden sich in ihrem freien Sensor-/Transportprotein für Mono- und Oligosaccharide (Gabijs et al. 2011). Erstmals wurden die Lektine 1888 von Peter H. Stillmark beschrieben, der Ricin aus dem Samen von *Ricinus communis*, der Rizinusbohne, isolierte und feststellte, dass Ricin die Fähigkeit zur Agglutination von Erythrozyten besitzt (Kocourek, 1986) (Franz, 1990). Bei der Arbeit mit blutgruppenspezifischen Proteinen aus Pflanzensamen führte W.C. Boyd im Jahre 1954 erstmals den Namen „Lektin“ ein, der sich von dem lateinischen Wort „legere“ = „auswählen“ ableitet (Rüdiger, 1978) (Goldstein und Poretz, 1986) (Gabijs, 2009). 1982 wurde von Goldstein et al. folgende Definition für Lektine vorgeschlagen: „Ein Lektin ist ein zuckerbindendes Protein oder Glykoprotein nichtimmunogenen Ursprungs, das Zellen agglutiniert und/oder Glykokonjugate präzipitiert“ (Goldstein und Poretz, 1986) (Franz, 1990) (VanDamme et al., 1998). Diese Definition wurde von einigen Wissenschaftlern kritisiert. Kocourek und Horjesi (1981) waren der Meinung, dass in den meisten Fällen die Agglutination der Zellen nur ein zufälliger Effekt ist und deshalb die Definition primär auf den physikochemischen Eigenschaften der Lektine, also auf der Interaktion mit den Kohlenhydraten basieren sollte (Kocourek und Horejsi, 1981). Kocourek und Horejsi (1981) kritisierten zudem, dass auch solche Lektine ausgeschlossen wurden, die nur eine Bindungsstelle und/oder toxische oder hormonähnliche Eigenschaften aufweisen (Kocourek und Horejsi, 1981). Aufgrund dieser Kritikpunkte schlugen die Autoren folgende Definition vor: „Lektine sind zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nichtimmunogenen Ursprungs, die keine enzymatische Aktivität bezüglich der Zucker, welche sie binden, aufweisen und welche für ihre Bindung keine freien glykosidischen Hydroxylgruppen an diesen Zuckern benötigen“ (Kocourek und Horejsi, 1981). 1981 wurde diese Problematik vor dem Nomenklaturkomitee der internationalen Gemeinschaft für Biochemie diskutiert. Man kam zu dem Schluss, dass Goldstein et al. mit der Aussage „Lektine sind zuckerbindende Proteine von nicht immunogenen Ursprung“ richtig liege, dass jedoch seiner Definition nach Lektine mehr als eine Kohlenhydrate Bindungsstelle besitzen müssen. Dies würde allerdings Proteine wie Ricin ausschließen, welche sehr nahe mit Lektinen verwandt sind. Das Komitee war jedoch auch der Meinung, dass die Agglutination von Zellen leichter zu überprüfen wäre als das Fehlen einer enzymatischen Aktivität. Somit soll die Definition von Goldstein et al. beibehalten werden, bis die Rolle der Lektine endgültig geklärt ist (Dixon, 1981).

3.1.2. Struktur und Einteilung

Lektine sind im gesamten Pflanzenreich zu finden. Sie wurden in Pilzen und Bakterien, am häufigsten allerdings in den Leguminosen nachgewiesen. Hier befindet sich der größte Teil der Lektine in den Samen, ein kleiner Teil aber auch in den restlichen Pflanzenteilen (Rüdiger, 1978). Lektinartige Proteine mit der Fähigkeit der Bindung von Kohlenhydraten und zur Zellagglutination finden sich auch in Tieren (Rüdiger, 1978). Betrachtet man die chemische Natur der Lektine, so sind sie meist Glykoproteine, die zu 2-50% Kohlenhydrate enthalten. Nur ConA und WGA enthalten keinen Zucker (Rüdiger, 1982). Alle Lektine enthalten Metallionen, die essentiell für ihre Kohlenhydrat-bindende Aktivität sind (VanDamme et al., 1998). Ihrer Struktur nach können Lektine in Einketten- und Zweikettenlektine unterteilt werden (VanDamme et al., 1998). Die Einkettenlektine weisen eine unterschiedliche Zuckerspezifität

auf und bestehen aus 2 bis 4 fast identischen Untereinheiten, den Peptidketten. Zu dieser Gruppe zählen z. B. ConA und PHA (Rüdiger, 1982) (VanDamme et al., 1998). Die Zweikettenlektine sind aus 2 bis 4 schweren β -Ketten und der gleichen Anzahl leichter α -Ketten aufgebaut und binden spezifisch Mannose, Glucose und deren α -Glykoside (Rüdiger, 1982) (VanDamme et al., 1998). Das Lektin aus *Pisum sativum* zählt zu der Gruppe der Zweikettenlektine (Rüdiger, 1982). Amerikanischen Forschern gelang es, eine Beziehung zwischen einem Ein- und Zweikettenlektin herzustellen. Ordnet man das Einkettenlektin ConA als Kreis so an, dass sein C-Terminus den N-Terminus berührt, dann lassen sich die beiden verschiedenen Untereinheiten des Zweikettenlektins aus der Saubohne (*Vicia faba*) hintereinander in einem parallelen Kreis so anfügen, dass maximale Ähnlichkeit besteht (Rüdiger, 1981). Dies bedeutet, dass die Aminosäuresequenzen der beiden Lektine zyklisch permutiert sind (Rüdiger, 1981) (Gabius, 2009). Besonders interessant ist, dass manche Pflanzen beide Arten der Lektine enthalten. Zu diesen Pflanzen zählt *Vicia cracca* (Vogel-Wicke) (Rüdiger, 1982). Van Damme et al. (1998) teilt die Lektine in 4 Hauptgruppen ein: Merolektine, Hololektine, Chimerolektine und Superlektine. Merolektine können keine Zellagglutination und Präzipitation von Glykokonjugaten herbeiführen. Hololektine besitzen einen oder mehrere Kohlenhydrat-bindende Bereiche und können Zellagglutination und Präzipitation herbeiführen. Zu ihnen zählen die meisten Lektine. Chimerolektine sind zusammengesetzte Proteine. Die Superlektine stellen eine spezielle Gruppe der Chimerolektine dar (VanDamme et al., 1998). Eine weitere Aufteilung kann nach der Zuckerspezifität der Lektine erfolgen (Goldstein und Poretz, 1986). Die Ansichten über die Zuckerspezifität sind unterschiedlich. Folgende Tabelle zeigt die Einteilung ausgewählter Lektine nach ihrer Zuckerspezifität.

Tabelle 4: Übersicht der Lektine

Zuckerspezifität	Herkunft	Abk
Glukose/Mannose bindende Lektine	<i>Canavalia ensiformis</i> → Schwertbohne <i>Lens culinaris</i> → Speiselinse <i>Pisum sativum</i> → Erbse	ConA LCA PSA
Galaktose bindende Lektine	<i>Arachis hypogea</i> → Erdnuß <i>Ricinus communis</i> → Rizinusbohne <i>Viscum album</i> → Mistel <i>Erythrina cristagalli</i> → Korallenstrauch	PNA RCA I + II VAA ECA
N-Acetylglukosamin bindende Lektine	<i>Griffonia simplicifolia</i> → afrik. Schwarzbohne <i>Datura stramonium</i> → Stechapfel <i>Triticum vulgare</i> → Weizen	GSL/GSA-II DSA WGA
N-Acetylgalaktosamin bindende Lektine	<i>Dolichos biflorus</i> → Afrik. Pferdebohne <i>Glycine max</i> → Sojabohne <i>Sophora japonica</i> → chin. Schnurbaum <i>Griffonia simplicifolia</i> → afrik. Schwarzbohne <i>Sambucus nigra</i> → schwarzer Holunder	DBA SBA SJA GSL/GSA-I SNA
L-Fukose bindende Lektine	<i>Lotus tetragonolobus</i> → rote Spargelerbse <i>Ulex europaeus</i> → Stechginster	LTA UEA-1
Oligosaccharid bindende Lektine	<i>Maakia amurensis</i> → asiatisches Gelbholz <i>Phaseolus vulgaris</i> → Gartenbohne	MAA PHA-E/L

3.1.3. Funktion und Anwendung

Die biologische Funktion der Lektine ist erst teilweise bekannt. Zum einen wird den Lektinen eine Schutzwirkung gegen verschiedene Insekten und pflanzliche Parasiten zugeschrieben (Rüdiger, 1978). Es konnte des Weiteren festgestellt werden, dass das Lektin aus Weizenkeimen und das Lektin der Brennessel (*Urtica dioica*) das Wachstum von Pilzen einschränken kann, indem es in die Zellwandsynthese eingreift (Rüdiger, 1978) (Rüdiger, 1998) (Rüdiger und Gabius, 2001). Die Zellwand der Pilze besteht aus Chitin, ein Polymer des Zuckers N-Acetylglucosamin, welchen diese Lektine spezifisch binden (Rüdiger, 1978). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass verschiedene pflanzliche Lektine die Fähigkeit besitzen, Mikroorganismen zu binden, die dann in Symbiose mit den Pflanzen leben (Rüdiger, 1978). Diese Bakterien gehören zu der Gattung *Rhizobium* und sind sog. Bodenbakterien (Rüdiger, 1978). Sie lagern sich an der Oberfläche differenzierter Wurzelzellen an, von wo sie dann in die Wurzel gelangen und dort die Pflanze mit gebundenen Stickstoff versorgen (Rüdiger, 1978) (Barondes, 1981). Bei Säugetieren sind Lektine am Abbau von Plasmaproteinen beteiligt. Die Leberzellmembranen enthalten Lektine, die bestimmte Zucker zirkulierender Glykoproteine des Serums erkennen und gealterte Glykoproteine aus der Zirkulation eliminieren (Rüdiger, 1981) (Franz, 1990). Lektine können zudem die Aktivität von Enzymen beeinflussen (Rüdiger, 1998), haben eine mitogene Wirkung auf tierische und pflanzliche Zellen (Rüdiger, 1978) und agieren als Erkennungsmoleküle in Zellen, auf Zelloberflächen und in physiologischen Flüssigkeiten (Sharon und Lis, 2004). Die Lektine werden zudem in direkten und indirekten Nachweisemethoden für den Kohlenhydratnachweis in Geweben und Zellen verwendet (Roth, 2011). Bei der direkten Methode wird ein bereits an einen Fluoreszenzfarbstoff oder Enzym gekoppeltes Lektin auf ein Gewebe gegeben. Dies ist bei den direkt FITC-markierten Lektinen der Fall und die Reaktion wird sofort sichtbar. Bei der indirekten Methode muss in einem zweiten Schritt ein markiertes Streptavidin oder ein anti-Antikörper aufgetragen werden, welcher dann an das zuvor gebundene Hapten bindet. Nach Inkubation wird die Reaktion somit sichtbar. Dies ist bei biotinylierten Lektinen der Fall (Roth, 2011).

3.2. Zuckerstrukturen auf den bovinen Blutzellen

Glykoproteine machen einen wesentlichen Teil der Erythrozytenmembran aus (Hudson et al., 1975) und sind für eine Reihe von wichtigen Vorgängen verantwortlich. Als Oberflächenantigene wirken sie als Andockstellen für Viren und Hormone, als Rezeptoren für die mitogene Stimulation durch Lektine und auch für die strukturelle Stabilität der Membran (Newman und Uhlenbruck, 1977). Beim Menschen umfassen sie ca. 10% des gesamten Proteingehalts der Erythrozytenmembran, wobei Sialoglykoproteine die dominierenden Proteine darstellen (Hamazaki et al., 1975). Die am besten untersuchten Blutzellen des Rindes sind die Erythrozyten, da sie in großer Menge vorhanden sind und sich ihre Membran leicht präparieren lässt (Chien et al., 1978). Beim Rind kann man zwischen einem großen und einem kleinen Membran-Glykoprotein unterscheiden: Laut Emerson und Kornfeld (1976) besteht das große Glykoprotein aus 20% Protein und aus 80% Kohlenhydrat (Emerson und Kornfeld, 1976). Eine weitere Studie von Fletcher et al. zeigt, dass das große Glykoprotein aus 77% Kohlenhydrat und 23% Peptiden, das kleine jedoch aus 27% Carbohydrat und 73% Peptiden besteht. Das große Glykoprotein besitzt des weiteren doppelt soviel Galaktose und Sialinsäure wie das kleinere (Fletcher et al., 1982). Die Zellmembran der menschlichen Erythrozyten besitzen ca. die gleiche Menge an Sialinsäure, Galaktose, Glukose und N-Acetyl-Galaktosamin wie die des Rindes (Emerson und Kornfeld, 1976). Allgemein können die Erythrozyten der Säugetiere, was ihre Membranzusammensetzung betrifft, in 2 Gruppen unterteilt werden: jene, die N-Acetyl-Galaktosamin enthalten wie die des Menschen, des Schweines, des Meerschweinchens und des Schafes; und jene, die zusätzlich noch N-Acetyl-Glucosamin

beinhalten wie die des Kaninchens und Rindes (Chien et al., 1978). Das Rind besitzt des weiteren auch mehr Galaktose als der Mensch, aber weniger Mannose und Fukose (Hudson et al., 1975) (Emerson und Kornfeld, 1976) (Newman und Uhlenbruck, 1977). Betrachtet man die Lymphozytenmembran, so besitzt das Rind mehr Galaktose und weniger Sialinsäure als der Mensch (Newman und Uhlenbruck, 1977). In einer Studie von Woodside und Kocholaty von 1960 wurden die Thrombozyten des Rindes und des Menschen genauer untersucht. Beide enthielten Glucose, Galaktose, Mannose, Fukose, Ribose, Glukosamine, Galaktosamine, Glukuronsäure, Sialinsäure und eine hohe Menge an Glykogen (Woodside und Kocholaty, 1960).

3.3. Lektinbindungsstellen der bovinen Blutzellen

Was die Lektinbindungsfähigkeit betrifft, sind die Erythrozyten und die Lymphozyten die am häufigsten untersuchten Blutzellen des Rindes. In einer Studie von Emmerson und Kornfeld (1976) wurde festgestellt, dass die Erythrozyten des Rindes die Lektine PHA-E und LCA um 10% weniger binden als die Erythrozyten des Menschen. WGA wird hingegen zu 50 % mehr gebunden und RCA und das Lektin von *Agaricus bisporus* etwa in gleicher Menge wie beim Menschen (Emerson und Kornfeld, 1976). Im gleichen Jahr kamen Newman und Uhlenbruck (1977) in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass die Erythrozyten des Rindes die Lektine PHA-E, LCA und RCA nicht binden und dass sie des weiteren keine Rezeptoren für PNA, HPA, ConA und UEA besitzen (Newman und Uhlenbruck, 1977). Eine Publikation von Sumner und Howell aus dem Jahre 1936 bestätigt, dass ConA weder an Rinder- noch Menschenerthrozyten bindet (Sumner und Howell, 1936). Bei den Untersuchungen von Lektineigenschaften der Rinderlymphozyten kam es zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen. Pearson et al. (1979) stellten fest, dass 95% der Lymphozyten ConA binden und auch positiv mit PNA, SBA und WGA reagieren (Pearson et al., 1979). In der Studie von Newman und Uhlenbruck (1977) konnte jedoch keine Bindung von WGA und ConA an Lymphozyten nachgewiesen werden (Newman und Uhlenbruck, 1977). Was die DNA-Synthese betrifft, so waren die Lektine ConA, PHA-M, PNA, Pokeweed mitogen aus *Phytolacca americana* und Succinyl-ConA in der Lage, diese zu stimulieren (Pearson et al., 1979). Bereits in der Studie von Pearson et al (1979) konnte festgestellt werden, dass PNA spezifisch an die T-Lymphozyten des Rindes bindet (Pearson et al., 1979). Durch weitere Untersuchungen wurde das Lektin als spezifischer Marker für die T-Zellen des Rindes bestätigt (Johansson und Morein, 1983) (Gershwin et al., 1983/1984) (Fossum et al., 1988). Behandelt man die Lymphozyten vorher mit Neuraminidase, so kann auch das Lektin von *Helix pomatia* (HPA) als T-Zell Marker verwendet werden. Die Bindung ist jedoch geringer als von PNA (Johansson und Morein, 1983). Djilali et al. (1987) konnte nachweisen, dass WGA auch zu den spezifischen Markern der T-Lymphozyten zählt. In dieser Studie banden 30-65% der Zellen das Lektin WGA und 50-65% das Lektin PNA (Djilali et al., 1987). Zu einem sehr interessanten Ergebnis kam die Forschungsgruppe von Fossum im Jahre 1988. Hier wurden auch Lymphozyten von Rindern untersucht, die mit dem bovinen Leukämie Virus infiziert waren. Nach einer Infektion waren auch B-Lymphozyten in der Lage, die Lektine PNA und HPA zu binden, was den Schluss erlaubt, dass eine Virusinfektion die normale Lektinbindungsfähigkeit verändert (Fossum et al., 1988).

4. Immunzytochemie

4.1. CD- Antikörper

4.1.1. Definition und Anwendung

Das Ziel immunhistochemischer Methoden ist die Darstellung und ortsrichtige Sichtbarmachung von antigenen Strukturen, die sich auf oder in Zellen bzw. Geweben befinden (Luppa et al., 1986) (Pschyrembel, 2004). Dazu werden Substanzen benutzt, die im Licht- oder Elektronenmikroskop direkt oder indirekt sichtbar gemacht werden können (Luppa et al., 1986). Die Technik, bei der Antigene genau identifiziert werden können, dient in der Pathologie und in der medizinischen Diagnostik als Werkzeug, um zum Beispiel Tumore identifizieren und lokalisieren zu können (Romeis, 2010).

4.1.2. Technik

In der Immunhistochemie können grundsätzlich zwei verschiedene Methoden unterschieden werden: Die direkte und indirekte Immunmarkierung (Sinowatz und Hees, 2000) (Romeis, 2010). Die direkte Methode besteht nur aus einem Arbeitsschritt. Der Antikörper gegen das zu identifizierende Antigen wurde zuvor mit einer Markersubstanz gekoppelt, welche dann unter dem Mikroskop sichtbar wird (Sinowatz und Hees, 2000) (Romeis, 2010). Als Marker dienen häufig FITC=Fluoresceinisothiocyanat oder Enzyme wie Meerrettichperoxidase (Sinowatz und Hees, 2000). Die indirekte Methode beruht auf der Verwendung eines Anti-Antikörpers. Ein Primärantikörper, welcher nicht markiert ist, bindet an das zu lokalisierende Antigen. Danach wird ein Sekundärantikörper, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist und mit einem Marker gekoppelt ist, aufgebracht (Sinowatz und Hees, 2000) (Romeis, 2010). Dieser Sekundärantikörper wird aus einem anderen Tier wie der Primärantikörper gewonnen und bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers (Romeis, 2010). Vorteile dieser Methode sind die Erhöhung der Empfindlichkeit des immunzytochemischen Nachweises und die Vermeidung von Verlusten von wertvollen spezifischen Antikörpern bei der Kopplung an Marker (Sinowatz und Hees, 2000). Weitere Verfahren zur Darstellung von Antigenen sind z.B. die Immunezymtechniken, die Antikörpermarkierung durch Schwermetallverbindungen und Immunkolloide sowie die Avidin-Biotin-Methoden.

Bei Immunezymtechniken werden Enzyme als Marker verwendet, wobei die Enzyme entweder durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion gebunden werden wie bei der Enzym-Brücken- und PAP (Peroxidase-anti-Peroxidase)-Technik, oder die Enzyme sind bereits mit dem Antikörper gekoppelt (Luppa et al., 1986). Als Marker von Antikörpern können auch Schwermetallverbindungen und Immunkolloide verwendet werden. Hier hat sich vor allem Ferritin für Membranuntersuchungen bewährt. Des Weiteren eignet sich kolloidales Gold besonders, da es wegen seiner hohen Elektronendichte im Elektronenmikroskop intensive, genau lokalisierbare Kontraste liefert (Luppa et al., 1986). Will man eine Verstärkung der Immunmarkierung erzielen oder geringe Antigenmengen in einem Präparat nachweisen, so eignet sich die Streptavidin-Avidin-Biotin-(ABC-)Technik am besten (Romeis, 2010). Bei dieser Methode wird zunächst der Primärantikörper (direkte Methode) oder der Sekundärantikörper (indirekte Methode) mit Biotin gekoppelt. Avidin und Streptavidin, die jeweils 4 Bindungsstellen für Biotin haben, werden mit einem biotinylierten Marker gemischt und bilden so einen Komplex. Dieser besteht aus vielen markierten Biotinmolekülen, die durch mehrere (Strept-)Avidin-Biotinmoleküle zusammengehalten werden. Dieses wird dann nach der Inkubation mit den Antikörpern auf das Präparat gegeben und bindet an den biotinylierten Antikörper (Romeis, 2010)

4.1.3. Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten

Lymphozyten lassen sich allgemein in B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK (Natural Killer)-Zellen unterteilen (Day, 2000). Die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen tragen auf ihrer Zelloberfläche charakteristische Moleküle, sog. CD-Antigene, welche zur Differenzierung herangezogen werden (Jain, 1993). Die B-Lymphozyten des Menschen tragen CD9, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD37, CD38 und CD39 auf ihrer Oberfläche (Jain, 1993). Des Weiteren besitzen die B-Lymphozyten Immunglobuline. Beim Rind besitzen die B-Lymphozyten ausschließlich Immunglobulin M in ihrer Zellmembran. Die Zellmembran der Menschen, Primaten, Nager und einiger anderer Spezies besitzen auch das Immunglobulin IgD (Naessens, 1996). Auf den T-Lymphozyten des Menschen sind die Antigene CD2, CD3, CD4, CD7 und CD8 zu finden (Jain, 1993). Beim Rind konnten homologe T-Lymphozyten zu den CD2, CD3, CD4 und CD8 tragenden Lymphozyten des Menschen nachgewiesen werden (Djilali et al., 1991). CD2 beim Rind ist wie CD3 ein Pan-T-Zell Marker und kommt nur auf T-Lymphozyten vor (Teale et al., 1987) (Davis et al., 1988). CD4 kommt sowohl auf Monozyten vor, ist aber auch charakteristisch für T-Helferzellen. Die zytotoxischen T-Zellen lassen sich mittels CD8 Antigene identifizieren (Teale et al., 1987) (Jain, 1993). T-Lymphozyten exprimieren einen sog. T-Zell-Rezeptor (TCR), welcher der Zelle eine einzigartige Antigenpezifität verleiht. In den meisten T-Zellen formen α und β Ketten den TCR-Komplex, es gibt aber noch eine zweite Gruppe, bei der die T-Zellen $\gamma\delta$ TCRs besitzen (Day, 2000). Die $\gamma\delta$ Zellen des Rindes können in zwei Untergruppen unterteilt werden: in $WC1^+ CD2^- CD4^- CD8^-$ und in $WC1^- CD2^+ CD8^{+-}$ (MacHugh et al., 1997). Eine Studie von Mackay und Hein (1989) zeigte, dass die $\gamma\delta$ Zellen des Rindes kein CD6 exprimieren (Mackay und Hein, 1989).

4.1.4. Altersunterschiede und Entwicklung des Immunsystems

Durch die Beschaffenheit der Plazenta kommt der Rinderfetus während der Entwicklung im mütterlichen Uterus nur wenig mit maternalen Immunglobulinen in Kontakt (Osburn et al., 1974). Dies ist auch der Grund, weshalb Kälber nach der Geburt besonders anfällig für Infektionen sind (Kolb und Seehawer, 1998). Für den Aufbau des Immunschutzes während der frühen postnatalen Entwicklung ist die Aufnahme von Kolostrum besonders wichtig.

Lymphozyten treten beim Fetus erstmals am Tag 42 der Trächtigkeit im Thymus auf. Im Blut sind sie ab Tag 45, in den Lymphknoten ab Tag 48 und in der Milz ab Tag 65 zu finden (Schultz, 1973) (Osburn et al., 1974) (Kolb und Seehawer, 1998). Bis zum Tag 120 der Trächtigkeit sind die Lymphozyten die einzigen Leukozyten des peripheren Blutes. Ab Tag 120 sind Granulozyten zu finden (Schultz, 1973). Die Zahl der B-Lymphozyten ist beim neugeborenen Kalb gering und steigt innerhalb der ersten 6 Monate auf einen Wert ähnlich dem des adulten Rindes an (Wyatt et al., 1993) (Kampen et al., 2005). So beläuft sich am Tag nach der Geburt die Zahl der B-Lymphozyten auf $0,22 \pm 0,04 \times 10^9$ je Liter und bleibt bis zum 10. Tag nach der Geburt gleich. Danach folgt ein Anstieg bis zum 90. Tag auf $0,97 \pm 0,13 \times 10^9$ je Liter. Die Zahl der T-Lymphozyten erhöht sich von der Geburt bis zum 90. Tag also um das Doppelte (Schultz, 1973). In der Milz des Fetus sind ab Tag 59 der Trächtigkeit Plasmazellen, die IgM bilden, und ab Tag 145 Plasmazellen mit IgG zu finden. Ab Tag 130 sind schon kleine Mengen an IgM und IgG im Blutplasma nachweisbar (Schultz, 1973) (Osburn et al., 1974) (Kolb und Seehawer, 1998). IgM-Lymphozyten kommen beim neugeborenen Kalb jedoch nur in geringer Zahl vor (Wyatt et al., 1993). Durch experimentelle Infizierung von Feten mit verschiedenen Pathogenen, unter anderem auch Viren und Bakterien, konnte festgestellt werden, dass schon der Rinderfetus die Fähigkeit besitzt, eine aktive Immunität gegen die meisten Pathogene zu entwickeln (Kendrick, 1976). So kommt es nach einer Infektion der Feten mit einem Parvovirus im Alter von 93 Tagen im Verlauf von 10 Tagen zur Bildung von IgM und IgG Antikörpern (Kolb und Seehawer, 1998). Erfolgt eine Infektion mit dem Virus der Bovinen

Virus Diarrhoe (BVD) oder eine Impfung mit einem inaktivierten IBR Stamm (Infektiöse Bovine Rhinotracheitis) vor dem vierten Trächtigkeitsmonat, so kommt es zur Bildung von Antikörpern beim Fetus. Eine Infektion mit dem hoch virulenten IBR-Virus führt jedoch zum Absterben des Fetus, noch bevor Antikörper gebildet werden können (Kendrick, 1976). Unter den einzelnen Rassen gibt es auch Unterschiede in der Immunantwort. So zeigte ein Studie von Schultz et al. (1971), dass die Kälber der sog. Brown-Swiss Rasse nach experimenteller Injektion mit Erythrozyten des Huhns einen 4 mal höheren Antikörpertiter aufweisen als Kälber der Rasse Guernsey, Holstein-Fries oder Ayrshire (Schultz et al., 1971). In einer Langzeitstudie von Ayoub und Yang (1996) wurde die Entwicklung der Lymphozyten über mehrere Jahre hin dokumentiert. Dabei wurde festgestellt, dass die CD2⁺ T-Lymphozyten bis 6 Monate nach Geburt ca. 40-55% der peripheren Blutlymphozyten ausmachen. Im Alter von 7-8 Monaten sinkt dieser Wert auf 20-25%. Die CD4⁺ T-Lymphozyten machen im Alter von 6 Monaten 20-35% der Lymphozyten im Blut aus, um im Alter von 7-8 Monaten auf 15% zu sinken. Auch der Gehalt an CD8⁺ T-Lymphozyten sinkt von 10-15% auf 5-7% (Ayoub und Yang, 1996). Die Ergebnisse, bezogen auf die $\gamma\delta$ T-Zellen, decken sich mit den Ergebnissen von Wyatt et al. aus dem Jahre 1994 und Kampen et al. aus dem Jahre 2005. Diese Studien zeigen, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen 60% der zirkulierenden Lymphozyten beim Neugeborenen ausmachen. Bis zu einem Alter von 5-6 Monaten kommt es zu einer starken Abnahme dieser Zellen. Beim adulten Tier sind vergleichsweise nur noch wenig vorhanden (Wyatt et al., 1993) (Kampen et al., 2005).

4.2. Zytoskelett

4.2.1. Definition und Funktion

Eukaryotische Zellen besitzen ein hochentwickeltes Zytoskelett, das für die Form der Zellen, aber auch für viele ihrer Funktionen, von entscheidender Bedeutung ist (Alberts et al., 2011). Es ist in den intrazellulären Transport von Organellen involviert, es stützt die Plasmamembran und ermöglicht der Zelle, Spannungen und Dehnungen, die bei der Änderung der Umgebung entstehen, ohne Schaden zu überstehen. Des Weiteren ist es an der Aufteilung der Chromatiden während der Mitose und der Chromosomen während der Meiose beteiligt, es ermöglicht die Fortbewegung der Zellen und es ist verantwortlich für Muskelkontraktionen und das Wachstum von Axonen und Dendriten (Alberts et al., 2011).

4.2.2. Zusammensetzung

Das Zytoskelett ist ein dreidimensionales Gerüst aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Mikrofilamenten (Aktinfilamenten) (Alberts et al., 2011) (Pschyrembel, 2004). Jede dieser Zellstrukturen hat charakteristische mechanische Eigenschaften. So bieten Intermediärfilamente mechanische Festigkeit und Widerstand gegen Scherkräfte, Mikrotubuli leiten den intrazellulären Transport und bestimmen die Lage membranumschlossener Organellen, und Aktinfilamente sind für die Form der Zelloberfläche verantwortlich und werden für die Fortbewegung der ganzen Zelle benötigt (Alberts et al., 2011). Des Weiteren gibt es eine große Anzahl an Hilfsproteinen, zu denen auch die Motorproteine zählen, ohne die die Zytoskelettproteine nicht wirken könnten. Zu den Motorproteinen zählt auch Myosin. Diese Hilfsproteine verbinden die Komponenten des Zytoskeletts mit anderen Zellbausteinen und auch untereinander und kontrollieren die räumliche Verteilung und das dynamische Verhalten des Zytoskeletts (Alberts et al., 2011).

Mikrotubuli sind feine Röhren (14 und 25 nm im inneren und äußeren Durchmesser), die aus kleinen, kugelig geformten Untereinheiten, den Tubulin-Molekülen, bestehen (Alberts et al., 2011) (Khismatullin, 2009). Tubulin selbst ist ein Heterodimer, welches sich aus zwei kugelförmigen Proteinen, α -Tubulin und β -Tubulin, zusammensetzt (Alberts et al., 2011). Die Mikrotubuli bilden auch die Zentriolen, welche sich nahe des Kerns befinden. Von dort ziehen sie radiär zur Plasmamembran (Khismatullin, 2009). Zusammen mit den Motorproteinen Kinesin und Dynein sind sie verantwortlich für die Positionierung der Zellorganellen und den Transport innerhalb der Zelle. Mikrotubuli sind dynamisch instabil. Während sie zur Plasmamembran hin wachsen, können sie sehr schnell zentrosomwärts bereits wieder abgebaut werden. Daher können sie die Zelle kaum gegen mechanische Einflüsse schützen. Diese schnellen Veränderungen in der Länge sind besonders für die Bewegung der Zellorganellen beim aktiven Einwandern von Zellen wie Leukozyten wichtig (Khismatullin, 2009).

Aktinfilamente (F-Aktin) bestehen, ähnlich wie die Mikrotubuli, aus kleinen, gewundenen und kugeligen Monomeren, dem sog. globulären Aktin (G-Aktin), welches einen Durchmesser von 7 nm besitzt (Alberts et al., 2011) (Khismatullin, 2009). G-Aktin ist vor allem im Zellkortex zu finden, wo es zusammen mit sog. Crosslinkers ein kortikales Zytoskelett bildet (Khismatullin, 2009). Dieses Skelett ist sowohl für die Stabilität der Zelle als auch für die mechanischen Eigenschaften von Leukozyten von Bedeutung (Khismatullin, 2009).

Intermediärfilamente sind aus kleineren, langgestreckten und faserförmigen Untereinheiten aufgebaut (Alberts et al., 2011). Das Netzwerk der Intermediärfilamente ist weitaus stabiler als das von Tubulin und Aktin. Es besteht aus tetramerischen Untereinheiten, was es sehr stabil gegenüber mechanischem Stress macht (Khismatullin, 2009). Es existieren viel mehr Intermediärfilament-Proteine als bei den anderen beiden Proteinfamilien, was die Anpassungsfähigkeit für einige Zellen erhöht. Diese Anpassungsfähigkeit ist besonders bei Leukozyten von Bedeutung (Khismatullin, 2009). Das wichtigste Protein ist hier Vimentin, was ein dynamisches Netzwerk bildet, welches sich schnell auflösen kann. Kurze Vimentin-Fibrillen können sich schnell im Zytoplasma bewegen. Lange sind weniger aktiv, da sie der Zelle Stabilität gegen mechanische Einwirkungen bieten (Khismatullin, 2009).

4.2.3. Technik

Neben den bereits unter Punkt 4.1.2 erwähnten direkten und indirekten Methoden in der Immunzytochemie können zur Darstellung des Zytoskeletts Proteine zur Lokalisation von Zellkomponenten verwendet werden. Die verwendeten Moleküle müssen eine hohe Affinität und Spezifität für die nachzuweisenden Moleküle aufweisen. Phalloidin zum Beispiel bindet spezifisch an Aktin. Koppelt man Phalloidin an ein Fluorochrom, kann es direkt zur Lokalisation von F-Aktin in Gewebeschnitten oder ganzen Organismen verwendet werden (Romeis, 2010).

4.2.4. Zytoskelett der Erythrozyten

Die roten Blutzellen besitzen ein kortikales Zytoskelett (Gov, 2007). Dieses besteht aus einem zweidimensionalen Netzwerk aus Spectrin-Proteinen (Gov et al., 2003) (Gov, 2007). Diese filamentösen Proteine sind an die Lipiddoppelschicht der Zellmembran gebunden und bedecken die gesamte Innenseite der Zellmembran (Gov, 2007) (Zhang und Brown, 2008). Dieses submembranäre Skelett verleiht den Erythrozyten hohe Elastizität und Flexibilität. Es ermöglicht den Erythrozyten, wiederholte Deformationen während der Zirkulation im Gefäßsystem zu überstehen (Jöns, 2001) (Gov, 2007). Beim Spectrin der roten Blutzellen handelt es sich um elongierte, flexible Moleküle, die in 2 Untereinheiten vorkommen: 280 kDa und 246 kDa (Jöns, 2001). Jeweils 6 dieser Spectrinfilamente sind an ein sog. Aktinknötchen gebunden, wobei die Filamente viel länger sind als die Entfernung zwischen den Knötchen, die sie

überbrücken (Gov, 2007). Das Zytoskelett der Erythrozyten wird auch oft mit einem Netzwerk entropischer Federn verglichen (Gov et al., 2003).

Eine Studie von Wong et al. (1984) beschäftigte sich mit Myosin in den menschlichen Erythrozyten. Die Autoren stellten fest, dass sich das Myosin, welches aus Erythrozyten isoliert wurde, von dem aus Thrombozyten unterscheidet (Wong et al., 1984). Das Myosin der Erythrozyten besteht aus einer schweren 200 kDa Polypeptidkette und zwei leichten Polypeptidketten mit 26 kDa und 19,5 kDa. Es formt kleine bipolare Filamente und besitzt eine Aktin-aktivierte Mg^{2+} -ATPase-Aktivität. Diese ist jedoch um einiges niedriger als die ATPase-Aktivität in den Thrombozyten (Wong et al., 1984).

Colin und Schrier beschäftigten sich 1991 mit dem Nachweis von Myosin aus Erythrozyten von adulten und neugeborenen Menschen. Sie bestätigten die Ergebnisse von Wong et al. (1984), dass die Konzentration von Myosin in den Thrombozyten 100 mal geringer ist als in den Erythrozyten. Des Weiteren zeigten sie, dass die Erythrozytenmembran neugeborener Kinder zu 44% positiv beim immunzytochemischen Nachweis von Myosin ist, wohingegen die Erythrozyten der Adulten kaum eine Reaktion aufwiesen (Colin und Schrier, 1991).

4.2.5. Zytoskelett der Thrombozyten

Mikrotubuli spielen im Zytoskelett der Thrombozyten eine wichtige Rolle. Sie stabilisieren die discoide Form der ruhenden Plättchen (Steiner, 1983). Sie liegen eng aufgespult unterhalb der Zellmembran (Castle und Crawford, 1974) (Schwer et al., 2001). Im Elektronenmikroskop sind die Verbindungen zwischen den Mikrotubuli und der Membran zu erkennen (Steiner, 1983). In aktivierten Thrombozyten dringen die Mikrotubuli in die Pseudopodien vor (Castle und Crawford, 1974). Bei der Aggregation der Thrombozyten zerfallen die Mikrotubuli und bilden sich innerhalb von Sekunden in Zentrumsnähe neu (Steiner, 1983). Blutplättchen beinhalten auch Mikrofilamente, welche einen deutlich kleineren Durchmesser (6 nm) als die Mikrotubuli aufweisen und einem sog. Aktomyosin ähnlichen kontraktilen Komplex angehören (Castle und Crawford, 1974).

Tubulin stellt eines der wichtigsten Proteine in den Thrombozyten dar. In den Plättchen vom Schwein und vom Menschen konnte Tubulin nachgewiesen werden (Castle und Crawford, 1974) (Steiner, 1983). β -1-Tubulin, eine Form von β -Tubulin, ist die dominierende Form in Thrombozyten, Prothrombozyten und auch Megakaryozyten (Schwer et al., 2001) (Gresele und Falcinelli, 2005). In den Thrombozyten ist das β -1-Tubulin hauptsächlich im Randbereich zu finden, wo es ca. 90% des gesamten β -Tubulins der Zelle ausmacht (Schwer et al., 2001) (Gresele und Falcinelli, 2005). Die Funktion des β -1-Tubulins war lange Zeit unbekannt. In einer Studie mit Mäusen, denen Tubulin fehlte, wurde festgestellt, dass diese Tiere zu 60% weniger Blutplättchen produzieren, und die vorhandenen Plättchen erhebliche funktionelle und strukturelle Defekte aufwiesen. Die Thrombozyten dieser Mäuse hatten weitaus weniger Mikrotubuli, sie wiesen keine discoide Form auf und die Tiere litten an verlängerten Blutungszeiten bei Verletzungen. All das führte zu der Annahme, dass β -1-Tubulin essentiell für die Biogenese, Struktur und Funktion der Thrombozyten ist (Schwer et al., 2001).

Kontraktile Proteine spielen eine große Rolle in der Funktion der Thrombozyten (Muhlrad et al., 1978). Sowohl bei der Aggregation und der Abgabe von Serotonin sind sie von Bedeutung (Cohen et al., 1976) (Muhlrad et al., 1978). Ihre Kontraktilität wird einem Aktomyosin-ähnlichen Protein zugeschrieben (Zucker-Franklin und Grusky, 1972). Aktin, Myosin und ein Aktin-bindendes Protein können beim Menschen und beim Rind in hoher Konzentration sowohl in der Plasmamembran der Thrombozyten als auch im Zytosol nachgewiesen werden (Zucker-Franklin und Grusky, 1972) (Muhlrad et al., 1978).

Thrombozyten wurden auch auf das Vorhandensein von Vimentin hin untersucht. Vimentin ist eine von fünf Untergruppen der Intermediärfilamente, welche vor allem eine mechanische Rolle

in Zellen spielen. Im Elektronenmikroskop konnten kurze Segmente (10 nm) dieser Intermediärfilamente erkannt werden, welche in ruhenden Thrombozyten des Rindes mit den Mikrotubuli in Kontakt treten. In den Blutplättchen des Menschen ist die Zahl der Intermediärfilamente geringer (Tablin, 1985). Vimentin kommt vor allem in Zellen mesenchymalen und zum Teil aber auch in Zellen nicht-mesenchymalen Ursprungs vor (Tablin und Taube, 1987). Bei der Untersuchung an bovinen und humanen Thrombozyten fand Tablin (1985) heraus, dass sich sowohl ruhende als auch aktivierte Thrombozyten mit Hilfe eines polyklonalen Anti-Vimentin Antikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellen lassen (Tablin, 1985) (Tablin und Taube, 1987). Ruhende Thrombozyten färbten sich am äußeren Rand und zeigten auch eine diffuse Färbung im Zytoplasma. Aktivierte Thrombozyten zeigten ein diskontinuierliches Färbemuster mit einem hellen Ring unter der Plasmamembran und zusätzlich punktförmige bis fibrilläre fluoeszierende Bereiche im Zellkörper (Tablin, 1985) (Tablin und Taube, 1987).

4.2.6. Zytoskelett der Leukozyten

Viele Studien befassen sich mit der Rolle und der Zusammensetzung des Zytoskeletts der weißen Blutzellen. Großes Augenmerk wurde auf die Aufteilung von F-Aktin, die Rolle des Zytoskeletts bei Phagozytose und Degranulation und auf die Verwandtschaft des Zytoskeletts zu anderen Geweben gelegt (Tatsumi et al., 1973) (Ryder et al., 1982) (Haston, 1987) (Egger et al., 2001) (Khismatullin, 2009).

Für die Regulation des Volumens der Leukozyten sind Mikrotubuli und Mikrofilamente verantwortlich (Downey et al., 1995). Eine Studie von Haston (1987) beschäftigte sich mit der Möglichkeit der Darstellung von F-Aktin, welches für die Kontraktionswellen der Neutrophilen verantwortlich ist. Dabei wurden die neutrophilen Granulozyten in einem kollagenen Gel mit Glutaraldehyd so fixiert, dass eine spätere Färbung mit TRITC-Phalloidin zu einer deutlichen Darstellung des F-Aktins bei der Kontraktion der Zelle führte (Haston, 1987). Egger et al. (2001) entwickelten eine Methode zur Darstellung von F-Aktin, die für klinische Untersuchungen am Blut von Bedeutung ist. Ihnen gelang es, das F-Aktin des Zytoskeletts, von polymorphnukleären Leukozyten, durch Schockfrostten und durch Behandlung der Proben mit Glycerol und Formaldehyd darzustellen. Bei Patienten mit Multiorganversagen konnten zwei Untergruppen von Leukozyten unterschieden werden: Eine mit mehr F-Aktin Gehalt und eine mit weniger als in unstimulierten Proben (Egger et al., 2001). Dies ist ein wichtiger Indikator, denn der Grad der Polymerization des Aktin-Zytoskeletts gibt Aussage über die Viskosität und die Stabilität der Zelle. Eine erhöhte Rigidität der Zelle ist ein wichtiger Faktor bei Bluthochdruck mit Arteriosklerose, bei Diabetes oder auch beim Multiorganversagen (Egger et al., 2001). Tatsumi et al. (1973) verglichen den Aktomyosinkomplex der Leukozyten mit dem von glatter- und Skelettmuskulatur. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass es keine Unterschiede im F-Aktin gab, jedoch das Myosin der Leukozyten mehr dem Myosin des glatten Muskels gleicht. Der gesamte Aktomyosinkomplex entspricht somit dem der glatten Muskulatur (Tatsumi et al., 1973). Bei Untersuchungen zu Chemotaxis und zur Phagozytose von Leukozyten wurde deutlich, dass die Mikrotubuli für die Chemotaxis wichtig sind. Bei der Phagozytose wird das Zytoskelett in den Pseudopodien, die ein Bakterium umgeben, verstärkt. Lysosomale Granula und Vesikel richten sich entlang der Mikrotubuli aus, was darauf schließen lässt, dass die Mikrotubuli des Zytoskeletts eine Leitschiene bei der Phagozytose darstellen (Ryder et al., 1982).

Beim Vergleich von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten konnte die Forschungsgruppe um Elsner et al. (1996) zeigen, dass Eosinophile im Gegensatz zu den Neutrophilen einen intrazellulären Calciumfluß für die Aktin-Polymerisation benötigen (Elsner et al., 1996). In den basophilen Granulozyten wird die Aktinsynthese durch Interleukin-3 stimuliert. Die Expression

von Tubulin hingegen wird durch Interleukin-3 nicht beeinflusst (Nielsen et al., 2004). Lymphozyten sind während der Wanderung von der Blutzirkulation in das Gewebe großem mechanischen Stress ausgesetzt. Für sie ist daher ein stabiles Zytoskelett besonders wichtig. Bei zirkulierenden T-Lymphozyten bilden Intermediärfilamente ein stabiles Grundgerüst. Der Hauptbestandteil ist hier Vimentin. Kommt es zur Einwanderung der Lymphozyten in das Gewebe, kann dieses Vimentingerüst kontrolliert kollabieren und damit der Zelle eine bessere Verformbarkeit ermöglichen (Brown et al., 2001). Aktin macht bei gesunden Menschen 12,8% des Gesamtproteingehalts der Lymphozyten aus, Tubulin 6,1%. Diese Werte sinken bei Patienten mit Leukämie erheblich, was möglicherweise bei Diagnosestellung Bedeutung haben kann (Atkins und Anderson, 1982).

5. Enzymhistochemie

5.1. Definition und Anwendung der Enzymhistochemie

Enzyme sind Proteine bzw. Glykoproteine, die in allen tierischen und pflanzlichen Geweben vorkommen und als Biokatalysatoren die im Organismus ablaufenden Reaktionen ermöglichen und beschleunigen (Lojda et al., 1976) (Sinowatz und Hees, 2000) (Löffler, 2008) (Romeis, 2010). Die enzymhistochemischen Methoden dienen dem Nachweis von Enzymen durch den bei der Substratumsetzung anfallenden Reaktionsprodukten in verschiedenen Zellen und Geweben (Lojda et al., 1976) (Sinowatz und Hees, 2000).

5.2. Technik

5.2.1. Allgemein

Enzyme können durch verschiedene Methoden histochemisch nachgewiesen werden. Zum einen gibt es die katalytische Enzymhistochemie bei der die enzymatische Aktivität mit Hilfe eines wasserlöslichen Substrates nachgewiesen wird aus welchem durch Enzymreaktion wasserunlösliche Produkte entstehen, die dann visualisiert werden. Zum anderen können die antigen wirksamen Strukturen von Enzymen durch immunhistochemische Methoden nachgewiesen werden. Des Weiteren kann auch die mRNA von Enzymen durch *in situ*-Hybridisierung lokalisiert werden (Romeis, 2010). Zur katalytischen Enzymhistochemie gehören die bereits erwähnten Fällungsreaktionen, die Azokupplungsreaktion, die Synthesereaktion und das Substratfilmverfahren (Sinowatz und Hees, 2000) (Romeis, 2010). All diese Verfahren beruhen auf den Substratumsatz eines bestimmten Enzyms (Sinowatz und Hees, 2000). Die Fällungsreaktionen lassen sich in vier verschiedene Methoden unterteilen: Die Präzipitationsreaktion mit Metallkationen, oder sog. Gomori-Typ stellt eine Methode dar, die hauptsächlich zum Nachweis von Phosphatasen, Sulfatasen und Cholinesterasen verwendet wird. Hierbei erfolgt zuerst die Spaltung des Substrates, gefolgt von der Fällungsreaktion, bei der die durch die Enzymtätigkeit entstandenen Spaltprodukte durch Ca^{2+} -, Pb^{2+} -, Cu^{2+} - oder Ba^{2+} -Ionen gefällt werden und in einem dritten Schritt sichtbar gemacht werden. Bei der sog. „Simultanen Azokupplung“ oder auch „Simultankupplung“ genannt werden zwei Schritte durchgeführt. Zuerst erfolgt die Spaltung von Naphtholderivaten, die als Substrate dienen, als zweites erfolgt eine Kupplungs- und Fällungsreaktion, wobei am Ende ein fettlöslicher Azofarbstoff entsteht. Nach diesem Prinzip können Phosphatasen, Glykosidasen, Esterasen und Peptidasen nachgewiesen werden. Weitere Fällungsmethoden stellen die Indigogen-Methode, mit der unspezifische Esterasen, Cholinesterasen, Glykosidasen, Phosphatasen und Peptidasen nachgewiesen werden können, und die Tetrazolium-Methode zum Nachweis von Dehydrogenasen und Monoaminoxidasen, dar (Lojda et al., 1976). Beim Nachweis von Enzymen ist darauf zu achten, dass der Aktivitätsverlust der Enzyme zum einen möglichst gering gehalten werden sollte, zum anderen sollte sich aber die zelluläre Lokalisation nicht verändern (Sinowatz und Hees, 2000). Dies stellt hohe Ansprüche an die Fixation der Zellen, da viele Enzyme gegenüber bestimmten Fixationsmitteln, wie zum Beispiel Formol, empfindlich sind (Romeis, 2010). Ein besonderes Augenmerk beim Nachweis von Enzymen sollte auf den pH-Wert und die Temperatur gelegt werden. Jedes Enzym besitzt ein pH-Optimum, bei welchem seine Aktivität am stärksten ist. Das Inkubationsmedium sollte mit Hilfe von Pufferlösungen auf dieses Optimum eingestellt werden. Für jedes Enzym existiert auch ein Temperaturoptimum, welches meist der Körpertemperatur des Organismus entspricht. Eine Temperaturabsenkung führt zu einer Verlangsamung der Reaktion, eine Temperaturerhöhung zu einer Reaktionsbeschleunigung. Eine zu starke Erhöhung kann zur Denaturierung von Proteinen und somit den Enzymen führen (Deane et al., 1960). Wichtig bei der Arbeit und dem Nachweis

der Enzyme in Blutaussstrichen ist die Verwendung von frischen, unfixierten Präparaten, die nicht älter als drei Tage sind. Für die Ausstriche sollte Blut ohne Antikoagulantien verwendet werden, da durch diese einige Enzymreaktionen abgeschwächt werden. Außerdem sollten die Ausstriche vor Verwendung mindestens 30 Minuten an der Luft trocknen (Mahlberg et al., 2005).

5.2.2. Peroxidasen

Peroxidasen sind Hämoproteine, die mit Hilfe von Wasserstoffperoxid die Oxidation eines Stoffes beschleunigen (Lojda et al., 1976) (Romeis, 2010).

Folgende Reaktion wird katalysiert: $\text{Donor} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{oxidiertes Donor} + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Lojda et al., 1976)

Sie kommen bei Tieren vor allem in der Milchdrüse als Laktoperoxidase, in den Speicheldrüsen als Speichelperoxidase, in der Schilddrüse und auch in den Leukozyten als Myeloperoxidase vor (Lojda et al., 1976) (Romeis, 2010). Pseudoperoxidasen werden Hämoproteine genannt, die Peroxidaseaktivität besitzen. Es handelt sich hierbei aber um keine echten Enzyme (Lojda et al., 1976) (Romeis, 2010). Die Myeloperoxidase ist ein lysosomales Enzym, welches vorwiegend bei sich entwickelnden Blutzellen im endoplasmatischen Retikulum, der Kernhülle, und im Golgi-Apparat zu finden ist (Borgers und Verheyen, 1985). Während ihrer Entwicklung enthalten die Granula der Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen und Monozyten eine hohe Peroxidaseaktivität, die später wieder schwächer wird oder ganz verschwindet. Die Peroxidase der Thrombozyten ist im Dense tubular system (DTS) zu finden, welches vom endoplasmatischen Retikulum der Megakaryozyten abgeleitet ist (Borgers und Verheyen, 1985). Auch wird der Myeloperoxidase der neutrophilen Granulozyten, welches sich in den primären Granula befindet, eine antibakterielle Wirkung und eine Beteiligung im Abwehrsystem zugeschrieben (Cooray et al., 1993) (Cooray und Björck, 1995). Die am häufigsten verwendete Nachweismethode ist die Methode nach Graham und Karnovsky aus dem Jahre 1966, bei welcher Diaminobenzidin oxidiert wird (Romeis, 2010). Bei der Benzidin-Reaktion kommt es zu einer Oxidation von Benzidin durch das Peroxid-Peroxidase-System, wobei instabiles Benzidinblau entsteht, welches spontan in stabiles Benzidinbraun übergeht (Lojda et al., 1976). Eine Alternative zu dieser Methode stellt die Methode nach Graham et al. aus dem Jahre 1965 dar, bei welcher 3-amino-9-Äthylcarbazol verwendet wird. Als Reaktionsprodukt entstehen feine, rote Granula (Lojda et al., 1976) (Raskin und Valenciano, 2000). Weitere Verfahren zur Darstellung der Peroxidasen sind die Benzidinreaktion von Goldfischer und Essner von 1969 sowie von Lojda von 1970 und die Methode mit 5,6-Dihydroxyindol von van der Ploeg und van Duijn aus dem Jahre 1964 (Lojda et al., 1976).

5.2.3. Phosphatasen

Die alkalische und saure Phosphatase gehören zu den Hydrolasen von Phosphomonoestern (Lojda et al., 1976).

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Spaltung von Estern der Orthophosphorsäure mit verschiedenen Alkoholen und Phenolen (Lojda et al., 1976).

Reaktionsschema: $\text{Monoester der Orthophosphorsäure} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Alkohol} + \text{Orthophosphat}$ (Lojda et al., 1976)

Das pH-Optimum der Reaktion liegt hierbei im stark alkalischen (pH 9,2-9,8) (Romeis, 2010). Durch Ionen von Magnesium, Mangan, Zink und Cobalt wird das Enzym aktiviert, durch Phosphat- und Arsenationen, verschiedene Alkohole und L-Cystein wird es gehemmt (Lojda et al., 1976) Das Enzym kommt in Zellmembranen vor, ist an der Knochenbildung beteiligt und ist vor allem dort zu finden, wo aktive Transportvorgänge ablaufen, wie in den Gallenkanälchen, im Bürstensaum von Enterozyten, in proximalen Tubuluszellen der Niere, im Kapillar- und

Arteriolenendothel sowie im endoplasmatischen Retikulum, Golgiapparat und in Lysosomen von Enterozyten. Im Blut ist die alkalische Phosphatase vor allem in der Granula der neutrophilen Granulozyten zu finden (Lojda et al., 1976) (Romeis, 2010). Enzyme mit einer Leukozyten spezifischen alkalischen Phosphatase hydrolysieren in der sog. Azokupplungsreaktion Naphthol AS-BI-phosphat und es entsteht Naphthol, welches mit Diazonium Salz einen unlöslichen Komplex bildet, der sich am Ort der Enzymaktivität niederschlägt. Diese Enzyme sind, wie schon erwähnt, in den Granulozyten, Osteoblasten, Histozyten und einem Teil der Lymphozyten zu finden (Raskin und Valenciano, 2000). Neben der Azokupplungsreaktion gibt es noch die Gomori- und die Indigogenmethode als Nachweisreaktion für die alkalische Phosphatase (Lojda et al., 1976). Vergleicht man die Reaktion nach Gomori, bei der Kobaltphosphat mit Ammoniumsulfid zu schwarzem Kobaltsulfid umgewandelt wird, mit der Azokupplungsreaktion, so stellt die Azokupplungsreaktion die empfindlichere Methode dar (Lojda et al., 1976).

Die saure Phosphatase katalysiert im sauren Milieu die Spaltung von Estern der Orthophosphorsäure mit verschiedenen Alkoholen und Phenolen (Lojda et al., 1976) (Romeis, 2010).

Reaktionsschema: Monoester der Orthophosphorsäure + H₂O → Alkohol (Phenol) + Orthophosphat (Lojda et al., 1976).

Sie ist primär in den Lysosomen lokalisiert und dient als Marker für diese (Borgers und Verheyen, 1985) (Romeis, 2010). Die saure Phosphatase kommt vor allem in den Makrophagen der Milz, im proximalen Tubulus der Niere, im Saumepithel des Dünndarms, in den Neuronen des ZNS, in der Adenohypophyse und auch in der Muskulatur vor (Romeis, 2010). Im Blut gibt es für verschiedene Zellen spezifische Isoenzyme der sauren Phosphatasen. In Lymphozyten, Monozyten, Histozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Megakaryozyten und im Golgi-Apparat der T-Lymphozyten ist das Enzym nachweisbar (Romeis, 2010). Die Nachweismethode der Wahl stellt die simultane Azokupplung mit Naphthol-AS-BI- oder Naphthol-AS-TR-phosphat dar. Weitere Nachweismethoden sind das Gomoriverfahren und das Indigogenverfahren (Lojda et al., 1976).

5.2.4. Esterasen

Die Esterasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Zum einen gibt es die spezifischen Esterasen, wie die Cholinesterase, welche Cholinester hydrolysiert, und zum anderen gibt es die unspezifischen Esterasen, zu denen die α -Naphthyl-Acetat-Esterase und die α -Naphthyl-Butyrat-Esterase gehören (Raskin und Valenciano, 2000) (Romeis, 2010). Die Cholinesterasen können in spezifische Acetylcholinesterasen und in unspezifische Cholinesterasen unterteilt werden. Die Acetylcholinesterase ist vor allem an den motorischen Endplatten, im Nervengewebe und in den Erythrozyten zu finden. Die Methode der Wahl zum Nachweis dieses Enzyms stellt das Verfahren nach Karnovsky und Roots aus dem Jahre 1964 dar, die sog. Thiocholintechnik (Romeis, 2010). Die nicht spezifischen Esterasen sind eine Gruppe von Enzymen, die Ester hydrolysieren und somit Naphthol freisetzen, welches am Ort der Enzymaktivität gebunden wird. Sie weisen eine große Spanne an Substratspezifität auf und zusätzlich eine Aktivität in unterschiedlichen pH Bereichen. Die Esterasen, welche mittels Polyacrylamidgelelektrophorese ermittelt werden, zeigen unterschiedliche Reaktionsmuster in den verschiedenen Zellen. In Monozyten kann man ein rot bis pink-farbenes Muster erkennen. In Histozyten stellt sich die Färbung intensiver dar, wohingegen in T-Lymphozyten nur einzelne punktförmige Reaktionsprodukte zu erkennen sind (Raskin und Valenciano, 2000). Die Esterasen einiger Zellen können durch Natriumfluorid gehemmt werden. So lässt sich das Enzym in den Monozyten hemmen, wohingegen die T-Lymphozyten resistent gegen Natriumfluorid sind. Eine Hemmung ist auch in den Megakaryozyten, den Thrombozyten und

den Plasmazellen zu erkennen. Für den Nachweis sollte frisches Gewebe oder Blut verwendet werden, da die Esterasen sehr empfindlich gegenüber Hitze, Fixierung und Lagerung sind (Raskin und Valenciano, 2000). Die α -Naphthyl-Acetat-Esterase der Monozyten und Lymphozyten lässt sich am besten im sauren Bereich nachweisen, die der Granulozyten eher im neutralen Medium. Vergleicht man die α -Naphthyl-Butyrat-Esterase mit der α -Naphthyl-Acetat-Esterase, so ist die Acetat-Esterase die sensitivere, aber weniger spezifische bei der Identifikation von Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten (Raskin und Valenciano, 2000).

5.2.5. β -Glucuronidase

Die β -Glucuronidase gehört zu der Gruppe der Glykosidasen (Hurley, 1987) und kommt in Bakterien, Pflanzen, Insekten, Weichtieren und in vielen Organen der Säugetiere vor (Deane et al., 1960). Mit ihrer Lokalisation in Lysosomen und im endoplasmatischen Retikulum ist eine besonders hohe Aktivität in der Leber, Niere, Milz, Nebenhoden und Nebennierenrinde nachweisbar (Lojda et al., 1976). Das Enzym zeigt eine ähnliche Reaktivität wie die Esterasen und hydrolysiert ein Substrat, wobei Naphthol frei wird, welches sich an eine Färbelösung bindet. Monozyten und Neutrophile zeigen eine schwache, verwaschene Reaktion im Zytoplasma, wohingegen T-Lymphozyten eine granuläre Reaktion aufweisen (Raskin und Valenciano, 2000). Das pH Optimum liegt zwischen 4 und 5,5 und ist spezies- und organabhängig. Durch D-Saccharonolacton, Citrat, D-Glucuronolacton und Ascorbinsäure lässt sich das Enzym hemmen. Die Nachweismethode der Wahl ist die simultane Azokupplung mit Naphthol-AS-BI- β -D-glucuronid (Lojda et al., 1976).

5.3. Enzyme der bovinen Blutzellen

Die am besten untersuchten Enzyme im Blut des Rindes sind die Myeloperoxidase, die alkalische Phosphatase, die α -Naphthyl-Esterase und die β -Glucuronidase.

Die Aktivität der Myeloperoxidasen wurde bereits im Jahre 1987 durch Harmon und Adams mit Hilfe von Messungen der H_2O_2 -Produktion und der luminolabhängigen Chemielumineszenz-Aktivität untersucht (Cooray et al., 1993).

In Studien von Cooray et al. aus dem Jahre 1993 und 1995 wurde herausgefunden, dass die neutrophilen Granulozyten des Rindes drei verschiedene Formen der MPO (Myeloperoxidase) enthalten (Cooray et al., 1993) (Cooray und Björck, 1995). Durch Proteinextraktion bei einem pH von 4 und Gelfiltration, die mit einer Chromatographie kombiniert wurde, wurden MPO I, MPO II und MPO III extrahiert. Die drei Formen des Rindes weisen eine hohe Ähnlichkeit mit den drei MPO Formen des Menschen auf. Die Analyse der Aminosäuresequenzen zeigt eine Ähnlichkeit der drei Formen, jedoch unterscheidet sich MPO III stärker von den anderen beiden Formen. Auch in ihrer Enzymaktivität lassen sich Unterschiede darstellen. MPO III zeigt die höchste Enzymaktivität. Im Allgemeinen sind die MPOs des Rindes hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung und des Molekulargewichts den kaninen und humanen MPOs sehr ähnlich (Cooray et al., 1993). Im Jahre 1995 untersuchten Cooray und Björck die Rolle der MPO in der Bekämpfung gegen bakterielle Infektionen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die bovine MPO, zusammen mit einem Peroxid entwickelnden System und Chlorid, ein sehr wirkungsvolles Bekämpfungssystem gegen die Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Streptokokkus uberis*, *Streptokokkus agalactiae*, *Streptokokkus dysgalactiae* und *Escherichia coli* darstellen, die bei den meisten Mastitiden beteiligt sind (Cooray und Björck, 1995). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass Milch den bakteriziden Effekt dieses MPO/Peroxid/Chlorid-Systems vollständig hemmt (Cooray und Björck, 1995). Folgende Zellen des Rinderblutes sind MPO-positiv: Neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Thrombozyten (Raskin und Valenciano, 2000).

Die alkalische Phosphatase (AP) in bovinen neutrophilen Granulozyten wurde 1985 von Yasuura et al. untersucht. Zu diesem Zeitpunkt war bereits bekannt, dass sich die alkalische Phosphatase der Säugetiere in zwei Typen unterteilen lässt: Zum einen der „Plazenta- und Darm“- Typ, bei welchem sich die AP durch L-Phenylalanin, aber nicht durch L-Homoarginin und Imidazol hemmen lässt, und zum anderen der „Leber- und Knochen“-Typ, bei welchem sich die AP durch L-Homoarginin und Imidazol, aber nicht durch L-Phenylalanin hemmen lässt (Yasuura et al., 1985). In der Studie ließ sich die AP der Rinderneutrophilen durch L-Histidin, Imidazol und L-Homoarginin hemmen, jedoch nicht durch L-Phenylalanin, was zunächst zu dem Schluss führte, dass die AP zu dem „Leber- und Knochentyp“ gehört (Yasuura et al., 1985). Weitere Versuche zeigten, dass sich das Enzym beim Erhitzen ähnlich einem Leberenzym verhält. Bei Behandlung mit Harnstoff, was zur Charakterisierung der alkalischen Phosphatasen in verschiedenen Geweben genutzt wird, war dieses Enzym stabiler als die Leber- und Knochenenzyme aber empfindlicher als die Plazentaenzyme. Die neutrophilen Granulozyten, eosinophile Granulozyten und teilweise auch die basophilen Granulozyten zeigen eine positive Reaktion beim Nachweis der alkalischen Phosphatase im Rinderblut (Raskin und Valenciano, 2000).

In einer Studie von Hegner aus dem Jahre 1968 wurde in den Leukozyten des Rindes saure Phosphatase, alkalische Phosphatase und β -Glucuronidase nachgewiesen (Hegner, 1968).

Die α -Naphthyl-Acetat-Esterase ist vor allem in den Lymphozyten und den Monozyten des Rindes zu finden (Yang et al., 1979) (Goddeeris et al., 1986). Bei den neutrophilen Granulozyten bestehen unterschiedliche Meinungen über das Vorkommen dieses Enzyms. Raskin und Valenciano (2000) beschreiben keine positive Reaktion beim Nachweis von unspezifischen Esterasen, wohingegen Reddi et al. (1980) eine deutlich positive Reaktion in Form von multiplen rot-braun farbigen Granula im Zytoplasma beschreibt (Reddi et al., 1980) (Raskin und Valenciano, 2000). Die Monozyten zeigen ein rot-braunes Reaktionsprodukt im Zytoplasma. T-Zellen beinhalten ein stark abgegrenztes rot-braunes Reaktionsprodukt, welches sich in der Peripherie des Zytoplasmas in der Nähe der Zellmembran befindet. Auch B-Lymphozyten zeigen eine positive Reaktion. Stimuliert man die Lymphozyten mit Phythaemagglutinin (PHA), so erhöht sich die Aktivität des Enzyms stark (Yang et al., 1979) (Goddeeris et al., 1986).

W. L. Hurley untersuchte 1987 die Glykosidasen, zu denen auch die β -Glucuronidase gehört, im Blut des Rindes. β -Glucuronidase ist sowohl in den sekundären Granula von polymorphonukleären Leukozyten als auch in der Milch des Rindes zu finden (Hurley, 1987). Monozyten und neutrophile Granulozyten weisen eine schwache Aktivität im Zytoplasma auf. T-Lymphozyten zeigen eine deutlich granuläre Reaktion (Raskin und Valenciano, 2000). Die β -Glucuronidase ließ sich in der Studie von Hurley durch D-Zuckersäure-1,4-Aceton hemmen und hatte ein sehr breites pH-Optimum von 4,5 bis 5,5 (Hurley, 1987). Die polymorphonukleären Leukozyten (Neutrophile und Eosinophile) und die mononukleären Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) wiesen eine ähnliche β -Glucuronidase-Aktivität auf (Hurley, 1987).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Für die lichtmikroskopischen, histochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen wurden Blutproben von insgesamt 31 Kälbern der Rasse Fleckvieh entnommen. Voraussetzung für die Entnahme war, dass jedes Kalb klinisch gesund, bis 24 Stunden alt und auf normalem Weg zur Welt gekommen war. Das jüngste untersuchte Kalb war 15 Minuten alt, das älteste 24 Stunden. Die Proben wurden am LVG (Lehr- und Versuchsgut) Oberschleißheim und bei Landwirten im Kreis Pfaffenhofen entnommen. Die Blutentnahme erfolgte an der Vena jugularis. Bei den Feten wurden insgesamt 22 Blutproben entnommen. Die Feten stammten alle aus Müttern der Rasse Fleckvieh und hatten eine Scheitel-Steiß-Länge von 5,5 cm bis 72 cm. Die Probenahmen wurden am Schlachthof München durchgeführt. Hier erfolgte die Blutentnahme jeweils aus der Nabelschnur. Alle Blutproben wurden in ein EDTA-Röhrchen eingebracht. Von 14 Feten und 31 Kälbern wurde ein Differentialblutbild angefertigt. Zusätzlich zu den bereits genannten Proben wurden für die Enzymhistochemie weitere 15 Kälber untersucht. Diese wurden in 5 Altersgruppen aufgeteilt: 3-6 Tage, 10-11 Tage, 20-23 Tage, 30-33 Tage und 39-42 Tage. Das Blut wurde hier nicht in EDTA-Röhrchen gegeben, um eine eventuelle Hemmung der Enzymaktivität zu verhindern; vielmehr wurde es unmittelbar nach der Entnahme auf Objektträgern ausgestrichen. Dasselbe wurde mit 9 Blutproben von Feten durchgeführt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Kälber (EM=Elektronenmikroskopie; LM=Lichtmikroskopie; GHC=Glykohistochemie; IZC=Immunzytochemie; ZSK=Zytoskelett)

Kälber	Alter	Geschlecht	EM	LM	GHC	IZC	ZSK
Kalb 1	15 min	M			X		X
Kalb 2	25 min	W	X				
Kalb 3	45 min	W			X	X	
Kalb 4	45 min	W					X
Kalb 5	1 Std	M	X				
Kalb 6	1 Std	W		X			X
Kalb 7	1,5 Std	M		X		X	
Kalb 8	1,5 Std	M			X		X
Kalb 9	2 Std	M	X				
Kalb 10	2,5 Std	W		X			
Kalb 11	3 Std	M			X	X	X
Kalb 12	3 Std	M		X	X		
Kalb 13	4 Std	W	X				
Kalb 14	4 Std	W		X	X		X
Kalb 15	5 Std	M		X		X	X
Kalb 16	5 Std	M		X			
Kalb 17	6 Std	M		X	X	X	
Kalb 18	6 Std	M		X			
Kalb 19	6 Std	M			X		X
Kalb 20	6,5 Std	W	X				
Kalb 21	6,5 Std	M		X	X	X	
Kalb 22	7 Std	W		X		X	X
Kalb 23	8 Std	M		X	X	X	
Kalb 24	9 Std	M		X	X	X	
Kalb 25	10 Std	W		X			X
Kalb 26	10 Std	M		X	X		
Kalb 27	12 Std	M		X	X	X	
Kalb 28	12 Std	W			X		X
Kalb 29	13 Std	M			X	X	X
Kalb 30	23 Std	W			X	X	X
Kalb 31	24 Std	M		X	X	X	

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Kälber für die Enzymhistochemie (EHC)

Altersgruppe	Kälber	Alter	Geschlecht
3-6 Tage	K1.1	4 Tage	W
	K1.2	5 Tage	M
10-12 Tage	K2.1	12 Tage	M
	K2.2	10 Tage	M
	K2.3	10 Tage	M
	K2.4	12 Tage	W
20-23 Tage	K3.1	20 Tage	W
	K3.2	22 Tage	M
	K3.3	22 Tage	M
30-33 Tage	K4.1	30 Tage	M
	K4.2	33 Tage	W
39-42 Tage	K5.1	39 Tage	W
	K5.2	39 Tage	W
	K5.3	41 Tage	W
	K5.4	42 Tage	W

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Feten (EM=Elektronenmikroskopie; LM=Lichtmikroskopie; GHC=Glykohistochemie; IZC=Immunzytochemie; ZSK=Zytoskelett; EHC=Enzymhistochemie)

Feten	SSL (cm)	Geschlecht	EM	LM	GHC	IZC	ZSK	EHC
F1	5,5	Nicht def.	X					
F2	7,2	Nicht def.		X		X	X	
F3	9,1	W	X					
F4	10	W			X		X	X
F5	11,2	M		X		X		X
F6	14	M						
F7	14,5	M		X			X	X
F8	15	M			X		X	
F9	18,9	W		X		X		
F10	19,8	W	X					
F11	20,1	W		X	X			X
F12	21,9	W		X		X	X	X
F13	22,4	M		X			X	
F14	22,7	M		X	X			X
F15	37,8	M			X	X		X
F16	39	W			X		X	
F17	39	W		X		X	X	
F18	40,2	M		X		X		X
F19	41,3	M		X			X	
F20	58,7	W	X					
F21	64	M		X		X	X	X
F22	72	M		X	X		X	

2. Lichtmikroskopie

An den Blutausstrichen wurden acht verschiedene Färbungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem Aristoplan Lichtmikroskop der Firma Leitz (Wetzlar).

2.1. Diff-Quick-Färbung

Die Färbung wird mit einem Kombinationspaket (LABOR + TECHNIK, Berlin), bestehend aus Fixierlösung, dem Xanthen-Farbstoff in Färbelösung I (eosinophil = rot) und dem Thiazin-Farbstoff in Färbelösung II (basophil = blau) durchgeführt. Es handelt sich um eine Schnellfärbung.

Protokoll:

- | | | |
|----|---|--------|
| 1. | Eintauchen der Objektträger in die Fixierlösung | 30 Sek |
| 2. | Abtropfen und eintauchen in die Eosin-Lösung (Lösung I) | 10 Sek |
| 3. | Eintauchen in Hämalaun-Lösung (Lösung II) | 10 Sek |
| 4. | Abspülen mit Aqua dest. | |
| 5. | Lufttrocknung | |
| 6. | Eindecken mit Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) | |

Ergebnis:

Die Zellkerne der Granulozyten färben sich dunkelblau an, die Granula der eosinophilen Granulozyten rot bis orange, die der basophilen Granulozyten dunkellila bis schwarz und die der neutrophilen Granulozyten hellrosa. Monozyten haben einen violetten Kern und ein hellblaues Zytoplasma. Thrombozyten stellen sich violett dar.

2.2. Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Stammlösung enthält Eosin, Methylenblau, Methylenazur, Methylenviolett. Als Lösungsmittel werden Methanol und Glycerin verwendet. Diese Mischung basischer Teerfarbstoffe und ihrer Salze mit Eosin färben das Zytoplasma und die Zellkerne je nach dem pH-Wert entsprechend an (Romeis, 2010).

Verwendete Reagenzien:

- Methanol (MERCK, Darmstadt)
- Giemsa Stammlösung (MERCK, Darmstadt)

Protokoll:

- | | | |
|----|---|-----------|
| 1. | Fixieren der Blutausstriche in Methanol | 5-10 min |
| 2. | Lufttrocknung | |
| 3. | Aufgießen der verdünnten Giemsa 1:20-Lösung | 30-45 min |
| 4. | Abspülen mit Aqua dest. | |
| 5. | Lufttrocknung | |
| 6. | Eindecken mit Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) | |

Ergebnis:

Die Erythrozyten färben sich blassrötlich, die Thrombozyten blau mit violetter Innenkörper. Die Zellkerne stellen sich rotviolett, die eosinophilen Granula rötlich-braun, die basophilen Granula blau und die neutrophile Granula rotviolett dar. Das Zytoplasma der Lymphozyten sowie das der Monozyten ist blau und enthält zum Teil feine purpur-rote Azurkörnchen (Mahlberg et al., 2005) (Romeis, 2010).

2.3. May-Grünwald-Färbung

Die May-Grünwald-Lösung enthält die Farbstoffe Eosin und Methylenblau. Der basische Teerfarbstoff Methylenblau bildet in der Farbstofflösung mit Eosin ein Salz, das Methyleneosinat, welches schlecht in Wasser löslich ist. Deshalb wird zur Herstellung der Farbstofflösung Methanol verwendet (Romeis, 2010).

Verwendete Reagenzien:

- a) Unverdünnte May-Grünwald Farbstofflösung (MERCK, Darmstadt)
- b) Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Protokoll:

1. Betropfen der Objektträger mit unverdünnter Färbelösung 3-5 min
2. Auftropfen gleicher Menge Aqua dest. 5-10 min
3. Abgießen und eintauchen in Aqua dest. 10 Sek
4. Abtropfen und Lufttrocknung
5. Eindecken mit Eukitt

Ergebnis:

Die Kerne der Leukozyten und Erythrozytenvorstufen färben sich blau-violett (rötlich). Das Zytoplasma der Erythrozyten stellt sich rötlich, das der Lymphozyten blau und das der Monozyten taubenblau dar. Die Granula der eosinophilen Granulozyten färben sich ziegelrot, die der basophilen Granulozyten blau-violett. Neutrophile Granula wird hell violett und die Thrombozyten violett (Romeis, 2010) .

2.4. Panoptische Färbung nach Pappenheim

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

Verwendete Reagenzien:

- a) May-Grünwald Färbelösung (MERCK, Darmstadt)
- b) Verdünnte Giemsa Stammlösung (MERCK, Darmstadt)
- c) Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Protokoll:

1. Betropfen der Objektträger mit 1 ml der May-Grünwald Lösung 3 min
2. Auftropfen von 1 ml Aqua dest. 1 min
3. Abgießen
4. Auftropfen verdünnter Giemsa-Lösung 15-20 min
5. Abspülen mit Aqua dest. und Lufttrocknung
6. Eindecken mit Eukitt

Ergebnis:

Alle Zellkerne sind unterschiedlich rötlich-violett, das Zytoplasma der Lympho- und Monozyten bläulich (basophil), das der neutrophilen Granulozyten zartrosa (azidophil) angefärbt. Die Granula der eosinophilen Granulozyten färben sich ziegelrot, die der basophilen Granulozyten dunkelviolett, die Granula der neutrophilen Granulozyten rötlich-braun. Die Erythrozyten erscheinen rosa, die Thrombozyten bläulich mit zarten rötlichen Granula (Stobbe, 1970) (Romeis, 2010).

2.5. Alcianblau-Färbung

Diese Färbung dient dem Nachweis saurer und sulfatierter Mukosubstanzen. Alcianblau ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff. Es werden zwei Färbungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 dient dem Nachweis saurer Mukosubstanzen, die Färbung bei einem pH-Wert von 1 dem der sulfatierten Mukosubstanzen (Romeis, 2010).

Verwendete Reagenzien für die Färbung mit pH 2,5:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) 5 g Alcianblau 8 GX Certistain® (MERCK, Darmstadt)
- c) 500 ml 3% ige Essigsäure:
 - 485 ml Aqua dest.
 - 15 ml Essigsäure 100% (MERCK, Darmstadt)
- d) Kernechtrot-Lösung:
 - Aluminiumsulfat
 - 100 ml Aqua dest.
 - 0,1 Kernechtrot Certistain® (MERCK, Darmstadt)
- e) Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Verwendete Reagenzien für die Färbung mit pH 1:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) 5 g Alcianblau 8 GX Certistain® (MERCK, Darmstadt)
- c) 500 ml 0,1 N Salzsäure (MERCK, Darmstadt)
- d) Kernechtrot-Lösung:
 - Aluminiumsulfat
 - 100 ml Aqua dest.
 - 0,1 Kernechtrot Certistain® (MERCK, Darmstadt)
- e) Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Protokoll:

- | | | |
|----|--------------------------------------|--------|
| 1. | Fixation der Blutausrich in Methanol | 10 min |
| 2. | Einstellen in Alcianblau-Lösung | 5 min |
| 3. | Spülen im fließenden Leitungswasser | 3 min |
| 4. | Kurze Spülung mit Aqua dest. | 10 Sek |
| 5. | Einstellen in Kernechtrot-Lösung | 10 min |
| 6. | Spülen im fließenden Leitungswasser | 3 min |
| 7. | Kurze Spülung mit Aqua dest. | 10 Sek |
| 8. | Lufttrocknung | |
| 9. | Eindecken mit Eukitt | |

Ergebnis:

Saure und sulfatierte Mukosubstanzen färben sich leuchtend blau an, wohingegen die Zellkerne durch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot rosa erscheinen (Romeis, 2010).

2.6. Toluidinblau-Färbung der basophilen Granulozyten nach Undritz

Durch die Toluidinblau-Färbung können Blut- und Gewebsbasophile dargestellt werden. Infolge des starken metachromatischen Effektes der im Heparin veresterten anorganischen Schwefelsäuren ist die Granulation beider Arten rotviolett (Freund und Heckner, 2001).

Verwendete Reagenzien:

- a) 1 g Toluidinblau
- b) 100 ml Methanol (MERCK, Darmstadt)
- c) Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Protokoll:

1. Bedecken der Blutausstriche mit der Färbelösung 5 min
2. Abgießen der Lösung und Spülung mit Aqua dem.
3. Lufttrocknung
4. Eindecken mit Eukitt

Ergebnis:

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

2.7. Sirius Red-Färbung

Mit dieser Färbung können die eosinophilen Granulozyten gezielt nachgewiesen werden (Romeis, 2010).

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) Saures Hämalaun nach Mayer
- c) Sirius Red-Färbelösung:
 - 500 mg Sirius Red (REACTIFS RAL, Martillac)
 - 45 ml Aqua bidest.
 - 50 ml Ethanol absol. (MERCK, Darmstadt)
 - 1 ml NaOH 1%
 - 4 ml NaCl 20%
- d) Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Protokoll:

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol 10 min
2. Einstellen der Objektträger in saures Hämalaun nach Mayer 10 min
3. Spülen mit fließendem Leitungswasser („Bläuen“) 15 min
4. Einstellen in Sirius Red-Färbelösung 60 min
5. Kurz abspülen mit Aqua dest.
6. Lufttrocknung
7. Eindecken mit Eukitt

Ergebnis:

Die Granula der eosinophilen Granulozyten stellen sich deutlich rosa-pink dar.

2.8. PAS-Färbung

Die sog. PAS-(periodic-acid-Schiff) Reaktion dient zum Nachweis von Glykogen, sauren und neutralen Mucopolysacchariden, Mucoproteiden, Glucoproteiden und Lipopolysacchariden in den Blutzellen (Stobbe, 1970).

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) Saures Hämalaun nach Mayer
- c) 600 ml SO₂-Wasser:
 - 3 ml konzentrierte Salzsäure
 - 3 g Natriumdisulfit
 - 600 ml Leitungswasser
 - 100 ml Aqua dest.

→ Das SO₂-Wasser sollte immer frisch hergestellt werden
- d) 200 ml 0,5% ige wässrige Perjodsäurelösung:
 - 1 g Perjodsäurepulver
 - 200 ml Aqua dest.

→ Die Perjodsäurelösung sollte immer frisch hergestellt werden
- e) Schiff'sches Reagenz (MERCK, Darmstadt)
- f) Eukitt (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Protokoll:

- | | | |
|-----|---|----------|
| 1. | Fixieren der Blutausrichie in Methanol | 5-10 min |
| 2. | Einstellen in wässrige Perjodsäurelösung | 5 min |
| 3. | Kurz abspülen mit Aqua dest. | |
| 4. | Einstellen in Schiff'sches Reagenz | 15 min |
| 5. | Spülen in SO ₂ -Wasser in 3 Kùvetten | 3x2 min |
| 6. | Spülen mit fließendem Leitungswasser | 3 min |
| 7. | Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer | 3-5 min |
| 8. | Spülen mit fließendem Leitungswasser | 5 min |
| 9. | Lufttrocknung | |
| 10. | Eindecken mit Eukitt | |

Ergebnis:

Alle Polysaccharide und Kohlenhydrat-Proteinkomplexe färben sich burgunderrot an. Bei den Zellen der Granulozytopoese nimmt die Reaktion vom Promyelozyten zum reifen neutrophilen Granulozyten an Stärke zu. Die Granula der basophilen Granulozyten zeigen eine intensive Reaktion. Bei den eosinophilen Granulozyten lässt sich höchstens im Bereich der zytoplasmatischen Grundsubstanz eine positive Reaktion erkennen (Stobbe, 1970).

3. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Blutproben von Kälbern mit dem Alter 25 min post natum, 1 Std post natum, 2 Std post natum, 4 Std post natum und 6,5 Std post natum verwendet. Des Weiteren wurden Blutproben von Feten mit einer Scheitel-Steiß-Länge 5,5 cm, 9,1 cm, 19,8 cm und 58,7 cm verwendet.

Sie wurden nach folgendem Protokoll bearbeitet:

- | | | |
|-----|---|------------|
| 1. | Zentrifugieren des Blutes bei 2000 U/min | 15 min |
| 2. | Abpipettieren des überstehenden Plasmas | |
| 3. | Fixieren durch Auftragen von Karnovsky-Fixierlösung auf den Leukozytensaum | |
| 4. | Fixierung bei 4°C | 1 Std |
| 5. | Spülen des entstandenen Zellpellet in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,7) | |
| 6. | Zellpellet in Karnovsky-Lösung | 1 Nacht |
| 7. | Schneiden in Blöcke von 1 mm Seitenlänge | |
| 8. | 3 maliges Waschen in Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,2) | |
| 9. | Kontrastieren der Proben mit 1%-igem Osmiumtetroxid und 1,5%-igem Kaliumferrocyanid bei 4° C | 2 Std |
| 10. | 3x waschen mit Natrium-Cacodylatpuffer | je 20min |
| 11. | Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90% je 30 min, 30 min absolutes Ethanol) | |
| 12. | Schrittweise Einbettung in Epon: | |
| | - Propylenoxid (MERCK, Darmstadt) | 2x15 min |
| | - Propylenoxid-Epon-Gemisch 2:1 | 1 Std |
| | - Propylenoxid-Epon-Gemisch 1:1 | über Nacht |
| | - reines Epon | 1 Std |
| 13. | Polymerisieren der Blöcke in Gelatinekapseln (PLANNET, Wetzlar) bei 60°C | 24 Std |
| 14. | Anfertigen von 1 µm Semidünnschnitten am Ultramikrotom (Ultracut E., Firma Reichert-Jung, Wien) | |
| 15. | Färben mit Richardson | |
| 16. | Anfertigen von Ultradünnschnitten (60 nm) | |
| 17. | Aufziehen auf Kupfer-Grids (200 Mesh) und Nachkontrastierung mit gesättigtem Uranylacetat und einer Bleizitrat-Lösung nach Reynolds | |

4. Glykohochemie

Für die glykohochemische Untersuchung wurden FITC (=Fluoreszeinisothiocyanat)-markierte Lektine und biotinylierte Lektine verwendet. Insgesamt handelte es sich um 14 FITC-markierte Lektine und drei biotinylierte Lektine.

4.1. FITC-markierte Lektine

Die verwendeten FITC-markierten Lektine sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten FITC-markierten Pflanzenlektine (modifiziert nach Rüdiger, Gabius und Habermann (Rüdiger und Gabius, 2009) (Gabius et al., 2011) (Habermann et al., 2011))

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

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

^a = Succinylierung von WGA (WGAs) reduziert die Sensitivität der Bindung an Neuraminidase in Zellen (Monsigny et al., 1979)

^b = Keine Spezifität für Monosaccharide bekannt.

Vorbereitung der Lektinfärbung:

Um die Proben vor Licht zu schützen, werden die Küvetten in Alufolie gepackt. Die feuchten Kammern werden mit Filterpapier bestückt und dieses mit Aqua dem. angefeuchtet, um später die Ausstriche vor dem Austrocknen zu bewahren. Auch die Deckel der Feuchtkammern werden mit Alufolie überzogen.

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS-Puffer
- c) FITC-markiertes Lektin (VECTOR, Burlingame)
- d) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- e) VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

Es wurden je 10 Blutausstriche von Kälbern und 10 von Feten unterschiedlichen Alters untersucht. Als Positivkontrolle dienten Blutausstriche adulter Rinder.

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol 10 min
2. Waschen der Objektträger in PBS 3x5 min
3. Lagerung der Objektträger in Feuchtkammer und bedecken mit Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) 10 min
4. Abtropfen und abtrocknen Unterseite
ab hier muss unter lichtarmen Bedingungen gearbeitet werden
5. Auftropfen von 100 µl der Lektinlösung pro Objektträger und Inkubation in Feuchtkammer 60 min
6. Waschen in PBS 3x5 min
7. Eindecken mit DAPI

Die Objektträger wurden bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop in einer lichtundurchlässigen Box im Kühlschrank aufbewahrt. Als Positivkontrolle wurden bei jeder Lektinfärbung 2 Blutausstriche des adulten Rindes und Pferdes mitgefärbt, bei denen die Ergebnisse bereits bekannt waren.

4.2. Hemmzucker

Bei den Lektinen, die deutlich positiv reagierten, wurde getestet, ob sich mittels spezifischer Kohlenhydrate die Bindung hemmen lässt. Im Falle von Kälbern und Feten waren WGA, ConA, LCA, PSA und PHA-E deutlich positiv.

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Hemmzucker.

Tabelle 9: Verwendete Hemmzucker

Lektin	Hemmstoff	Konzentration	Inkubationszeit
WGA	Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)	1:4	30 min
ConA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y-Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Std
LCA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Std
PSA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Std
PHA-E	Essigsäure (ROTH, Karlsruhe)	24 μ l/ml	1 Std

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS-Puffer
- c) FITC-markiertes Lektin (VECTOR, Burlingame)
- d) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- e) Hemmstoffe
- f) Essigsäure (ROTH, Karlsruhe)
- g) VECTASHIELD[®] Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

Es wurden je 2 Objektträger gefärbt. Zusätzlich wurde jeweils 1 Objektträger ohne Hemmzucker gefärbt. Das Lektin wurde vor dem Auftragen auf die Objektträger mit dem jeweiligen Hemmzucker 1 Stunde bzw. 30 Minuten lang vorinkubiert.

Vorgehen siehe Punkt 4.1.

4.3. Vorbehandlung mit Neuraminidase

Neuraminidase ist ein Enzym, welches von verschiedenen Glykoproteinen die endständige Sialinsäure abspaltet, so dass die anschließenden Zuckermoleküle zugänglich für die Lektine sind. Die hier verwendete Neuraminidase von *Vibrio cholerae* spaltet vorwiegend $\alpha(2\rightarrow3)$ Verbindungen der Sialinsäure. Es werden aber auch die $\alpha(2\rightarrow6)$ und $\alpha(2\rightarrow8)$ Verbindungen gespalten. Die Vorbehandlung mit Neuraminidase wurde bei den Lektinen SBA, DBA, RCA, PNA und SJA durchgeführt.

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) Natrium Acetat wasserfrei (MERCK, Darmstadt)
- c) Essigsäure (ROTH, Karlsruhe)
- d) Calciumchlorid (MERCK, Darmstadt)
- e) Neuraminidase (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- f) Salzsäure (HCl)
- g) PBS-Puffer
- h) VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

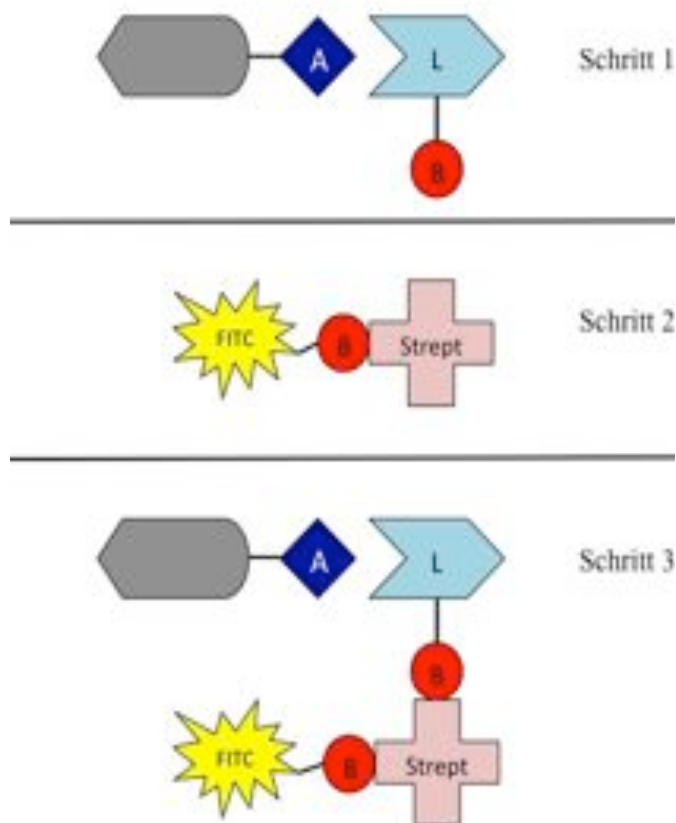
Es wurden je 5 Objektträger vom Kalb und 5 vom Fetus pro Lektin gefärbt. Zur Kontrolle wurden 2 Objektträger mit Rinderblut und humanen Blut mitgefärbt.

1. Lufttrocknen der Ausstriche
2. Fixieren der Blutausstriche in Methanol 10 min
3. Waschen der Objektträger im Natrium-Acetatpuffer pH 5,5 3x5 min
4. Bedecken der Blutausstriche mit je 200 μ l der verdünnten Neuraminidaselösung
5. Inkubation bei 37°C in Feuchtkammer 1 Std
6. Spülen in PBS-Puffer 3x5 min
7. Auftragen von 100 μ l der Lektinlösung
8. Inkubation in Feuchtkammer unter Lichtabschluss 1 Std
9. Waschen in PBS-Puffer 3x5 min
10. Eindecken mit DAPI

4.4. Biotinylierte Lektine

Die Lektine MAA-1, SNA und VAA wurden mit der Streptavidin-Biotin-Methode nachgewiesen. Streptavidin ist ein Protein, welches von *Streptomyces avidinii* stammt und eine hohe Bindungsaffinität zu dem Vitamin Biotin aufweist. Das Lektin, welches an Biotin gekoppelt ist, bindet bei dieser direkten Methode an sein spezifisches Kohlenhydrat. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC ist auch an Biotin gekoppelt und bildet mit dem Streptavidin einen Komplex. Gibt man nun den Streptavidin-FITC-Komplex zu dem Lektin, so bindet das Streptavidin mit hoher Affinität an das Biotin-Molekül. Die Bindungsstelle des Lektins wird so durch FITC sichtbar gemacht. Dies stellt eine indirekte Methode des Lektinnachweises dar (Roth, 2011).

Diese Methode stellt eine Variante der Avidin-Biotin-Methode dar. In folgendem Diagramm wird das Prinzip verdeutlicht:



Schritt 1 = Biotinyliertes Lektin wird aufgetragen und bindet an das Kohlenhydrat

Schritt 2 = Streptavidin/FITC wird aufgetragen

Schritt 3 = Streptavidin/FITC bindet an das Biotin und wird sichtbar durch Fluoreszenz

Abbildung 3: Avidin-Biotin-Methode (A=Zucker; L=Lektin; B=Biotin; Strept=Streptavidin)

In folgender Tabelle sind die Eigenschaften der biotinylierten Lektine zusammengefasst:

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten biotinylierten Lektine, modifiziert nach Gabius und Habermann (Gabius et al., 2011) (Habermann et al., 2011)

Name	Abk	Herkunft	Zuckerspezifität	Potente Oligosaccharide
Maackia amurensis Agglutinin I (Leukoagglutinin)	MAA-I	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)	a	Neu5Ac/Glc α 3Gal β 4GlcNAc/Glc ^b 3'-Sulfatierung wird toleriert Core-reaktiv bei 3-sulfatiertem LacNAc
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	Gal, GalNAc	Neu5Ac α 6Gal/GalNAc ^c , clustered T _n -Antigen, 9'-O-Acetylierung wird toleriert
Viscum album Agglutinin	VAA	<i>Viscum album</i> (Mistel)	Gal	Gal β 2(3); Gal α 3(4)Gal; Fuca α 2Gal; Gal β 3(4)GlcNAc ohne/mit α 2,6-Sialisierung

^a = Keine Spezifität für Monosaccharide bekannt

^b = Bindungsspezifität für Typ II LacNAc Core

^c = Bindung von Typ I LacNAc Core bevorzugt; 6-Sulfatierung von GlcNAc in α 2,6-sialysierten LacNAc steigert die Affinität

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS-Puffer
- c) Biotinyliertes Lektin (VECTOR, Burlingame)
- d) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- e) Streptavidin-FITC
- f) VECTASHIELD[®] Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

Es wurden je 10 Blutausstriche verwendet. Als Positivkontrolle dienten Blutausstriche von adulten Rindern.

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol 10 min
2. Waschen der Objektträger in PBS 3x5 min
3. Lagern der Objektträger in Feuchtkammer und bedecken mit Protein Block Serum Free 10 min
4. Abtropfen und abtrocknen der Unterseite
5. Auftropfen von 100 μ l des Lektins pro Objektträger und Inkubation 60 min
6. Waschen in PBS 3x5 min
ab hier muss unter lichtarmen Bedingungen gearbeitet werden
7. Auftropfen von 300 μ l der Streptavidin-FITC-Lösung und Inkubation 30 min
8. Waschen in PBS 3x5 min
9. Eindecken mit DAPI

5. Immunzytochemie

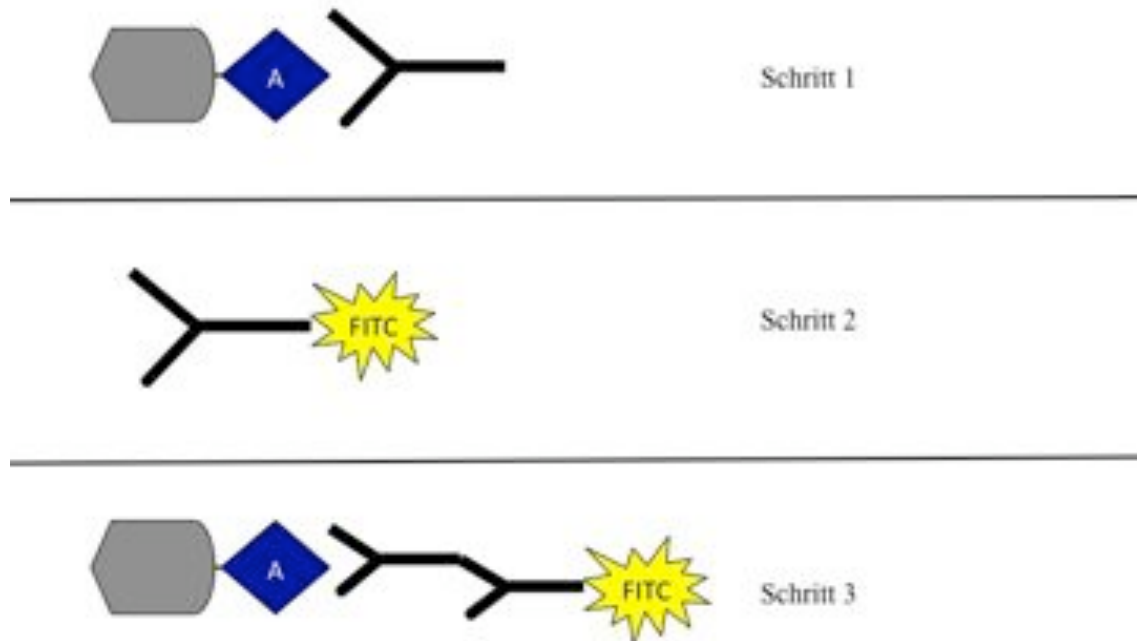
Die hier durchgeführte Methode stellt eine indirekte Immunmarkierung dar. Hierbei wird ein markierter Anti-Antikörper (Sekundärantikörper) verwendet der sich gegen den zuvor gebundenen Antikörper richtet. Dieser Anti-Antikörper ist mit einem Marker gekoppelt, welcher im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird (Sinowatz und Hees, 2000) (Romeis, 2010).

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

Zielzelle	Antikörper	Konz.	Tierart	Sekundärantikörper	Konz.
CD4-Lymphozyten	CD4 (SEROTEC, Düsseldorf)	1:100	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC vom Kaninchen	1:20
CD8-Lymphozyten	CD8 (SEROTEC, Düsseldorf)	1:200	Maus	Anti-Maus-IgG-FITC vom Kaninchen	1:20

In folgendem Schema wird die Antikörper-Färbung beschrieben:



Schritt 1 = Primärantikörper bindet an Antigen

Schritt 2 = FITC-markierter Sekundärantikörper wird aufgetragen

Schritt 3 = Sekundärantikörper bindet an Primärantikörper und damit wird Bindung durch Fluoreszenz sichtbar

Abbildung 4: Antikörper-Färbung (A=Antigen)

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS-Puffer
- c) Antikörper-Diluent (DAKO, Hamburg)
- d) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- e) Antikörperlösung (CD4, CD8)
- f) Sekundäntikörperlösung (Anti-Kaninchen-FITC, Anti-Maus-FITC)
- g) VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

Es wurden Ausstriche von 10 Tieren gefärbt

- | | | |
|-----|--|---------|
| 1. | Fixieren der Ausstriche in Methanol | 10 min |
| 2. | Waschen in PBS | 3x5 min |
| 3. | Benetzen der Objektträger in der Feuchtkammer mit Protein-Block-Serum-Free | 10 min |
| 4. | Abgießen und trocknen der Unterseite mit fusselfreiem Papier | |
| 5. | Auftragen von 200 µl Ak-Lösung pro OT | |
| 6. | Inkubieren über Nacht im Kühlschrank | |
| 7. | Waschen in PBS | 3x5 min |
| | ab hier muss unter lichtarmen Bedingungen gearbeitet werden | |
| 8. | Auftropfen von 200 µl der Sekundäntikörper-Lösung und Inkubation in Feuchtkammer | 30 min |
| 9. | Waschen in PBS | 3x5 min |
| 10. | Eindecken mit DAPI | |

Ergebnis:

Am Ort der Immunreaktion kommt es zu einer grünen Fluoreszenz, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird.

6. Zytoskelett

Es wurden insgesamt 5 verschiedene Reaktionen zur Darstellung des Zytoskeletts durchgeführt.

6.1. Phalloidin-TRITC

Phalloidin ist das Toxin des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*. Phalloidin bindet spezifisch an (filamentäres) F-Aktin (Romeis, 2010). Das Phalloidin ist mit TRITC (Tetramethylrhodamine B isothiocyanate) gekoppelt, welches sich im Fluoreszenzmikroskop rot darstellt .

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS-Puffer
- c) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- d) Phalloidin-TRITC-DMSO (Dimethylsulfoxid) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Katalognummer: P1951)
- e) Antibody Diluent (DAKO, Hamburg)
- f) VECTASHIELD[®] Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

Es wurden je 10 Objektträger gefärbt

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol 10 min
2. Waschen in PBS 3x5 min
3. Benetzen der Objektträger in Feuchtkammer mit Protein-Block-Serum-Free (DAKO, Hamburg) 10 min
4. Abtropfen und abwischen der Unterseite
ab hier muss unter lichtarmen Bedingungen gearbeitet werden
5. Auftropfen von 100 µl der Phalloidin-TRITC-DMSO-Lösung pro OT und Inkubation 45 min
6. Waschen in PBS 3x5 min
7. Eindecken mit DAPI

Ergebnis:

Am Ort der Phalloidin-TRITC-Bindung kommt es zu einer leuchtend-roten Reaktion, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird.

6.2. Myosin

Zur Darstellung des Myosins in Blutzellen wird ein polyklonaler Antikörper gegen „non-muscle Myosin IIA“ von abcam® (Cambridge) verwendet. Non-muscle myosin II ist an Zellbeweglichkeit, Zelladhäsion, Zytokinese und vesikulärem Transport beteiligt.

Es wurde erst mit einer Konzentration von 1:500 und anschließend mit einer Konzentration von 1:250 gefärbt.

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS Puffer
- c) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- d) Antibody Diluent (DAKO, Hamburg)
- e) Non-muscle-myosin-Lösung (1:250; 1:500) (Katalognummer: ab24762)
- f) Sekundär-AK: Anti-Kaninchen-FITC von der Ziege (1:300) (DAKO, Hamburg)
- g) VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

Es wurden je 10 Ausstriche von Kälbern im Alter von 15 Minuten bis 23 Stunden post natum und 10 Ausstriche von Feten der Größe 7,2 cm bis 72 cm verwendet. Jeweils 2 Ausstriche von Pferdeblut und von adulten Rindern dienten als Positivkontrollen. Die Untersuchungen wurden jeweils mit fixierten und unfixierten Ausstrichen durchgeführt, um den Einfluss der Fixierung auf die Immunfärbung abschätzen zu können.

- | | | |
|----|---|---------|
| 1. | Fixieren in Methanol (MERCK, Darmstadt)) | 10 min |
| 2. | Waschen in PBS | 3x5 min |
| 3. | Auftropfen von Protein-Block-Serum-Free auf OT in Feuchtkammer | 10 min |
| 4. | Abtropfen und abwischen der Unterseite | |
| 5. | Auftropfen vom 100 µl Myosin-Lösung pro OT und Inkubation über Nacht bei 4°C im Kühlschrank | |
| 6. | Waschen in PBS | 3x5 min |
| | ab hier muss unter lichtarmen Bedingungen gearbeitet werden | |
| 7. | Auftropfen von 100 µl Sekundärantikörper-Lösung pro OT | 30 min |
| 8. | Waschen in PBS | 3x5 min |
| 9. | Eindecken mit DAPI | |

Ergebnis:

Durch die Markierung des Sekundärantikörpers mit FITC kommt es am Ort der Reaktion zu einer grünen Fluoreszenz.

6.3. Vimentin

Vimentin ist ein Intermediärfilament-Protein, das einen Teil des Zytoskeletts der Säugetierzellen bildet.

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS Puffer
- c) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- d) Antibody Diluent (DAKO, Hamburg)
- e) Primärantikörper: Vimentin (abcam[®], Cambridge, Katalognummer: ab8069)
- f) Sekundär-AK: Anti-Maus-IgG FITC-markiert (DAKO, Hamburg)
- g) VECTASHIELD[®] Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

wie bei Myosin (siehe Punkt 6.2.)

Ergebnis:

Auch bei Vimentin kommt es durch die Bindung des FITC-markierten Sekundärantikörpers zu einer grünen Fluoreszenz am Ort der Immunreaktion.

6.4. Panzytokeratin

Keratine sind eine Gruppe von wasserunlöslichen Proteinen, die sog. Tonofilamente (Keratinfilamente) in allen Epithelien bilden (Weiss et al., 1984).

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS Puffer
- c) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- d) Antibody Diluent (DAKO, Hamburg)
- e) Primärantikörper: Panzytokeratin aus der Maus (BIOCARTA, Hamburg)
- f) Sekundär-AK: Anti-Maus-IgG FITC-markiert (DAKO, Hamburg)
- g) VECTASHIELD[®] Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

wie bei Myosin (siehe Punkt 6.2.)

Ergebnis:

Zytokeratine sind in Blutzellen nicht nachweisbar.

6.5. Tubulin

Tubulin ist Bestandteil der Mikrotubuli, die in fast allen eukaryotischen Zellen ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts sind.

Verwendete Reagenzien:

- a) Methanol (MERCK, Darmstadt)
- b) PBS Puffer
- c) Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg)
- d) Antibody Diluent (DAKO, Hamburg)
- e) Primär-AK: Tubulin aus der Maus (abcam[®], Cambridge, Katalognummer: ab3194)
- f) Sekundär-AK: Anti-Maus-IgG FITC-markiert (DAKO, Hamburg)
- g) VECTASHIELD[®] Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame)

Protokoll:

wie bei Myosin (siehe Punkt 6.2.)

Ergebnis:

Im Fluoreszenzmikroskop wird am Ort der Immunreaktion grüne Fluoreszenz sichtbar.

7. Enzymhistochemie

7.1. Peroxidase

Peroxidasen sind lysosomale Katalasen, die Wasserstoff von einem geeigneten Donator (hier: 4-Chlor-1-Naphthol) auf ein Peroxid (hier: Wasserstoffperoxid) übertragen. Dabei wird der Donator oxidiert und in einen schwarzbraunen, unlöslichen Farbstoff umgewandelt, der die zelluläre Lokalisation der jeweiligen Peroxidase-Aktivität anzeigt (Mahlberg et al., 2005).

Verwendete Reagenzien:

- a) Leucognost[®]-Fixiergemisch (MERCK, Darmstadt)
- b) 4-Chlor-1-Naphthol (Reagenz 1)
- c) Tris (hydroxymethyl-aminomethan)-HCl-Puffer (Reagenz 2)
- d) Wasserstoffperoxid-Lösung (Reagenz 3)
- e) Saures Hämalaun nach Mayer
- f) Ethanol
- g) Aquatex[®] (MERCK, Darmstadt)

Protokoll:

Das Blut wurde nicht in EDTA Röhrchen gegeben, um eine eventuelle Hemmung der Enzymaktivität zu verhindern, sondern unmittelbar nach der Entnahme auf Objektträgern ausgestrichen.

1. Lufttrocknen der Ausstriche
2. Fixieren der Ausstriche im Leucognost[®]-Fixiergemisch 1 min
3. Spülen mit fließendem Leitungswasser 10 Sek
4. Einstellen in frisch bereitete Färbelösung 10 min
5. Abspülen mit Aqua dest. 10 Sek
6. Lufttrocknung
7. Kernfärbung mit saurem Hämalaun
8. Spülen mit fließendem Leitungswasser 3-5 min
9. Lufttrocknung
10. Eindecken mit Aquatex[®]

Ergebnis:

Alle Zellen der neutrophilen und insbesondere der eosinophilen Bildungsreihe der Granulozyten (ab den Promyelozyten) zeigen schwarz-braun gefärbte Granula und sind damit eindeutig POX-positiv. Monozyten, basophile Granulozyten sowie alle Zellen der lymphatischen und erythropoietischen Reihe sind Peroxidase-negativ.

7.2. Alkalische Phosphatase

Die alkalische Leukozytenphosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern im alkalischen Milieu. Aus 1-Naphthylphosphat freigesetztes 1-Naphthol wird mit einem Diazoniumsalz zu einem braunen Azofarbstoff gekuppelt, der entsprechend der Lokalisation und der Aktivität der AP in der Zelle präzipitiert (Mahlberg et al., 2005).

Verwendete Reagenzien:

- a) Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (MERCK, Darmstadt)
- b) 1-Naphthylphosphat-Natriumsalz (MERCK, Darmstadt)
- c) Variamin[®]-Blausalz B (MERCK, Darmstadt)
- d) Leucognost[®]-Fixiergemisch (MERCK, Darmstadt)
- e) Destilliertes Wasser
- f) Saures Hämalaun nach Mayer
- g) Aquatex[®] (MERCK, Darmstadt)

Protokoll:

- | | | |
|----|---|-----------|
| 1. | Fixieren im Leucognost [®] Fixiergemisch | 1-3 min |
| 2. | Spülen mit fließendem Leitungswasser | 10 Sek |
| 3. | Lufttrocknung | |
| 4. | Einstellen in frisch bereitete Färbelösung | 10-15 min |
| 5. | Abspülen mit Aqua dest. und lufttrocknen | |
| 6. | Nachfärben mit Mayers Hämalaunlösung | 5 min |
| 7. | Abspülen mit Leitungswasser | 1-3 min |
| 8. | Lufttrocknung | |
| 9. | Eindecken mit Aquatex [®] | |

Ergebnis:

Das braune Reaktionsprodukt befindet sich nur in den Zellen der Endreifungsstufen der Granulopoese (Mahlberg et al., 2005).

7.3. Saure Phosphatase

Die saure Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern im sauren Milieu (Mahlberg et al., 2005)

Verwendete Reagenzien:

- a) Leucognost[®]-Fixiergemisch (MERCK, Darmstadt)
- b) Naphthol AS-OL Phosphorsäure (MERCK, Darmstadt)
- c) Natriumacetat (MERCK, Darmstadt)
- d) Pararosanilin-HCl-Lösung (2N) (MERCK, Darmstadt)
- e) Nitritlösung (MERCK, Darmstadt)
- f) Di- Natriumtartrat (MERCK, Darmstadt)
- g) Aqua dest.
- h) Saures Hämalaun nach Mayer
- i) Filterpapier
- j) Aquatex[®] (MERCK, Darmstadt)

Protokoll:

- | | | |
|----|--|---------|
| 1. | Fixieren im Leucognost [®] -Fixiergemisch | 1-3 min |
| 2. | Abspülen mit Aqua dest. | 1 min |
| 3. | Einstellen in frisch bereitete Färbelösung und Inkubation im Dunkeln | 2-3 Std |
| 4. | Abspülen in Aqua dest. | 10 Sek |
| 5. | Nachfärben mit Mayers Hämalaun | 15 min |
| 6. | Abspülen (Bläuen) mit Leitungswasser | 2 min |
| 7. | Lufttrocknung | |
| 8. | Eindecken mit Aquatex [®] | |

Ergebnis:

T-lymphoblastische Zellen zeigen im Gegensatz zu den übrigen lymphatischen Zellelementen charakteristische rot-braune Granula. Eine leicht positive Reaktion kann auch bei den Neutrophilen, Eosinophilen und Monozyten festgestellt werden.

7.4. Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

Spezifische Esterase nach Moloney und Mitarbeiter (1971).

Bei der Esterase wird die Enzymaktivität, die ein bestimmtes Substrat spaltet, nach diesem angebotenen Substrat benannt. Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase wird wegen ihrer ausgesprochenen Substratspezifität der Gruppe der spezifischen Esterasen zugeordnet (Stobbe, 1970).

Verwendete Reagenzien:

- a) 10% iges Methanol-Formol
- b) 40 mg Naphthol-AS-D-Chloracetat (APPLICHEM, Darmstadt)
- c) 4 ml Aceton (MERCK, Darmstadt)
- d) PBS-Puffer (pH 7,0; 6,6 und 5,5)
- e) 100 mg Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride salt) (1 mg/ml) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- f) Saures Hämalaun nach Mayer
- g) Kernechtrot (MERCK, Darmstadt)
- h) Aquatex[®] (MERCK, Darmstadt)

Protokoll:

Die Färbung wird bei pH 7,0, pH 6,6 und pH 5,5 durchgeführt

- | | | |
|----|---|---------|
| 1. | Lufttrocknen der Blutausrüche | 1-3 Std |
| 2. | Fixation in kaltem (4°C) Methanol-Formol 10% | 30 Sek |
| 3. | Einstellen in frisch bereitete Färbelösung | 30 min |
| 4. | Abspülen mit Aqua dest. | |
| 5. | Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer oder mit Kernechtrot | 8 min |
| 6. | Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) | 15 min |
| 7. | Lufttrocknung | |
| 8. | Eindecken mit Aquatex [®] | |

Ergebnis:

Am Ort der Enzymreaktion kommt es zu einem feingranulären Niederschlag. Bei Gegenfärbung mit Kernechtrot lässt sich diese Reaktion deutlicher erkennen als bei einer Kernfärbung mit Hämalaun.

7.5. α -Naphthyl-Acetat-Esterase

Die mit den Substraten α -Naphthyl-Acetat und Naphthol-AS-Acetat-Derivaten nachweisbare Esterase-Aktivität wird auch unter der Bezeichnung „unspezifische Esterase“ zusammengefasst (Stobbe, 1970).

Verwendete Reagenzien:

- a) Formaldehyd 37% (ROTH, Karlsruhe)
- b) 10 mg 2-Naphthyl-Acetat (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- c) 0,2 ml absolut reines Aceton (MERCK, Darmstadt)
- d) 40 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,0 und 6,6)
- e) 50 mg Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride salt) (2 mg/ml) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- f) Saures Hämalaun nach Mayer
- g) Aquatex[®] (MERCK, Darmstadt)

Protokoll:

Die Färbung wird bei einem pH von 8,0 und 6,6 durchgeführt

- | | | |
|----|--|---------|
| 1. | Lufttrocknen der Blutausrüche | 1-3 Std |
| 2. | Fixation im Formoldampf | 4 min |
| 3. | Einstellen in frisch bereitete Färbelösung | 30 min |
| 4. | Gründliches Spülen mit fließendem Leitungswasser | |
| 5. | Kernfärbung mit saurem Hämalaun | 8 min |
| 6. | Spülen in fließendem Leitungswasser („Bläuen“) | 15 min |
| 7. | Lufttrocknung | |
| 8. | Eindecken mit Aquatex [®] | |

Ergebnis:

An der Stelle der Enzymreaktion kommt es zu einem rotbraunen, feingranulären Niederschlag. Die Zellkerne färben sich blau.

7.6. Naphthol-AS-Acetat-Esterase

Die Naphthol-AS-Acetat-Esterase zählt wie die α -Naphthyl-Acetat-Esterase zu den unspezifischen Esterasen (Stobbe, 1970).

Verwendete Reagenzien:

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

Protokoll:

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

Ergebnis:

Am Ort der Enzymreaktion bildet sich ein blaubrauner, feingranulärer Niederschlag. Die Zellkerne sind blau gefärbt.

7.7. β -Glucuronidase

Die β -Glucuronidase gehört zu der Gruppe der Glykosidasen (Hurley, 1987). Das Enzym hydrolysiert ein Substrat, wobei Naphthol frei wird. Monozyten und Neutrophile zeigen eine schwache, verwaschene Reaktion im Zytoplasma, wohingegen T-Lymphozyten eine granuläre Reaktion aufweisen (Raskin und Valenciano, 2000).

Verwendete Reagenzien:

- a) 8 mg Naphthol AS-BI β -D-Glucuronid (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)
- b) 1 ml N,N-Dimethylformamid (MERCK, Darmstadt)
- c) 18,2-19,4 ml 0,2 M Natriumacetatlösung
- d) 0,6-1,8 ml Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung
- e) Saures Hämalaun nach Mayer
- f) Aquatex[®] (MERCK, Darmstadt)

Protokoll:

1. Lufttrocknen der Blutausrichre 30 min
2. Betropfen der OT in der Feuchtkammer mit Färbelösung
3. Inkubation bei 37°C 3 Std
4. Abspülen mit Aqua dest.
5. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer 8 min
6. Spülen mit fließendem Leitungswasser („Bläuen“) 15 min
7. Lufttrocknung
8. Eindecken mit Aquatex[®]

Ergebnis:

An Stellen der Enzymaktivität zeigt sich eine rosa bis rote Färbung. Die Zellkerne färben sich blau.

8. Auswertungen

Die Übersichtsfärbungen und die enzymhistochemischen Färbungen wurden unter dem Lichtmikroskop „Aristoplan“ der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar) ausgewertet. Die Auswertung und photographische Dokumentation der elektronenmikroskopischen Proben erfolgte an dem Transmissionmikroskop Zeiss EM 902 (ZEISS, Oberkochen). Die FITC oder auch TRITC-markierten Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop „Dialux 20“ der Firma Leitz (LEITZ, Wetzlar) ausgewertet und mit dem Fotoprogramm Progress[®] CFcool fotografiert.

IV. ERGEBNISSE

1. Blutbilder der verwendeten Kälber und Feten

Von allen Blutproben der Kälber wurde ein Differentialblutbild angefertigt. Als Richtwerte dienten die Werte von Tennant et al. (1973) und Jain (1993).

Tabelle 12: Übersicht der Blutbilder der Kälber

Kälber	Ery x10 ⁶ /µl	Htk %	Hb g/dL	LEU Pro µl	GRAN %	LYM/MO %
1	8,3	47,8	14,2	15,2	91	9,1
2	8,2	48,6	14,1	15,5	86	10,3
3	9,8	46,1	14,3	13,4	70,3	15
4	9,2	46,4	13,5	14,3	58	35,7
5	10,7	44,7	12,9	12,5	65	34
6	10,4	43,6	12,3	11,4	78	13
7	8,4	47,4	12,1	14,2	85	14,8
8	8,3	42,3	11,8	13,9	45,2	55
9	7,9	44,7	11,6	11,6	80,6	13,5
10	8,0	40,2	11,5	10,8	89	10,6
11	7,8	39,2	11,4	10,9	81,3	15
12	7,8	38,3	11,4	11,8	68,9	28
13	6,8	38,2	11,3	22,3	67,5	34
14	7,5	39,0	11,3	18,6	61	38,6
15	7,3	39,8	11,5	11,3	92	7,7
16	9,4	38,3	10,9	10,4	79	21,4
17	7,3	38,1	11,0	11,5	78,7	21
18	7,2	37,8	10,7	12,6	80,6	19
19	6,7	38,0	10,7	10,2	69,5	30
20	6,5	36,3	10,2	10,0	58	39
21	7,6	36,0	10,6	9,8	73,8	28,2
22	7,1	35,6	11,0	10,3	89	11,3
23	6,8	34,7	10,5	7,9	65,2	35
24	5,4	35,8	10,4	8,3	82,9	12,7
25	7,3	32,9	10,0	8,9	75,1	25
26	5,5	32,7	9,8	9,5	78	22,1
27	5,2	32,3	9,9	9,3	69,8	27
28	6,3	31,4	8,5	10,4	82,5	12,6
29	4,8	32,0	9,2	10,1	84	16,8
30	4,6	31,7	8,4	9,9	87	12,7
31	5,0	31,0	8,1	7,9	75,8	23,7

(Ery=Erythrozyten; Htk=Hämatokrit; Hb=Hämoglobin; LEU=Leukozyten; GRAN=Granulozyten; LYM/MO=Lymphozyten und Monozyten)

IV. Ergebnisse

Bei den fetalen Blutproben konnten nur Blutbilder von den Tieren über 18,9 cm SSL angefertigt werden, da bei den jüngeren Tieren zu wenig Blut gewonnen werden konnte. Als Richtwerte dienten hier die Werte von Hubbert und Hollen (1971), siehe auch Tabelle 2.

Tabelle 13: Übersicht der Blutbilder der Feten (Ery=Erythrozyten; Htk=Hämatokrit; Hb=Hämoglobin; LEU=Leukozyten; LYM=Lymphozyten)

Feten	Größe SSL in cm	Alter In Tagen	Ery $\times 10^6/\mu\text{l}$	Htk %	Hb g/dL	LEU Pro ml	LYM Pro ml
F1	5,5	< 100	-	-	-	-	-
F2	7,2	< 100	-	-	-	-	-
F3	9,1	< 100	-	-	-	-	-
F4	10	< 100	-	-	-	-	-
F5	11,2	< 100	-	-	-	-	-
F6	14	< 100	-	-	-	-	-
F7	14,5	< 100	-	-	-	-	-
F8	15	< 100	-	-	-	-	-
F9	18,9	< 100	3,6	-	-	2,1	1,5
F10	19,8	100-120	3,8	-	-	2,6	2,1
F11	20,1	100-120	3,8	37,4	9,5	2,2	1,8
F12	21,9	100-120	3,9	38,2	13,1	2,5	1,3
F13	22,4	121-140	5,2	41,2	13,4	2,1	2,5
F14	22,7	121-140	5,1	45,9	8,2	2,6	2,3
F15	37,8	141-160	5,5	42,7	13,8	2,5	2,5
F16	39	141-160	5,6	43,3	14,2	2,9	2,8
F17	39	141-160	5,7	44,1	10,2	2,7	2,4
F18	40,2	161-180	5,2	40,2	12,1	3,1	3,1
F19	41,3	161-180	5,6	42,2	9,4	3,7	2,9
F20	58,7	181-200	3,9	35,9	12,4	4,3	2,2
F21	64	201-230	6,9	40,1	15,2	6,7	4,4
F22	72	> 231	12,7	45,3	15,1	7,3	4,7

2. Konventionelle lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Blutausstriche der Kälber und Feten wurden mit 8 verschiedenen Methoden (siehe Material und Methoden 2.1.-2.8.) gefärbt. Anschließend wurden die Ausstriche unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

2.1. Erythrozyten

2.1.1. Pränatal

Die ausgereiften Erythrozyten der Feten mit einer Größe von 7,2 μm bis 72 μm stellten sich als runde, kernlose Zellen dar. In der Mitte der Zellen konnte man teilweise eine zentrale Aufhellung erkennen. Sehr häufig waren sternförmige oder auch stechapfelförmige Erythrozyten zu erkennen, die als Fixierungsartefakte anzusehen sind. Erythrozyten mit spitzen Ausläufern werden auch als Akanthozyten oder Echinozyten bezeichnet. Einige Erythrozyten wiesen eine tropfenförmige Form auf; diese Zellen werden als Dakryozyten bezeichnet. Im fetalen Blut waren vor allem viele Erythrozytenvorstufen zu finden, auf die besonderes Augenmerk gelegt wurde. Die Erythroblasten kamen bei allen untersuchten Tieren gleich häufig vor. Pro Sichtfeld waren ca. 2-5 Erythroblasten zu sehen. Manche Erythroblasten waren dabei nur schwer von Lymphoblasten zu unterscheiden. Am häufigsten war der Proerythroblast zu erkennen, welcher noch mehr Zytoplasma um den Zellkern enthält als der basophile Erythroblast. Der Zellkern lag zentral oder leicht exzentrisch. Der basophile Erythroblast war ebenfalls häufig zu finden. Die kleine, ca 5-6 μm große Zelle besaß kaum Zytoplasma. Der Zellkern lag zentral. Die Erythrozyten und die Vorstufen wurden in 4 unterschiedlichen Färbungen beurteilt.

Tabelle 14: Übersichtsfärbungen Erythrozytenvorstufen, Fetus

Struktur	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim
Zellkern	Lila	Lila-dunkelblau	Hellblau	Lila-blau
Zytoplasma	Lila-blau	Lila-blau	Hellrot	Lila-blau

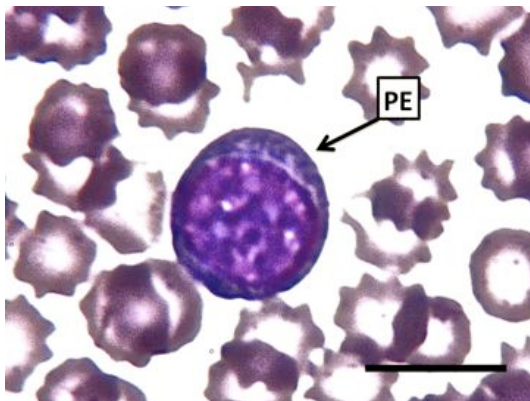


Abbildung 5: Proerythroblast, Diff-Quick-Färbung

(Fetus, m, SSL 72 cm)

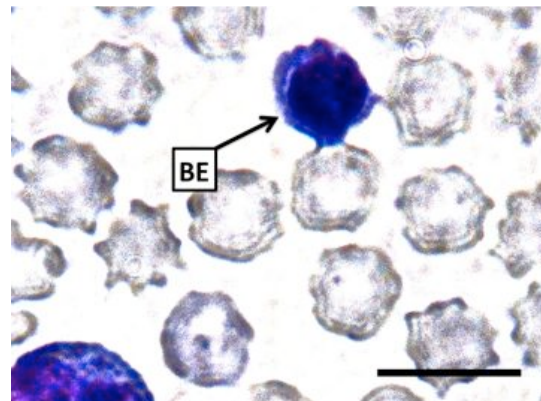


Abbildung 6: Basophiler Erythroblast, Giemsa Färbung

(Fetus, m, SSL 22,7 cm)

Um den Zellkern befindet sich mehr Zytoplasma als bei Erythroblasten. Um den Proerythroblasten (PE) befinden sich vermehrt Akanthozyten.

Der Zellkern liegt zentral und ist nur noch von wenig Zytoplasma umgeben.

SB = 10 μm

BE = Basophiler Erythroblast
SB = 10 μm

2.1.2. Postnatal

Wie bei den Ausstrichen der Feten waren auch beim Kalb Akanthozyten, Echinozyten und Dakryozyten zu finden, jedoch weniger häufig als beim fetalen Blut. Proerythroblasten und Erythroblasten waren nur sehr selten im Blut der Kälber zu sehen. Die Erythrozyten stellten sich ebenfalls als runde, kernlose Zellen mit teilweise zentraler Aufhellung dar.

Tabelle 15: Übersichtsfärbungen Erythrozyten, Kalb

Struktur	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim
Zytoplasma	Braun-rot	Blasses Rot	Hellrot	Blau

2.2. Thrombozyten

2.2.1. Pränatal

Die Thrombozyten stellten sich als kleine runde, ovale oder auch unregelmäßig geformte Zellen dar. Die Unterteilung in Hyalomer und Granulomer war beim fetalen Blut teilweise nur schwer zu erkennen. Die Thrombozyten traten in den Austrichen des fetalen Blutes meist in Gruppen auf. Ein Unterschied in Anzahl, Form und Größe konnte zwischen den Altersgruppen nicht dokumentiert werden. Vereinzelt waren sie auch zwischen den Erythrozyten und Granulozyten zu finden. Die Tabelle 16 zeigt eine Übersicht der Färbungen bei Thrombozyten der Feten und der Kälber. Die PAS-Färbung wird bei den Thrombozyten, je nach Stärke der Reaktion, mit +, ++ oder +++ bewertet, wobei + für eine sehr schwache Reaktion und +++ für eine starke Reaktion steht.

Tabelle 16: Übersichtsfärbungen Thrombozyten, Fetus und Kalb

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	PAS +,++,+++
Zytoplasma/ Hyalomer	Blasslila- braun	Hellblau- lila	Blassblau	Blau-braun	+++
Granula/ Granulomer	Kräftiges Lila	Lila	Helles Blau	Dunkles Lila	Blau

+++ starke Reaktion

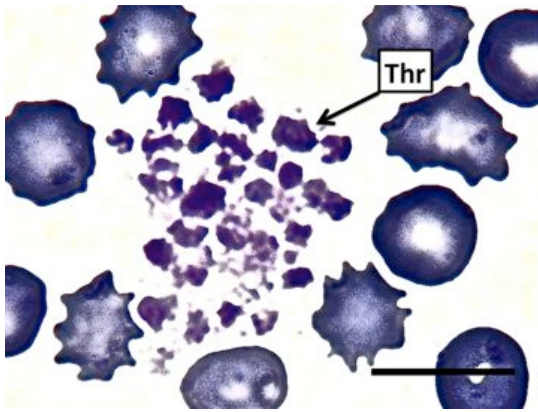


Abbildung 7: Thrombozytengruppe, Papanheim-Färbung (Fetus, m, SSL 11,2 cm)

Thrombozytengruppe zwischen Erythrozyten. Die Thrombozyten (Thr) sind unregelmäßig geformt.

SB = 10 µm

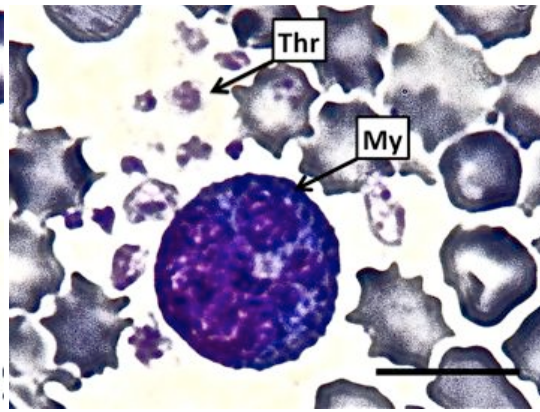


Abbildung 8: Thrombozyten, Papanheim-Färbung (Fetus, m, SSL 22,7 cm)

Thrombozyten (Thr) neben einem Myelozyten (My). Hyalomer und Granulomer sind bei den Thrombozyten gut zu erkennen.

SB = 10 µm

2.2.2. Postnatal

Im Unterschied zum fetalen Blut waren unregelmäßig geformte Thrombozyten weniger häufig zu finden.

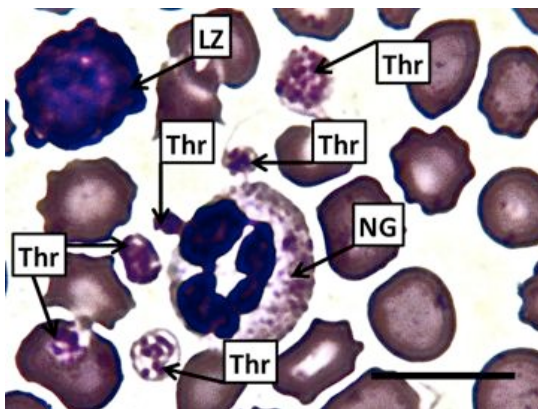


Abbildung 9: Thrombozyten, Diff-Quick-Färbung (Kalb, m, Alter: 15 min post natum)

Thrombozyten (Thr) neben Lymphozyten (LZ) und neutrophilen Granulozyten (NG). Hyalomer und Granulomer sind deutlich zu erkennen.

SB = 10 µm

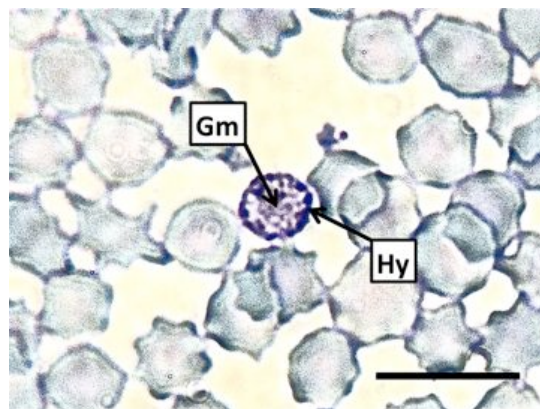


Abbildung 10: Thrombozyt, PAS-Färbung (Kalb ,w , Alter: 2,5 Std post natum)

Das Hyalomer (Hy) zeigt eine deutlich positive PAS-Reaktion. Das Granulomer (Gm) ist gut im Zentrum der Zelle zu erkennen.

SB = 10 µm

2.3. Lymphozyten

2.3.1. Pränatal

In den Übersichtsfärbungen des fetalen Blutes waren vor allem Lymphoblasten zu finden, die teilweise nur schwer von Erythroblasten und Myeloblasten zu unterscheiden waren. Die Anzahl der Lymphozyten und deren Vorstufen nahm mit steigender Größe der Feten zu. Auch ausgereifte Lymphozyten waren zu sehen. Die großen Lymphozyten stellten sich als runde Zellen mit großem Zellkern dar. Das den Zellkern umgebende Zytoplasma war jedoch noch größer als das bei den kleinen Lymphozyten, bei welchen der Zellkern fast komplett die Zelle ausfüllte. Teilweise fand man auch Lymphozyten, bei denen der Zellkern eingebuchtet war. Im Zytoplasma waren manchmal die kleinen Granula zu sehen. Lymphozyten und deren Vorgänger waren in großen Mengen in jedem Ausstrich zu finden. Die Tabelle 17 zeigt eine Zusammenfassung der Färbungen bei den Lymphozyten und Lymphoblasten beim Fetus. Bei der PAS-Färbung kam es kaum zu positiven Reaktionen. In der Alcianblau-Färbung kam es weder bei pH 1 noch bei pH 2,5 zu einer Anfärbung.

Tabelle 17: Übersichtsfärbungen Lymphozyten und Lymphoblasten

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim
Zytoplasma	Hell-lila	Grau-blau	Helles Blau	Blassblau
Zellkern	Leuchtend Lila-blau	Lila-blau	Hell-rosa	Lila

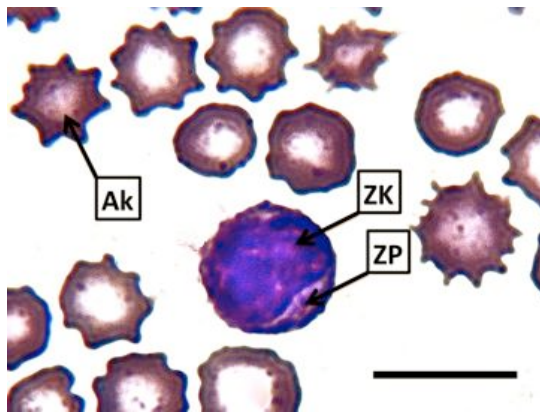


Abbildung 11: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung

(Fetus, m, SSL 72 cm)

Der Zellkern (ZK) des Lymphozyten ist eingebuchtet. Im Zytoplasma (ZP) sind feine Granula zu erkennen. Neben dem Lymphozyten sind Akanthozyten (Ak) zu sehen.

SB = 10 µm

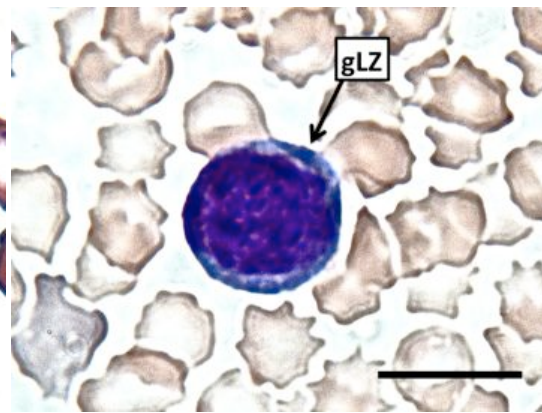


Abbildung 12: Großer Lymphozyt, Giemsa-Färbung

(Fetus, m, SSL 72 cm)

Der zentral liegende Zellkern ist von einem Zytoplasmasaum umgeben, in dem feine Granula zu sehen sind.

gLZ = großer Lymphozyt
SB = 10 µm

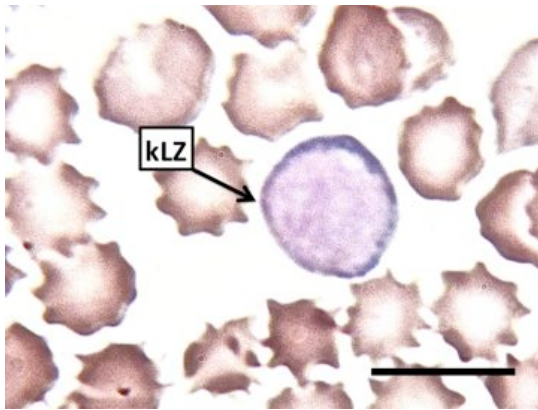


Abbildung 13: Kleiner Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung (Fetus, w, SSL 18,9 cm)

Der Zellkern füllt fast die komplette Zelle aus.

KLZ = kleiner Lymphozyt
SB = 10 µm

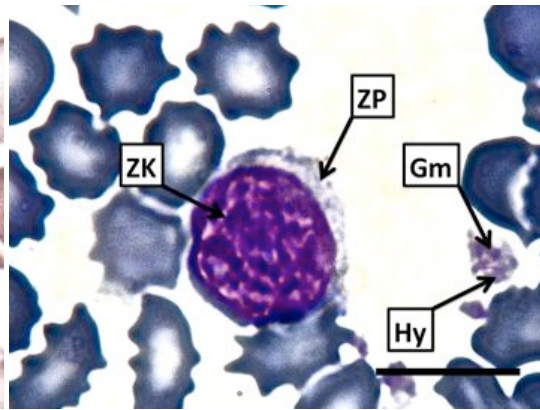


Abbildung 14: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung (Fetus, m, SSL 22,7 cm)

Der Zellkern (ZK) liegt exzentrisch in der Zelle. Im Zytoplasma (ZP) sind die feinen Granula zu sehen. Daneben ist ein Thrombozyt zu sehen, bei dem sich deutlich Hyalomer (Hy) und Granulomer (Gm) unterscheiden lässt.

SB = 10 µm

2.3.2. Postnatal

In den Ausstrichen der Kälber waren ebenfalls viele Lymphozyten zu finden. Lymphoblasten waren nicht mehr zu sehen. In der PAS-Färbung kam es zu einer deutlich stärkeren Reaktion im Zytoplasma der Lymphozyten. Die Anzahl der Lymphozyten wies eine steigende Tendenz mit dem steigenden Alter der Tiere auf. In Tabelle 18 sind die Färbungen der einzelnen Zellstrukturen beim Kalb zusammengefasst. In der Alcianblau-Färbung kam es zu keiner Reaktion. Die PAS-Färbung wird in einer eigenen Tabelle 19 behandelt, wobei + für eine schwache Reaktion steht.

Tabelle 18: Übersichtsfärbungen Lymphozyten, Kalb

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim
Zytoplasma	Helllila-blau	Blau	Helles Blau	Blassblau-blau
Zellkern	Leuchtend Lila	Leuchtend Lila	Blau-grau	Lila-blau

Tabelle 19: PAS-Färbung, Kalb

	PAS-Färbung
Farbe des Zellkerns	Grau-blau
Farbe des Zytoplasmas	Grau-blau
Farbe der Granula	Blau
Stärke der PAS-Reaktion	+
Art der Anfärbung	Dunkelblau
Lokalisation	Granulär

+ schwache Reaktion

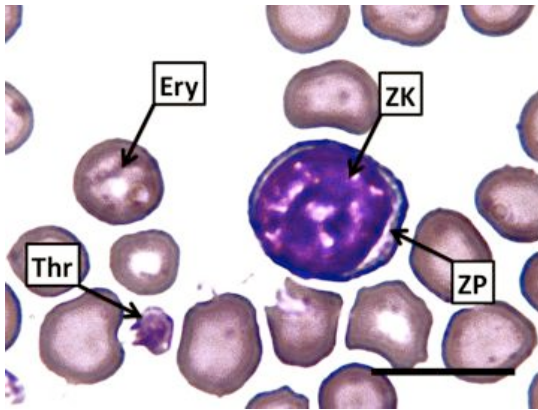


Abbildung 15: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung (Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Der Zellkern (ZK) liegt exzentrisch in der Zelle. Im Zytoplasma (ZP) sind feine Granula zu sehen.

Ery = Erythrozyt
Thr = Thrombozyt
SB = 10 µm

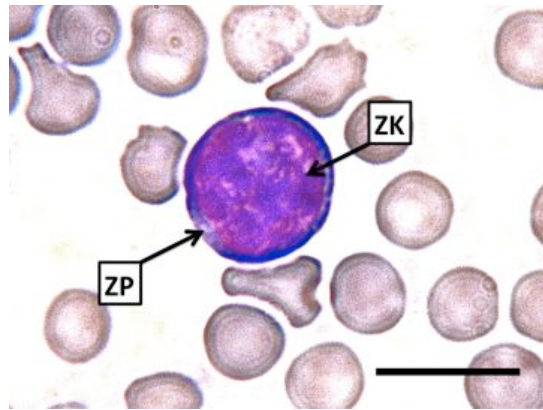


Abbildung 16: Lymphozyt, Giemsa-Färbung (Kalb, w, Alter: 10 Std post natum)

Um den Zellkern (ZK) ist nur noch ein feiner Zytoplasmasaum (ZP) zu erkennen

SB = 10 µm

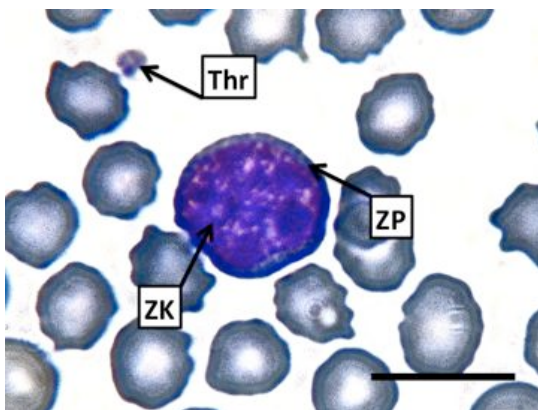


Abbildung 17: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung (Kalb, m, Alter: 5 Std post natum)

Der Zellkern (ZK) ist leicht eingebuchtet.

Thr = Thrombozyt
ZP = Zytoplasma
SB = 10 µm

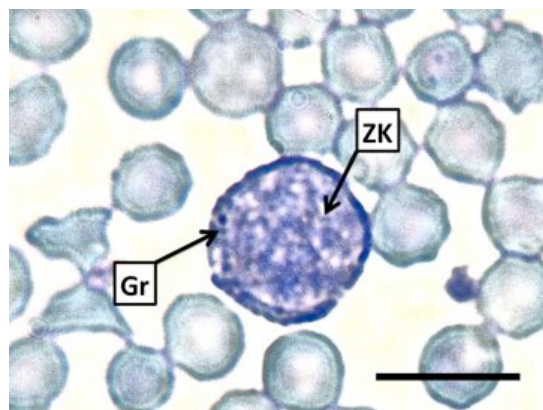


Abbildung 18: Lymphozyt, PAS-Färbung (Kalb, w, Alter: 7 Std post natum)

Im Zytoplasma sind leicht PAS-positive Granula (Gr) zu erkennen. Der Zellkern (ZK) liegt etwas exzentrisch.

SB = 10 µm

2.4. Neutrophile Granulozyten

2.4.1. Pränatal

Im fetalen Blut konnten besonders viele Myelozyten gefunden werden. Der Zellkern war eingebuchtet und lag zentral oder auch exzentrisch in der Zelle. Myelozyten besaßen weniger Zytoplasma und waren mit 13-20 µm teils größer als die ausgereiften Granulozyten (10-15 µm). In Abhängigkeit von der Färbung waren die Granula unterschiedlich deutlich zu erkennen. Auch waren in den Ausstrichen jugendliche, stabkernige und reife, segmentkernige Granulozyten zu finden, jedoch nur in sehr geringem Ausmaß und bei den größeren SSL.

Die Ergebnisse der Färbung beim fetalen Blut sind in der Tabelle 20 aufgelistet, die der PAS-Färbung und Alcianblau-Färbung pH 2,5 in Tabelle 21.

Tabelle 20: Übersichtsfärbungen neutrophiler Granulozyten und Myelozyten, Fetus

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim
<u>Neutrophiler Granulozyt</u>				
Zytoplasma	Blass-Lila	Blass-Rosa	Rosa	Rötlich
Zellkern	Lila	Lila	Blau	Lila
Granula	Dunkel-Lila	Blass-Grau	Dunkelrosa	Bläulich
<u>Myelozyt</u>				
Zytoplasma	Dunkel-Lila	Blau	Blass-Rosa	Blau
Zellkern	Lila	Lila	Hellblau	Lila
Granula	Blau-Lila	Blau	Rosa	Dunkelblau

Tabelle 21: PAS-Färbung und Alcianblau-Färbung neutrophile Granulozyten, Fetus

	Alcianblau pH 2,5	PAS-Färbung
Farbe des Zellkerns	Pink	Dunkellila
Farbe des Zytoplasmas	Blassblau	Hellrosa
Farbe der Granula	Blau	Blasslila
Stärke der PAS-Reaktion	+++	+
Art der Anfärbung	Intensiv Blau	Lila
Lokalisation	Granulär	Granulär

+ schwache Reaktion

+++ starke Reaktion

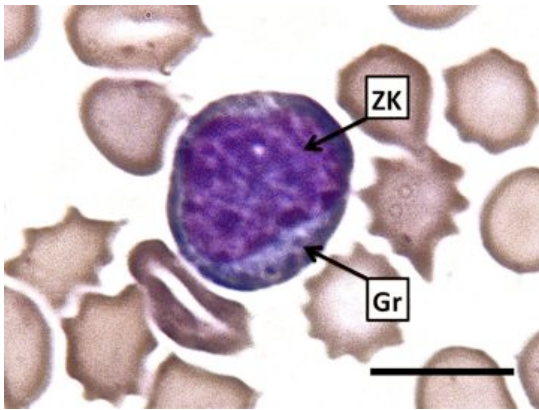


Abbildung 19: Myelozyt, Diff-Quick-Färbung
(Fetus, m, SSL 22,4 cm)

Der Zellkern (ZK) des Myelozyten erscheint deutlich eingebuchtet. Im Zytoplasma sind die Granula (Gr) zu erkennen.

SB = 10 µm

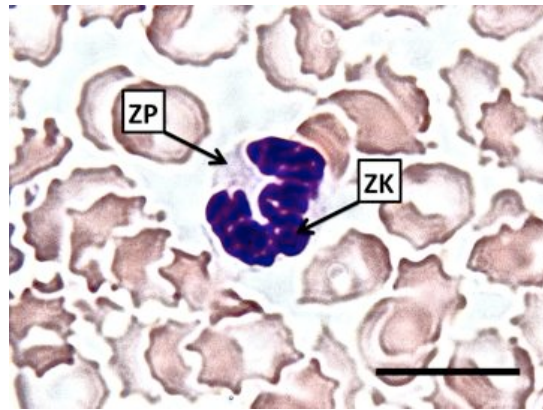


Abbildung 20: Neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung
(Fetus, m, SSL 72 cm)

Die Zelle ist kleiner als ein Myelozyt, im Zytoplasma (ZP) sind kaum Granula zu sehen. Der Zellkern (ZK) beginnt mit der Segmentierung.

SB = 10 µm

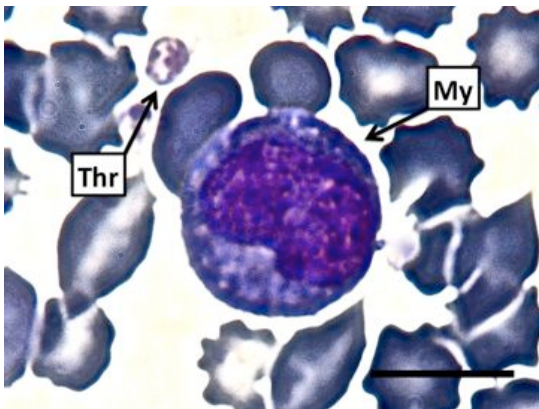


Abbildung 21: Myelozyt, Pappenheim-Färbung
(Fetus, m, SSL 22,7 cm)

Ein Myelozyt (My) mit deutlichen Granula und eingebuchteten Zellkern. Daneben ist ein Thrombozyt (Thr) zu sehen.

SB = 10 µm



Abbildung 22: Neutrophiler Granulozyt, PAS-Färbung
(Fetus, m, SSL 11,2 cm)

Im Zytoplasma ist eine leicht positive Reaktion zu erkennen (Pfeile).

SB = 10 µm

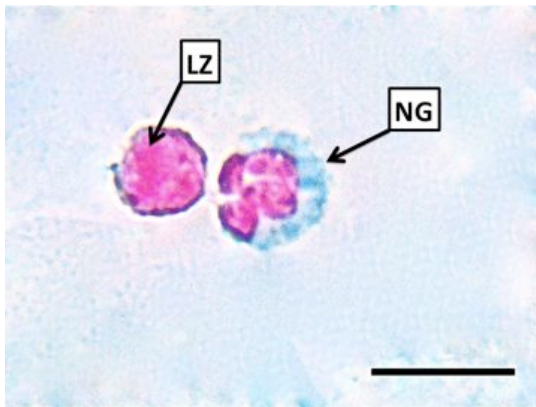


Abbildung 23: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5 (Fetus, m, SSL 14,5 cm)

Der neutrophile Granulozyt (NG) zeigt eine deutlich positive Reaktion im Bereich der Granula. Der Lymphozyt (LZ) ist negativ.

SB = 10 µm

2.4.2. Postnatal

Bei den Kälbern waren keine Vorstufen von Granulozyten zu finden. In den Ausstrichen waren sehr häufig stabkernige und segmentkernige Granulozyten zu sehen. Die stabkernigen waren mittelgroß und besaßen viel Zytoplasma. Der Zellkern lag meist am Rand der Zelle und es war kaum Granula zu finden. Bei den segmentkernigen Granulozyten befand sich der Zellkern oft in der Mitte der Zelle. Die unterschiedlich großen Segmente waren oft durch fadenförmiges Chromatin verbunden. Oftmals überlagerten sich die Segmente im Ausstrich gegenseitig, so dass die Einteilung schwierig war. Im Zytoplasma waren die Granula meist gut zu erkennen. Die PAS-Reaktion war hier viel intensiver als beim fetalen Blut. Die Granula färbten sich auch in der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 intensiv blau.

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse der Färbungen bei den neutrophilen Granulozyten des Kalbes, Tabelle 23 die Ergebnisse der PAS-Färbung und Alcianblau-Färbung pH 2,5.

Tabelle 22: Übersichtsfärbungen neutrophile Granulozyten, Kalb

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim
Zytoplasma	Rosa-rötlich	Rötlich-braun	Hellrosa	Rötlich
Zellkern	Lila-rötlich	Lila	Blau	Lila-blau
Granula	Lila	Braun-rot	Dunkelrosa	Braun-lila

Tabelle 23: PAS-Färbung neutrophiler Granulozyt, Kalb

	Alcianblau pH 2,5	PAS-Färbung
Farbe des Zellkerns	Pink	Hellblau
Farbe des Zytoplasmas	Blassblau	Rosa
Farbe der Granula	Blau	Lila
Stärke der PAS-Reaktion	+++	++
Art der Anfärbung	Intensiv blau	Dunkelblau
Lokalisation	Granulär	Granulär

++ mittelstarke Reaktion

+++ starke Reaktion

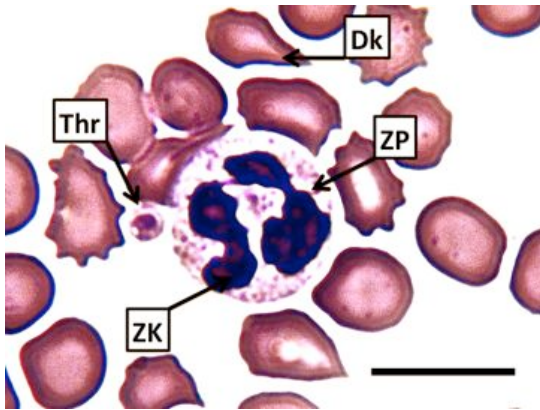


Abbildung 24: Neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung
(Kalb, m, Alter: 15 min post natum)

Der Zellkern (ZK) ist segmentiert. Im Zytoplasma (ZP) sind die Granula zu erkennen. Beim Thrombozyten (Thr) sind die beiden Zonen deutlich zu erkennen. Oberhalb des Granulozyten ist ein Dakryozyt (Dk) zu sehen.

SB = 10 µm

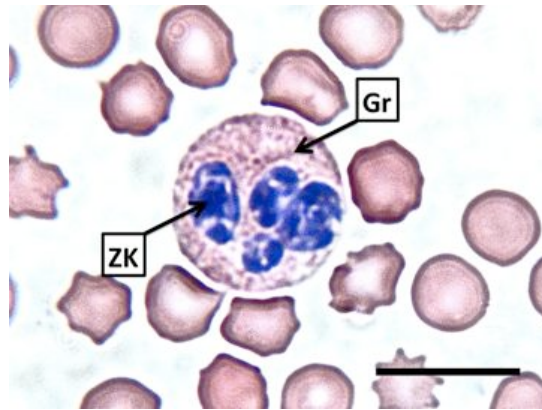


Abbildung 25: Neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung
(Kalb, m, Alter: 5 Std post natum)

Der Zellkern (ZK) ist segmentiert. Die Granula (Gr) sind deutlich zu sehen.

SB = 10 µm

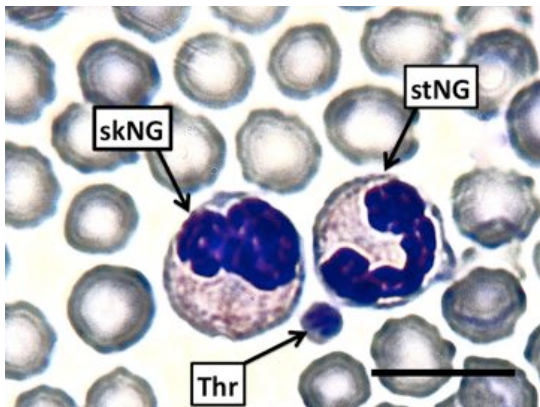


Abbildung 26: Segmentkerniger und stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung
(Kalb, m, Alter: 5 Std post natum)

Die Granula sind beim segmentkernigen Granulozyten (skNG) deutlicher zu erkennen als beim stabkernigen Granulozyten (stNG).

Thr = Thrombozyt
SB = 10 µm

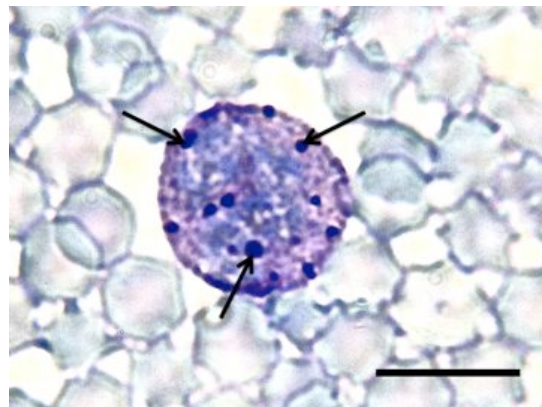


Abbildung 27: Neutrophiler Granulozyt, PAS-Färbung
(Kalb, w, Alter: 2,5 Std post natum)

Es ist eine deutlich positive granuläre Reaktion zu sehen (Pfeile).

SB = 10 µm

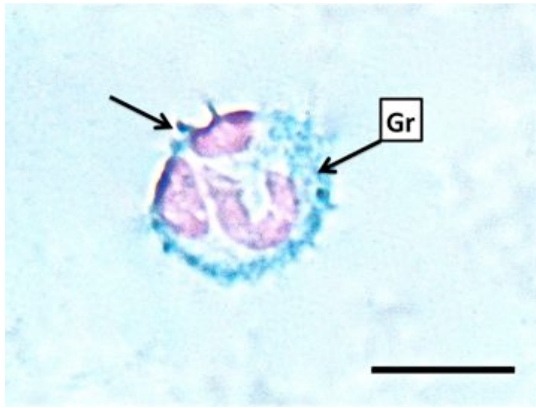


Abbildung 28: Neutrophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5 (Kalb, m, Alter: 9 Std post natum)

Die Granula (Gr) färben sich am Rand der Zelle intensiv blau. Außerhalb der Zelle kann man gelöste Granula erkennen (Pfeil).

SB = 10 µm

2.5. Eosinophile Granulozyten

2.5.1. Pränatal

Die eosinophilen Granulozyten waren ab dem Stadium des Promyelozyten im Blut zu erkennen. Je jünger der Fetus, desto weniger häufig waren sie zu finden. Bei den älteren Feten waren sie häufiger zu sehen. Der meist zentral gelegene Kern zeigte oft keine Lobulierung. Leicht segmentierte Kerne waren nur bei älteren Feten gegen Ende der Gravidität zu beobachten. Als eosinophilen-spezifische Färbung wurde die Sirius Red-Färbung durchgeführt, in der sich die eosinophilen Granulozyten durch die tief-roten Granula erkennen lassen. Aber auch in den anderen Übersichtsfärbungen konnten eosinophile Granulozyten eindeutig identifiziert werden. In der PAS-Färbung und in der Alcianblau-Färbung zeigten eosinophile Granulozyten keine positive Reaktion.

Tabelle 24: Übersichtsfärbung eosinophile Granulozyten, Fetus

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	Sirius Red
Zytoplasma	Blau	Blassrosa	Bläulich	Grau-blau	Grau-blau
Zellkern	Dunkelblau-lila	Tief-violett	Blau-lila	Lila	Blau
Granula	Rot-orange	Pink	Rot	Rot-orange	Rot-pink

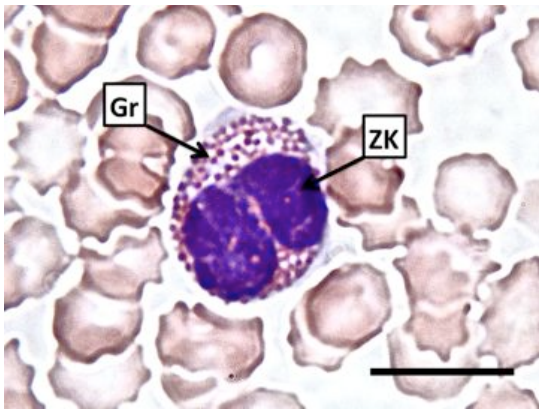


Abbildung 29: Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung
(Fetus, m, SSL 72 cm)

Der Zellkern (ZK) ist zweigelappt. Die Granula (Gr) sind deutlich pinkfarben.

SB = 10 µm

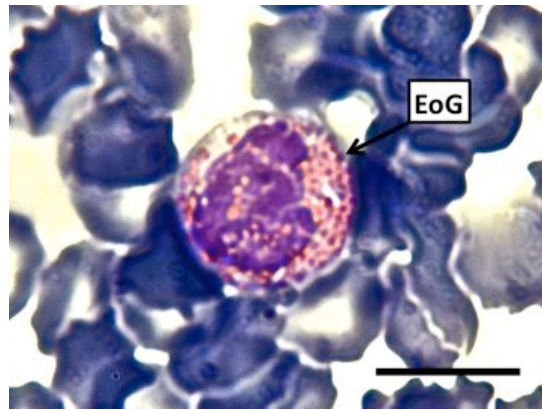


Abbildung 30: Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung
(Fetus, m, SSL 22,4 cm)

Der Kern des eosinophilen Granulozyt (EoG) ist gelappt und liegt zentral. Die Granula stellen sich deutlich dar und bilden sich auch auf dem Kern ab.

SB = 10 µm

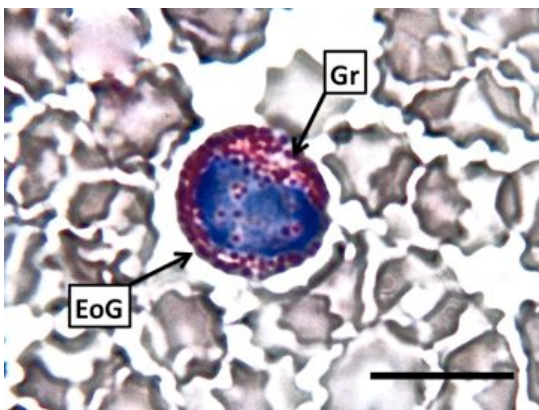


Abbildung 31: Eosinophiler Granulozyt, Sirius-Red-Färbung
(Fetus, m, SSL 22,4 cm)

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten (EoG) sind in dieser Färbung deutlich rot-pink gefärbt.

SB = 10 µm

2.5.2. Postnatal

Im Blut der Kälber waren eosinophile Granulozyten sehr selten zu finden. Der Kern war meist segmentiert. Der einzige Unterschied zwischen den eosinophilen Granulozyten des Kalbes und des Fetus lag in der unterschiedlichen Beschaffenheit des Zellkerns. Beim Fetus waren die Zellkerne meist nicht gelappt. Die Kerne der Kälber waren oft zweigelappt.

Tabelle 25: Übersichtsfärbungen eosinophile Granulozyten, Kalb

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	Sirius Red
Zytoplasma	Blau	Blassrosa	Bläulich	Grau-blau	Grau-blau
Zellkern	Dunkelblau-lila	Tief-violett	Blau-lila	Lila	Blau
Granula	Rot-orange	Orange-rot	Rot	Rot-orange	Rot-pink

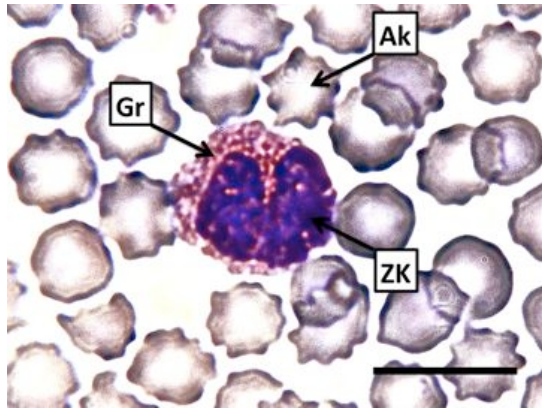


Abbildung 32: Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung (Kalb, m, Alter: 45 min post natum)

Die Granula (Gr) bedecken teils den Zellkern (ZK). Neben dem Eosinophilen sind Akanthozyten (Ak) zu sehen.

SB = 10 µm

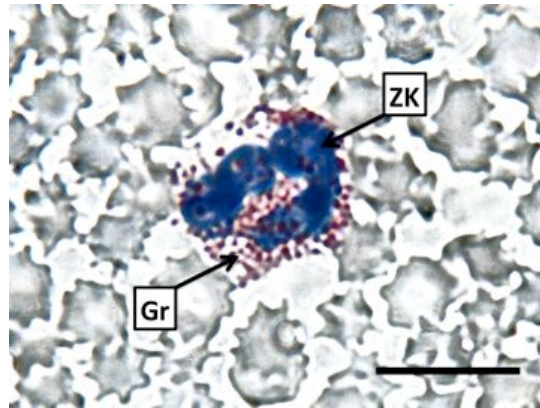


Abbildung 33: Eosinophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung (Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Die Granula (Gr) sind tief rot-pink. Der Zellkern (ZK) ist zweigelappt.

SB = 10 µm

2.6. Basophile Granulozyten

2.6.1. Pränatal

Die basophilen Granulozyten waren eindeutig nur in der May-Grünwald-, PAS- und Toluidinblau-Färbung zu identifizieren. In der Alcianblau-Färbung waren die basophilen Granulozyten nicht eindeutig zu identifizieren. Im fetalen Blut waren sie äußerst selten zu finden. Der Zellkern war mehrfach gelappt, war aber meist durch die großen und intensiv gefärbten Granula überdeckt. Die Toluidinblau-Färbung war spezifisch für die basophilen Granulozyten, jedoch waren hier die Granula oft nicht mehr zu erkennen, da die sich beim Färbedurchgang lösten. Die basophile Zelle an sich, war aber noch eindeutig zu erkennen. Das Zytoplasma war durch die dichten Granula in der May-Grünwald- und Toluidin-Färbung nicht zu erkennen.

Tabelle 26: Übersichtsfärbungen basophile Granulozyten, Fetus

	May-Grünwald	Toluidinblau
Zytoplasma	-	-
Zellkern	Blau	Blau-lila
Granula	Dunkelviolet	Hellviolet

Tabelle 27: PAS-Färbung basophiler Granulozyt, Fetus

	PAS-Färbung
Farbe des Zellkerns	Blau
Farbe des Zytoplasmas	Lila
Farbe der Granula	Lila
Stärke der PAS-Reaktion	++
Art der Anfärbung	Dunkelblau-lila
Lokalisation	Granulär

++ mittelstarke Reaktion

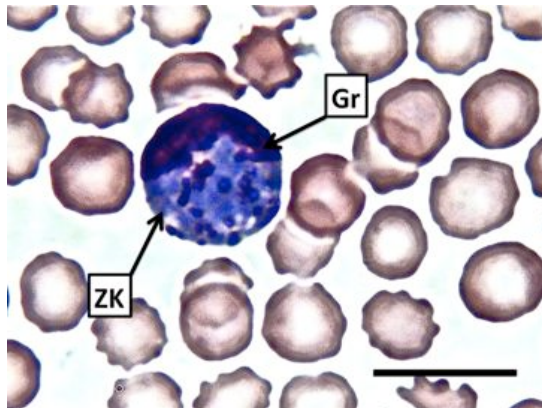


Abbildung 34: Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung (Fetus, w, SSL 18,9 cm)

Die Granula (Gr) liegen extrem dicht und überlagern teilweise den Zellkern (ZK).

SB = 10 µm

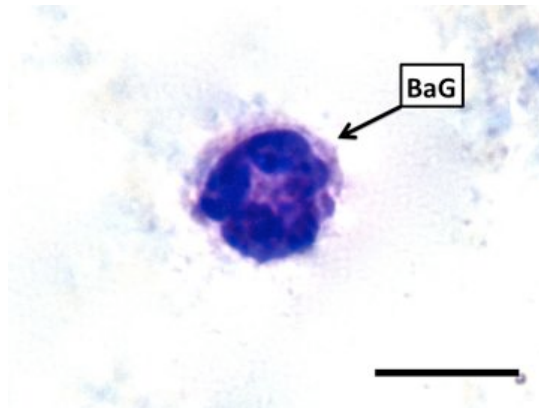


Abbildung 35: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung (Fetus, m, SSL 22,4 cm)

Die Granula des basophilen Granulozyten (BaG) sind ausgewaschen, ihre ursprüngliche Lokalisation ist aber noch durch die violette Färbung des Zytoplasmas zu erkennen.

SB = 10 µm

2.6.2. Postnatal

In den Ausstrichen der Kälber waren die basophilen Granulozyten ebenfalls selten zu finden (ca. 2-4 pro Ausstrich). Die Reaktion in der PAS-Färbung war deutlich stärker.

Tabelle 28: Übersichtsfärbungen basophile Granulozyten, Kalb

	May-Grünwald	Toluidinblau
Zytoplasma	-	-
Zellkern	Hellblau	Dunkelblau
Granula	Dunkelviolet	Tiefviolet

Tabelle 29: PAS-Färbung basophile Granulozyten, Kalb

	PAS-Färbung
Farbe des Zellkerns	Blau
Farbe des Zytoplasmas	Lila
Farbe der Granula	Lila
Stärke der PAS-Reaktion	+++
Art der Anfärbung	Dunkelblau-lila
Lokalisation	Granulär

+++ starke Reaktion

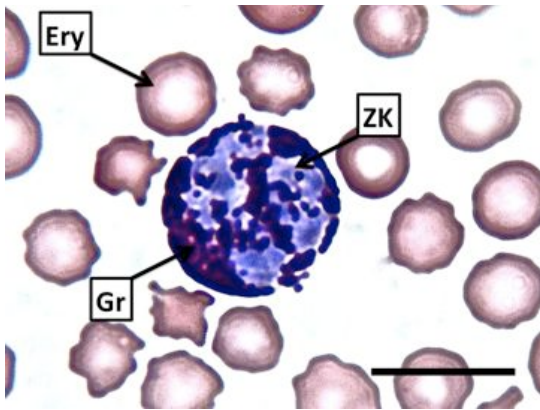


Abbildung 36: Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung
(Kalb, w, Alter: 2,5 Std post natum)

Die Granula (Gr) liegen extrem dicht, so dass das Zytoplasma kaum zu erkennen ist. Der Zellkern (ZK) ist ebenfalls teilweise von den Granula überdeckt.

SB = 10 µm

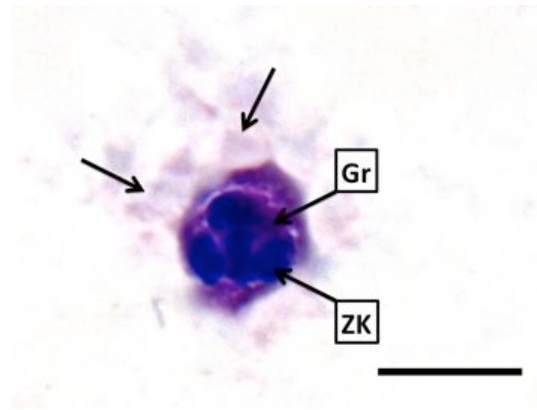


Abbildung 37: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung
(Kalb, m, Alter: 1 Std post natum)

Die Granula (Gr) sind in der Nähe des Zellkerns (ZK) noch gut zu erkennen. Um die Zelle herum sind die ausgewaschenen Granula zu erkennen (Pfeile).

SB = 10 µm

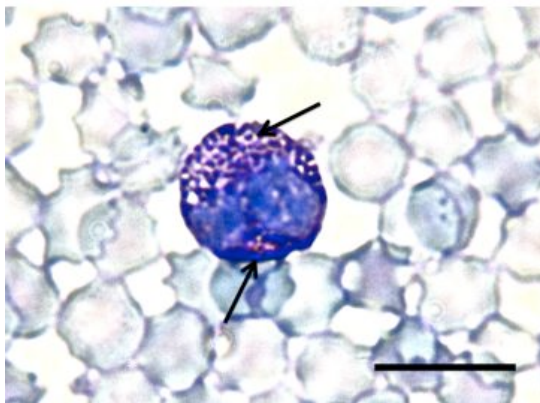


Abbildung 38: Basophiler Granulozyt, PAS-Färbung
(Kalb, w, Alter: 2,5 Std post natum)

Es ist eine deutlich positive granuläre Reaktion zu erkennen (Pfeile).

SB = 10 µm

2.7. Monozyten

2.7.1. Pränatal

Die Monozyten im fetalen Blut waren neben den Myelozyten die größten Zellen in den Ausstrichen. Der Kern war meist bohnenförmig oder leicht eingebuchtet. Vakuolen waren bei den meisten Monozyten zu sehen. Bei den Vorstufen der Monozyten, den Monoblasten, waren noch keine Vakuolen zu erkennen. Im Zytoplasma waren teilweise die feinen Granula zu erkennen. Bei der PAS-Färbung und Alcianblau-Färbung zeigten Monozyten keine Reaktion.

Tabelle 30: Übersichtsfärbungen Monozyten und Monoblasten, Fetus

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim
Zytoplasma	Dunkelviolett	Hellblau	Hellblau	Blasslila-blau
Zellkern	Lila	Lila	Blau	Lila

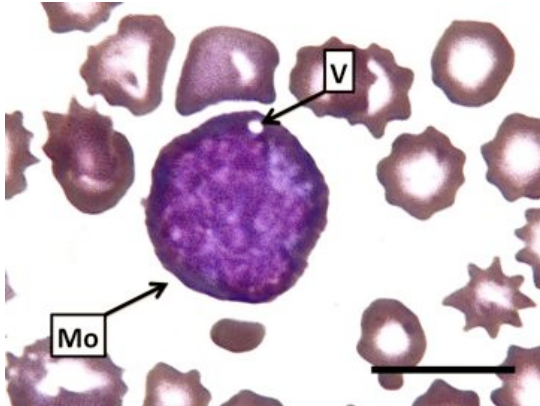


Abbildung 39: Monozyt, Diff-Quick-Färbung (Fetus, m, SSL 72 cm)

Im Bild ist ein Monozyt (Mo) mit eingebuchteten Zellkern und kleiner Vakuole (V) zu sehen.

SB = 10 µm

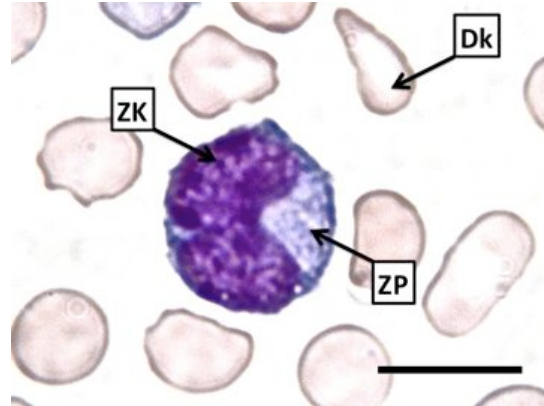


Abbildung 40: Monozyt, Giemsa-Färbung (Fetus, m, SSL 11,2 cm)

Im Zytoplasma (ZP) sind feine Granula zu sehen. Der Zellkern (ZK) ist bohnenförmig und liegt exzentrisch in der Zelle. Oben im Bild ist ein Dakryozyt (Dk) zu erkennen.

SB = 10 µm

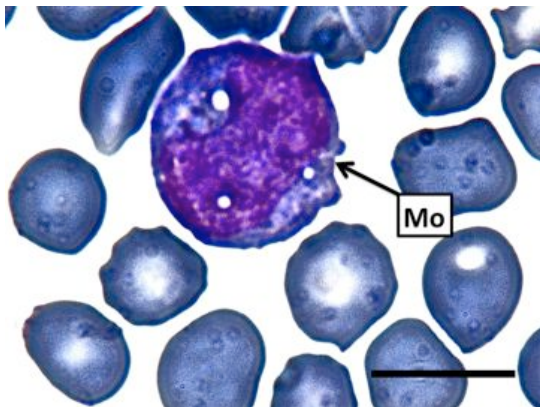


Abbildung 41: Monozyt, Pappenheim-Färbung (Fetus, m, SSL 11,2 cm)

Das Bild zeigt einen Monozyten (Mo) mit drei Vakuolen und eingebuchteten Zellkern.

SB = 10 µm

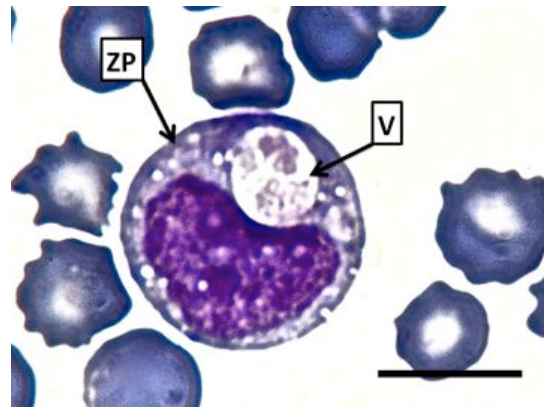


Abbildung 42: Monozyt, Pappenheim-Färbung (Fetus, m, SSL 22,4 cm)

Im Zytoplasma (ZP) sind sehr viele und teilweise sehr große Vakuolen (V) zu sehen.

SB = 10 µm

2.7.2. Postnatal

Zwischen den Monozyten der Kälber und der Feten waren keine morphologischen Unterschiede zu erkennen. Auch hier lagen die Zellkerne exzentrisch und waren meist bohnenförmig.

Tabelle 31: Übersichtsfärbungen Monozyten, Kalb

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim
Zytoplasma	Dunkelviolett	Hellblau-lila	Hellblau	Blasslila-blau
Zellkern	Lila	Lila	Blau	Lila

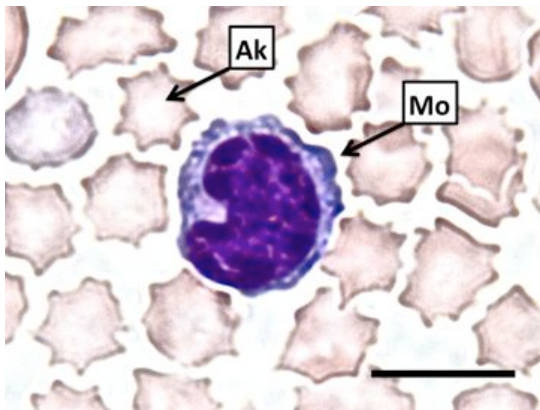


Abbildung 43: Monozyt, Giemsa-Färbung (Kalb, m, Alter: 1 Std post natum)

Der Monozyt (Mo) ist von Akanthozyten (Ak) umgeben.

SB = 10 µm

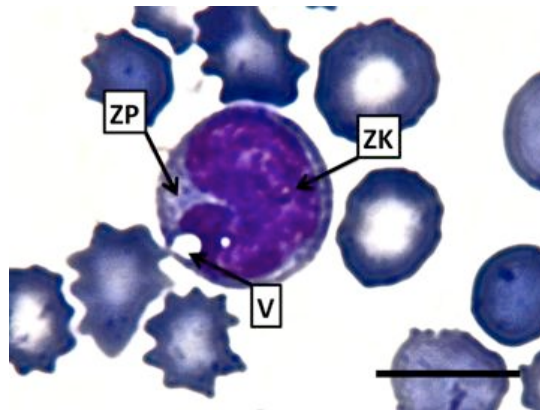


Abbildung 44: Monozyt, Pappenheim-Färbung (Kalb, m, Alter: 5 Std post natum)

Neben dem bohnenförmigen Zellkern (ZK) sind Vakuolen (V) zu erkennen. Im Zytoplasma (ZP) lassen sich die feinen Granula erahnen.

SB = 10 µm

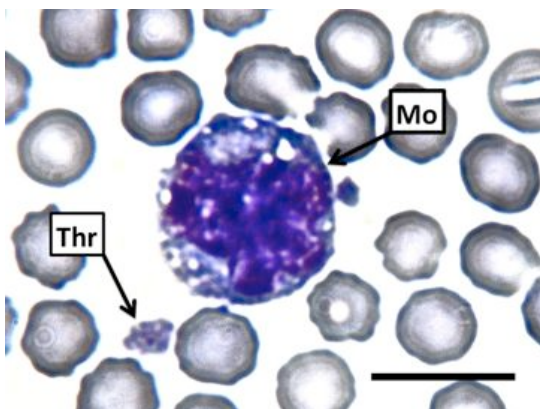


Abbildung 45: Monozyt, Pappenheim-Färbung (Kalb, w, Alter: 10 Std post natum)

Das Bild zeigt einen Monozyten (Mo) mit vielen Vakuolen.

SB = 10 µm

3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.1. Erythrozyten

3.1.1. Pränatal

Die Erythrozyten der Feten stellen sich als Zellen mit glatter Zellmembran und homogenen Inhalt dar. In den Vorläuferzellen, den Erythroblasten, waren zentral gelegene Zellkerne, als auch elektronendurchlässige Vakuolen im Zytoplasma zu finden. Bei einigen wenigen Erythroblasten konnten ferritinhaltige Granula gesehen werden.

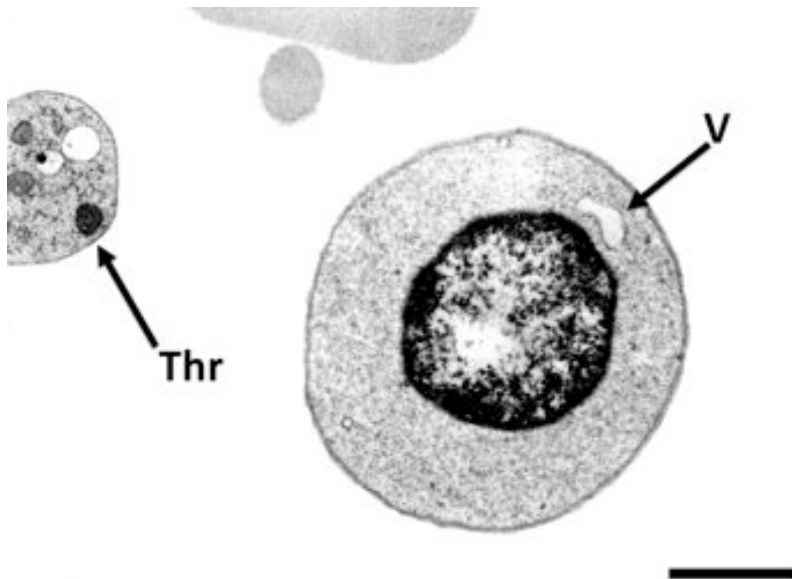


Abbildung 46: Erythroblast und Thrombozyt
(Fetus, w, SSL 9,1 cm)

Im Zytoplasma des Erythroblasten sind Vakuolen (V) zu erkennen. Das Zytoplasma ist homogen. Im Zytoplasma des Thrombozyten (Thr) sind „dense bodies“ und α -Granula zu sehen.

SB = 2 μ m

3.1.2. Postnatal

Die roten Blutzellen der Kälber stellten sich durchgehend als unregelmäßige sichel- bis napfförmige Zellen dar. Sie besitzen eine glatte Zellmembran und einen homogenen Zellinhalt, das Zytoplasma. Im Blut der Kälber waren keine Vorläuferzellen der Erythrozyten zu finden.

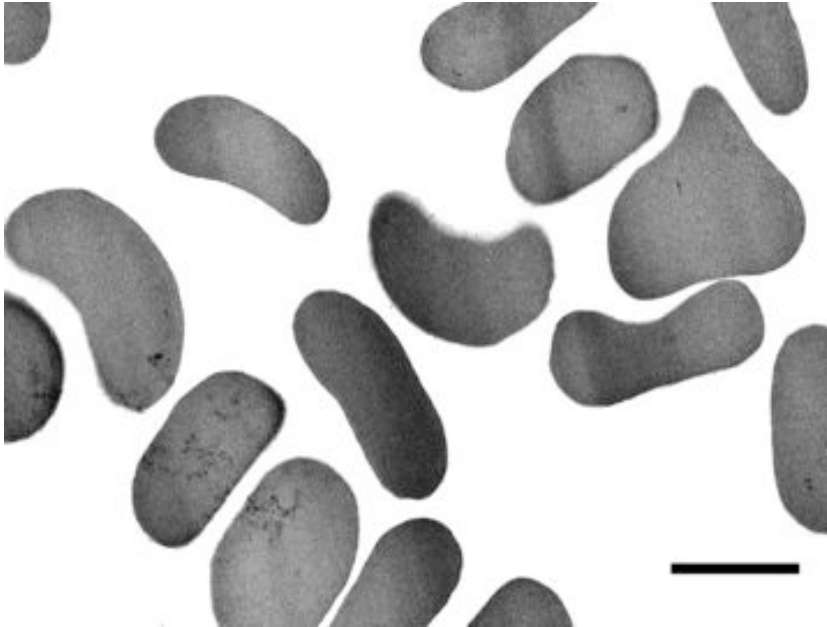


Abbildung 47: Erythrozyten
(Kalb, m, 1 Std post natum)

Die Erythrozyten besitzen einen homogenes Zytoplasma und eine glatte Zellmembran.

SB = 2 μ m

3.2. Thrombozyten

3.2.1. Pränatal

Die Thrombozyten der Feten wiesen eine Größe von 1,3 – 4 μm auf und variierten somit stark in ihrer Größe. Ihre Zellmembran war glatt und sie wiesen unregelmäßige Formen auf. Im Zytoplasma konnten zwei auffällige Zellstrukturen festgestellt werden. Die „dense bodies“, welche mit ihrem charakteristischem, exzentrisch gelegenen und elektronendichten Kern besonders gut von den großen, runden, ebenfalls elektronendichten α -Granula zu unterscheiden sind. Die α -Granula kommen im Zytoplasma der Thrombozyten weit häufiger vor als die „dense bodies“. In einigen Thrombozyten konnten außerdem Vakuolen gesehen werden.

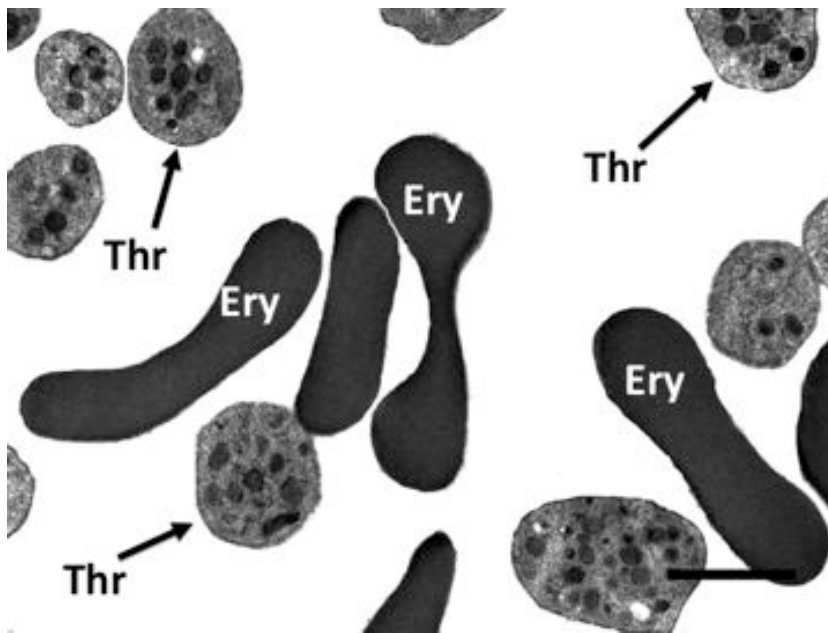


Abbildung 48: Thrombozyten und Erythrozyten
(Fetus, w, SSL 19,8 cm)

Es sind Thrombozyten (Thr) mit ihren Zellstrukturen zu sehen. Es sind vor allem die α -Granula zu erkennen. In der Mitte befinden sich einige Erythrozyten (Ery).

SB = 2 μm

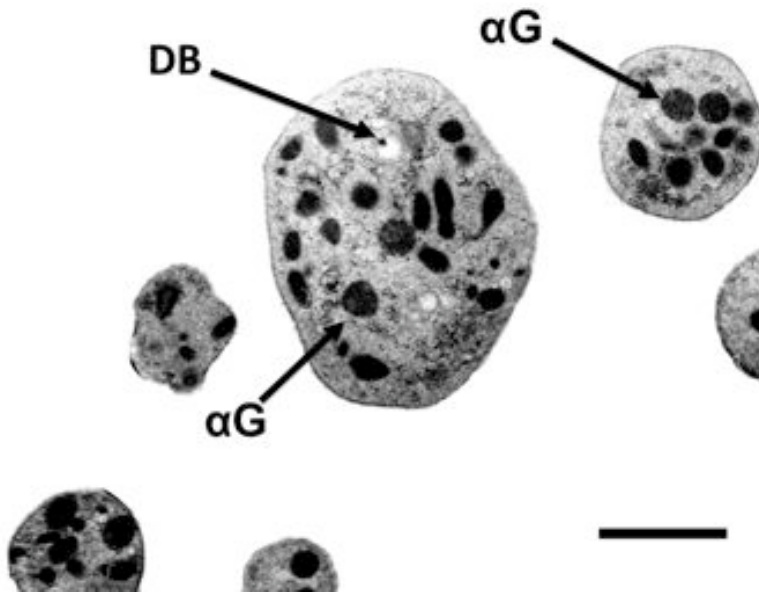


Abbildung 49: Thrombozyten
(Fetus, w, SSL 19,8 cm)

Der in der Mitte liegende, große Thrombozyt weist viel α -Granula (α G) und einen „dense body“ (DB) im Zytoplasma auf.

SB = 1 μ m

3.2.2. Postnatal

Die Blutplättchen der Kälber wiesen die gleiche unregelmäßige ovale bis runde Form wie die der Feten auf. Das Zytoplasma enthielt, wie bei den Feten auch, α -Granula, „dense bodies“ und einige Vakuolen. Auffällig war das häufig vorkommende Glykogen in den Thrombozyten, welches bei den Feten in weit geringerer Menge zu sehen war.

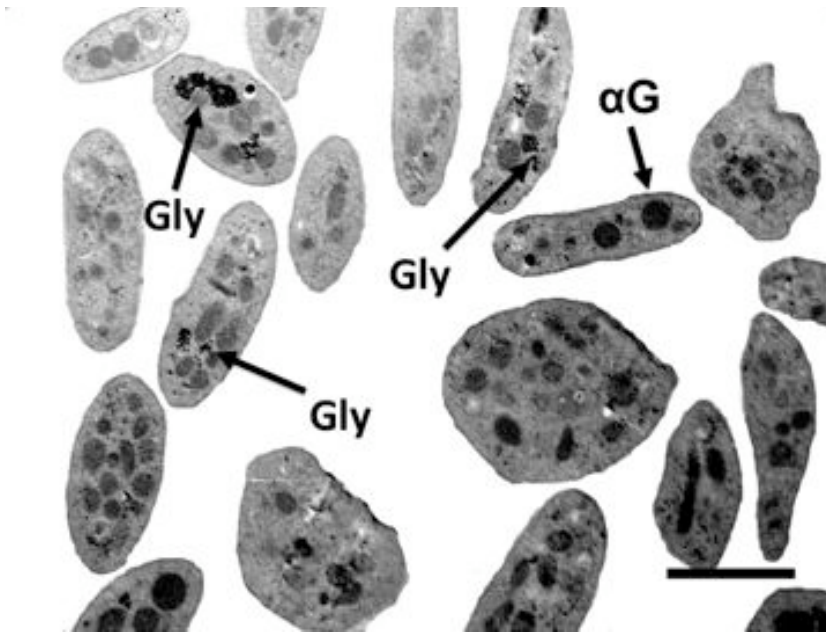


Abbildung 50: Thrombozyten
(Kalb, w, 4 Std post natum)

In dieser Thrombozytengruppe lässt sich besonders viel Glykogen (Gly) nachweisen. „Dense bodies“ und α -Granula (α G) sind ebenfalls zu sehen.

SB = 2 μ m

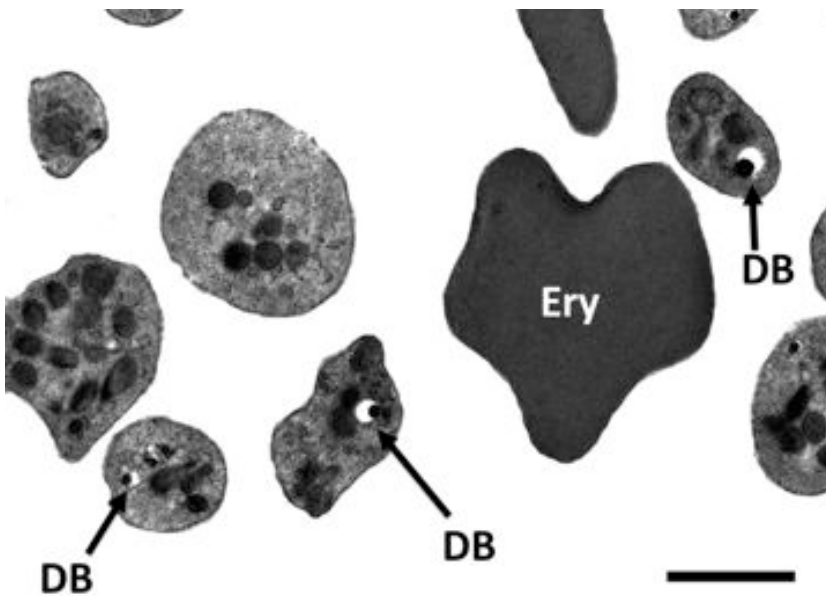


Abbildung 51: Thrombozyten
(Kalb, w, 4 Std post natum)

Bei diesen Thrombozyten sind die charakteristischen „dense bodies“ (DB) besonders gut zu erkennen.

SB = 2 μ m

3.3. Lymphozyten

3.3.1. Pränatal

Die Lymphozyten waren bei allen untersuchten SSL nachweisbar. Sie hatten unterschiedliche Größen, die von 6 – 12 μm reichten. Ihre Zellmembran war glatt und wies bei einigen der Lymphozyten auch Pseudopodien auf. Der Kern war meist rund geformt, hatte aber auch oft Einziehungen und lag exzentrisch in der Zelle. Im Zytoplasma das bei einigen Zellen nur noch aus einem kleinen Saum bestand, waren oft Mitochondrien zu finden. Des Weiteren konnten in wenigen Lymphozyten elektronendichte Granula gesehen werden.

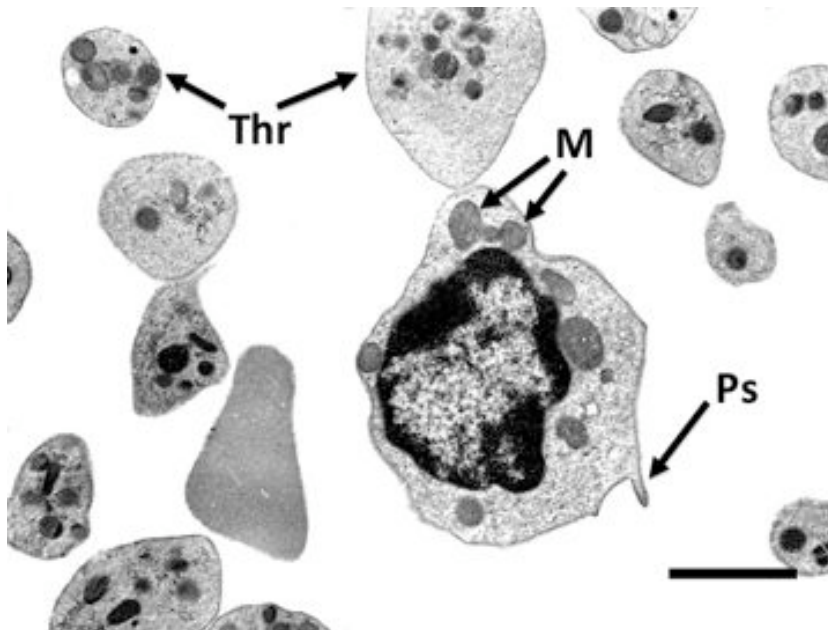


Abbildung 52: Lymphozyt und Thrombozyten
(Fetus, w, SSL 58,7 cm)

Der Lymphozyt besitzt viele Mitochondrien (M) im Zytoplasma. Die Zellmembran weist Pseudopodien auf (Ps). Um den Lymphozyten sind Thrombozyten zu erkennen (Thr).

SB = 2 μm

3.3.2. Postnatal

Die Lymphozyten der Kälber stellten sich als runde Zellen mit exzentrisch liegendem Zellkern dar. Die Zellmembran war glatt und hatte bei einigen Zellen, wie bei den Feten, Pseudopodien. Im Zytoplasma waren Mitochondrien und elektronendichte Granula zu finden. Im Zellkern konnte deutlich zwischen peripherem, dicht gepacktem Heterochromatin und zentral liegendem, lockerem Euchromatin unterschieden werden.

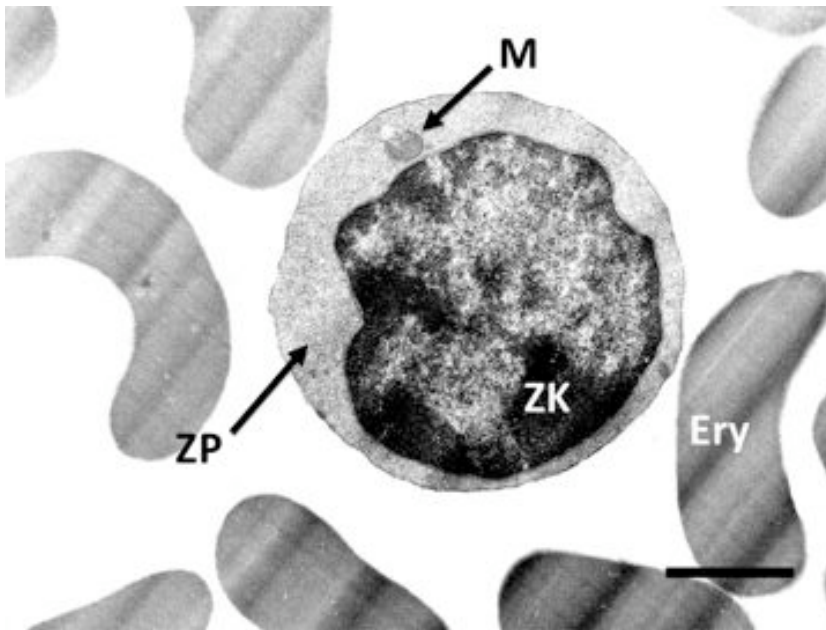


Abbildung 53: Lymphozyt
(Kalb, w, 4 Std post natum)

Bei diesem Lymphozyten ist nur noch wenig Zytoplasma (ZP) übrig, in dem sich Mitochondrien (M) befinden. Der Zellkern (ZK) liegt exzentrisch in der Zelle.

SB = 2 μ m

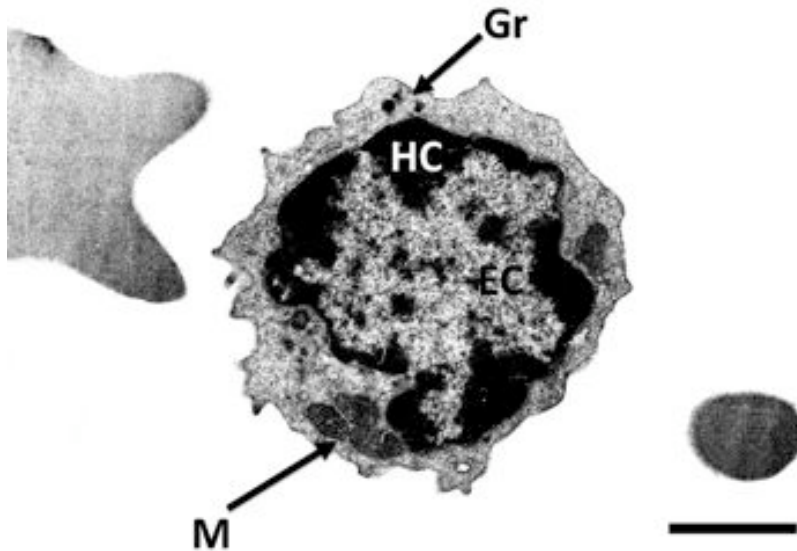


Abbildung 54: Lymphozyt
(Kalb, m, 2 Std post natum)

Im Zytoplasma des Lymphozyten sind Mitochondrien (M) und elektronendichte Granula (Gr) zu sehen. Der Kern lässt sich deutlich in Heterochromatin (HC) und Euchromatin (EC) unterteilen.

SB = 2 μ m

3.4. Neutrophile Granulozyten

3.4.1. Pränatal

Im Blut der Feten waren, auch unter dem Elektronenmikroskop, neutrophile Myelozyten zu finden. Der Zellkern war noch nicht segmentiert und lag meist zentral bis exzentrisch in der Zelle. Im Zytoplasma waren bereits die sekundären oder spezifischen Granula zu finden, die sich als elektronendichte, runde Gebilde darstellten. Daneben waren auch längliche Granula zu sehen, die als primäre Granula identifiziert wurden. Des Weiteren waren im Zytoplasma Ribosomen und endoplasmatisches Retikulum zu finden. Die Zellmembran bildete Pseudopodien aus.

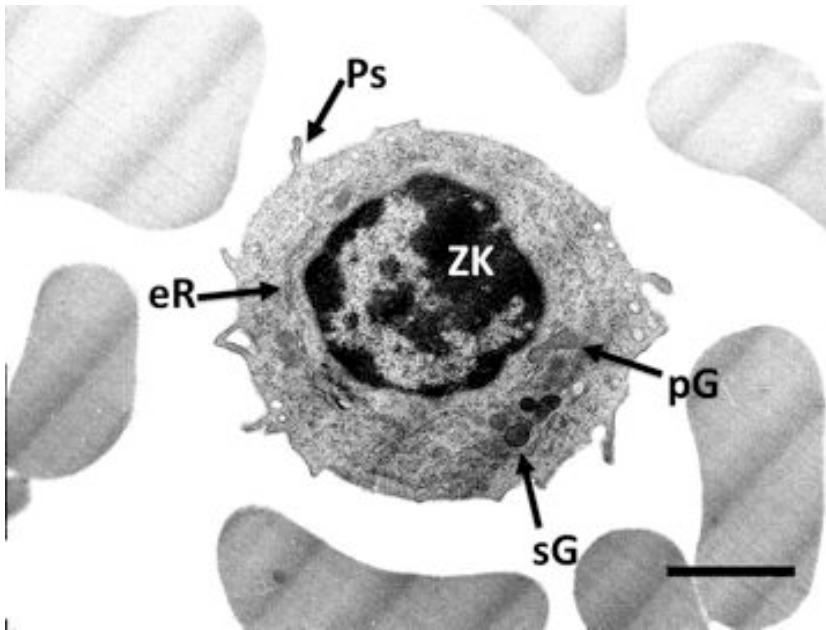


Abbildung 55: Neutrophiler Myelozyt
(Fetus, w, SSL 9,1 cm)

Im Zytoplasma sind spezifische Granula (sG) und längliche primäre Granula (pG) zu erkennen. Daneben ist das endoplasmatische Retikulum (eR) vorhanden. Die Zellmembran weist Pseudopodien (Ps) auf. Der Zellkern (ZK) ist nicht segmentiert.

SB = 2 μ m

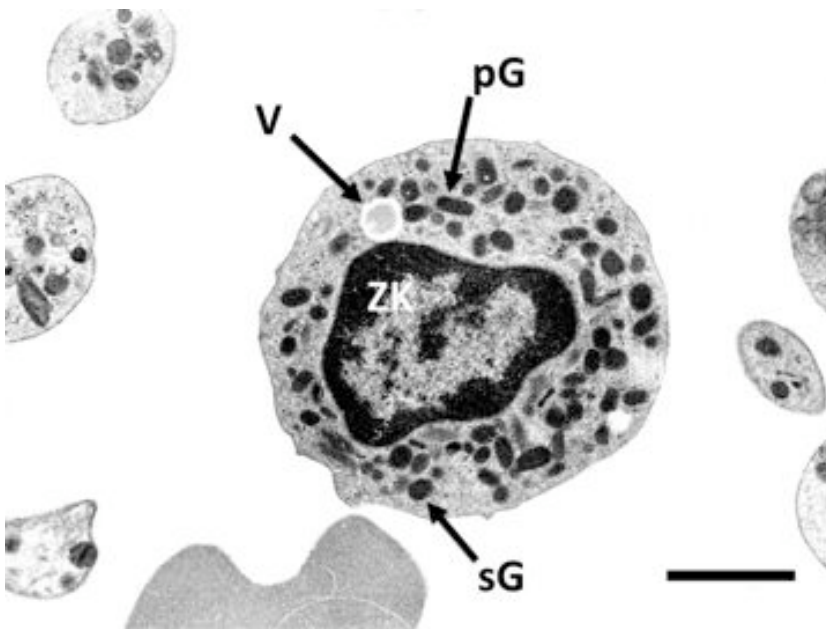


Abbildung 56: Neutrophiler Granulozyt
(Fetus, w, SSL 19,8 cm)

Im Zytoplasma lassen sich die runde spezifische Granula (sG) und die längliche primäre Granula (pG) unterscheiden. Auch Vakuolen (V) sind im Zytoplasma zu erkennen.

SB = 2 μ m

3.4.2. Postnatal

Im Blut der Kälber waren sowohl stabkernige als auch segmentkernige neutrophile Granulozyten zu finden. Die stabkernigen neutrophilen Granulozyten wiesen einen länglichen bis gebogenen Zellkern auf. In den segmentkernigen neutrophilen Granulozyten waren oft nur die einzelnen Kernsegmente zu erkennen (vgl. Abb. 57). Im Zytoplasma waren drei verschiedene Granula-Typen zu finden: die weniger elektronendichten großen Granula, die länglichen primären Granula und die runden spezifischen Granula. Daneben waren endoplasmatisches Retikulum, Vakuolen, Ribosomen und Pseudopodien an der Zellmembran sichtbar.

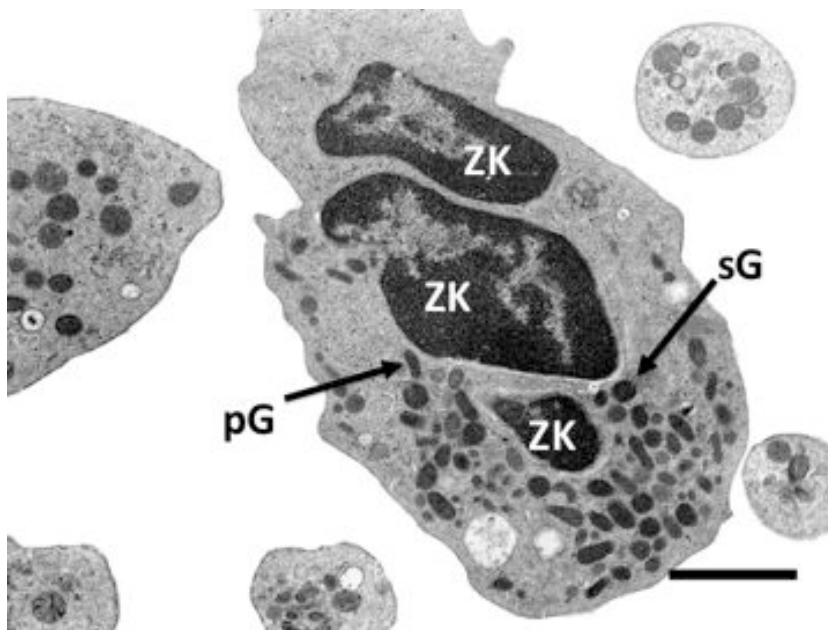


Abbildung 57: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (Kalb, m, 2, Std post natum)

Der Zellkern (ZK) des neutrophilen Granulozyten besteht aus 3 Segmenten. Im Zytoplasma sind die primären Granula (pG) und die spezifischen Granula (sG) zu erkennen.

SB = 2 μ m

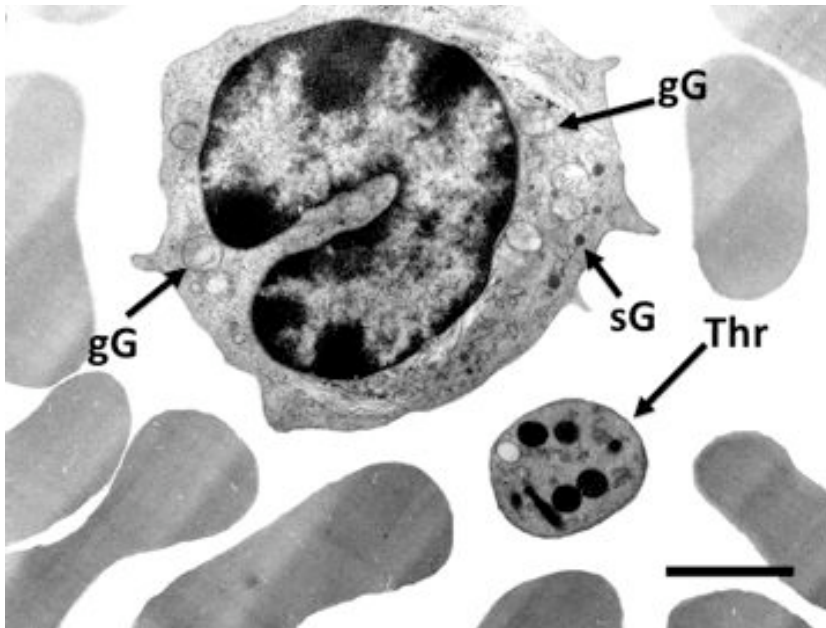


Abbildung 58: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt (Kalb, m, 1 Std post natum)

Der Zellkern des neutrophilen Granulozyten ist hufeisenförmig gebogen. Im Zytoplasma sind die weniger elektronendichten großen Granula (gG) zu sehen. Daneben sind die spezifischen Granula (sG) vorhanden. Neben dem Granulozyten befindet sich ein Thrombozyt (Thr) mit α -Granula.

SB = 2 μ m

3.5. Eosinophile Granulozyten

3.5.1. Pränatal

In den elektronenmikroskopischen Präparaten konnten keine eosinophilen Granulozyten identifiziert werden.

3.5.2. Postnatal

In den elektronenmikroskopischen Präparaten konnten ebenfalls keine eosinophilen Granulozyten identifiziert werden.

3.6. Basophile Granulozyten

3.6.1. Pränatal

In den Proben, die für die Elektronenmikroskopie verwendet wurden, konnten beim Fetus keine basophilen Granulozyten gefunden werden.

3.6.2. Postnatal

Die basophilen Granulozyten waren nur sehr selten zu finden. Durch die charakteristischen, sehr großen Granula waren sie eindeutig zu identifizieren. Die Granula bedeckten größtenteils den Zellkern und andere Zellorganellen. Der Zellkern, soweit erkennbar, war meist zweigeteilt. Neben den Granula waren oft Mitochondrien zu erkennen. Die Zellmembran war glatt und wies Einbuchtungen auf.

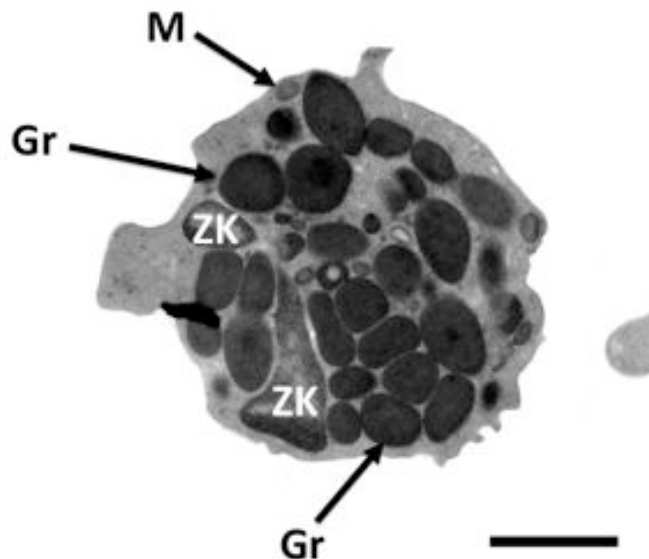


Abbildung 59: Basophiler Granulozyt
(Kalb, w, 4 Std post natum)

Dieser basophile Granulozyt ist durch seine charakteristischen großen Granula (Gr) deutlich zu identifizieren. Neben den Granula sind Mitochondrien (M) im Zytoplasma zu sehen. Es sind zwei Zellkernsegmente (ZK) zu erkennen.

SB = 2 μ m

3.7. Monozyten

3.7.1. Pränatal

In den pränatalen Präparaten konnten keine Monozyten gefunden werden.

3.7.2. Postnatal

Die Monozyten waren die größten Zellen im Blut der Kälber. Im Zytoplasma der Monozyten waren Mitochondrien und kleine elektronendichte Granula zu sehen. In den Mitochondrien waren die charakteristischen Cristae deutlich zu erkennen. Neben Mitochondrien und Granula im Zytoplasma waren vor allem die kurzen Zisternen des endoplasmatischen Retikulum auffällig. Der Zellkern hatte meist eine bohnen- oder U-förmige Gestalt. Die zwei Zonen, Heterochromatin und Euchromatin waren deutlich voneinander zu unterscheiden. Die Zellmembran stellte sich glatt dar.

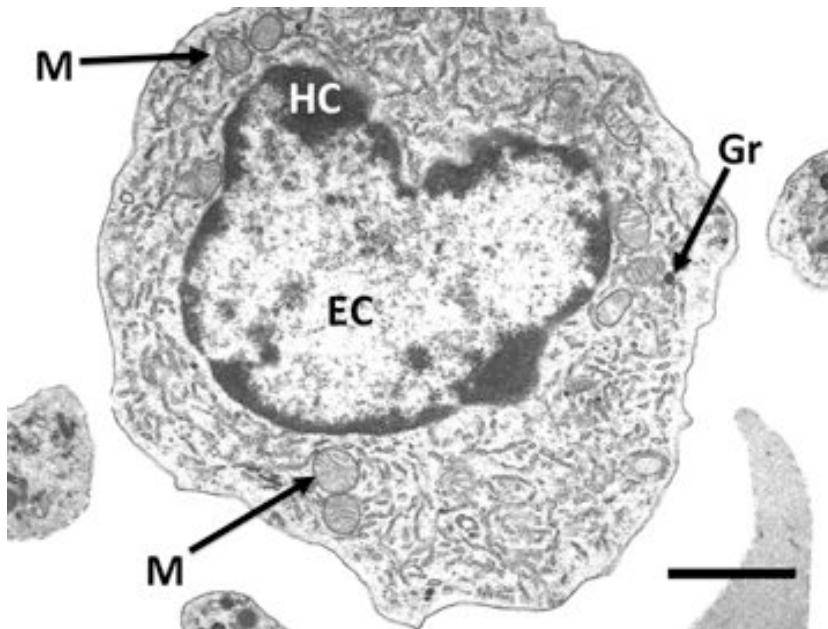


Abbildung 60: Monozyt
(Kalb, w, 4 Std post natum)

Im Zytoplasma sind die Mitochondrien (M) mit ihren Cristae zu erkennen. Die elektronendichten Granula (Gr) liegen zwischen den kurzen Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. Die zwei Zonen des Zellkerns, Heterochromatin (HC) und Euchromatin (EC) sind deutlich zu erkennen.

SB = 2 μ m

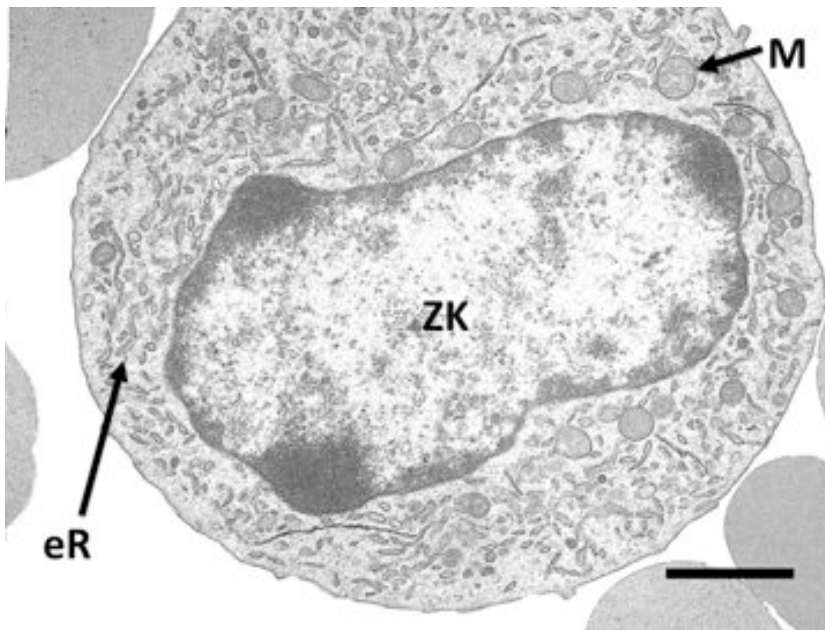


Abbildung 61: Monozyt
(Kalb, m, 1 Std post natum)

Die kurzen Teile des endoplasmatischen Retikulums (eR) sind deutlich im Zytoplasma zu erkennen. Der Zellkern (ZK) hat eine längliche Form. Es sind viele Mitochondrien (M) im Zytoplasma vorhanden.

SB = 2 μ m

4. Glykohistochemische Untersuchungen

4.1. Glukose/Mannose spezifische Lektine

4.1.1. Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA-FITC)

4.1.1.1. Pränatal

In allen Ausstrichen des fetalen Blutes konnte eine Bindung von ConA an die Erythrozyten festgestellt werden. Im Zentrum mancher Erythrozyten konnte auch eine positive Anfärbung erkannt werden. Auch Erythroblasten zeigten eine stark positive Reaktion im Zytoplasma. Die Thrombozyten wiesen sowohl an der Zellmembran und auch an den Granula eine durchgehend stark positive Reaktion auf. Die Zellmembran der Lymphozyten sowie die Zellmembran und das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten waren stark ConA-positiv. Lymphoblasten und Myelozyten konnten nur teilweise sicher identifiziert werden. Auch diese Vorstufen banden das Lektin deutlich. Monozyten zeigten eine starke Bindung an der Zellmembran und dem Zytoplasma. Eosinophile und basophile Granulozyten sowie deren Vorstufen konnten nicht sicher identifiziert werden. Tabelle 32 zeigt die Ergebnisse der ConA-FITC-Bindung.

Tabelle 32: Auswertung Lektin: ConA-FITC, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	28,6 %	42,9 %	28,6 %	70 %
Zytoplasma	0	14,3 %	42,9 %	28,6 %	14,3 %	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	0	0	14,3 %	85,7 %	70 %
Granula	0	0	0	0	100 %	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	0	42,9 %	57,1 %	70 %
Zytoplasma	0	57,1 %	28,6 %	14,3 %	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	14,3 %	57,1 %	28,6 %	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	0	0	14,3 %	14,3 %	71,4 %	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	0	25 %	25 %	50 %	40 %
Zytoplasma	50 %	0	25 %	25 %	0	40 %

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

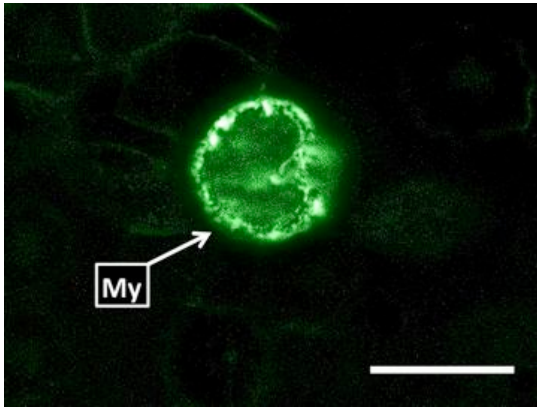


Abbildung 62: Myelozyt, ConA-FITC

(Fetus, w, SSL 39 cm)

Das Bild zeigt einen Myelozyten (My) mit deutlicher Bindung von ConA-FITC im Bereich des Zytoplasmas und der Zellmembran.

WB = 10 μ m

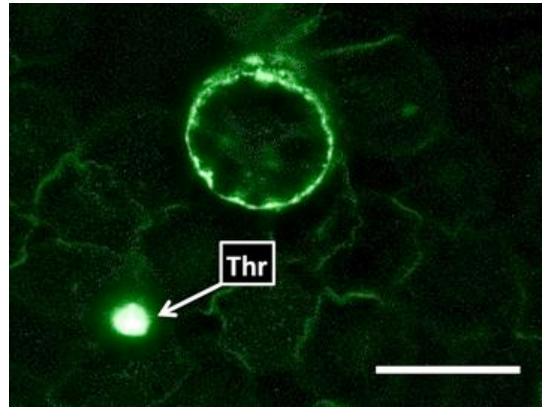


Abbildung 63: Lymphozyt und Thrombozyt, ConA-FITC

(Fetus, w, SSL 39 cm)

Die Zellmembran des Lymphozyten reagiert stark mit dem Lektin. Der Thrombozyt (Thr) weist eine sehr starke Bindung von ConA-FITC auf.

WB = 10 μ m

4.1.1.2. Postnatal

ConA-FITC band auch im Kälberblut deutlich an die Erythrozyten, wobei die Zellmembran stärker positiv erschien als die der Feten. Bei den Thrombozyten war die Reaktion mit ConA-FITC bei den Feten und Kälbern gleich stark und wurde mit +++ (sehr starke Bindung) beurteilt. Auch die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten zeigten eine ähnliche Affinität zu ConA wie die der Feten. Eosinophile Granulozyten konnten nur sehr selten gefunden werden. Eine Bindung war hier im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas zu erkennen.

Tabelle 33: Auswertung Lektin: ConA-FITC, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	12,5 %	25 %	62,5 %	80 %
Zytoplasma	12,5 %	12,5 %	25 %	50 %	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	0	0	0	100 %	80 %
Granula	0	0	0	0	100 %	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	12,5 %	25 %	62,5 %	80 %
Zytoplasma	25 %	12,5 %	50 %	12,5 %	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	12,5 %	12,5 %	75 %	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	0	0	0	25 %	75 %	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	0	0	100 %	20 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	20 %
Zytoplasma	0	0	0	50 %	50 %	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	0	0	66,7 %	33,3 %	30 %
Zytoplasma	0	0	66,7 %	33,3 %	0	30 %

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

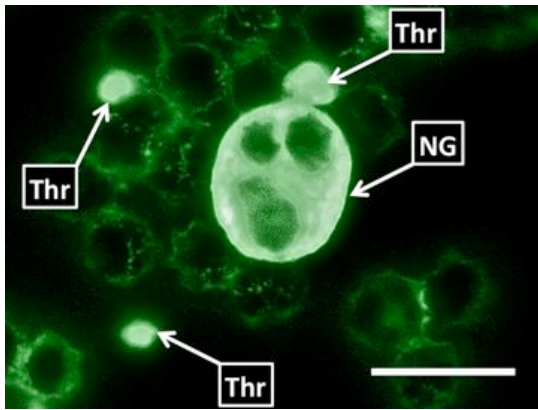


Abbildung 64: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten, ConA-FITC (Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Die Thrombozyten (Thr) und der neutrophile Granulozyt (NG) sind stark positiv.

WB = 10 µm

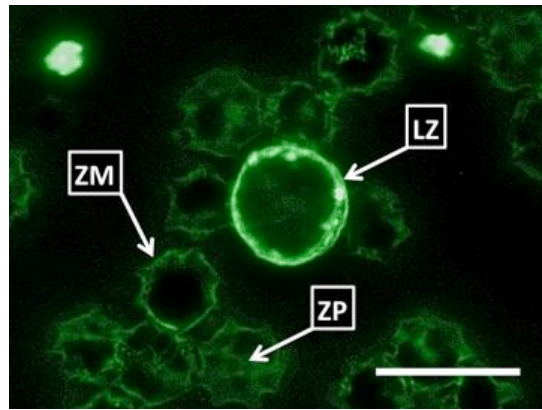


Abbildung 65: Lymphozyt, ConA-FITC

(Kalb, m, Alter: 6,5 Std post natum)

Der Lymphozyt bindet ConA-FITC im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas. Die Zellmembran (ZM) und das Zytoplasma (ZP) der Erythrozyten ist schwächer positiv.

WB = 10 µm

4.1.2. Bindung von *Lens culinaris* Agglutinin (LCA-FITC)

4.1.2.1. Pränatal

Die Erythrozyten der Feten banden LCA-FITC meist nur schwach. Die wenigen Erythroblasten banden LCA noch schwächer als die Erythrozyten. Thrombozyten und Lymphozyten waren dagegen durchgehend positiv. Die Lymphoblasten waren kaum von den Erythroblasten zu unterscheiden. Die Bindung war hier nur sehr schwach. Die neutrophilen Granulozyten und die Myelozyten banden LCA gleichermaßen stark. Wie in Tabelle 34 verdeutlicht wird, stellten sich die Granula der eosinophilen Granulozyten am stärksten positiv dar. Die Monozyten waren kaum zu finden. Die wenigen, sicher identifizierbaren Monozyten zeigten eine leicht positive Reaktion an der Zellmembran. Es war kein Unterschied in der Intensität der Bindung bei den Feten unterschiedlichen Alters zu sehen.

Tabelle 34: Auswertung Lektine: LCA-FITC, Fetus

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	85,7 %	14,3 %	0	0	70 %
Zytoplasma	0	14,3 %	57,1 %	28,6 %	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	14,3 %	42,9 %	42,9 %	0	0	70 %
Granula	14,3 %	28,6 %	57,1 %	0	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	28,6 %	28,6 %	42,9 %	0	0	70 %
Zytoplasma	57,1 %	14,3 %	28,6 %	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	42,9 %	42,9 %	14,3 %	70 %
Granula	85,7 %	14,3 %	0	0	0	70 %
Zytoplasma	0	0	14,3 %	57,1 %	28,6 %	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	40 %	0	60 %	0	50 %
Granula	0	0	0	0	100 %	50 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	50 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	100 %	0	0	0	30 %
Zytoplasma	66,7 %	33,3 %	0	0	0	30 %

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

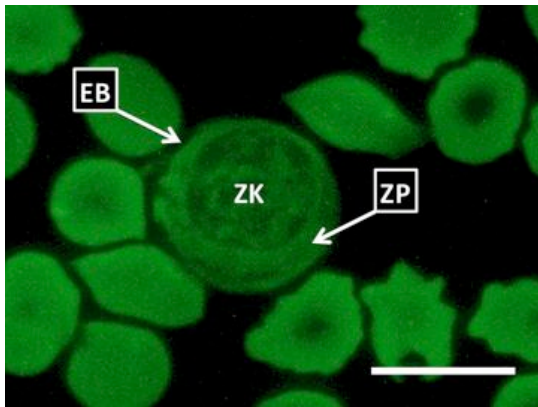


Abbildung 66: Erythroblast, LCA-FITC (Fetus, m, SSL 14 cm)

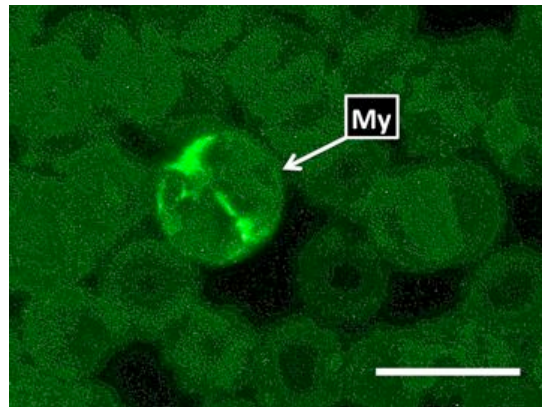


Abbildung 67: Myelozyt, LCA-FITC (Fetus, m, SSL 64 cm)

Eine eindeutige Unterscheidung in Erythroblast (EB) oder Lymphoblast (LB) ist bei den Lektin-gefärbten Ausstrichen schwierig. Die Erythrozyten binden LCA-FITC stärker als die Vorläuferzelle.

Das Bild zeigt einen Myelozyten (My) mit deutlich positiver Reaktion im Zytoplasma.

ZK = Zellkern
ZP = Zytoplasma
WB = 10 µm

WB = 10 µm

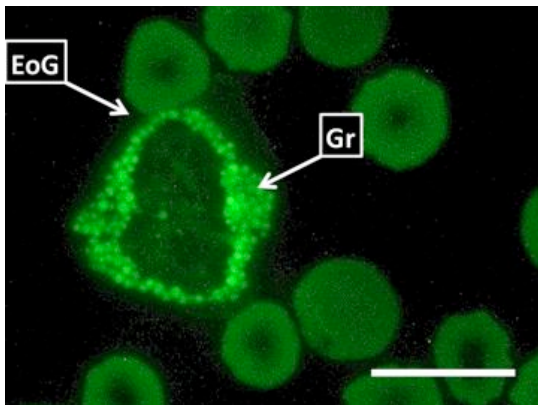


Abbildung 68: Eosinophiler Granulozyt, LCA-FITC (Fetus, w, SSL 21,9 cm)

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten (EoG) zeigen eine stark positive Bindung.

WB = 10 µm

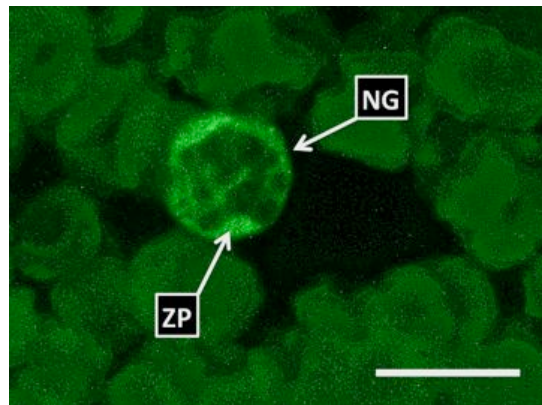


Abbildung 69: Neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC (Fetus, w, SSL 39 cm)

LCA-FITC bindet stark an das Zytoplasma (ZP) des neutrophilen Granulozyten (NG).

WB = 10 µm

4.1.2.2. Postnatal

Die Erythrozyten der Kälber banden LCA teilweise an der Zellmembran, stärker jedoch im Zytoplasma. Thrombozyten wurden in Tabelle 35 mit ++ (starke Reaktion) bewertet. Lymphozyten zeigten die gleiche Reaktionsstärke wie die der Feten. Die Bindungen an der Zellmembran und im Zytoplasma wurden mit + (deutliche Reaktion) beurteilt. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten und die Granula der eosinophilen Granulozyten wiesen die stärkste Reaktion auf und wurden mit +++ (sehr starke Reaktion) bewertet. Monozyten banden das Lektin kaum.

Tabelle 35: Auswertung Lektine: LCA-FITC, Kalb

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	11,1 %	77,8 %	11,1 %	0	90 %
Zytoplasma	0	0	22,2 %	77,8 %	0	90 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	77,8 %	0	22,2 %	0	90 %
Granula	33,3 %	22,2 %	33,3 %	11,1 %	0	90 %
Lymphozyten						
Zellmembran	22,2 %	44,4 %	33,3 %	0	0	90 %
Zytoplasma	55,6 %	22,2 %	22,2 %	0	0	90 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	33,3 %	55,6 %	11,1 %	0	90 %
Granula	100 %		0	0	0	90 %
Zytoplasma	0	0	33,3 %	44,4 %	22,2 %	90 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	25 %	75 %	0	0	0	40 %
Granula	0	0	0	0	100 %	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	100 %	0	0	0	20 %
Zytoplasma	50 %	50 %	0	0	0	20 %

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

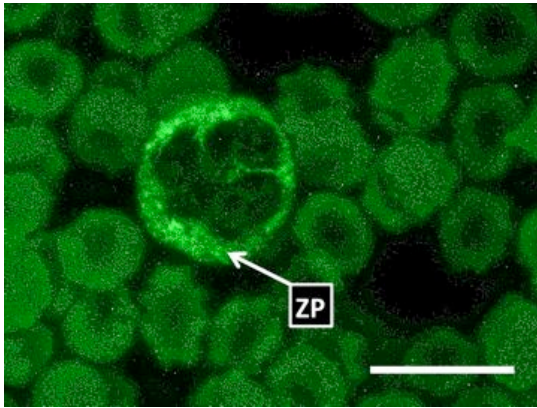


Abbildung 70: Neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC
(Kalb, m, Alter: 13 Std post natum)

Das Zytoplasma (ZP) des neutrophilen Granulozyten bindet LCA-FITC.

WB = 10 µm

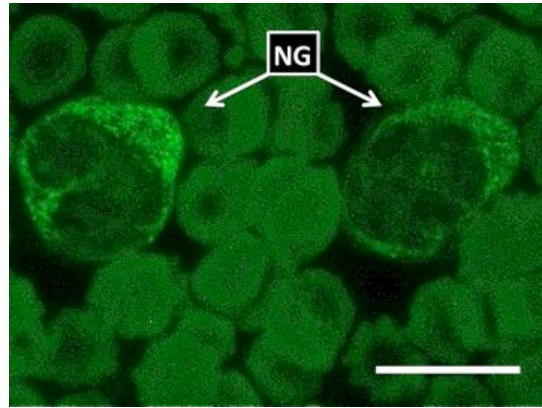


Abbildung 71: Segmentkerniger und stabkerniger neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC
(Kalb, w, Alter: 12 Std post natum)

Der stabkernige Granulozyt (links) bindet das Lektin stärker als der segmentkernige Granulozyt (rechts).

WB = 10 µm

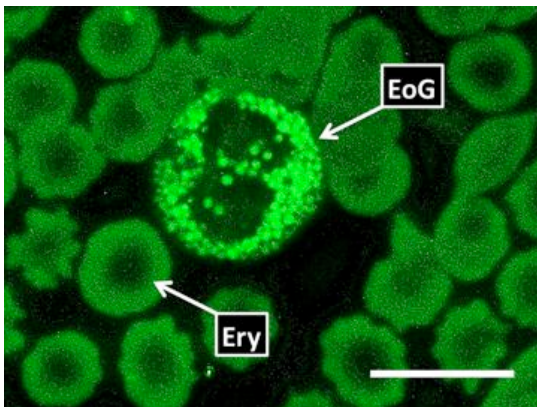


Abbildung 72: Eosinophiler Granulozyt, LCA-FITC
(Kalb, m, Alter: 13 Std post natum)

Ein Eosinophiler Granulozyt (EoG) mit stark positiver Reaktion an den Granula. Die Erythrozyten (Ery) zeigen eine schwächere Reaktion.

WB = 10 µm

4.1.3. Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin (PSA-FITC)

4.1.3.1. Pränatal

Die Erythrozyten banden das Lektin nur im geringen Maße im Zytoplasma und teilweise in der Membran. Die Thrombozyten waren stark PSA-positiv. Die Lymphozyten und Lymphoblasten, soweit erkennbar, wiesen eine starke Bindung im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas auf. Myelozyten und die neutrophilen Granulozyten banden das Lektin hauptsächlich an den Granula, teilweise auch an der Zellmembran. Eosinophile Granulozyten waren sehr selten zu finden und zeigten eine positive Reaktion an den Granula und der Zellmembran. Die Monozyten waren meist negativ. Selten zeigte sich eine Bindung von PSA an der Zellmembran oder im Zytoplasmas. Die Tabelle 36 zeigt eine Zusammenfassung der Lektinbindung von PSA-FITC.

Tabelle 36: Auswertung Lektine: PSA-FITC, Fetus

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	33,3 %	50 %	16,7 %	0	0	60 %
Zytoplasma	16,7 %	33,3 %	50 %	0	0	60 %
Thrombozyten						
Zellmembran	50 %	33,3 %	16,7 %	0	0	60 %
Granula	0	0	16,7 %	50 %	33,3 %	60 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	16,7 %	50 %	33,3 %	60 %
Zytoplasma	0	0	16,7 %	50 %	33,3 %	60 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	16,7 %	33,3 %	33,3 %	16,7 %	90 %
Granula	0	0	0	33,3 %	66,7 %	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	90 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	16,7 %	16,7 %	0	0	20 %
Granula	0	0	16,7 %	0	16,7 %	20 %
Zytoplasma	0	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	16,7 %	16,7 %	0	0	0	20 %
Zytoplasma	0	16,7 %	16,7 %	0	0	20 %

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

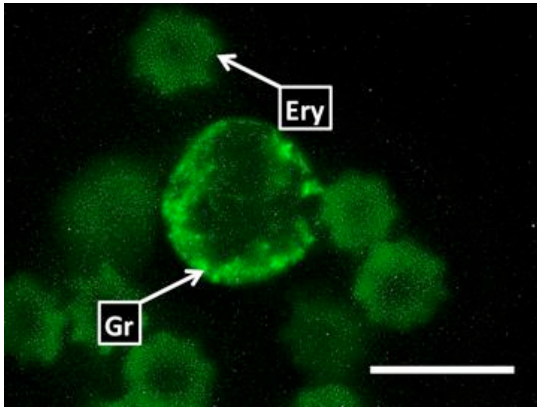


Abbildung 73: Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC (Fetus, m, SSL 15 cm)

Die Granula (Gr) der neutrophilen Granulozyten sind stark positiv. Die Erythrozyten (Ery) binden das Lektin im Zytoplasma.

WB = 10 μ m

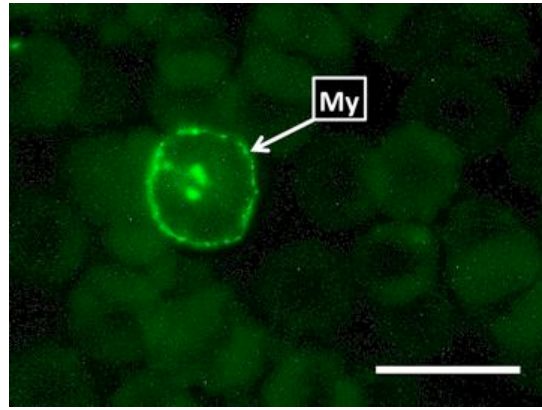


Abbildung 74: Myelozyt, PSA-FITC (Fetus, w, SSL 39 cm)

Das PSA-FITC bindet deutlich an die Granula des Myelozyten (My).

WB = 10 μ m

4.1.3.2. Postnatal

Die Erythrozyten der Kälber banden PSA hauptsächlich im Zytoplasma. Die Thrombozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten zeigten eine ähnliche Bindung wie im fetalen Blut, indem sie deutlich PSA-positiv waren. Eosinophile Granulozyten und Monozyten waren nur selten zu finden. Wie in Tabelle 37 verdeutlicht wird, banden die Eosinophilen PSA-FITC stark an ihren Granula und an der Zellmembran. Die Monozyten zeigten kaum eine positive Reaktion.

Tabelle 37: Auswertung Lektine: PSA-FITC, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	12,5 %	50 %	37,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	12,5 %	25 %	50 %	12,5	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	0	62,5 %	37,5 %	0	80 %
Granula	0	0	0	50 %	50 %	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	12,5 %	25 %	25 %	37,5 %	80 %
Zytoplasma	0	0	62,5 %	37,5 %	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	25 %	25 %	37,5 %	12,5 %	80 %
Granula	0	0	12,5 %	62,5 %	25 %	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	33,3 %	0	66,7 %	0	30 %
Granula	0	33,3 %	0	33,3 %	33,3 %	30 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	30 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	25 %	25 %	50 %	0	0	40 %
Zytoplasma	50 %	50 %	0	0	0	40 %

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

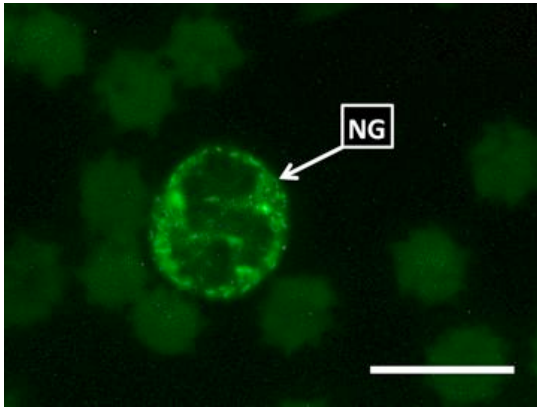


Abbildung 75: Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC
(Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) binden PSA-FITC.

WB = 10 μ m

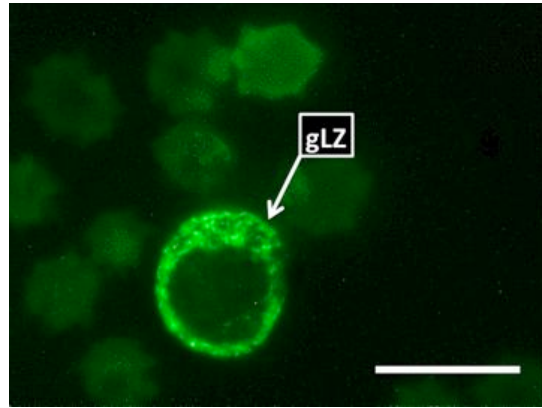


Abbildung 76: Großer Lymphozyt, PSA-FITC
(Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Ein großer Lymphozyt (gLZ) mit positiver Reaktion im Zytoplasma und an der Zellmembran.

WB = 10 μ m

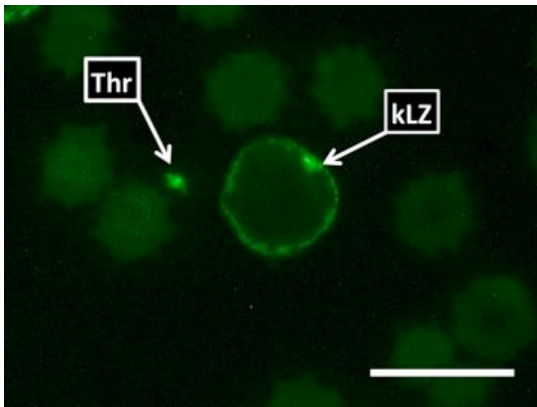


Abbildung 77: Kleiner Lymphozyt und Thrombozyt, PSA-FITC
(Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Der kleine Lymphozyt (kLZ) zeigt eine Reaktion im Bereich der Zellmembran. Der Thrombozyt ist deutlich positiv.

WB = 10 μ m

4.2. Galaktose spezifische Lektine

4.2.1. Bindung von Peanut Agglutinin (PNA-FITC)

Die Färbung von PNA-FITC wurde mit und ohne vorangehende Neuraminidase-Inkubation durchgeführt.

4.2.1.1. Pränatal

Ohne Neuraminidase kam es zu keiner Bindung von PNA-FITC an die Erythrozyten und Erythroblasten des fetalen Blutes. Die Thrombozyten zeigten kaum eine positive Reaktion. Auch die Lymphozyten und Lymphoblasten waren bis auf wenige Ausnahmen negativ. Die Myelozyten waren die einzigen Zellen, die eine positive Bindung im Bereich des Zytoplasmas aufwiesen.

Nach Vorbehandlung mit Neuraminidase kam es zu einer starken Bindung an die Erythrozytenmembran. Auch die Zellmembran der Lymphozyten, Lymphoblasten und Myelozyten banden das Lektin deutlich. Die Monozyten und Monoblasten zeigten eine positive Reaktion im Bereich des Zytoplasmas und der Zellmembran. Zwischen den Feten unterschiedlichen Alters kam es zu keinen Unterschieden in der Intensität der Bindung.

Die Tabellen 38 und 39 zeigen ein Übersicht der PNA-FITC-Bindung mit und ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase.

Tabelle 38: Auswertung Lektine: PNA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	75 %	25 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	62,5 %	37,5 %	0	0	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	87,5 %	12,5 %	0	0	0	80 %
Granula	25 %	37,5 %	37,5 %	0	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	25 %	25 %	50 %	0	0	80 %
Zytoplasma	12,5 %	62,5 %	25 %	0	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	50 %	37,5 %	12,5 %	0	0	80 %
Granula	75 %	25 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	0	37,5 %	37,5 %	25 %	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	50 %	50 %	0	0	40 %
Granula	0	0	25 %	50 %	25 %	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	0	20 %
Zytoplasma	50 %	50 %	0	0	0	20 %

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

Tabelle 39: Auswertung Lektine: PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	0	25 %	75 %	80 %
Zytoplasma	0	25 %	50 %	25 %	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	25 %	50 %	25 %	0	0	80 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	0	50 %	50 %	80 %
Zytoplasma	0	0	50 %	50 %	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	25 %	0	50 %	25 %	80 %
Granula	0	25 %	25 %	50 %	0	80 %
Zytoplasma	25 %	50 %	25 %	0	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	100 %	0	0	0	40 %
Granula	0	0	0	50 %	50 %	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	0	33,3 %	66,7 %	0	60 %
Zytoplasma	0	33,3 %	33,3 %	33,3 %	0	60 %

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

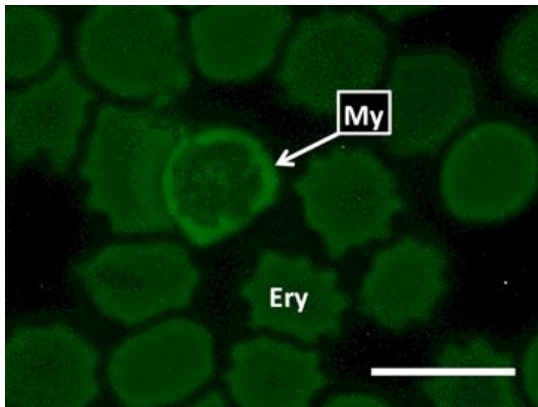


Abbildung 78: Myelozyt, PNA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, w, SSL 39 cm)

Der Myelozyt (My) zeigt eine positive Reaktion im Bereich des Zytoplasmas.

WB = 10 µm

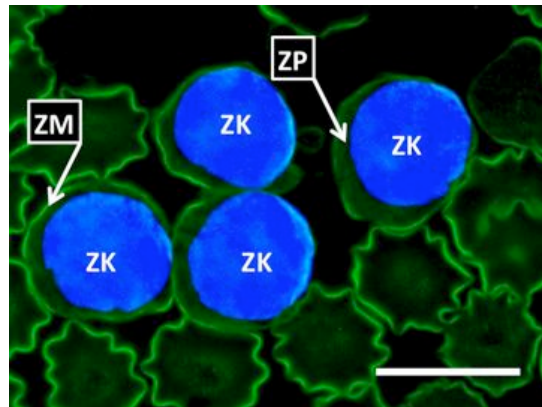


Abbildung 79: Lymphozyten, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Lymphozyten mit deutlicher Anfärbung in der Zellmembran (ZM) und weniger starker Reaktion im Zytoplasma (ZP). Die Zellkerne (ZK) färben sich mit DAPI blau an.

WB = 10 µm

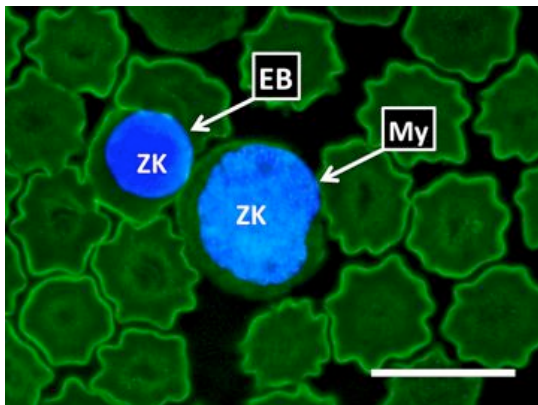


Abbildung 80: Myelozyt und Erythroblast, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Das Zytoplasma und die Zellmembran des Myelozyten (My) sind positiv. Die Zellmembran der Erythrozyten und des Erythroblasten (EB) sind deutlich positiv. Die Zellkerne (ZK) färben sich blau an.

WB = 10 µm

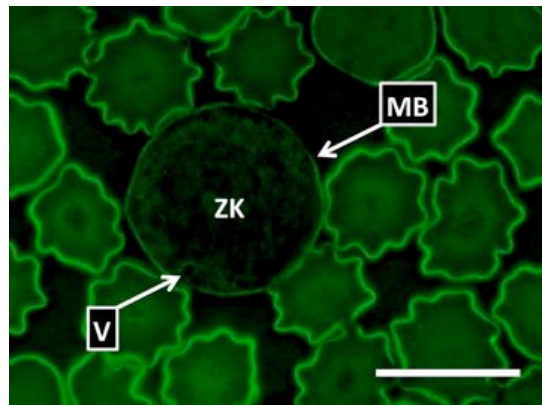


Abbildung 81: Monoblast, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Die Zellmembran des Monoblasten (MB) bindet PNA-FITC. Auch im Zytoplasma ist eine positive Reaktion zu sehen. In der Zelle sind Vakuolen (V) zu erkennen.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.2.1.2. Postnatal

Tabelle 40 zeigt eine Zusammenfassung der PNA-FITC Bindung ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase. Ohne Neuraminidasevorbehandlung zeigten die Granula der eosinophilen Granulozyten eine deutliche Bindung von PNA-FITC. Nach Neuraminidasevorbehandlung erschien die Zellmembran der Erythrozyten stark positiv. Auch das Zytoplasma der Erythrozyten band PNA-FITC. Die Thrombozyten stellten sich nur leicht positiv dar. Neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten banden das Lektin an den Granula, wobei die Bindung an die eosinophilen Granula stärker war als die der neutrophilen Granula. Die Lymphozyten waren teils stark positiv, teils waren aber auch Lymphozyten zu sehen, die PNA nicht banden. Monozyten banden PNA schwach an der Zellmembran und im Zytoplasma.

Tabelle 40: Auswertung Lektine: PNA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	33,3 %	44,4 %	22,2 %	0	0	90 %
Zytoplasma	44,4 %	55,6 %	0	0	0	90 %
Thrombozyten						
Zellmembran	88,9 %	11,1 %	0	0	0	90 %
Granula	11,1 %	33,3 %	33,3 %	22,2 %	0	90 %
Lymphozyten						
Zellmembran	44,4 %	44,4 %	11,1 %	0	0	90 %
Zytoplasma	22,2 %	55,6 %	22,2 %	0	0	90 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	11,1 %	44,4 %	44,4 %	0	0	90 %
Granula	11,1 %	22,2 %	33,3 %	33,3 %	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	90 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	60 %	40 %	0	0	50 %
Granula	0	0	0	20 %	80 %	50 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	50 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	66,7 %	33,3 %	0	0	30 %
Zytoplasma	66,7 %	33,3 %	0	0	0	30 %

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

Tabelle 41: Auswertung Lektine: PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	20 %	40 %	40 %	0	100 %
Zytoplasma	0	40 %	40 %	20 %	0	100 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Granula	0	20 %	60 %	20 %	0	100 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	40 %	40 %	20 %	100 %
Zytoplasma	0	0	40 %	60 %	0	100 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	20 %	20 %	60 %	0	100 %
Granula	0	0	20 %	40 %	40 %	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	50 %	50 %	0	0	40 %
Granula	0	0	0	50 %	50 %	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Granula	0	0	0	0	100 %	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Monozyten						
Zellmembran	0	0	50 %	50 %	0	40 %
Zytoplasma	0	50 %	50 %	0	0	40 %

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

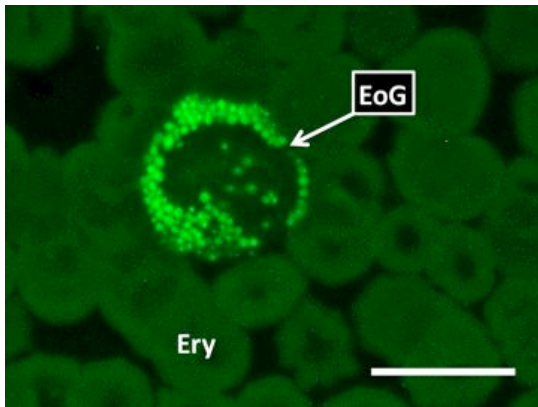


Abbildung 82: Eosinophiler Granulozyt, PNA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, m, Alter: 9 Std post natum)

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EoG) binden PNA-FITC stark.

WB = 10 μ m

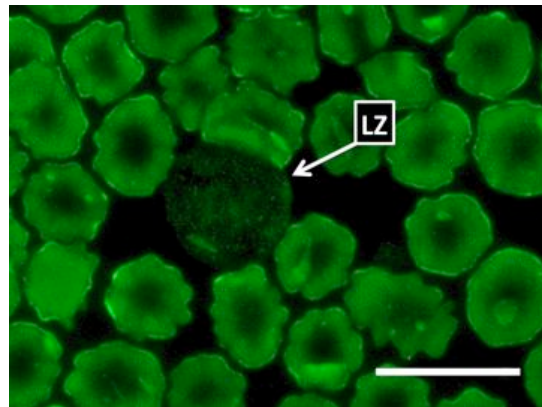


Abbildung 83: Lymphozyt, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, m, Alter: 1,5 Std post natum)

Dieser Lymphozyt (LZ) bindet das Lektin kaum.

WB = 10 μ m

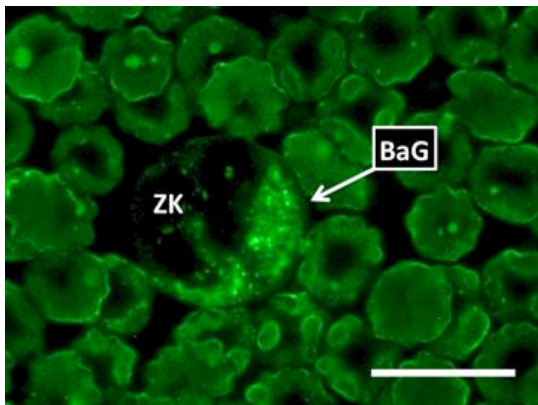


Abbildung 84: Basophiler Granulozyt, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, m, Alter: 1,5 Std post natum)

Ein basophiler Granulozyt (BaG) mit deutlich positiven Granula. Die Erythrozyten binden das Lektin ebenfalls.

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

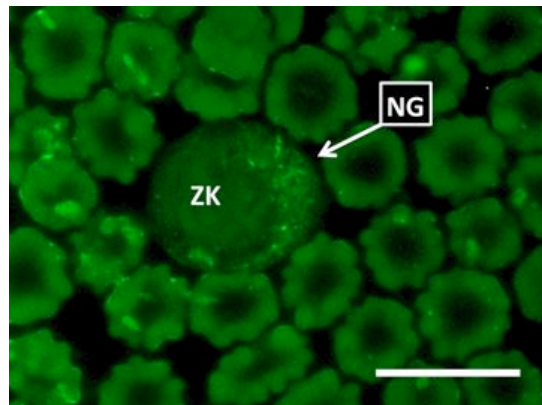


Abbildung 85: Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, w, Alter 23 Std post natum)

Der neutrophile Granulozyt (NG) bindet PNA-FITC an den Granula.

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

4.2.2. Bindung von Ricinus communis Agglutinin (RCA-FITC)

Die Färbung mit RCA-FITC wurde mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung durchgeführt.

4.2.2.1. Pränatal

Ohne Neuraminidasevorbehandlung konnte an den Erythrozyten durchgehend eine grüne Autofluoreszenz dokumentiert werden. Das Zytoplasma der Erythroblasten war leicht positiv für RCA. Thrombozyten wiesen gelegentlich im Bereich der Granula eine Bindung von RCA-FITC auf. Die neutrophilen Granulozyten und Myelozyten banden das Lektin schwach im Zytoplasma.

Nach Vorinkubation mit Neuraminidase band RCA deutlich an die Zellmembran der Erythrozyten, Erythroblasten, Lymphozyten und Monozyten. Das Zytoplasma der Monozyten war hingegen negativ. Bei den neutrophilen Granulozyten waren die Granula deutlich RCA-positiv. Auch die Granula der eosinophilen Granulozyten fluoreszierten deutlich positiv.

Tabelle 42: Auswertung Lektine: RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	33,3 %	50 %	16,7 %	0	0	60 %
Zytoplasma	33,3 %	33,3 %	33,3 %	0	0	60 %
Thrombozyten						
Zellmembran	33,3 %	66,7 %	0	0	0	60 %
Granula	16,7 %	33,3 %	50 %	0	0	60 %
Lymphozyten						
Zellmembran	16,7 %	33,3 %	33,3 %	16,7 %	0	60 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	60 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	0	60 %
Granula	100 %	0	0	0	0	60 %
Zytoplasma	16,7 %	33,3 %	50 %	0	0	60 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	0	20 %
Granula	0	50 %	50 %	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %

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

Tabelle 43: Auswertung Lektine: RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	25 %	50 %	25 %	80 %
Zytoplasma	0	25 %	75 %	0	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	75 %	25 %	0	0	80 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	25 %	50 %	25 %	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	25 %	50 %	25 %	0	0	80 %
Granula	0	0	12,5 %	25 %	62,5 %	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Membran	0	0	75 %	25 %	0	60 %
Granula	0	0	25 %	25 %	50 %	60 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	60 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	0	25 %	50 %	25 %	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %

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

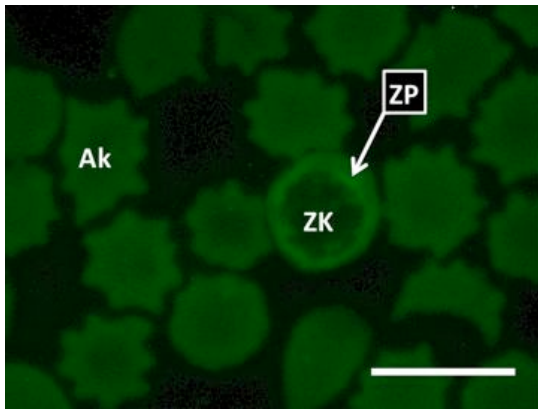


Abbildung 86: Erythroblast, RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, w, SSL 39 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des Erythroblasten ist leicht positiv. Daneben sind viele Akanthozyten (Ak) zu erkennen.

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

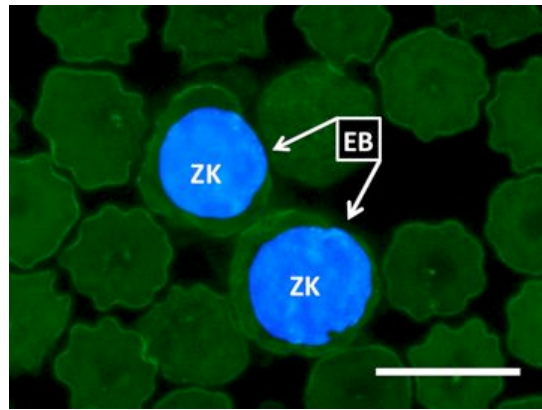


Abbildung 87: Erythroblasten, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Die Zellkerne (ZK) der Erythroblasten (EB) sind mit DAPI gefärbt. Die Zellmembran ist deutlich positiv. Teilweise färbt sich auch das Zytoplasma.

WB = 10 μ m

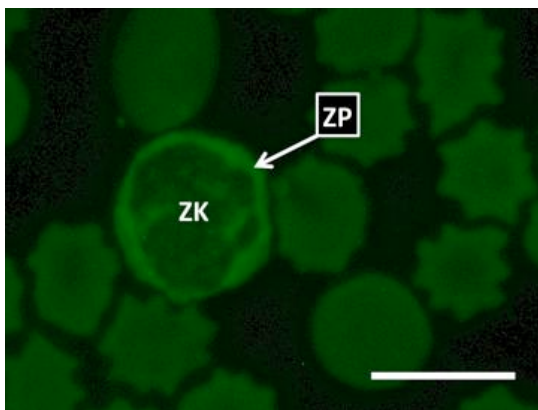


Abbildung 88: Myelozyt, RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, w, SSL 39 cm)

Das Zytoplasma (ZP) ist leicht RCA-positiv.

WB = 10 μ m

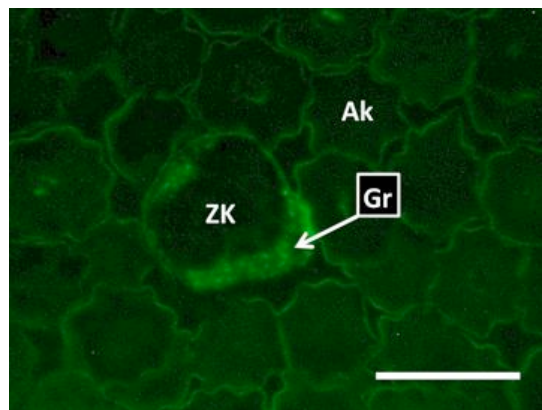


Abbildung 89: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Die Granula (Gr) zeigen eine deutlich positive Reaktion. Um den Neutrophilen sind Akanthozyten (Ak) zu finden.

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

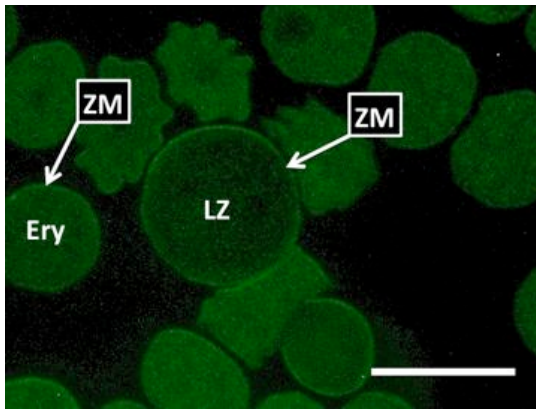


Abbildung 90: Lymphozyt, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, w, SSL 39 cm)

Die Zellmembranen (ZM) der Erythrozyten (Ery) und Lymphozyten (LZ) binden RCA-FITC.

WB = 10 μ m

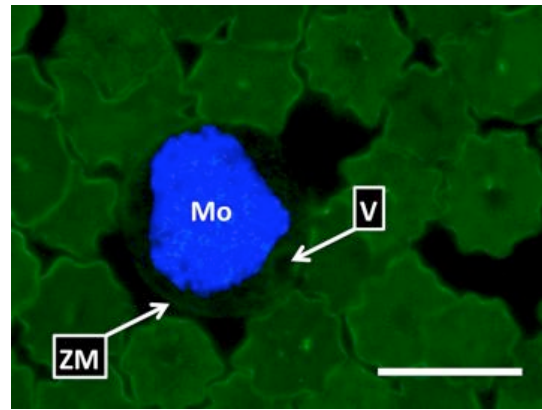


Abbildung 91: Monozyt, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Die Zellmembran (ZM) des Monozyten (Mo) ist positiv, das Zytoplasma negativ. Im Zytoplasma sind Vakuolen (V) zu erkennen.

WB = 10 μ m

4.2.2.2. Postnatal

Die Erythrozyten waren sowohl mit als auch ohne Neuraminidasevorbehandlung durchgehend schwach bis deutlich RCA-positiv. Thrombozyten wiesen eine leicht positive Reaktion an den Granula auf. Lymphozyten waren ohne Neuraminidasevorbehandlung meist negativ. Die neutrophilen Granulozyten reagierten ohne vorangehende Neuraminidaseinkubation nicht mit dem Lektin. Mit Neuraminidase zeigten die Granula eine positive Reaktion. Die eosinophilen Granulozyten banden RCA-FITC deutlich an den Granula. Die Monozyten waren ohne Neuraminidasevorbehandlung negativ. Nach Vorinkubation mit Neuraminidase kam es zu einer leichten Bindung von RCA an die Zellmembran.

Tabelle 44: Auswertung Lektine: RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	28,6 %	57,1 %	14,3 %	0	0	70 %
Zytoplasma	0	28,6 %	42,9 %	28,6 %	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	57,1 %	28,6 %	14,3 %	0	0	70 %
Granula	0	42,9 %	42,9 %	14,3 %	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	14,3 %	57,1 %	28,6 %	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	40 %	60 %	0	0	0	50 %
Granula	0	0	20 %	60 %	20 %	50 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	50 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	30 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	30 %

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

Tabelle 45: Auswertung Lektine: RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	40 %	40 %	20 %	0	0	100 %
Zytoplasma	20 %	40 %	40 %	0	0	100 %
Thrombozyten						
Zellmembran	20 %	80 %	0	0	0	100 %
Granula	20 %	20 %	60 %	0	0	100 %
Lymphozyten						
Zellmembran	20 %	40 %	20 %	20 %	0	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	20 %	60 %	20 %	0	0	100 %
Granula	0	20 %	40 %	40 %	0	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	100 %	0	0	0	40 %
Granula	0	0	0	50 %	50 %	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	33,3 %	33,3 %	33,3 %	0	60 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	60 %

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

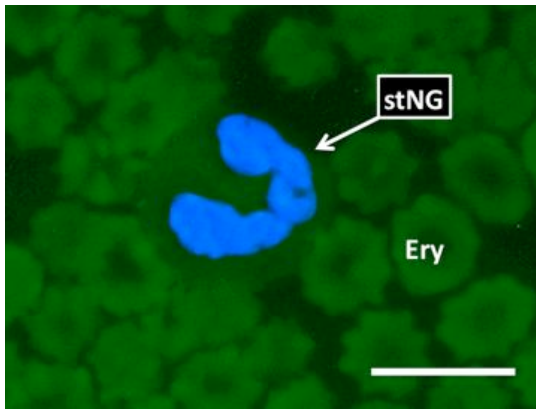


Abbildung 92: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Der stabkernige neutrophile Granulozyt (stNG) bindet das Lektin weder an den Granula noch im Zytoplasma. Das Zytoplasma der Erythrozyten (Ery) ist leicht RCA-positiv.

WB = 10 µm

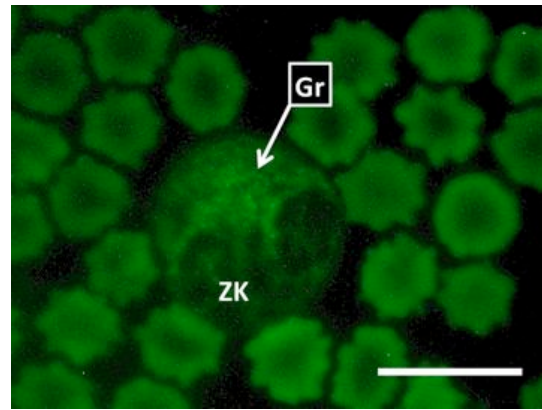


Abbildung 93: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase

(Kalb, m, Alter: 1,5 Std post natum)

Die Granula (Gr) des neutrophilen Granulozyten binden das Lektin nach Neuraminidasevorinkubation deutlich.

WB = 10 µm

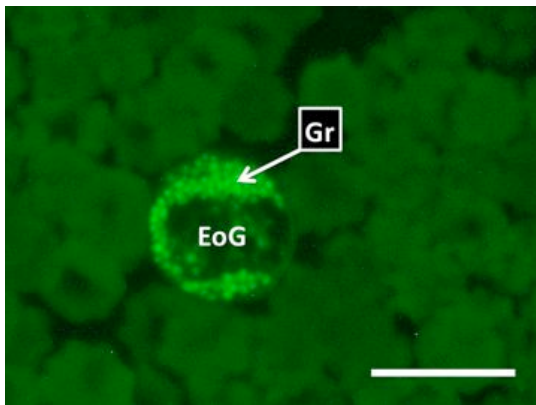


Abbildung 94: Eosinophiler Granulozyt, RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten (EoG) binden RCA-FITC auch ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase deutlich.

WB = 10 µm

4.2.3. Bindung von *Viscum album* Agglutinin (VAA-Biotin)

4.2.3.1. Pränatal

Die Erythrozyten und Erythroblasten banden das VAA im Zytoplasma und teilweise an der Zellmembran. Die Granula der Thrombozyten sind deutlich positiv. Das Zytoplasma der Lymphozyten reagierte ebenfalls positiv. Es kam zu einer gut erkennbaren Bindung von VAA an die Granula der neutrophilen Granulozyten und Myelozyten. Die eosinophilen Granulozyten banden VAA ebenfalls an den Granula. Monozyten und Basophile waren bei diesem Nachweis nicht sicher zu identifizieren.

Tabelle 46: Auswertung Lektine: VAA-Biotin, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	25 %	50 %	12,5 %	12,5 %	80 %
Zytoplasma	12,5 %	37,5 %	37,5 %	12,5 %	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	0	12,5 %	25 %	37,5 %	25 %	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	87,5 %	12,5 %	0	0	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	62,5 %	25 %	12,5 %	0	0	80 %
Granula	0	12,5 %	25 %	50 %	12,5 %	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	33,3 %	66,7 %	0	0	30 %
Granula	0	0	0	66,7 %	33,3 %	30 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	30 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-

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

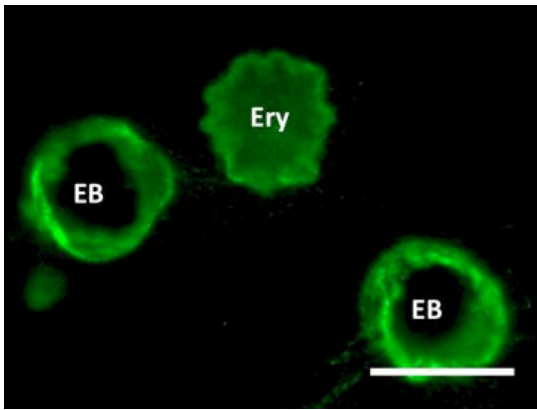


Abbildung 95: Erythroblasten, VAA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, SSL 7,2 cm)

VAA-Biotin bindet sich intensiv an die Membran und das Zytoplasma der Erythroblasten (EB). Auch die Erythrozyten weisen eine positive Reaktion auf.

WB = 10 µm

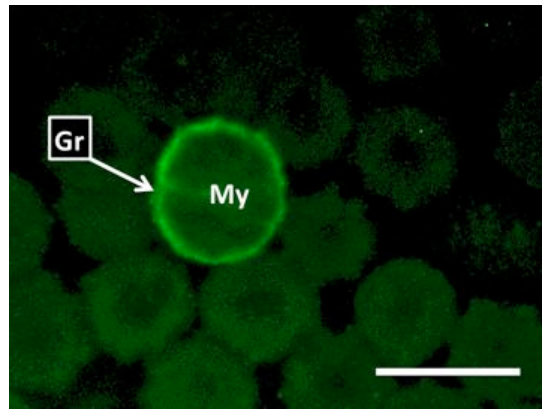


Abbildung 96: Myelozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, w, SSL 39 cm)

Die Granula (Gr) des Myelozyten (My) sind positiv.

WB = 10 µm

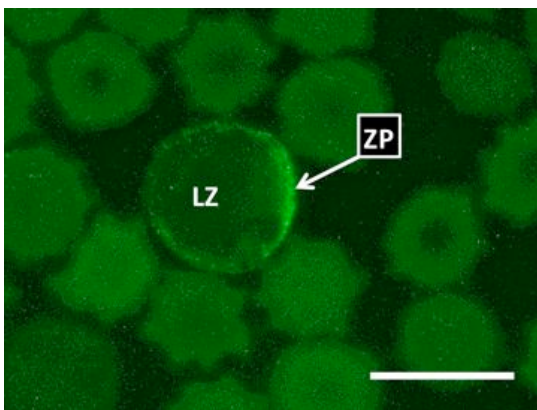


Abbildung 97: Lymphozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Der Lymphozyt (LZ) bindet das Lektin im Zytoplasma (ZP)

WB = 10 µm

4.2.3.2. Postnatal

Die Erythrozyten banden VAA deutlich an der Zellmembran und im Zytoplasma. Aus Tabelle 47 geht hervor, dass die Granula der Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten eine starke bis sehr starke Reaktion aufwiesen. Die Granula der eosinophilen Granulozyten banden VAA ebenfalls sehr stark. Das Zytoplasma der Lymphozyten bindet VAA nur schwach bis mittelstark, genauso wie die Zellmembran.

Tabelle 47: Auswertung Lektine: VAA-Biotin, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	22,2 %	44,4 %	33,3 %	0	0	90 %
Zytoplasma	0	44,4 %	22,2 %	33,3 %	0	90 %
Thrombozyten						
Zellmembran	11,1 %	44,4 %	44,4 %	0	0	90 %
Granula	0	0	0	11,1 %	88,9 %	90 %
Lymphozyten						
Zellmembran	11,1 %	44,4 %	33,3 %	11,1 %	0	90 %
Zytoplasma	0	22,2 %	55,6 %	22,2 %	0	90 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	11,1 %	33,3 %	44,4 %	11,1 %	0	90 %
Granula	0	0	22,2 %	44,4 %	33,3 %	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	90 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	50 %	50 %	0	0	20 %
Granula	0	0	0	0	100 %	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-

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

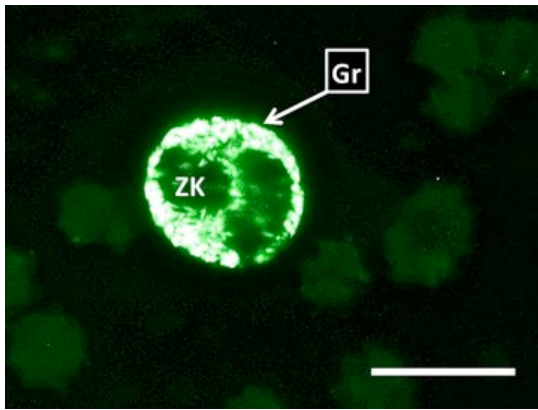


Abbildung 98: Neutrophiler Granulozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Die Granula (Gr) des neutrophilen Granulozyten stellen sich stark positiv dar.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

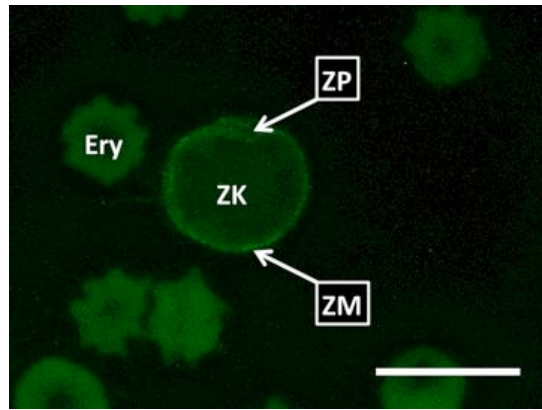


Abbildung 99: Lymphozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 1,5 Std post natum)

Sowie die Zellmembran (ZM) als auch das Zytoplasma (ZP) des Lymphozyten sind leicht positiv. Die Erythrozyten (Ery) zeigen eine ähnliche Bindung.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

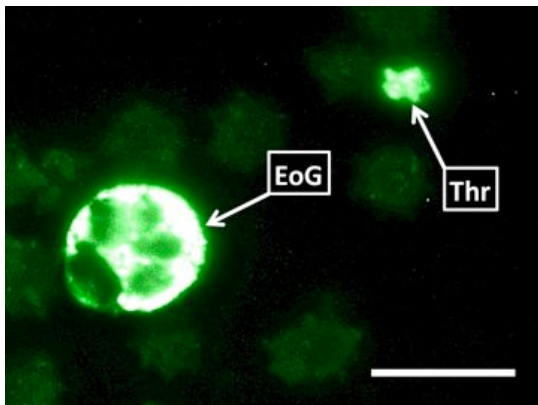


Abbildung 100: Eosinophiler Granulozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Der eosinophile Granulozyt (EoG) bindet das Lektin deutlich an den Granula. Im Thrombozyten (Thr) ist ebenfalls eine Bindung zu erkennen.

WB = 10 µm

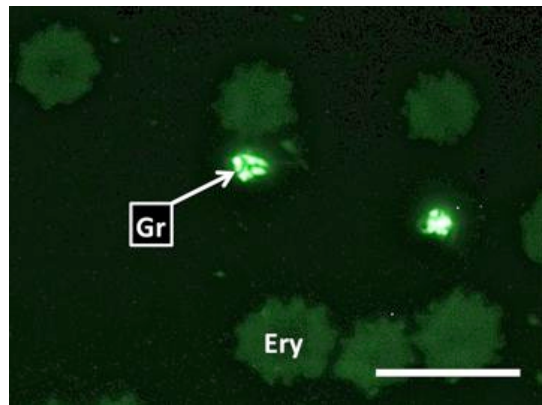


Abbildung 101: Thrombozyten, VAA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, w, Alter: 7 Std post natum)

Die Granula (Gr) der Thrombozyten sind deutlich zu erkennen. Sie weisen eine starke Bindung mit dem Lektin auf.

Ery = Erythrozyt
WB = 10 µm

4.3. N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure spezifische Lektine

4.3.1. Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA-FITC)

4.3.1.1. Pränatal

WGA-FITC band sehr stark an die Zellmembran der Erythrozyten. Auch die Zellmembran der Erythroblasten war positiv. Das Zytoplasma stellte sich leicht WGA-positiv dar. Die Zellmembran und das Zytoplasma der Lymphozyten war in fast allen Ausstrichen leicht positiv, nur bei manchen konnte eine stärkere Bindung von WGA festgestellt werden. Bei den neutrophilen Granulozyten band die Zellmembran das Lektin am stärksten. In wenigen Ausstrichen waren auch die Granula und das Zytoplasma positiv. Die Granula der eosinophilen Granulozyten stellten sich deutlich WGA-positiv dar. Die wenigen, sicher identifizierbaren Monozyten banden das Lektin nur leicht an der Membran und teils auch im Zytoplasma. Die Feten im sehr frühen Entwicklungsstadium wiesen die gleiche Bindungsintensität wie die älteren Feten auf.

Tabelle 48: Auswertung Lektine: WGA-FITC, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	0	0	100 %	70 %
Zytoplasma	0	42,9 %	42,9 %	14,3 %	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	85,7 %	14,3 %	0	0	0	70 %
Granula	0	14,3 %	57,1 %	28,6 %	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	28,6 %	47,1 %	14,3 %	0	70 %
Zytoplasma	28,6 %	42,9 %	14,3 %	14,3 %	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	28,6 %	28,6 %	14,3 %	28,6 %	70 %
Granula	28,6 %	57,1 %	14,3 %	0	0	70 %
Zytoplasma	28,6 %	28,6 %	42,9 %	0	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	33,3 %	33,3 %	33,3 %	30 %
Granula	0	0	0	33,3 %	66,7 %	30 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	30 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	100 %	0	0	0	20 %
Zytoplasma	0	50 %	50 %	0	0	20 %

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

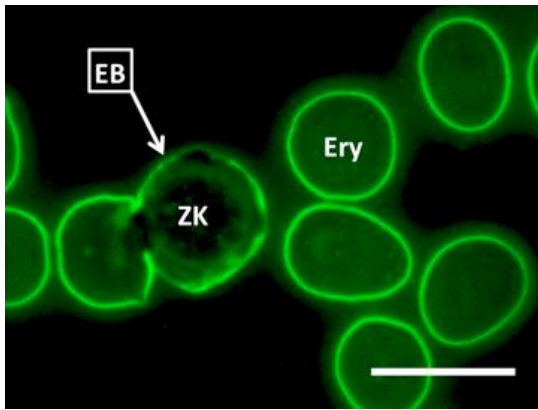


Abbildung 102: Erythroblast, WGA-FITC

(Fetus, m, SSL 15 cm)

Die Zellmembran des Erythroblasten (EB) und der Erythrozyten (Ery) ist stark positiv. Auch das Zytoplasma färbt sich grün.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

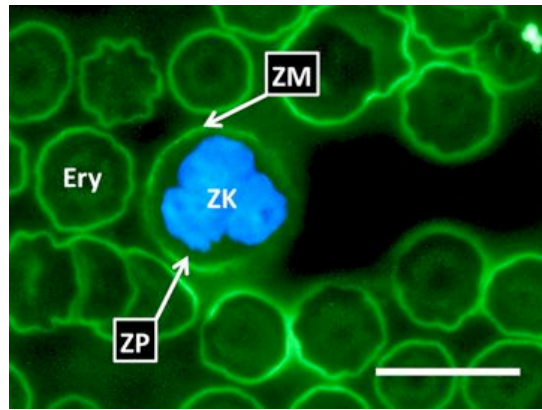


Abbildung 103: Neutrophiler Granulozyt, WGA-FITC

(Fetus, w, SSL 39 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des neutrophilen Granulozyten ist nur schwach gefärbt. Die Zellmembran (ZM) bindet WGA-FITC deutlich. Der Zellkern (ZK) ist mit DAPI gefärbt. Die Membran der Erythrozyten (Ery) ist wieder deutlich zu erkennen.

WB = 10 µm

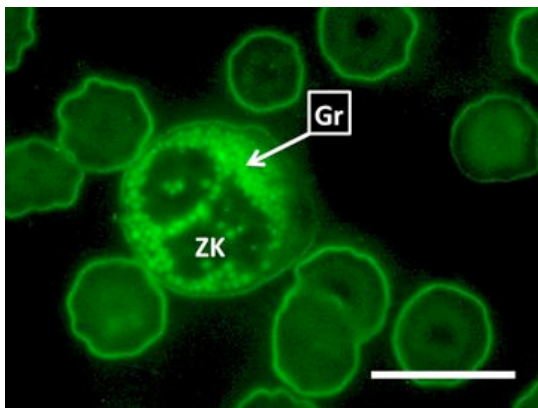


Abbildung 104: Eosinophiler Granulozyt, WGA-FITC

(Fetus, w, SSL 39 cm)

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten sind deutlich positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

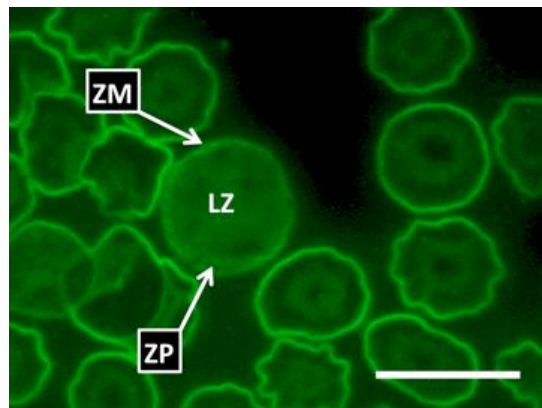


Abbildung 105: Lymphozyt, WGA-FITC

(Fetus, w, SSL 39 cm)

Der Lymphozyt (LZ) bindet das Lektin an der Zellmembran (ZM) und im Zytoplasma (ZP). Die Bindung ist schwächer als bei den benachbarten Erythrozyten.

WB = 10 µm

4.3.1.2. Postnatal

Die Erythrozyten der Kälber banden WGA stark an der Zellmembran, das Zytoplasma wies eine schwächere WGA-Bindung als die Zellmembran auf, was aus Tabelle 49 hervorgeht. Die Zellmembranen der Lymphozyten sind in den meisten Ausstrichen stark positiv und wurden mit ++ (starke Reaktion) und +++ (sehr starke Reaktion) beurteilt. Die Granula der eosinophilen Granulozyten sind stark WGA-positiv.

Tabelle 49: Auswertung Lektine: WGA-FITC, Kalb

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	16,7 %	33,3 %	50 %	60 %
Zytoplasma	16,7 %	50 %	16,7 %	16,7 %	0	60 %
Thrombozyten						
Zellmembran	16,7 %	83,3 %	0	0	0	60 %
Granula	0	16,7 %	66,7 %	16,7 %	0	60 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	16,7 %	50 %	33,3 %	60 %
Zytoplasma	16,7 %	16,7 %	33,3 %	33,3 %	0	60 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	33,3 %	16,7 %	33,3 %	16,7 %	60 %
Granula	0	16,7 %	33,3 %	33,3 %	16,7 %	60 %
Zytoplasma	0	33,3 %	50 %	16,7 %	0	60 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	50 %	50 %	0	0	20 %
Granula	0	0	0	100 %	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	0	20 %
Zytoplasma	0	0	50 %	50 %	0	20 %

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

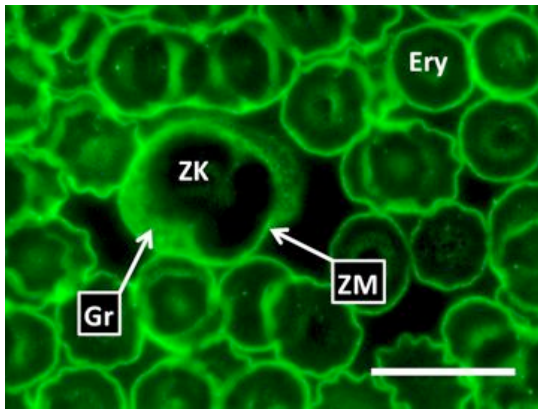


Abbildung 106: Neutrophiler Granulozyt, WGA-FITC
(Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Die Granula (Gr) als auch die Zellmembran (ZM) des Neutrophilen sind WGA-positiv. Die Zellmembran der Erythrozyten zeigt ebenfalls deutliche Fluoreszenz.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

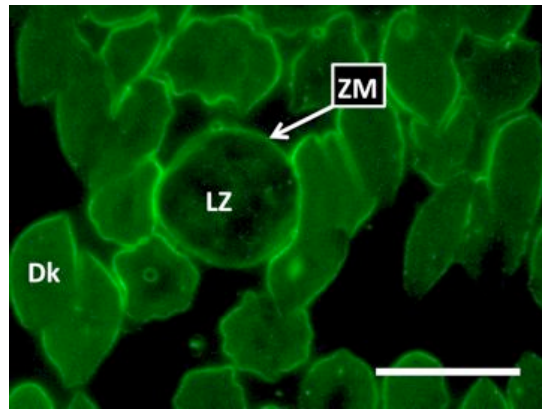


Abbildung 107: Lymphozyt, WGA-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Die Zellmembran (ZM) des Lymphozyten (LZ) stellt sich positiv dar. Um den Lymphozyten herum sind viele Dakryozyten (Dk) zu erkennen.

WB = 10 µm

4.3.2. Bindung von succinyliertem Wheat germ Agglutinin (WGAs-FITC)

4.3.2.1. Pränatal

Im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas wiesen die meisten Erythrozyten nur eine schwach positive Reaktion auf. Die Erythroblasten und Lymphoblasten banden WGAs deutlich bis stark an der Zellmembran als auch im Zytoplasma. Die Thrombozyten waren durchgehend negativ. Lymphozyten banden das WGAs-FITC an der Zellmembran und im Zytoplasma. Die Granula der neutrophilen Granulozyten und das Zytoplasma wiesen eine positive Reaktion auf. Myelozyten waren selten zu finden und zeigten eine deutliche Reaktion mit WGAs. Die Granula der Eosinophilen waren positiv. Monozyten waren selten zu finden und banden das Lektin meist nur schwach.

Tabelle 50: Auswertung Lektine: WGAs-FITC, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	62,5 %	25 %	12,5 %	0	80 %
Zytoplasma	12,5 %	50 %	37,5 %	0	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	25 %	12,5 %	50 %	12,5 %	0	80 %
Zytoplasma	12,5 %	25 %	37,5 %	25 %	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	0	25 %	50 %	25 %	0	80 %
Zytoplasma	0	37,5 %	37,5 %	25 %	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	30 %
Granula	0	0	33,3 %	66,7 %	0	30 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	30 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	50 %	50 %	0	0	0	40 %

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

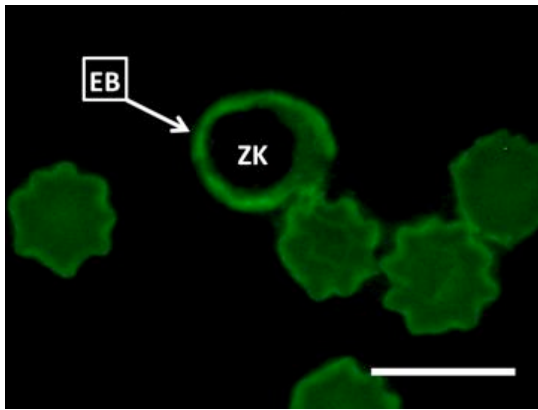


Abbildung 108: Erythroblast, WGAs-FITC
(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Das Zytoplasma und die Zellmembran des Erythroblasten (EB) sind leicht positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

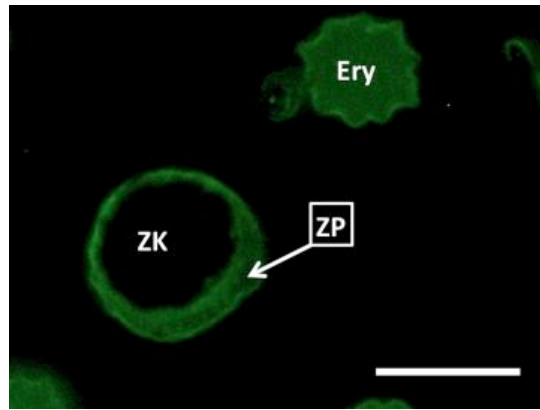


Abbildung 109: Lymphoblast, WGAs-FITC
(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des Lymphoblasten weist eine leichte Bindung von WGAs-FITC auf. Die Erythrozyten (Ery) binden das Lektin an der Zellmembran.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

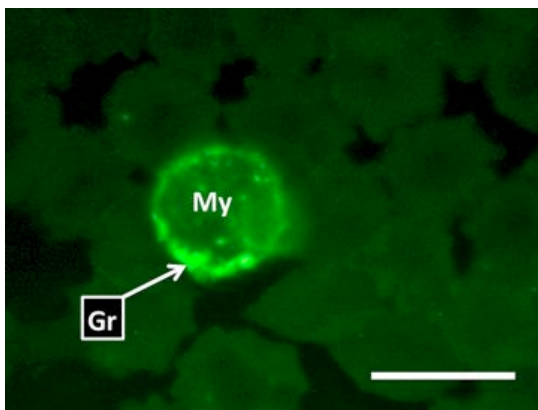


Abbildung 110: Myelozyt, WGAs-FITC
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Der Myelozyt (My) weist eine deutlich granuläre Reaktion auf. Dies deutet darauf hin, dass es sich um einen eosinophilen Promyelozyten handeln könnte.

Gr = Granula
WB = 10 µm

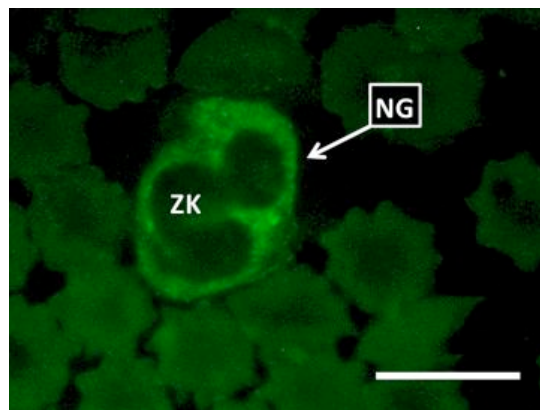


Abbildung 111: Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) sind deutlich zu erkennen. Das Zytoplasma ist ebenfalls leicht positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.3.2.2. Postnatal

Die Erythrozyten des Kalbes banden WGAs sehr stark an der Zellmembran und im Zytoplasma. Im Zytoplasma waren teilweise körnige Strukturen zu erkennen. Die Membran war stark positiv. Thrombozyten waren durchgehend negativ. Die Lymphozytenmembran und das Zytoplasma banden WGAs-FITC deutlich. Die neutrophilen Granulozyten wiesen eine WGAs-Bindung an Zellmembran, Granula und Zytoplasma auf. Nur wenige Eosinophile waren zu finden, bei denen die Granula positiv waren. Die Monozyten waren im Allgemeinen nur leicht positiv. Die Tabelle 51 fasst die Ergebnisse noch einmal zusammen.

Tabelle 51: Auswertung Lektine: WGAs-FITC, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	28,6 %	14,3 %	28,6 %	28,6 %	70 %
Zytoplasma	0	42,9 %	42,9 %	14,3 %	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	42,9 %	42,9 %	14,3 %	70 %
Zytoplasma	0	14,3 %	28,6 %	57,1 %	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	28,6 %	14,3 %	42,9 %	14,3 %	0	70 %
Granula	0	14,3 %	28,6 %	42,9 %	14,3 %	70 %
Zytoplasma	14,3 %	28,6 %	42,9 %	14,3 %	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Granula	0	0	0	100 %	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	30 %
Zytoplasma	33,3 %	66,7 %	0	0	0	30 %

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

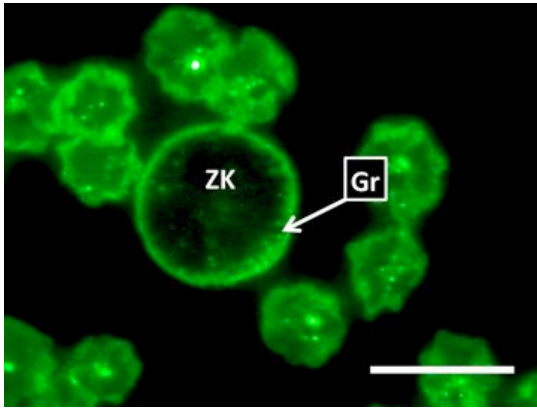


Abbildung 112: Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Die deutlich positiven Granula (Gr) sind gut zu erkennen. Die Erythrozytenmembran bindet das Lektin ebenfalls.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

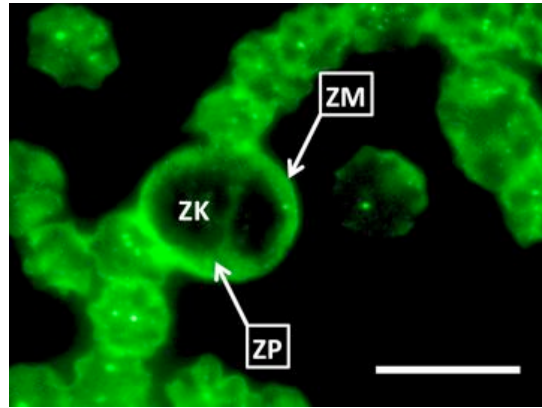


Abbildung 113: Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC
(Kalb, m, Alter: 9 Std post natum)

Die Zellmembran (ZM) und das Zytoplasma (ZP) binden WGAs-FITC.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

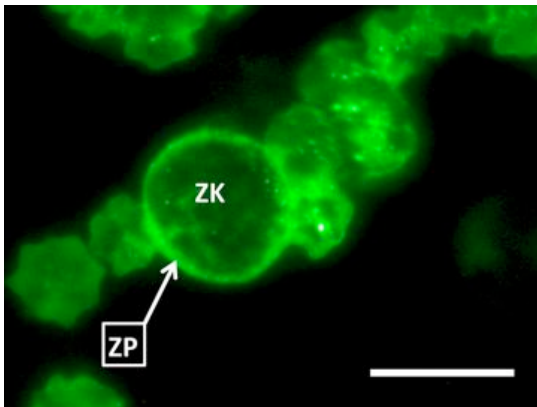


Abbildung 114: Lymphozyt, WGAs-FITC
(Kalb, m, Alter: 9 Std post natum)

Bei dem Lymphozyten ist vor allem das Zytoplasma (ZP) positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

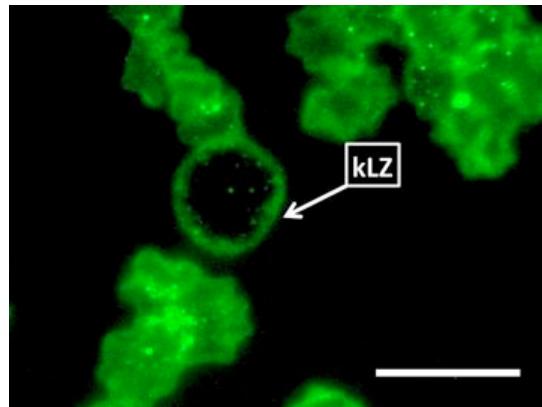


Abbildung 115: Kleiner Lymphozyt, WGAs-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Der kleine Lymphozyt (kLZ) weist ebenfalls eine deutliche Bindung auf.

WB = 10 µm

4.4. N-Acetyl-Galaktosamin spezifische Lektine

4.4.1. Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL-1-FITC)

4.4.1.1. Pränatal

Aus Tabelle 52 geht hervor, dass die Erythrozyten und Erythroblasten des Fetus eine schwache bis deutliche Bindung von GSL-1 zeigten. Lymphozyten und Lymphoblasten wiesen nur sehr selten eine leicht positive Reaktion im Zytoplasma auf. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten und Myelozyten war deutlich positiv. Auch die Granula der Neutrophilen waren teilweise positiv. Die Thrombozyten banden das Lektin an den kleinen zytoplasmatischen Granula. Monozyten waren in allen Ausstrichen negativ. Die eosinophilen Granulozyten wiesen nur eine schwache Bindung von GSL-1 an der Zellmembran und an den Granula auf.

Tabelle 52: Auswertung Lektine: GSL-1-FITC, Fetus

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	42,9 %	28,6 %	28,6 %	0	0	70 %
Zytoplasma	28,6 %	42,9 %	28,6 %	0	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	42,9 %	42,9 %	14,3 %	0	70 %
Granula	0	0	28,6 %	57,1 %	14,3 %	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	85,7 %	14,3 %	0	0	0	70 %
Zytoplasma	28,6 %	71,4 %	0	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	42,9 %	42,9 %	14,3 %	0	70 %
Granula	0	14,3 %	42,9 %	42,9 %	0	70 %
Zytoplasma	0	0	14,3 %	57,1 %	28,6 %	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	100 %	0	0	0	20 %
Granula	0	50 %	50 %	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %

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

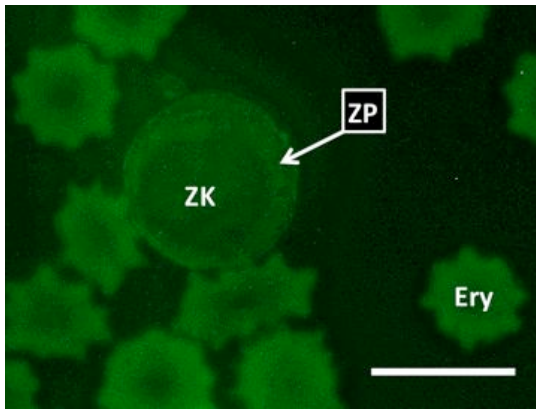


Abbildung 116: Lymphozyt, GSL-1-FITC
(Fetus, m, SSL 15 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des Lymphozyten färbt sich nur leicht an. Die Erythrozyten (Ery) sind GSL-1-positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

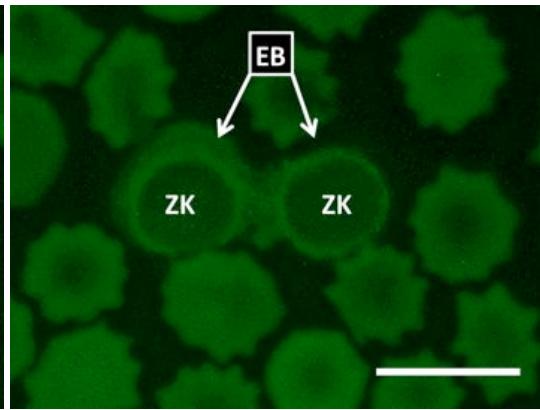


Abbildung 117: Erythroblasten, GSL-1-FITC
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Die Erythroblasten (EB) zeigen eine schwach-positive Reaktion.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

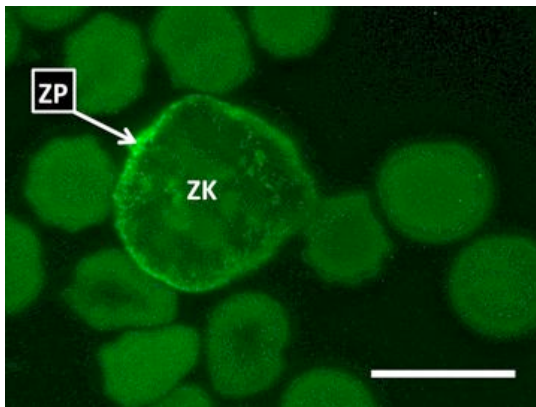


Abbildung 118: Myelozyt, GSL-1-FITC
(Fetus, m, SSL 15 cm)

Der Myelozyt bindet GSL-1 im Zytoplasma (ZP).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

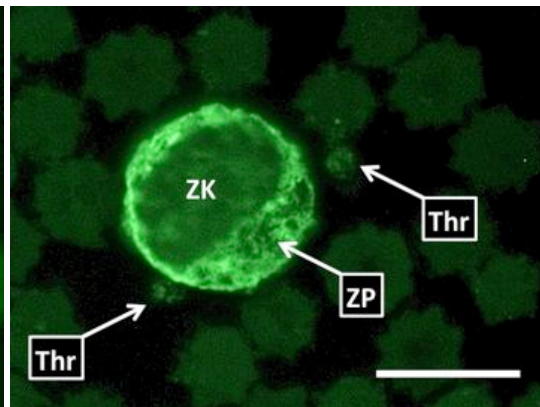


Abbildung 119: Neutrophiler Granulozyt, GSL-1-FITC
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Das Zytoplasma (ZP) weist eine deutlich positive Reaktion auf. Teilweise kann auch positive Granula gesehen werden. Die Granula der Thrombozyten (Thr) sind ebenfalls GSL-1-positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.4.1.2. Postnatal

Die Erythrozyten der Kälber banden das Lektin deutlich an ihrer Zellmembran und Zytoplasma. Die Thrombozyten zeigten eine positive Reaktion in den Granula. Die Zellmembran der Lymphozyten war deutlich positiv, das Zytoplasma nur leicht positiv. Die Granula der neutrophilen Granulozyten banden GSL-1 deutlich, auch das Zytoplasma stellte sich teils positiv dar. Die Granula der Eosinophilen zeigten nur eine leicht positive Reaktion. Monozyten waren durchgehend negativ.

Tabelle 53: Auswertung Lektine: GSL-1-FITC, Kalb

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	25 %	62,5 %	12,5 %	0	0	80 %
Zytoplasma	25 %	50 %	25 %	0	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	12,5 %	37,5 %	50 %	0	0	80 %
Granula	0	25 %	37,5 %	37,5 %	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	12,5 %	25 %	37,5 %	25 %	80 %
Zytoplasma	12,5 %	37,5 %	37,5 %	12,5 %	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	25 %	50 %	25 %	0	0	80 %
Granula	0	0	12,5 %	25 %	62,5 %	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	66,7 %	33,3 %	0	0	30 %
Granula	0	0	66,7 %	33,3 %	0	30 %
Zytoplasma	0	33,3 %	66,7 %	0	0	30 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %

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

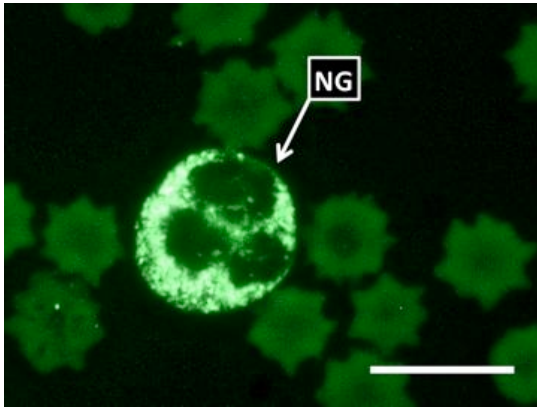


Abbildung 120: Neutrophiler Granulozyt, GSL-1-FITC
(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) sind deutlich positiv. Auch das Zytoplasma färbt sich an.

WB = 10 µm

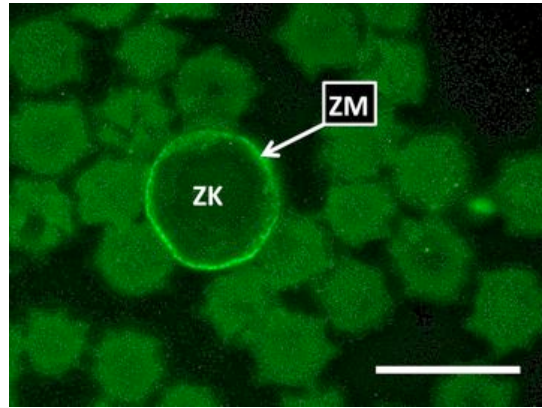


Abbildung 121: Lymphozyt, GSL-1-FITC
(Kalb, w, Alter: 10 Std post natum)

Die Zellmembran (ZM) des Lymphozyten bindet GSL-1-FITC und zeigt eine positive Reaktion.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.4.2. Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA-FITC)

Die Bindung von DBA wurde mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung untersucht.

4.4.2.1. Pränatal

Alle Ausstriche, die ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase gefärbt wurden, wiesen keine Bindung an den Blutzellen auf.

Nach Inkubation mit Neuraminidase kam es zu keiner Bindung von DBA an die Erythrozyten. Auch Erythroblasten, Thrombozyten und die meisten Monozyten waren negativ. Die Lymphozytenmembran stellte sich in manchen Ausstrichen DBA-positiv dar. Die Granula der neutrophilen Granulozyten banden DBA teilweise stark. Die Myelozyten banden das Lektin nicht. Die eosinophile Granula der eosinophilen Myelozyten zeigten immer eine positive Reaktion. In Tabelle 54 sind die Ergebnisse der DBA-Färbung nach Neuraminidasevorbehandlung noch einmal zusammengefasst. Zur Lektin-Färbung ohne Neuraminidaseinkubation wurde keine Auswertungstabelle erstellt, da es hier in keinem Fall zu einer positiven Reaktion gekommen ist.

Tabelle 54: Auswertung Lektine: DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Granula	100 %	0	0	0	0	100 %
Lymphozyten						
Zellmembran	40 %	40 %	20 %	0	0	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Granula	0	20 %	40 %	40 %	0	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %

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

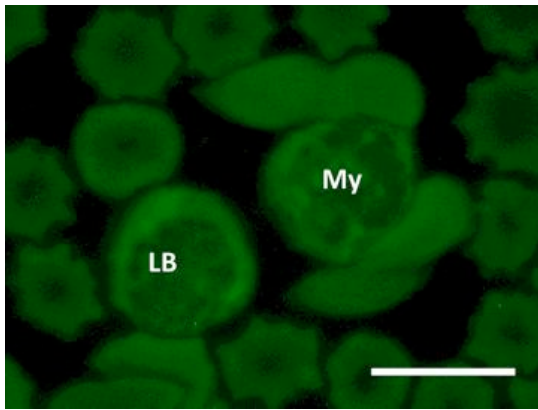


Abbildung 122: Lymphoblast und Myeloblast, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, w, SSL 39 cm)

Der Lymphoblast (LB) als auch der Myeloblast (My) binden das Lektin nicht. Diese Zellen weisen nur Autofluoreszenz auf.

WB = 10 µm

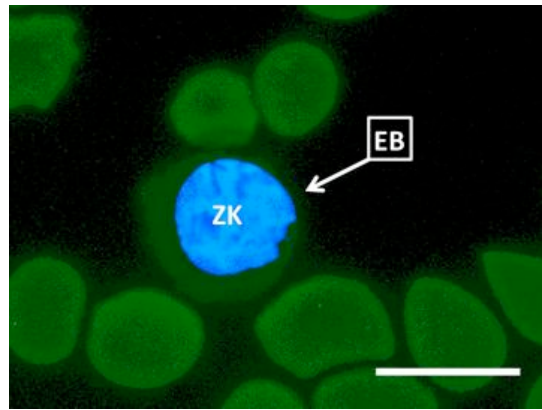


Abbildung 123: Erythroblast, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase

(Fetus, w, SSL 39 cm)

Es kommt zu keiner Bindung an den Erythroblasten (EB). Der Zellkern (ZK) ist mit DAPI gefärbt.

WB = 10 µm

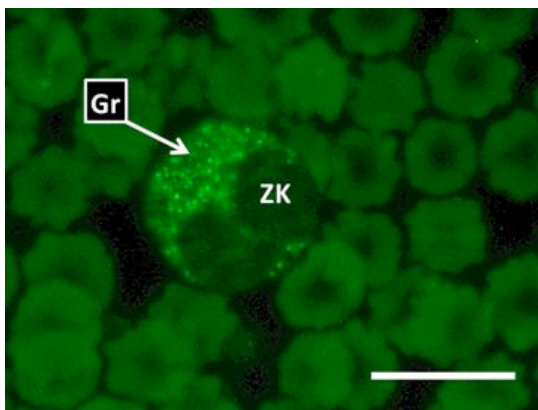


Abbildung 124: Neutrophiler Granulozyt, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 15 cm)

Die Granula (Gr) stellen sich deutlich DBA-positiv dar.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.4.2.2. Postnatal

Auch im Kälberblut kam es ohne Neuraminidasevorbehandlung zu keiner Bindung von DBA an die Blutzellen.

Nach Vorbehandlung mit Neuraminidase band das Lektin an die eosinophilen Granula und auch an die Granula der neutrophilen Granulozyten, bei letzteren jedoch in unterschiedlicher Intensität. Die DBA-Bindung wird in Tabelle 55 noch einmal verdeutlicht.

Tabelle 55: Auswertung Lektine: DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Granula	0	20 %	40 %	40 %	0	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Granula	0	25 %	25 %	50 %	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %

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

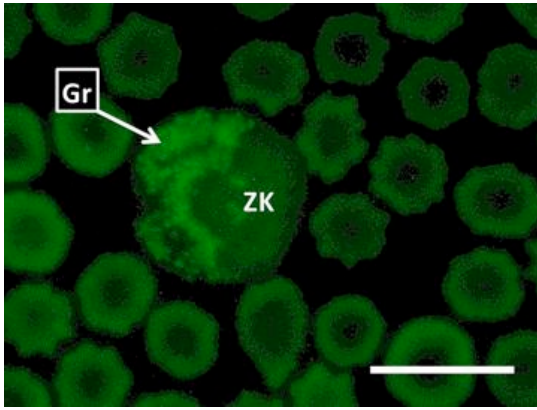


Abbildung 125: Eosinophiler Granulozyt, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten binden das Lektin.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

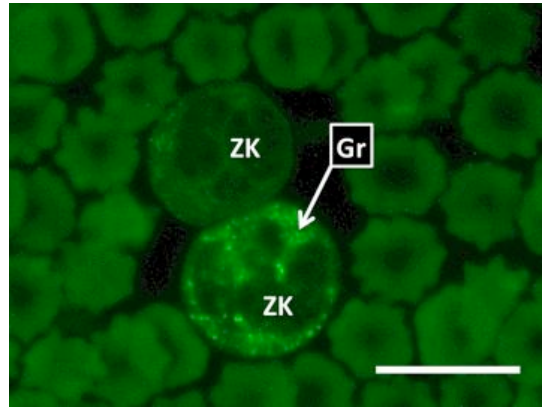


Abbildung 126: Neutrophile Granulozyten, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Neutrophile Granulozyten binden das Lektin unterschiedlich stark. Die Lektinbindung des unteren Neutrophilen erscheint deutlich stärker.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.4.3. Bindung von *Sophora japonica* Agglutinin (SJA-FITC)

Die Bindung von SJA-FITC wurde mit und ohne Vorinkubation mit Neuraminidase untersucht.

4.4.3.1. Pränatal

Ohne Neuraminidasevorbehandlung kam es zu einer Bindung von SJA im Zytoplasma der Erythrozyten und Erythroblasten. Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten verhielten sich negativ. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten und Myelozyten zeigte eine leicht positive Reaktion. Teilweise waren auch die Granula leicht positiv. Es konnten nur wenige eosinophile Granulozyten mit positiven Granula gefunden werden.

Nach Neuraminidasevorbehandlung wurde die Bindung von SJA im Zytoplasma der Erythrozyten und Erythroblasten leicht verstärkt. Die neutrophilen Granula waren nun besser zu erkennen und banden das Lektin deutlich. Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten waren weiterhin negativ. In den Tabellen 56 und 57 sind die Ergebnisse der Lektinbindung ohne und mit Neuraminidasevorbehandlung zusammengefasst.

Tabelle 56: Auswertung Lektine: SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	60 %
Zytoplasma	16,7 %	33,3 %	33,3 %	16,7 %	0	60 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	60 %
Granula	100 %	0	0	0	0	60 %
Lymphozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	60 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	60 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	60 %
Granula	66,7 %	16,7 %	16,7 %	0	0	60 %
Zytoplasma	16,7 %	16,7 %	33,3 %	33,3 %	0	60 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	10 %
Granula	0	0	0	100 %	0	10 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	10 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %

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

Tabelle 57: Auswertung Lektine: SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	0	0	25 %	50 %	25 %	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	0	50 %	25 %	25 %	0	80 %
Zytoplasma	25 %	25 %	50 %	0	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %

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

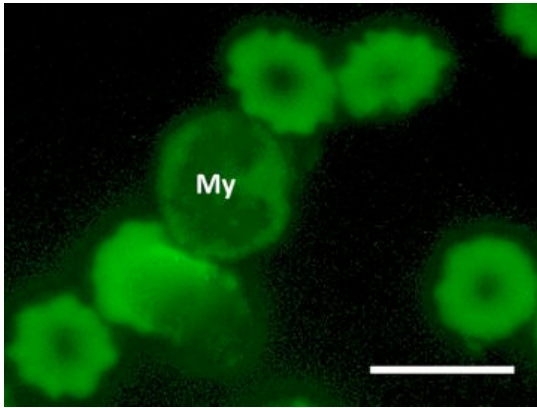


Abbildung 127: Myelozyt, SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 64 cm)

Das Zytoplasma des Myelozyten (My) bindet das Lektin.

WB = 10 µm

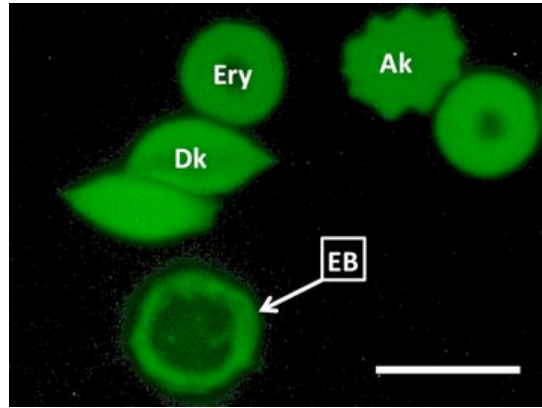


Abbildung 128: Erythroblast, SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 14 cm)

Das Zytoplasma des Erythroblasten (EB) ist positiv. Das Zytoplasma des Erythrozyten (Ery), Akanthozyten (Ak) und Dakryozyten (Dk) ist ebenfalls deutlich SJA-positiv.

WB = 10 µm

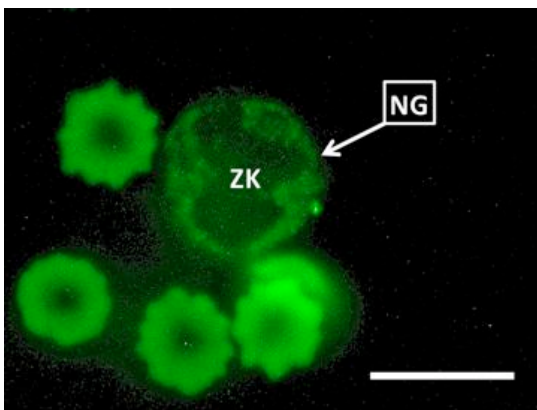


Abbildung 129: Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 64 cm)

Mit Neuraminidase sind die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) zu erkennen.

WB = 10 µm

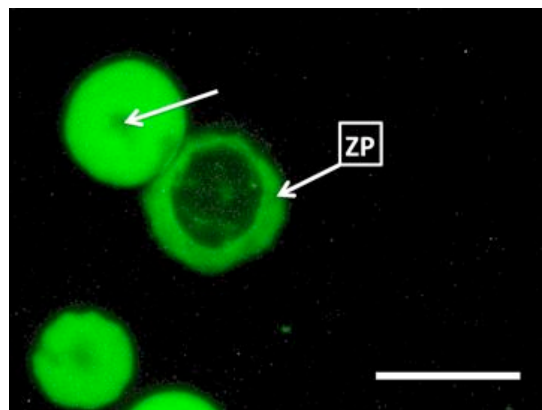


Abbildung 130: Erythroblast, SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Fetus, m, SSL 14 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des Erythroblasten bindet das Lektin nach Neuraminidasebehandlung stärker. Bei dem Erythrozyten ist eine zentrale Aufhellung zu erkennen (Pfeil).

WB = 10 µm

4.4.3.2. Postnatal

Ohne Neuraminidasevorinkubation band das Lektin deutlich im Zytoplasma der Erythrozyten. Die Granula der neutrophilen Granulozyten waren leicht positiv. Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten waren, wie bei den Feten auch, negativ. Die eosinophile Granula war nur leicht positiv. In Tabelle 58 sind die Ergebnisse der Lektinbindung ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase zusammengefasst.

Durch die Behandlung mit Neuraminidase konnte die Bindung an den neutrophilen Granula leicht verstärkt werden. Bei anderen Blutzellen kam es zu keiner Intensivierung der Bindung.

Tabelle 58: Auswertung Lektine: SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	0	28,6 %	28,6 %	28,6 %	14,3 %	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	0	14,3 %	57,1 %	28,6 %	0	70 %
Zytoplasma	57,1 %	42,9 %	0	0	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	30 %
Granula	0	33,3 %	66,7 %	0	0	30 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	30 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %

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

Tabelle 59: Auswertung Lektine: SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Zytoplasma	0	0	40 %	40 %	20 %	100 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Granula	100 %	0	0	0	0	100 %
Lymphozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Granula	0	20 %	20 %	40 %	20 %	100 %
Zytoplasma	40 %	40 %	20 %	0	0	100 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %

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

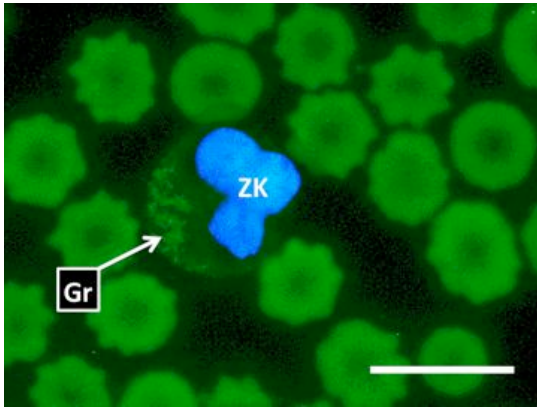


Abbildung 131: Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Die Granula (Gr) des Neutrophilen sind leicht positiv.

WB = 10 μ m

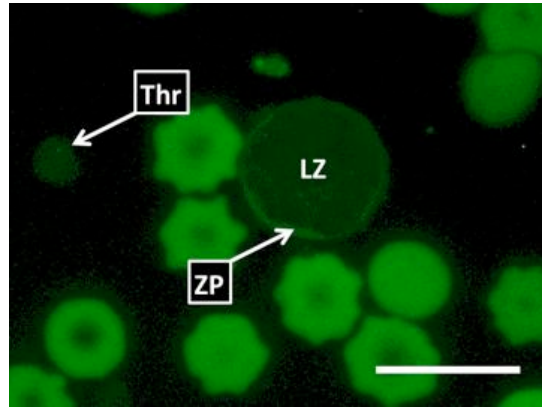


Abbildung 132: Lymphozyt, SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Das Zytoplasma (ZP) des Lymphozyten (LZ) und der Thrombozyt (Thr) binden das Lektin nicht.

WB = 10 μ m

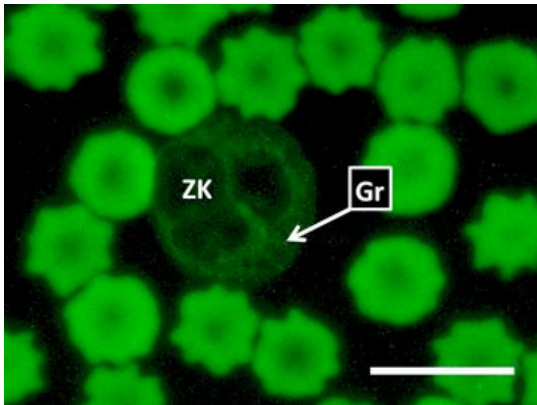


Abbildung 133: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Die Granula (Gr) des Granulozyten sind nach Neuraminidasevorbehandlung deutlicher zu erkennen. Auch das Zytoplasma ist leicht SJA-positiv.

WB = 10 μ m

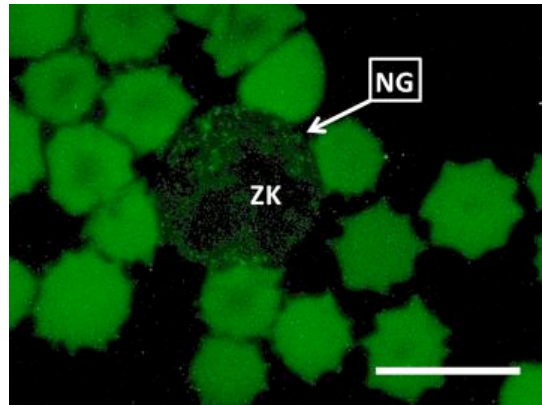


Abbildung 134: Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, w, Alter: 12 Std post natum)

Ein Neutrophiler Granulozyt (NG) mit positiven Granula.

WB = 10 μ m

4.5. N-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose spezifische Lektine

4.5.1. Bindung von Soybean Agglutinin (SBA-FITC)

Die Bindung von SBA-FITC wurde mit und ohne Neuraminidasevorbehandlung untersucht.

4.5.1.1. Pränatal

Ohne vorangehende Inkubation der Schnitte mit Neuraminidase kam es zu keiner Bindung an die Blutzellen der Feten.

Auch nach Neuraminidasevorbehandlung stellten sich die Erythrozyten und Erythroblasten meist negativ dar, nur in wenigen Ausstrichen kam es zu einer schwachen Bindung von SBA im Zytoplasma. Die Granula der Thrombozyten reagierten positiv mit dem SBA-FITC. Die Lymphozyten und Monozyten stellten sich fast durchgehend negativ dar. Die Granula der neutrophilen Granulozyten waren deutlich positiv. Myelozyten konnten nur schwer erkannt werden und banden das Lektin kaum. Die Granula der eosinophilen Granulozyten stellten sich ebenfalls positiv dar. In Tabelle 60 sind die Ergebnisse der Bindung von SBA nach Neuraminidasevorbehandlung noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 60: Auswertung Lektine: SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	80 %	20 %	0	0	0	100 %
Zytoplasma	60 %	40 %	0	0	0	100 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Granula	0	20 %	20 %	60 %	0	100 %
Lymphozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	100 %
Granula	0	0	20 %	40 %	40 %	100 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	100 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	60 %
Granula	0	0	33,3 %	66,7 %	0	60 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	60 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	50 %	50 %	0	0	0	40 %

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

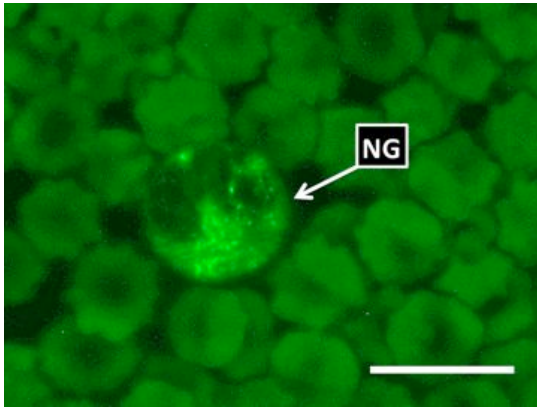


Abbildung 135: Neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase

(Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Der neutrophile Granulozyt (NG) weist eine deutliche Bindung auf. Die Erythrozyten sind negativ und zeigen nur Autofluoreszenz.

WB = 10 μ m

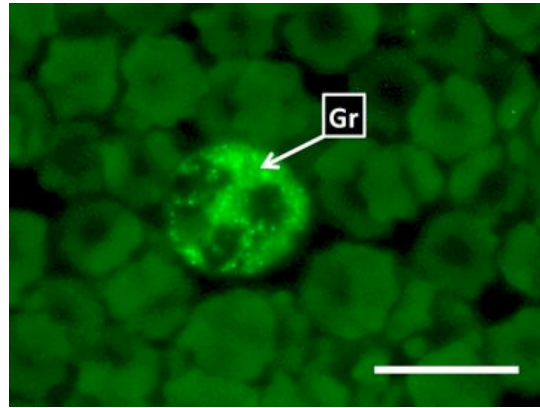


Abbildung 136: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase

(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Die Granula (Gr) binden das Lektin deutlich.

WB = 10 μ m

4.5.1.2. Postnatal

Ohne die Vorbehandlung mit Neuraminidase band SBA an keine Zellstrukturen der Blutzellen der Kälber.

Nach Neuraminidasevorbehandlung band SBA deutlich an die Granula der neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und eosinophilen Granulozyten.

Tabelle 61: Auswertung Lektine: SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	50 %	50 %	0	0	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	0	25 %	25 %	50 %	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	0	0	0	75 %	25 %	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	60 %
Zytoplasma	66,7 %	33,3 %	0	0	0	60 %

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

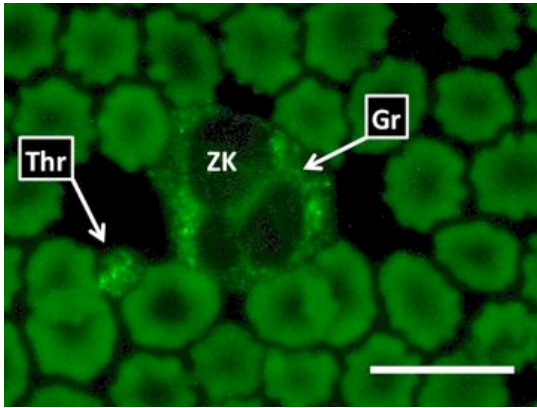


Abbildung 137: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt, SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (Kalb, m, Alter: 1,5 Std post natum)

Die Granula (Gr) des neutrophilen Granulozyten und des Thrombozyten (Thr) sind deutlich positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

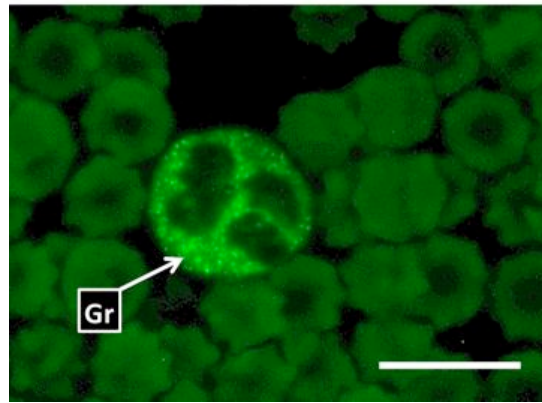


Abbildung 138: Neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase

(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Bei diesem Granulozyten bindet SBA-FITC stark an die Granula (Gr).

WB = 10 µm

4.5.2. Bindung von Sambucus niger Agglutinin (SNA-Biotin)

4.5.2.1. Pränatal

Die Erythrozyten und Erythroblasten banden SNA deutlich an der Zellmembran. Teilweise war auch das Zytoplasma der Erythrozyten positiv. Sehr selten konnten Thrombozyten gefunden werden, welche eine positive Reaktion an der Zellmembran aufwiesen. Die Lymphozyten und die Lymphoblasten stellten sich durchgehend positiv dar und banden das Lektin hauptsächlich in der Membran sowie ein wenig schwächer im Zytoplasma. In Tabelle 62 ist die positive Bindung von SNA-Biotin an die Zellmembran und das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten und Myelozyten dokumentiert. Die eosinophilen Granula banden das Lektin deutlich. Die Monozyten hatten eine positive Membran und nur teilweise ein positives Zytoplasma. Die Intensität der Bindung war bei allen Altersgruppen gleich.

Tabelle 62: Auswertung Lektine: SNA-Biotin, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	14,3 %	57,1 %	28,6 %	70 %
Zytoplasma	0	42,9 %	28,6 %	28,6 %	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	28,6 %	42,9 %	28,6 %	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	14,3 %	28,6 %	57,1 %	70 %
Zytoplasma	0	14,3 %	42,9 %	42,9 %	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	28,6 %	28,6 %	42,9 %	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	0	0	42,9 %	57,1 %	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	0	25 %	50 %	25 %	40 %
Zytoplasma	25 %	50 %	25 %	0	0	40 %

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

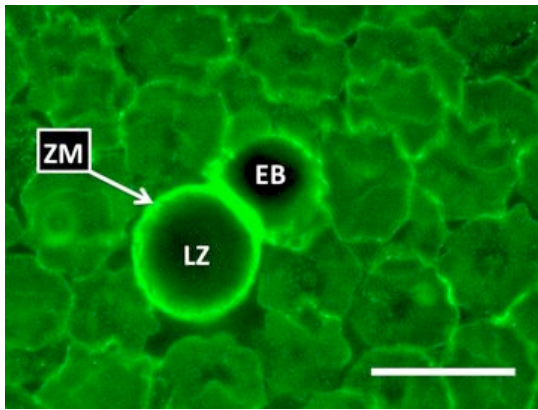


Abbildung 139: Lymphozyt und Erythroblast, SNA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Die Zellmembranen (ZM) des Lymphozyten (LZ) und des Erythroblasten (EB) sind positiv.

WB = 10 µm

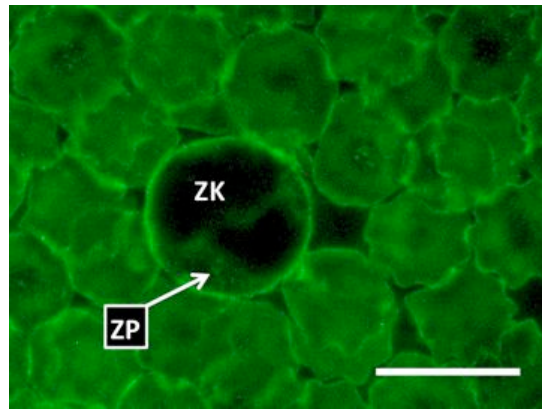


Abbildung 140: Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des Neutrophilen stellt sich positiv dar.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

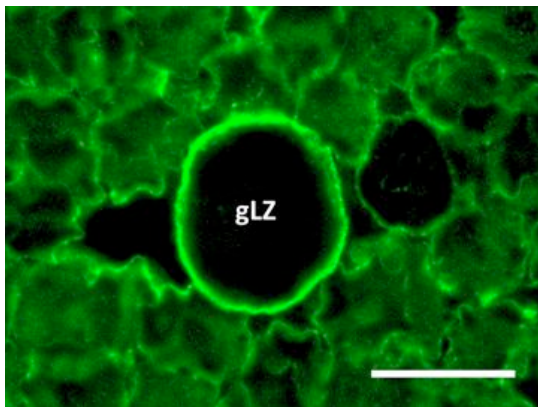


Abbildung 141: Großer Lymphozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Der Lymphozyt zeigt eine deutliche Bindung des Lektins an der Zellmembran.

WB = 10 µm

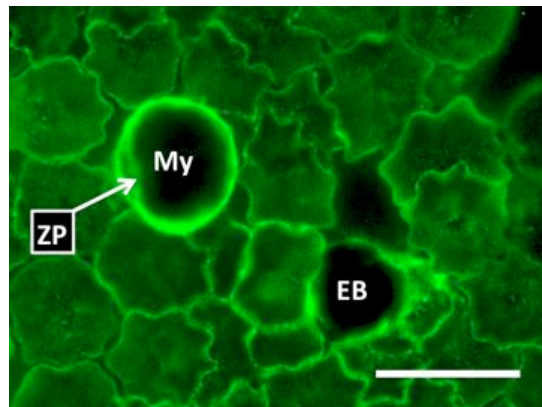


Abbildung 142: Myelozyt und Erythroblast, SNA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Der Myelozyt bindet SNA sowohl an der Zellmembran als auch im Zytoplasma (ZP).

WB = 10 µm

4.5.2.2. Postnatal

Die Bindung von SNA-Biotin verlief ähnlich wie bei den Feten: Die Zellmembran der Erythrozyten band SNA stark und wurde großteils mit ++ (starke Reaktion) und +++ (sehr starke Reaktion) bewertet. Die Lymphozyten waren durchgehend positiv. Monozyten und neutrophile Granulozyten zeigten eine starke Bindung an der Zellmembran. Das Zytoplasma der Neutrophilen war ebenfalls positiv. Die Granula der eosinophilen Granulozyten banden SNA deutlich.

Tabelle 63: Auswertung Lektine: SNA-Biotin, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	25 %	37,5 %	37,5 %	80 %
Zytoplasma	0	25 %	25 %	50 %	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	12,5 %	25 %	40 %	12,5	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	12,5 %	37,5 %	50 %	80 %
Zytoplasma	0	12,5 %	62,5 %	25 %	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	25 %	25 %	50 %	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	0	12,5 %	50 %	37,5 %	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	30 %
Granula	0	0	0	33,3 %	66,7 %	30 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	30 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	0	0	0	25 %	75 %	40 %
Zytoplasma	0	50 %	50 %	0	0	40 %

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

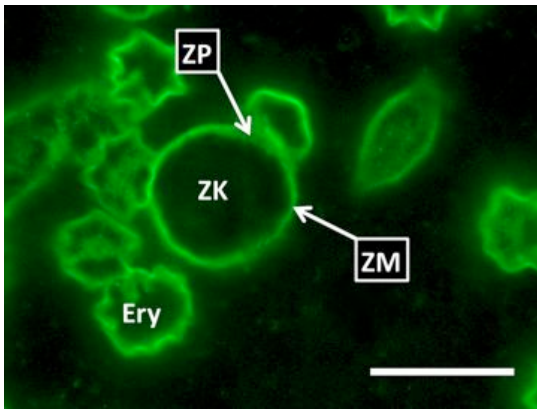


Abbildung 143: Lymphozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 24 Std post natum)

Der Lymphozyt bindet SNA-Biotin deutlich an der Zellmembran (ZM). In der Zelle ist auch positives Zytoplasma (ZP) zu sehen. Die Erythrozyten (Ery) haben eine positive Membran.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

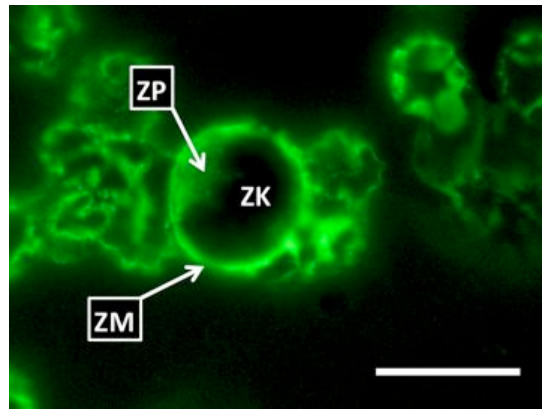


Abbildung 144: Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 8 Std post natum)

Die Zellmembran (ZM) bindet das Lektin deutlich. Die Bindung im Zytoplasma (ZP) ist schwächer.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

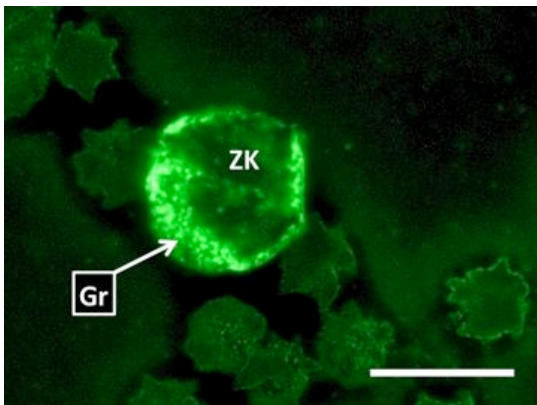


Abbildung 145: Eosinophiler Granulozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 24 Std)

Die Granula (Gr) sind deutlich positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

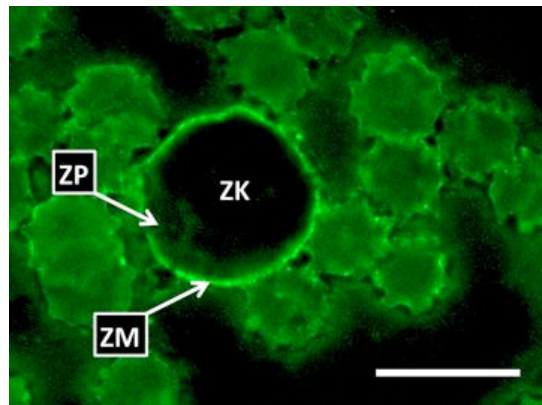


Abbildung 146: Monozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 3 Std)

Die Zellmembran (ZM) ist deutlich SNA-positiv. Das Zytoplasma (ZP) bindet nur schwach.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.6. Fukose spezifische Lektine

4.6.1. Bindung von *Ulex europaeus* Agglutinin 1 (UEA-1-FITC)

4.6.1.1. Pränatal

Die Erythrozyten und Erythroblasten der Feten banden das Lektin im Zytoplasma. Thrombozyten waren negativ. Lymphoblasten waren kaum von Myelozyten zu unterscheiden, da auch sie schwach positive Granula in ihrem Zytoplasma aufwiesen. Neutrophile Granulozyten und Myelozyten wiesen eine deutlich positive Reaktion im Zytoplasma auf. Eosinophile Granulozyten waren in keinem der Ausstriche eindeutig zu identifizieren. Monozyten waren durchgehend negativ.

Tabelle 64: Auswertung Lektine: UEA-1-FITC, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	12,5 %	25 %	37,5 %	25 %	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	37,5 %	62,5 %	0	0	0	80 %
Zytoplasma	25 %	75 %	0	0	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	37,5 %	25 %	25 %	12,5 %	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	0	0	0	50 %	50 %	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %

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

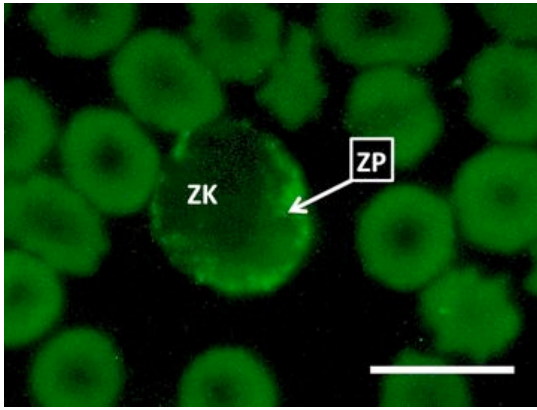


Abbildung 147: Myelozyt, UEA-1-FITC
(Fetus, m, SSL 64 cm)

Der Myelozyt weist eine positive Reaktion im Zytoplasma (ZP) auf.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

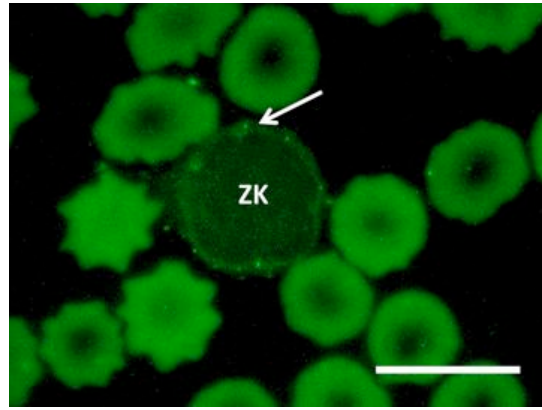


Abbildung 148: Lymphoblast, UEA-1-FITC
(Fetus, m, SSL 64 cm)

Im Zytoplasma des Lymphoblasten sind feine positive Granula zu erkennen (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.6.1.2. Postnatal

Das Zytoplasma der Erythrozyten war deutlich UEA-positiv. Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten blieben nach Inkubation mit UEA-FITC, wie in Tabelle 65 deutlich wird, durchgehend negativ. Neutrophile Granulozyten zeigten eine Bindung von UEA im Zytoplasma und an der Zellmembran. Eosinophile Granulozyten wurden nicht sicher identifiziert.

Tabelle 65: Auswertung Lektine: UEA-1-FITC, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	0	14,3 %	42,9 %	42,9 %	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	100 %		0	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %		0	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	28,6 %	42,9 %	28,6 %	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	0	0	28,6 %	42,9 %	28,6 %	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	40 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	40 %

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

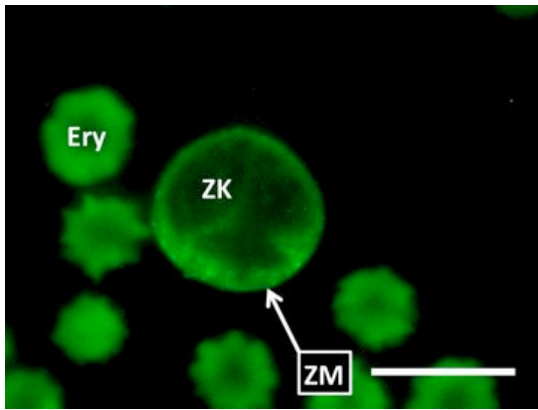


Abbildung 149: Neutrophiler Granulozyt, UEA-1-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Die Erythrozyten (Ery) weisen ein deutlich UEA-1-positives Zytoplasma auf. Die Zellmembran (ZM) des neutrophilen Granulozyten bindet das Lektin ebenfalls.

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

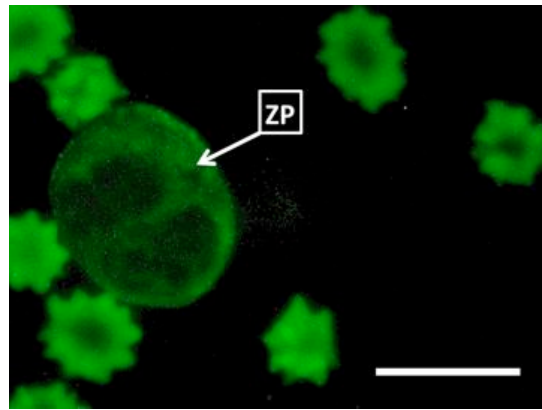


Abbildung 150: Neutrophiler Granulozyt, UEA-1-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Das Zytoplasma (ZP) ist positiv.

WB = 10 μ m

4.7. Oligosaccharid spezifische Lektine

4.7.1. Bindung von *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA-Biotin)

4.7.1.1. Pränatal

MAA-Biotin band unterschiedlich stark an die Erythrozyten des Fetus. Teilweise kam es zu einer starken Reaktion an der Zellmembran und dem Zytoplasma. Bei manchen Ausstrichen konnte auch in den Erythrozyten Fluoreszenz gesehen werden. Erythroblasten und Lymphoblasten konnten bei dieser Lektin-Reaktion nicht sicher voneinander unterschieden werden. Beide Zelltypen wiesen eine starke Bindung an der Zellmembran auf. Thrombozyten banden MAA in ihrer Granula. Bei den neutrophilen Granulozyten kam es zu einer positiven Reaktion mit den Granula und oft auch mit der Zellmembran. Myelozyten banden das Lektin ebenfalls nur in den Granula. Eosinophile Granulozyten wiesen nur eine leichte Reaktion im Zytoplasma auf. Monozyten ließen sich nicht sicher identifizieren. Zwischen den Feten unterschiedlichen Alters waren keine Unterschiede in der Bindungsintensität zu erkennen. In Tabelle 66 ist das Ergebniss der Bindung von MAA mit dem fetalen Blut zusammengefasst.

Tabelle 66: Auswertung Lektine: MAA-Biotin, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	0	42,9 %	42,9 %	14,3 %	70 %
Zytoplasma	0	28,6 %	28,6 %	42,9 %	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	14,3 %	28,6 %	42,9 %	14,3 %	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	0	57,1 %	42,9 %	70 %
Zytoplasma	42,9 %	28,6 %	28,6 %	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	14,3 %	42,9 %	28,6 %	14,3 %	70 %
Granula	0	0	28,6 %	28,6 %	42,9 %	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Granula	0	50 %	50 %	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-

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

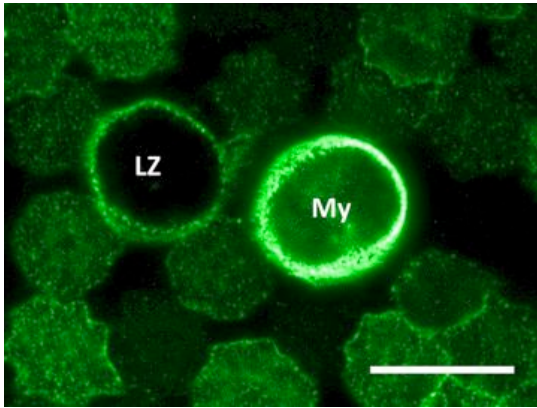


Abbildung 151: Lymphozyt und Myelozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, w, SSL 10 cm)

Die Zellmembran des Myelozyten (My) ist positiv. Zusätzlich sind feine Granula zu erkennen. Auch die Zellmembran des Lymphozyten (LZ) ist positiv. Auch hier sind feine Granula im Zytoplasma angefärbt.

WB = 10 µm

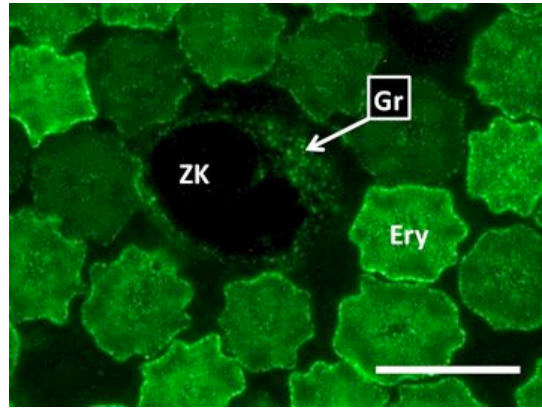


Abbildung 152: Neutrophiler Granulozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, m, SSL 64 cm)

Die Granula (Gr) stellen sich deutlich MAA-positiv dar. Die Zellmembran der Erythrozyten (Ery) bindet das Lektin.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

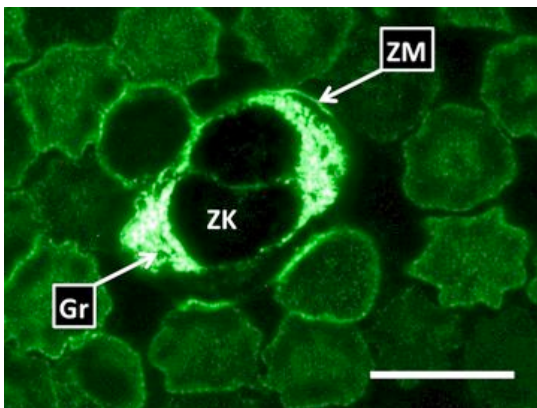


Abbildung 153: Neutrophiler Granulozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, m, SSL 14,5 cm)

Die Granula (Gr) und die Zellmembran (ZM) stellen sich positiv dar.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

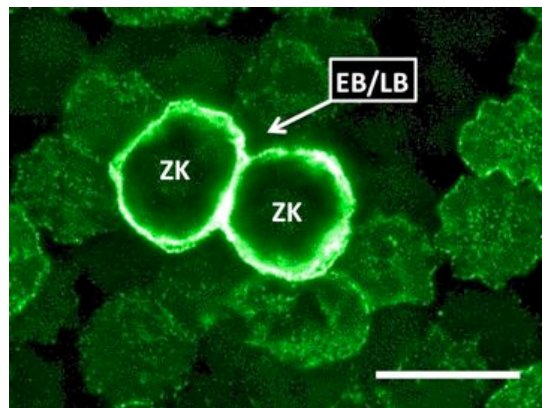


Abbildung 154: Erythroblast oder Lymphoblast, MAA-Biotin und Avidin-FITC (Fetus, w, SSL 10 cm)

Die Zellmembran bindet das Lektin sehr stark. Eine eindeutige Unterscheidung ist nicht möglich.

EB/LB = Erythroblast/Lymphoblast
WB = 10 µm

4.7.1.2. Postnatal

Die Bindung des Lektins verhält sich sehr ähnlich wie bei dem Blut des Fetus. Am stärksten bindet es an den Granula der neutrophilen Granulozyten. Die Granula der Thrombozyten sind hier besser zu erkennen als beim Fetus. Monozyten waren auch hier nicht zu erkennen. Eosinophile waren sehr selten zu finden. In Tabelle 67 ist das Ergebniss der MAA-Bindung zusammengefasst.

Tabelle 67: Auswertung Lektine: MAA-Biotin, Kalb

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	22,2 %	22,2 %	33,3 %	22,2 %	90 %
Zytoplasma	0	22,2 %	11,1 %	44,4 %	22,2	90 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	90 %
Granula	0	0	22,2 %	44,4 %	33,3	90 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	33,3 %	22,2 %	44,4 %	90 %
Zytoplasma	0	66,7 %	33,3 %	0	0	90 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	11,1 %	44,4 %	33,3 %	11,1 %	90 %
Granula	0	22,2 %	22,2 %	33,3 %	22,2 %	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	90 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Granula	0	50 %	50 %	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-

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

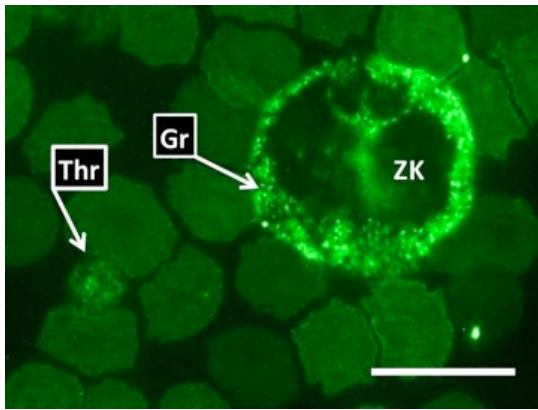


Abbildung 155: Neutrophiler Granulozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 6,5 Std post natum)

Die Granula (Gr) der Granulozyten und des Thrombozyten (Thr) sind MAA-positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

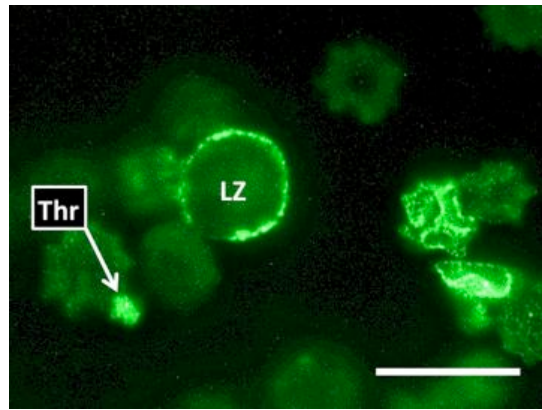


Abbildung 156: Lymphozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Die Zellmembran des Lymphozyten (LZ) bindet das Lektin stark. Der Thrombozyt (Thr) ist positiv. Die Erythrozyten sind in unterschiedlicher Intensität gefärbt.

WB = 10 µm

4.7.2. Bindung von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E-FITC)

4.7.2.1. Pränatal

Die Erythrozyten banden PHA-E-FITC an der Zellmembran sowie auch teilweise im Zytoplasma. Bei den Erythroblasten kam es nur zu einer leichten Bindung im Zytoplasma. Die Granula und die Zellmembran der Thrombozyten waren deutlich positiv. Die Lymphozytenmembran und das Zytoplasma waren ebenfalls positiv. Lymphoblasten konnten nicht sicher identifiziert werden. Neutrophile Granulozyten und Myelozyten banden PHA-E-FITC teils in den Granula, aber auch teilweise im Zytoplasma. In einigen Ausstrichen konnte eine positive Reaktion an der Zellmembran beobachtet werden. Die eosinophilen Granulozyten banden das Lektin in den Granula und in schwacher Intensität an der Membran. Monozyten wurden beim Fetus nicht gefunden. Es gab keine Unterschiede in der Intensität der Lektinbindung bei den jüngeren und älteren Feten.

Tabelle 68: Auswertung Lektine: PHA-E-FITC, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	0	16,7 %	50 %	33,3 %	0	60 %
Zytoplasma	0	16,7 %	66,7 %	16,7 %	0	60 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	16,7 %	16,7 %	50 %	16,7 %	60 %
Granula	0	0	33,3 %	33,3 %	33,3 %	60 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	16,7 %	50 %	33,3 %	60 %
Zytoplasma	0	0	33,3 %	66,7 %	0	60 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	66,7 %	33,3 %	0	0	60 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	60 %
Zytoplasma	0	0	16,7 %	66,7 %	16,7 %	60 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	100 %	0	0	20 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-

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

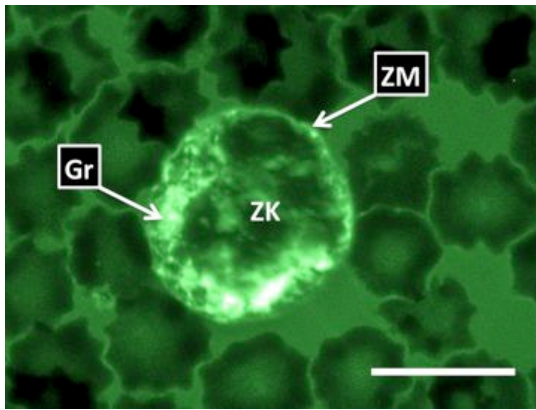


Abbildung 157: Neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC
(Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Die Granula (Gr) und die Zellmembran (ZM) binden PHA-E-FITC deutlich.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

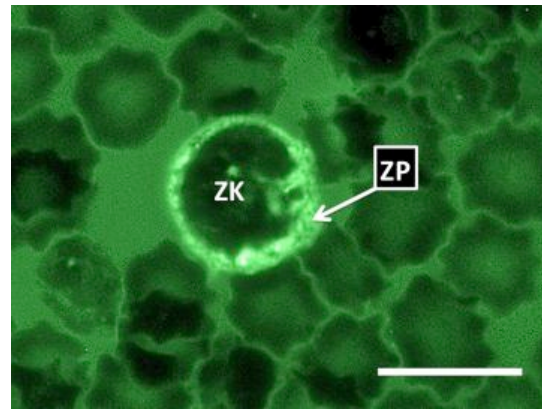


Abbildung 158: Myelozyt, PHA-E-FITC
(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Bei dem Myelozyten ist das Zytoplasma (ZP) stark angefärbt.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

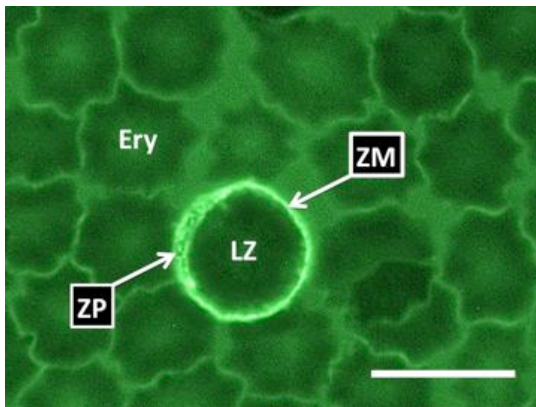


Abbildung 159: Lymphozyt, PHA-E-FITC
(Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Der Lymphozyt (LZ) bindet das Lektin im Zytoplasma (ZP) und an der Zellmembran (ZM). Die Erythrozyten (Ery) weisen eine positive Membran auf.

WB = 10 µm

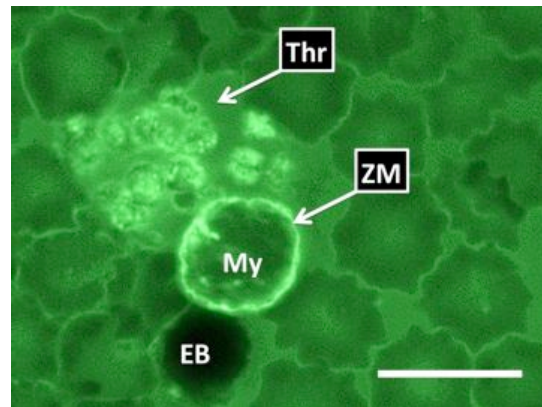


Abbildung 160: Myelozyt und Erythroblast, PHA-E-FITC
(Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Der Myelozyt weist eine positive Zellmembran (ZM) auf. Die Thrombozyten (Thr) binden PHA-E-FITC sowohl an den Granula als auch in der Zellmembran. Der Erythroblast (EB) bindet das Lektin nur leicht im Zytoplasma.

WB = 10 µm

4.7.2.2. Postnatal

Die Erythrozyten der Kälber banden PHA-E-FITC deutlich im Zytoplasma. Die Granula der Thrombozyten wiesen eine starke Bindung auf. Lymphozyten banden das Lektin an der Zellmembran sehr stark und wurden somit fast durchgehend mit +++ (sehr starke Reaktion) bewertet. Die Granula der neutrophilen Granulozyten stellten sich deutlich positiv dar. Die Granula der eosinophilen Granulozyten waren nur leicht positiv. Monozyten banden PHA-E-FITC im Zytoplasma.

Tabelle 69: Auswertung Lektine: PHA-E-FITC, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	71,4 %	28,6 %	0	0	0	70 %
Zytoplasma	0	14,3 %	42,9 %	42,9 %	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	0	42,9 %	57,1 %	0	0	70 %
Granula	0	28,6 %	42,9 %	28,6 %	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	0	14,3 %	85,7 %	70 %
Zytoplasma	57,1 %	42,9 %	0	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	0	0	14,3 %	57,1 %	28,6 %	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	30 %
Zytoplasma	0	33,3 %	66,7 %	0	0	30 %

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

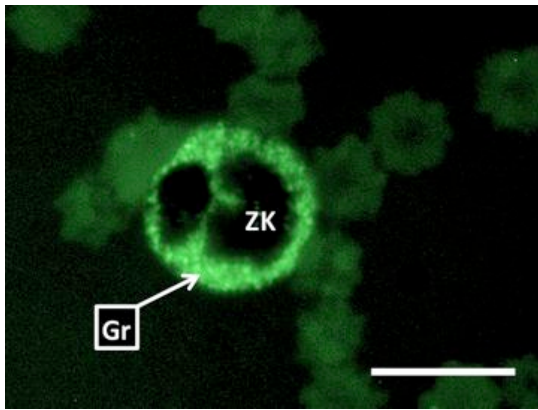


Abbildung 161: Neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Der neutrophile Granulozyt des Kalbes bindet PHA-E-FITC an den Granula (Gr).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

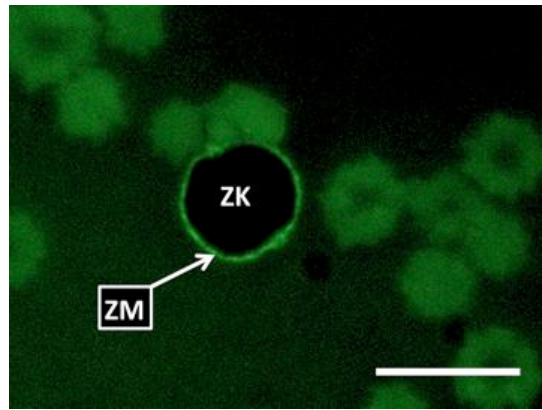


Abbildung 162: Lymphozyt, PHA-E-FITC
(Kalb, m, Alter: 9 Std post natum)

Die Zellmembran (ZM) des Lymphozyten weist eine starke Bindung auf.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

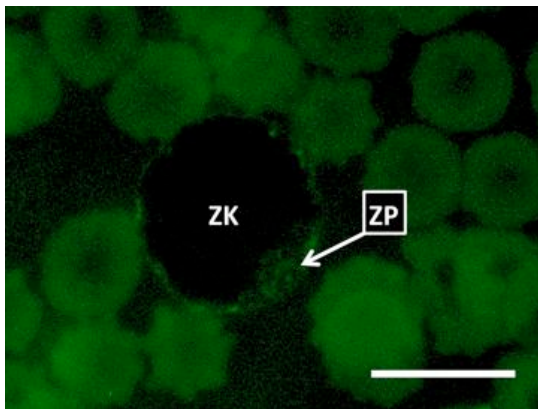


Abbildung 163: Monozyt, PHA-E-FITC
(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Der Monozyt weist nur eine leichte Bindung im Zytoplasma (ZP) auf.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.7.3. Bindung von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L-FITC)

4.7.3.1. Pränatal

PHA-L-FITC band nur im geringen Ausmaß im Zytoplasma der Erythrozyten. Die Erythroblasten stellten sich deutlich positiv dar und banden das Lektin hauptsächlich im Zytoplasma. In wenigen Ausstrichen kam es auch zu einer Bindung an die Zellmembran. Thrombozyten waren durchgehend negativ. Die Lymphozyten wiesen ein positives Zytoplasma auf. Die Zellmembran der Lymphozyten war nur schwach PHA-L-FITC positiv. Oft war sie komplett negativ. Die neutrophilen Granulozyten und Myelozyten stellten sich unterschiedlich dar. In manchen Ausstrichen banden nur die Granula PHA-L-FITC, bei anderen sowohl die Granula, das Zytoplasma und auch die Zellmembran. Die eosinophilen Granulozyten banden das Lektin nur leicht in den drei genannten Strukturen. Monozyten banden das Lektin im Zytoplasma und an der Zellmembran.

Tabelle 70: Auswertung Lektine: PHA-L-FITC, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	42,9 %	57,1 %	0	0	0	70 %
Zytoplasma	14,3 %	57,1 %	28,6 %	0	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	57,1 %	42,9 %	0	0	0	70 %
Zytoplasma	0	0	28,6 %	42,9 %	28,6 %	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	42,9 %	57,1 %	0	70 %
Granula	0	42,9 %	28,6 %	28,6 %	0	70 %
Zytoplasma	0	0	28,6 %	42,9 %	28,6 %	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	0	50 %	50 %	0	0	20 %
Granula	0	0	100 %	0	0	20 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	33,3 %	66,7 %	0	0	0	30 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	0	30 %

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

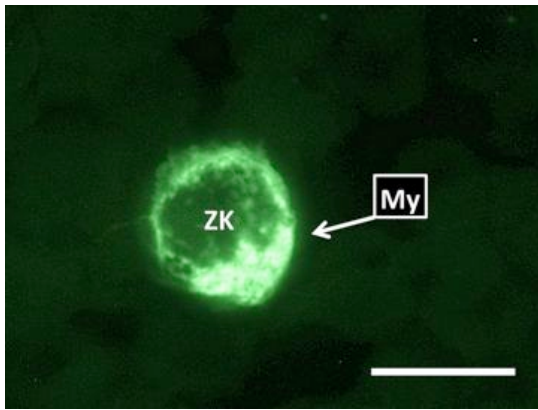


Abbildung 164: Myelozyt, PHA-L-FITC
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Der Myelozyt (My) ist deutlich PHA-L-positiv und bindet das Lektin stärker als das Zytoplasma.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

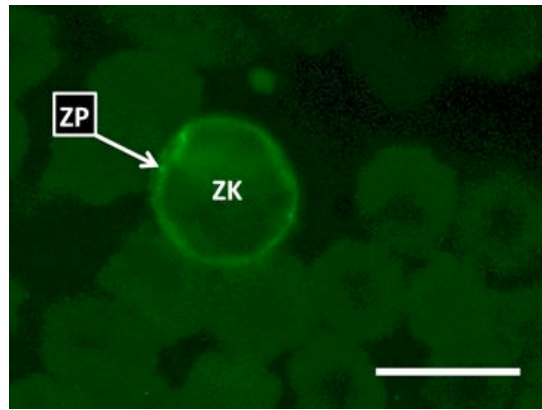


Abbildung 165: Lymphozyt, PHA-L-FITC
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des Lymphozyten färbt sich positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

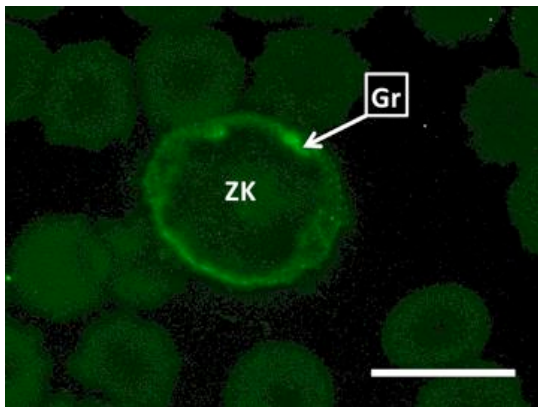


Abbildung 166: Myelozyt, PHA-L-FITC
(Fetus, m, SSL 64 cm)

Bei diesem Myelozyten sind die Granula (Gr) deutlich zu erkennen. Auch die Zellmembran bindet PHA-L-FITC.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

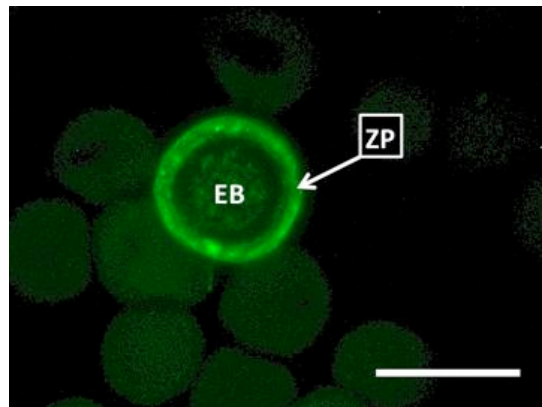


Abbildung 167: Erythroblast, PHA-L-FITC
(Fetus, m, SSL 64 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des Erythroblasten (EB) ist stark positiv.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

4.7.3.2. Postnatal

Das Zytoplasma der Erythrozyten der Kälber band PHA-L-FITC nur in einigen Ausstrichen in geringem Ausmass. Die Granula der Thrombozyten waren deutlich positiv. Die Lymphozytenmembran band das Lektin stark, das Zytoplasma schwächer. Die Granula der neutrophilen Granulozyten stellten sich deutlich positiv dar, das Zytoplasma band das Lektin weniger stark. Die eosinophilen Granulozyten banden das Lektin an den Granula und teils im Zytoplasma. Monozyten waren nur leicht positiv.

Tabelle 71: Auswertung Lektine: PHA-L-FITC, Kalb

Reaktionsstärke						Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	90 %
Zytoplasma	11,1 %	88,9 %	0	0	0	90 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	90 %
Granula	0	33,3 %	33,3 %	33,3 %	0	90 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	0	44,4 %	33,3 %	22,2 %	90 %
Zytoplasma	11,1 %	22,2 %	33,3 %	33,3 %	0	90 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	90 %
Granula	0	0	22,2 %	44,4 %	33,3 %	90 %
Zytoplasma	0	44,4 %	55,6 %	0	0	90 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Granula	0	0	50 %	50 %	0	20 %
Zytoplasma	0	0	100 %	0	0	20 %
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	50 %	50 %	0	0	0	40 %
Zytoplasma	0	100 %	0	0	0	40 %

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

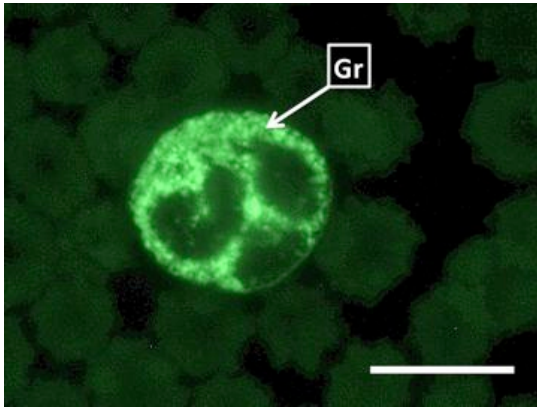


Abbildung 168: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA-L-FITC
(Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Die positiv gebundenen Granula (Gr) sind hier gut zu erkennen.

WB = 10 μ m

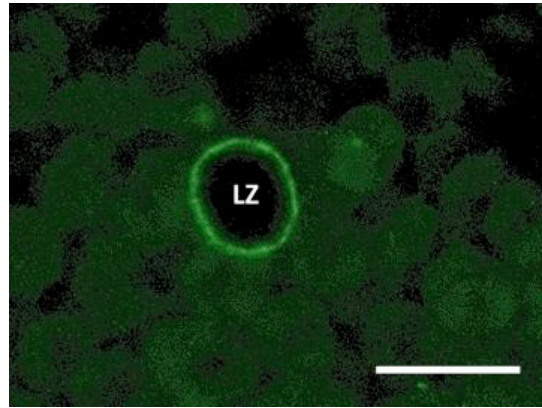


Abbildung 169: Lymphozyt, PHA-L-FITC
(Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Die Zellmembran des Lymphozyten (LZ) bindet PHA-L-FITC deutlich.

WB = 10 μ m

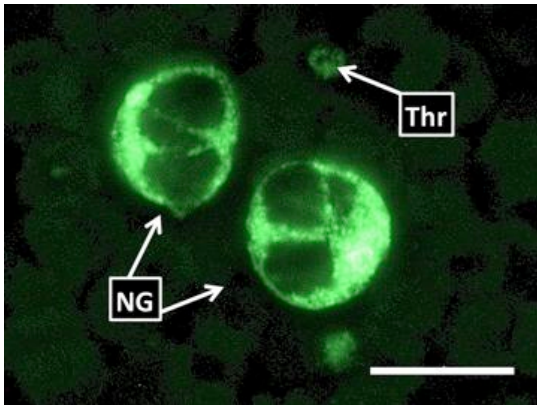


Abbildung 170: Neutrophile Granulozyten, PHA-L-FITC
(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Die Granula der beiden neutrophilen Granulozyten (NG) binden PHA-L-FITC stark. Die Granula des Thrombozyten (Thr) stellen sich positiv dar.

WB = 10 μ m

4.8. Ergebnisse der Zuckerhemmung

Bei den Lektinen, die eine positive Reaktion in den Blutaussstrichen von Feten und Kälbern ergaben, wurde eine kompetitive Zuckerhemmung (siehe Tabelle 9) durchgeführt. Vor Inkubation mit den Lektinen wurde mit den jeweiligen Hemmzucker vorinkubiert. Bei dem Lektin PHA-E wurden die Ausstriche mit Essigsäure vorbehandelt. Bei allen Ausstrichen kam es zu einer weitgehenden Hemmung der Bindung des Lektins an die Blutzellen.

4.9. Ergebnisse der Vorbehandlung mit Neuraminidase

Die Lektine SJA, RCA, PNA, DBA und SBA banden nur sehr schwach oder auch gar nicht an die Blutzellen. Hier wurden die Ausstriche vor dem Auftragen des Lektins mit Neuraminidase vorbehandelt. Bei SJA-FITC konnte durch die Neuraminidase die Bindung an die Erythrozyten des Fetus verstärkt werden. Auch die Granula der neutrophilen Granulozyten des Kalbes und des Fetus stellten sich nach der Behandlung deutlich positiv dar. RCA-FITC band mit Neuraminidase stärker an die Erythrozyten und Erythroblastenmembran der Feten. Die Bindung an den Granula der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten der Kälber und Feten wurde verstärkt. Auch die Lymphozyten und Monozytenmembran war besser zu erkennen. Durch die Vorbehandlung mit Neuraminidase konnte die Bindung von PNA-FITC an alle Zellen verstärkt werden. Bei DBA-FITC wurde nur die Bindung an die neutrophilen und eosinophilen Granula intensiviert. SBA-FITC band sowohl beim Kalb als auch beim Fetus stärker an den Granula der neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten.

5. Immunzytochemische Untersuchungen

5.1. Bindung der CD4-Antikörper

5.1.1. Pränatal

Die CD4-Antikörper zeigten im Blut der Feten kaum eine Bindung an die Blutzellen. Es kam nur in wenigen Ausstrichen zu einer leichten Bindung an die Zellmembran der Erythrozyten. Die Membran der neutrophilen Granulozyten zeigte teilweise eine schwach bis mittelstarke Bindung des Antikörpers. Thrombozyten und Lymphozyten waren durchgehend negativ. Eosinophile, Basophile und Monozyten zeigten gleichfalls keine immunzytochemische erkennbare Reaktion.

Tabelle 72: Auswertung Antikörper: CD4-FITC, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	71,4 %	28,6 %	0	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	28,6 %	28,6 %	42,9 %	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-

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

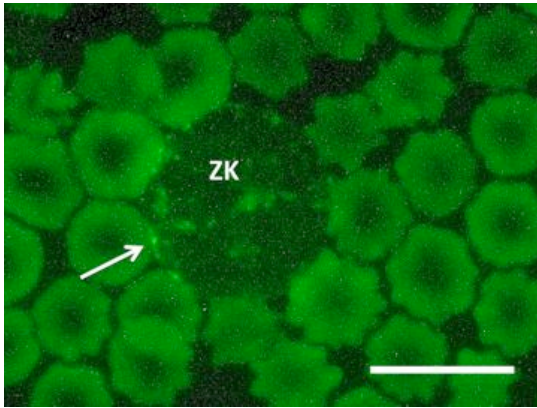


Abbildung 171: Neutrophiler Granulozyt, CD4-FITC
(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Die Zellmembran bindet den Antikörper leicht (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

5.1.2. Postnatal

Die Erythrozytenmembranen der Feten banden die CD4-Antikörper deutlich und wurden in Tabelle 73 mit + (deutliche Reaktion) bewertet. In einigen Ausstrichen waren Lymphozyten zu finden, die den Antikörper in ihrer Zellmembran banden. Die Mehrzahl der Lymphozyten waren CD4-negativ. Die neutrophilen Granulozyten zeigten eine leichte Bindung an der Zellmembran. Thrombozyten und Monozyten waren negativ.

Tabelle 73: Auswertung Antikörper: CD4-FITC, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	50 %	25 %	25 %	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Lymphozyten						
Zellmembran	0	25 %	25 %	50 %	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	25 %	37,5 %	37,5 %	0	80 %
Granula	100 %	0	0	0	0	80 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	80 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	20 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	20 %

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

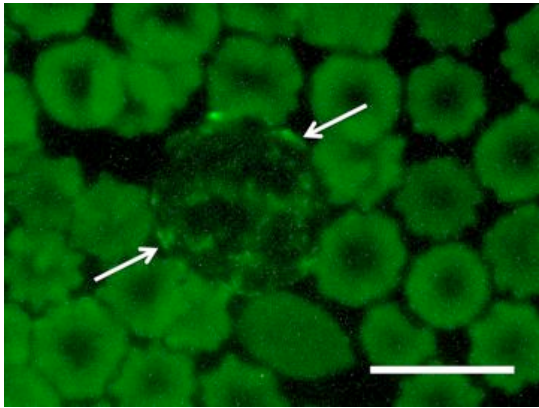


Abbildung 172: Neutrophiler Granulozyt, CD4-FITC
(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Die Pfeile zeigen die positive Reaktion an der Zellmembran der neutrophilen Granulozyten.

WB = 10 μ m

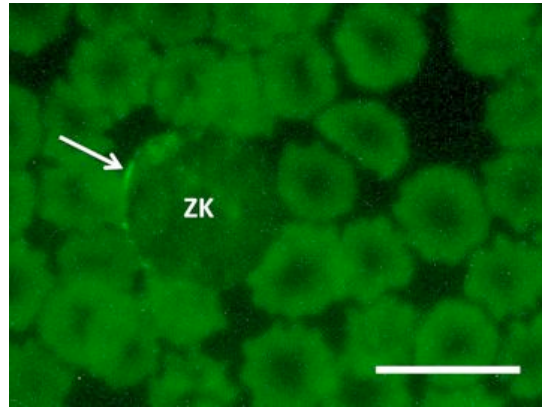


Abbildung 173: Lymphozyt, CD4-FITC
(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Der Lymphozyt bindet den CD4-Antikörper an der Zellmembran (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

5.2. Bindung der CD8-Antikörper

5.2.1. Pränatal

Der CD8-Antikörper band in einigen wenigen Ausstrichen an die Membran der Erythrozyten. Es waren nur sehr wenige positive Lymphozyten zu finden, die meisten Lymphozyten waren negativ. Die Membran der neutrophilen Granulozyten war deutlich positiv.

Tabelle 74: Auswertung Antikörper: CD8-FITC, Fetus

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	57,1 %	14,3 %	28,6 %	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Lymphozyten						
Zellmembran	42,9 %	14,3 %	28,6 %	14,3 %	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	42,9 %	57,1 %	0	70 %
Granula	100 %	0	0	0	0	70 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	70 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-

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

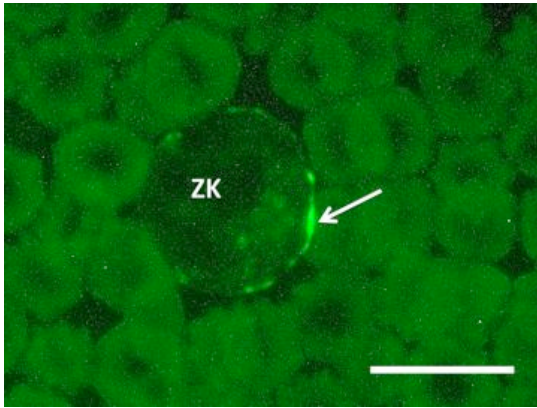


Abbildung 174: Neutrophiler Granulozyt, CD8-FITC
(Fetus, m, SSL 64 cm)

Die Zellmembran bindet den Antikörper deutlich (Pfeil)

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

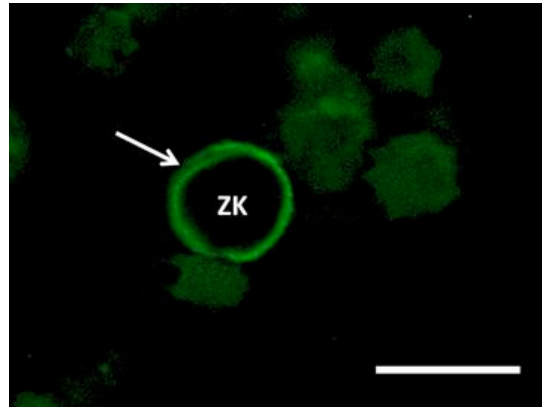


Abbildung 175: Lymphozyt, CD8-FITC
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Die Membran des Lymphozyten ist deutlich positiv (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

5.2.2. Postnatal

Die Erythrozytenmembranen der Kälber banden den Antikörper deutlich und wurden mit + (deutliche Reaktion) bewertet. Die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten konnte großteils mit ++ (starke Reaktion) und +++ (sehr starke Reaktion) beurteilt werden. Das Verhältnis von positiven und negativen Lymphozyten war in den Ausstrichen ausgeglichen. Die Thrombozyten waren negativ.

Tabelle 75: Auswertung Antikörper: CD8-FITC, Kalb

	Reaktionsstärke					Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	+/-	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten						
Zellmembran	44,4 %	22,2 %	33,3 %	0	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	90 %
Thrombozyten						
Zellmembran	100 %	0	0	0	0	90 %
Granula	100 %	0	0	0	0	90 %
Lymphozyten						
Zellmembran	55,6 %	0	0	0	44,4 %	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	90 %
Neutrophile Granulozyten						
Zellmembran	0	0	11,1 %	44,4 %	44,4 %	90 %
Granula	100 %	0	0	0	0	90 %
Zytoplasma	100 %	0	0	0	0	90 %
Eosinophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Basophile Granulozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-
Monozyten						
Zellmembran	-	-	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-	-	-

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

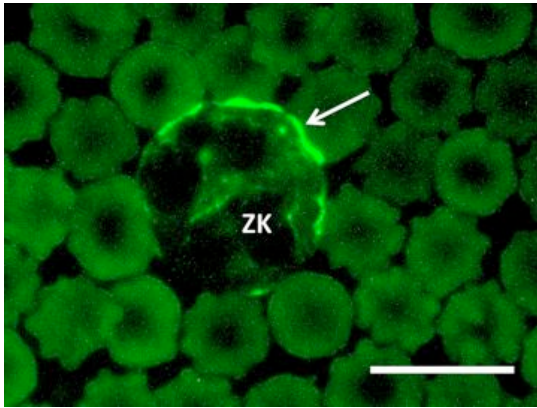


Abbildung 176: Neutrophiler Granulozyt, CD8-FITC
(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Die Zellmembran ist CD8-positiv (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

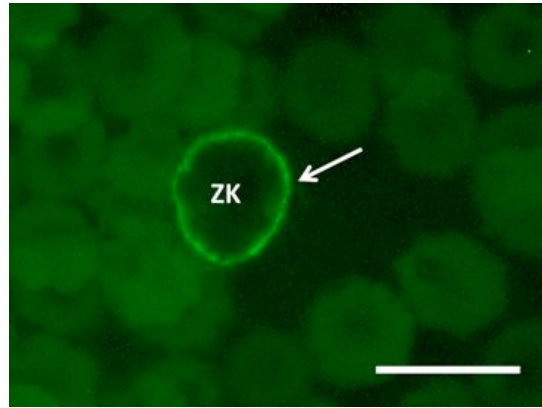


Abbildung 177: Lymphozyt, CD8-FITC
(Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Dieser Lymphozyt bindet den Antikörper und zeigt eine positive Reaktion an der Zellmembran (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

6. Untersuchungen zum Zytoskelett

6.1. Aktinnachweis mit Phalloidin-TRITC

6.1.1. Pränatal

Die Erythrozyten der Feten zeigten nur eine sehr geringe Reaktion beim Nachweis von Aktin. Erythroblasten reagierten dagegen deutlich positiv. Lymphoblasten waren nicht eindeutig zu erkennen. Lymphozyten zeigten im Allgemeinen eine stark positive Reaktion, teilweise waren aber auch weniger stark gefärbte Lymphozyten zu sehen. Die Thrombozyten waren durchgehend deutlich positiv. Die neutrophilen Granulozyten und Myelozyten zeigten eine deutliche Bindung von Phalloidin. Beim Phalloidin-TRITC-Nachweis waren eosinophile und basophile Granulozyten im fetalen Blut nicht zu erkennen. Monozyten waren schwer zu finden und färbten sich nur sehr leicht an.

Tabelle 76: Auswertung Zytoskelett: Phalloidin-TRITC, Fetus

Zytoskelett	Reaktionsstärke				Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten	70 %	30 %	0	0	100 %
Thrombozyten	0	0	60 %	40 %	100 %
Lymphozyten	0	10 %	30 %	60 %	100 %
Neutrophile Granulozyten	0	0	40 %	60 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Monozyten	33,3 %	66,7 %	0	0	30 %

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

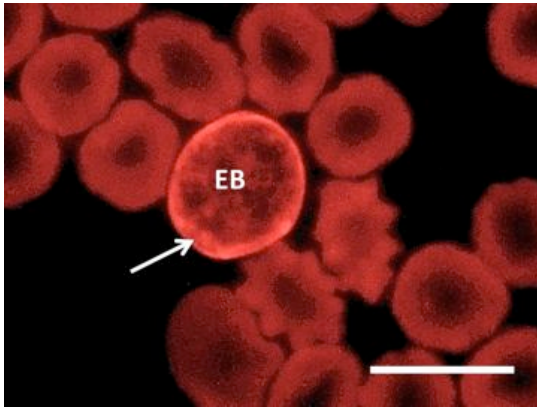


Abbildung 178: Erythroblast, Phalloidin-TRITC (Fetus, m, SSL 22,7 cm)

Die Bindung des Phalloidin-TRITC ist bei dem Erythroblasten (EB) deutlich zu erkennen (Pfeil).

WB = 10 μ m

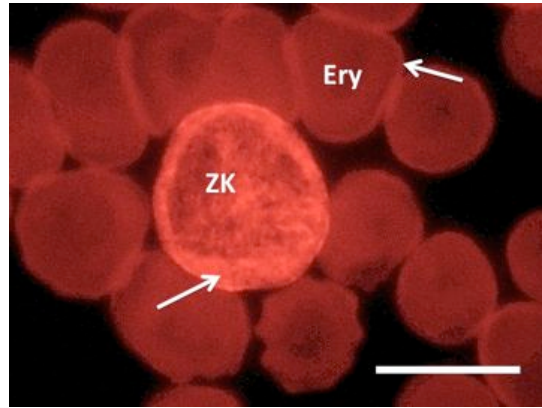


Abbildung 179: Lymphozyt, Phalloidin-TRITC (Fetus, m, SSL 11,2 cm)

Bei diesem Lymphozyten ist die Reaktion gut zu erkennen (Pfeil), der Zellkern (ZK) wird teilweise überlagert. Bei den Erythrozyten (Ery) ist die positive Reaktion zu erkennen (Pfeil).

WB = 10 μ m

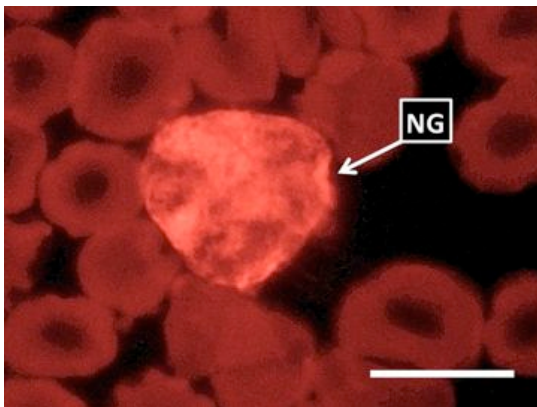


Abbildung 180: Neutrophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC (Fetus, m, SSL 22,7 cm)

Der neutrophile Granulozyt (NG) weist eine starke Bindung auf. Der Zellkern ist nur noch schwer erkennbar.

WB = 10 μ m

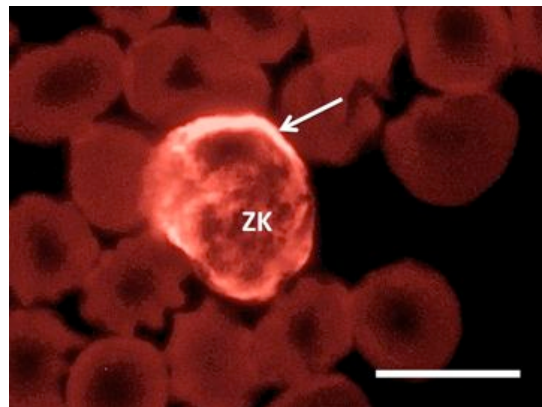


Abbildung 181: Myelozyt, Phalloidin-TRITC (Fetus, m, SSL 22,4 cm)

Bei diesem Myelozyten ist die Bindung von Phalloidin-TRITC besonders stark (Pfeil). Die Filamente sind gut zu erkennen.

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

6.1.2. Postnatal

Die Bindung von Phalloidin-TRITC war bei den Blutzellen der Kälber besonders gut in den Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten zu erkennen. Filamente waren deutlich zu sehen. Es waren aber auch Lymphozyten vorhanden, die eine schwächere Bindung aufwiesen. Basophile Granulozyten waren nicht eindeutig zu identifizieren. Eosinophile konnten nur sehr selten identifiziert werden, da die Filamente meist die Granula stark überlagerten. Monozyten waren nur leicht positiv.

Tabelle 77: Auswertung Zytoskelett: Phalloidin-TRITC, Kalb

Zytoskelett	Reaktionsstärke				Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten	80 %	20 %	0	0	100 %
Thrombozyten	0	0	0	100 %	100 %
Lymphozyten	0	20 %	40 %	40 %	100 %
Neutrophile Granulozyten	0	0	10 %	90 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0	0	50 %	50 %	20%
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Monozyten	50 %	50 %	0	0	20 %

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

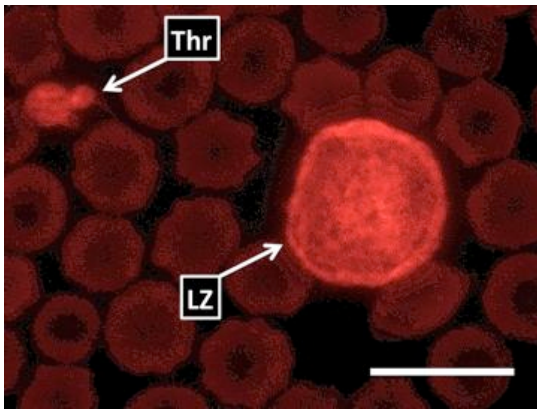


Abbildung 182: Lymphozyt und Thrombozyt, Phalloidin-TRITC
(Kalb, m, Alter: 6,5 Std post natum)

Der Lymphozyt (LZ) und der Thrombozyt (Thr) binden Phalloidin-TRITC stark.

WB = 10 μ m

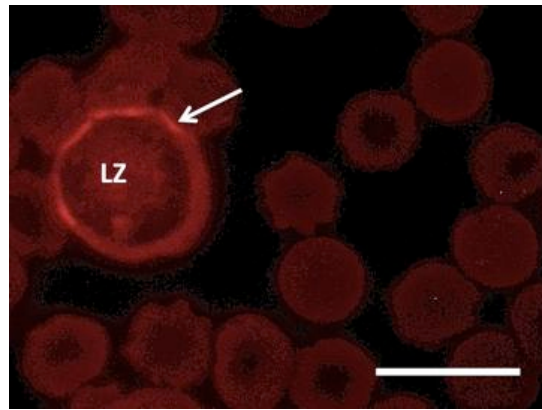


Abbildung 183: Lymphozyt, Phalloidin-TRITC
(Kalb, w, Alter: 2,5 Std post natum)

Bei diesem Lymphozyten ist der Zellkern noch gut zu erkennen. Die Reaktion konzentriert sich auf den Zytoplasmabereich unter der Zellmembran (Pfeil).

WB = 10 μ m

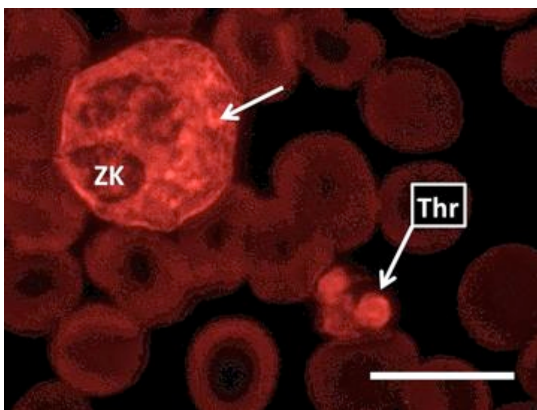


Abbildung 184: Neutrophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC
(Kalb, m, Alter: 6,5 Std post natum)

Im neutrophilen Granulozyten sind Bündel von Filamenten zu sehen (Pfeil), der Zellkern (ZK) ist fast komplett überlagert. Der Thrombozyt (Thr) bindet das Phalloidin-TRITC.

WB = 10 μ m

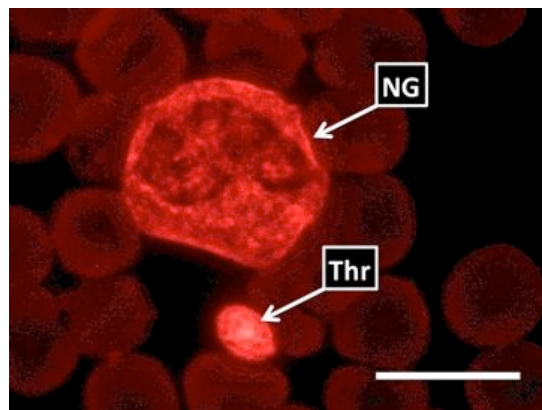


Abbildung 185: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt, Phalloidin-TRITC
(Kalb, w, Alter: 2,5 Std post natum)

Der neutrophile Granulozyt (NG) und der Thrombozyt (Thr) weisen eine starke Bindung mit Phalloidin-TRITC auf.

WB = 10 μ m

6.2. Immunhistochemischer Nachweis von Myosin

6.2.1. Pränatal

Für den Nachweis des Myosins in den Blutzellen wurden zwei verschiedene Konzentrationen des Antikörpers verwendet, nämlich 1:250 und 1:500. Die Färbedurchgänge wurden jeweils an fixierten und unfixierten Ausstrichen durchgeführt. Bei der Konzentration 1:250 konnte man sowohl in den fixierten als auch in den unfixierten Ausstrichen nur Autofluoreszenz der Erythrozyten erkennen. Bei den fixierten Proben war in den neutrophilen Granulozyten eine deutliche Fluoreszenz in Form granulärer Strukturen zu erkennen. Bei den unfixierten konnte man teils bei den Myelozyten noch Filamente sehen. Erythroblasten und Lymphoblasten färbten sich nur leicht im Zytoplasma. Basophile Granulozyten waren nicht eindeutig zu erkennen. Monozyten wiesen nur in Einzelfällen eine positive Reaktion auf. Die Eosinophilen wiesen eine positive Reaktion auf, welche allerdings schwer zu erkennen war, da sich die Myosin-positiven granulären Strukturen zwischen den spezifischen Granula der eosinophilen Granulozyten befand. Thrombozyten ließen sich in den fixierten Ausstrichen besser erkennen. In der Konzentration 1:500 kam es zu einer leichten Verbesserung der Färbung bei den neutrophilen Granulozyten, unfixiert kam es zu einer stärkeren Fluoreszenz der Erythrozyten, ansonsten verlief die Reaktion ähnlich.

Tabelle 78: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Myosin, Fetus

Zytoskelett	Reaktionsstärke				Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten	77,8 %	22,2 %	0	0	90 %
Thrombozyten	0	55,6 %	44,4 %		90 %
Lymphozyten	22,2 %	77,8 %	0	0	90 %
Neutrophile Granulozyten	0	22,2 %	33,3 %	44,5 %	90 %
Eosinophile Granulozyten	0	33,3 %	66,7 %	0	30%
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Monozyten	0	50 %	50 %	0	20 %

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

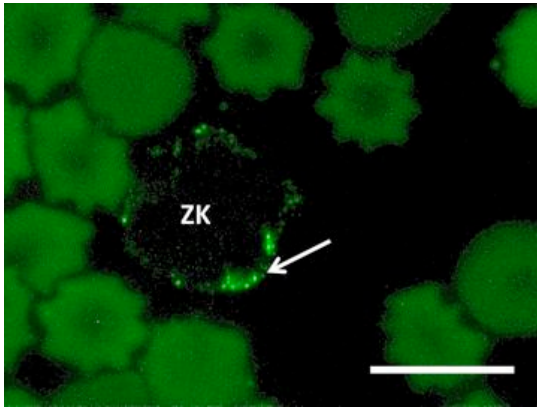


Abbildung 186: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, fixiert (Fetus, w, SSL 39 cm)

Im Zytoplasma ist eine positive granuläre Reaktion zu erkennen (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

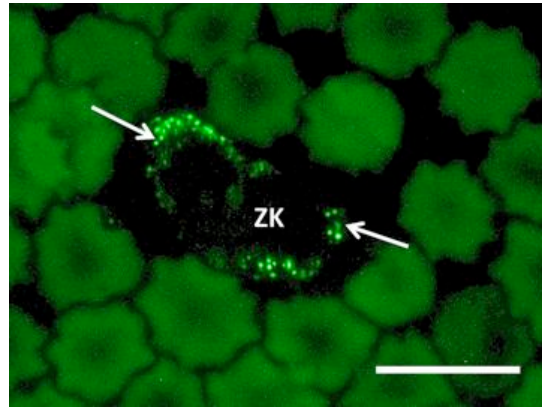


Abbildung 187: Neutrophile Granulozyten, Nachweis von Myosin, 1:250, fixiert (Fetus, w, SSL 39 cm)

Zwei neutrophile Granulozyten bei denen die deutlichen Myosin-positiven Granula gut zu erkennen sind (Pfeile).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

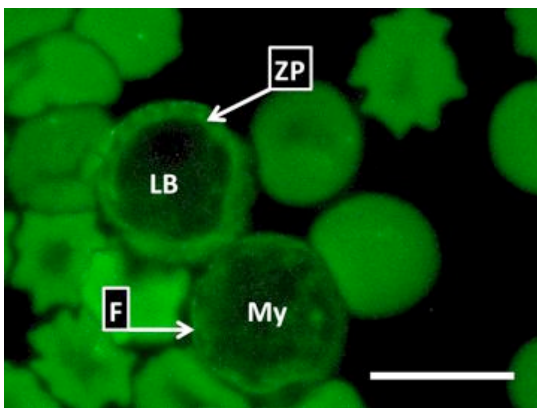


Abbildung 188: Lymphoblast und Myelozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, unfixiert (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Das Zytoplasma (ZP) des Lymphoblasten (LB) färbt sich leicht positiv an. Im Myelozyten (My) sind feine Filamente (F) zu erkennen.

WB = 10 µm

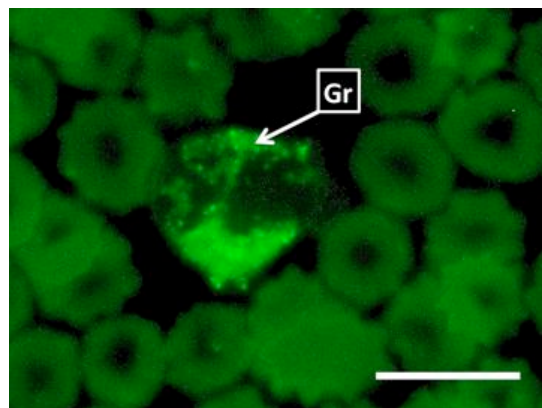


Abbildung 189: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, unfixiert (Fetus, m, SSL 15 cm)

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten sind deutlich zu sehen. Eine Reaktion ist bei unfixierten Zellen schwer zu erkennen.

WB = 10 µm

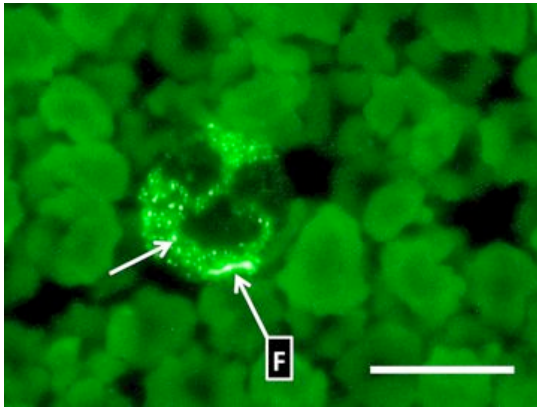


Abbildung 190: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, fixiert (Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Im Zytoplasma ist eine granuläre Reaktion zu sehen (Pfeil). Am Zellrand sind deutlich fluoreszierende Filamente (F) zu erkennen.

WB = 10 µm

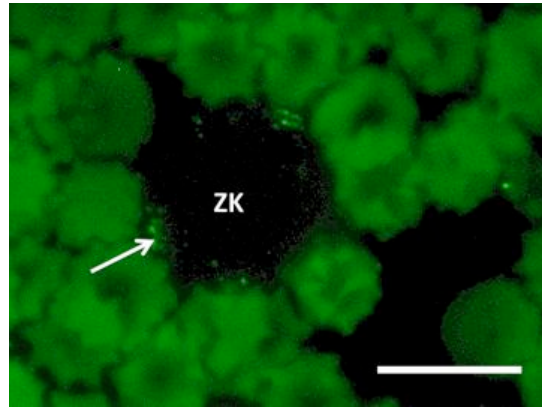


Abbildung 191: Monozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, fixiert (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

In dem Monozyten ist eine feine positive Reaktion zu erkennen (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

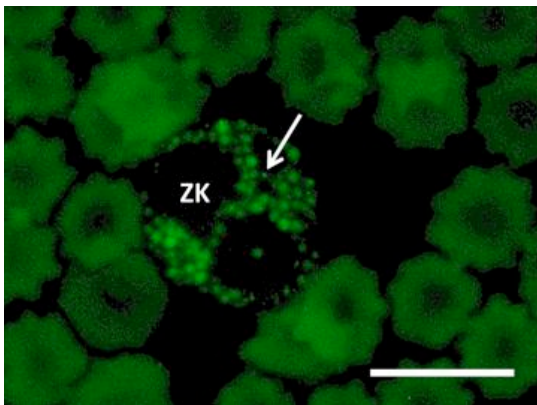


Abbildung 192: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, unfixiert (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Zwischen den Granula des eosinophilen Granulozyten ist feine granuläre Fluoreszenz zu finden (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

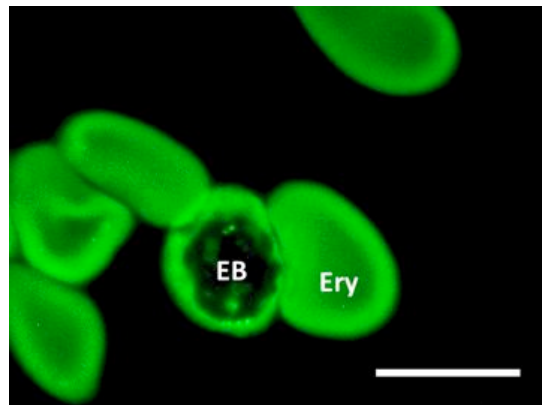


Abbildung 193: Erythroblast, Nachweis von Myosin, 1:500, unfixiert (Fetus, w, SSL 39 cm)

Der Erythroblast (EB) und die Erythrozyten (Ery) zeigen deutliche Fluoreszenz, jedoch sind keine eindeutigen Strukturen zu differenzieren.

WB = 10 µm

6.2.2. Postnatal

Die Reaktionen beim Kalb waren denen der Feten ähnlich. Zwischen den beiden Antikörperkonzentrationen kam es zu keinen großen Unterschieden. Bei den fixierten Ausstrichen wiesen die Erythrozyten stärkere Autofluoreszenz auf. Auch die neutrophilen Granulozyten banden die Antikörper gegen Myosin in unfixierten Ausstrichen stärker und die Filamente waren besser zu sehen. Bei einer Konzentration von 1:250 und unfixierten Ausstrichen war teilweise eine granuläre Reaktion in den Erythrozyten zu erkennen. Einige Lymphozyten wiesen in den fixierten sowie in den unfixierten Ausstrichen eine deutliche Reaktion auf; es waren jedoch auch komplett negative Lymphozyten vorhanden. Die Thrombozyten waren in den unfixierten Ausstrichen am besten zu erkennen. Basophile Granulozyten waren nicht zu erkennen.

Tabelle 79: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Myosin, Kalb

Zytoskelett	Reaktionsstärke				Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten	10 %	50 %	40 %	0	100 %
Thrombozyten	0	30 %	30 %	40 %	100 %
Lymphozyten	30 %	10 %	40 %	20 %	100 %
Neutrophile Granulozyten	0	20 %	20 %	60 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0	33,3 %	66,7 %	0	30%
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Monozyten	0	66,7 %	33,3 %	0	30 %

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

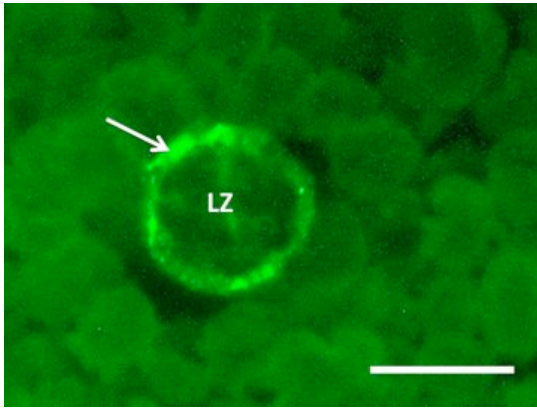


Abbildung 194: Lymphozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, unfixiert
(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Der Lymphozyt (LZ) weist eine deutliche Reaktion auf (Pfeil).

WB = 10 µm

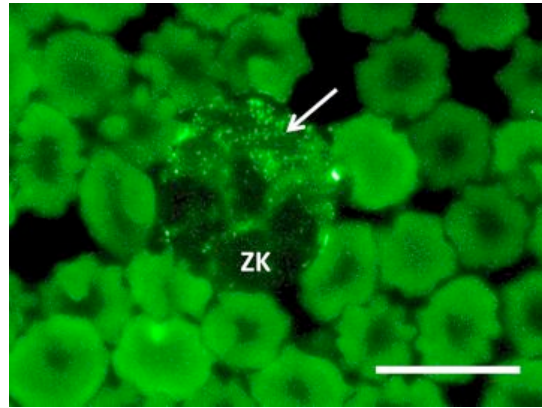


Abbildung 195: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, fixiert
(Kalb, m, Alter: 6 Std post natum)

Eine granuläre Reaktion ist gut zu erkennen (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

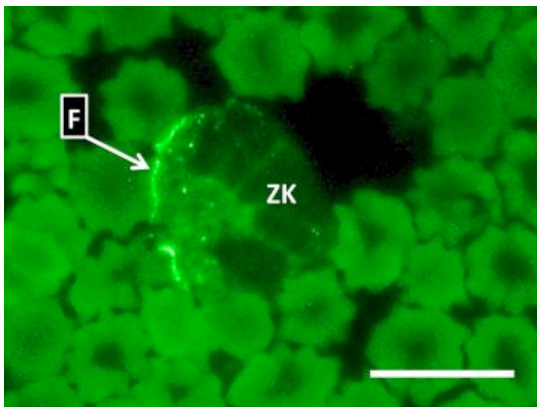


Abbildung 196: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, fixiert
(Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Bei dem neutrophilen Granulozyten ist subplasmalemmal eine deutliche Immunfärbung zu erkennen.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

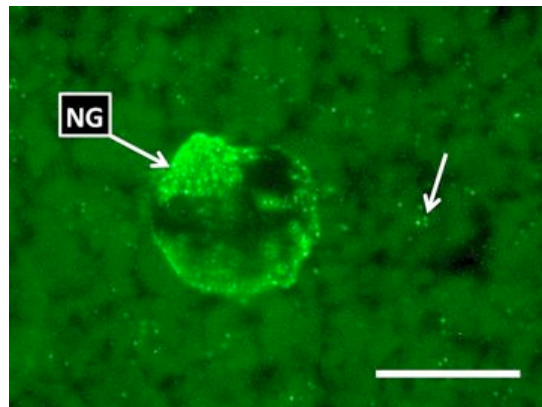


Abbildung 197: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, unfixiert
(Kalb, m, Alter: 8 Std post natum)

Bei dem unfixierten Ausstrich ist die Reaktion im Zytoplasma sehr deutlich. Auch in den Erythrozyten ist eine punktförmige Reaktion zu sehen (Pfeil).

NG = Neutrophiler Granulozyt
WB = 10 µm

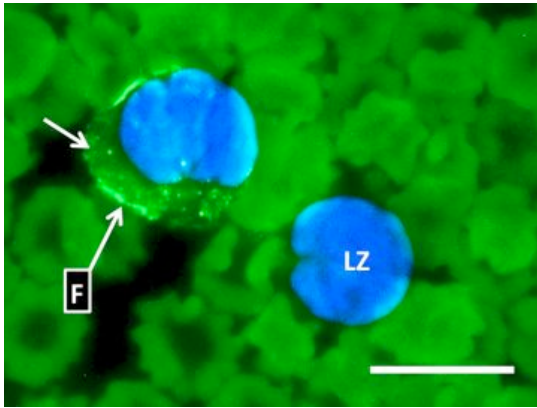


Abbildung 198: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, unfixiert

(Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Der neutrophile Granulozyt zeigt eine deutliche granuläre Reaktion (Pfeil) und Filamente am Zellrand. Der Lymphozyt (LZ) ist negativ. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt.

WB = 10 µm

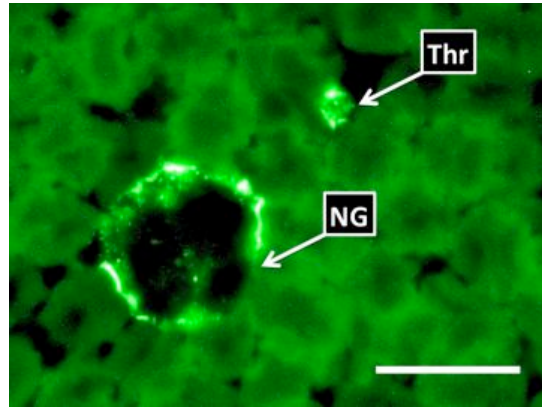


Abbildung 199: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, unfixiert

(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Der neutrophile Granulozyt (NG) und der Thrombozyt (Thr) sind stark positiv.

WB = 10 µm

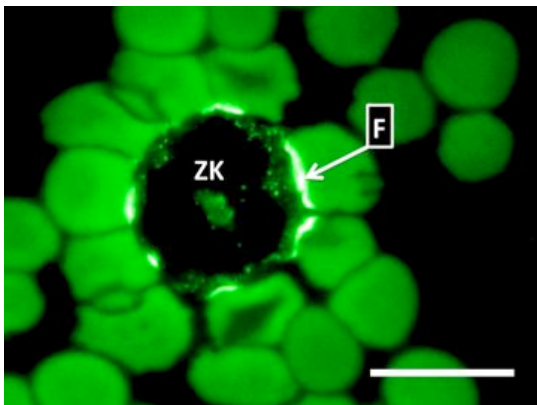


Abbildung 200: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, fixiert

(Kalb, m, Alter: 3 Std post natum)

Hier sind die Filamente (F) besonders gut zu erkennen.

WB = 10 µm

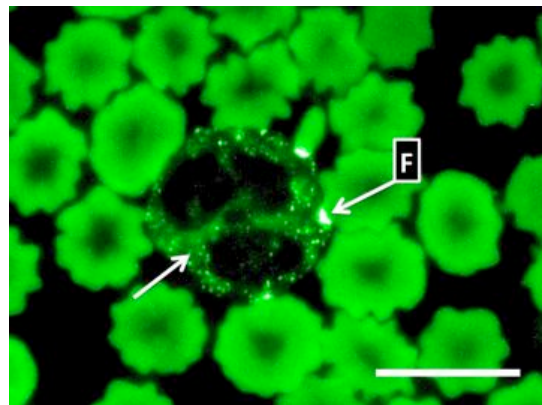


Abbildung 201: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, fixiert

(Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Der neutrophile Granulozyt zeigt kleine positive Filamente (F) und granuläre Strukturen an der Zellmembran (Pfeil).

WB = 10 µm

6.3. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

6.3.1. Pränatal

Die Inkubation mit FITC-markierten Antikörpern gegen Vimentin wurde an fixierten und unfixierten Ausstrichen durchgeführt. Die Erythrozyten und Erythroblasten wiesen in beiden Ansätzen feine filamentöse Strukturen auf. Thrombozyten waren nur in den unfixierten Ausstrichen zu erkennen. Lymphozyten und Lymphoblasten verhielten sich wie die Erythrozyten. Die neutrophilen Granulozyten zeigten deutliche Filamente im Zytoplasma. Eosinophile Granulozyten waren sehr schwer zu finden, da hier die Filamente die Granula umgeben, wodurch sie unter dem Fluoreszenzmikroskop besonders schwer zu erkennen sind. Basophile Granulozyten waren nicht zu identifizieren. Die Monozyten wiesen kaum Bindung von Antikörpern gegen Vimentin auf und waren meist als negativ zu beurteilen.

Tabelle 80: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Vimentin, Fetus

Zytoskelett	Reaktionsstärke				Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten	0	50 %	50 %	0	80 %
Thrombozyten	0	25 %	37,5 %	37,5 %	80 %
Lymphozyten	0	25 %	25 %	50 %	80 %
Neutrophile Granulozyten	0	0	25 %	75 %	80 %
Eosinophile Granulozyten	0	0	50 %	50 %	20%
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Monozyten	66,7 %	33,3 %	0	0	80 %

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

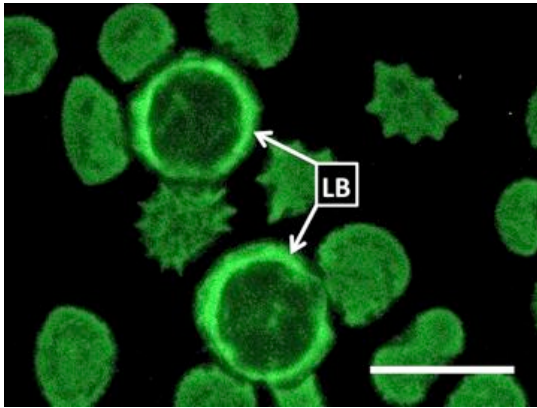


Abbildung 202: Lymphoblasten, Nachweis von Vimentin, unfixiert
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Das Zytoplasma der Lymphoblasten (LB) ist positiv gefärbt.

WB = 10 µm

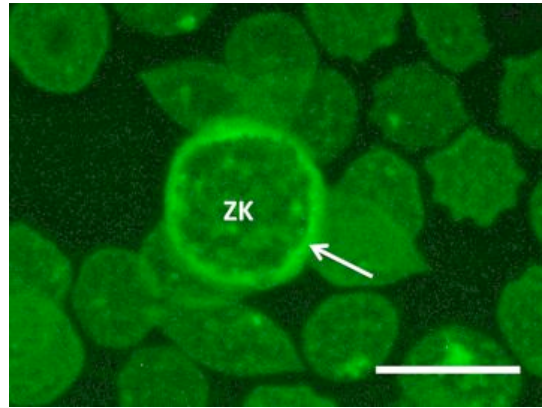


Abbildung 203: Lymphozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert
(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Im Zytoplasma sind feine Filamente zu erkennen (Pfeil).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

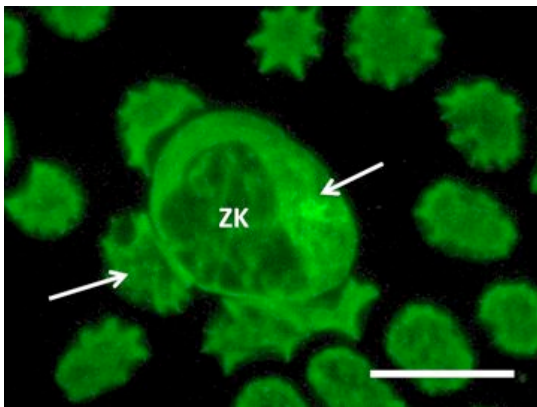


Abbildung 204: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert
(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Sowohl im Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten als auch im Zytoplasma der Erythrozyten sind feine Filamente zu sehen (Pfeile).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

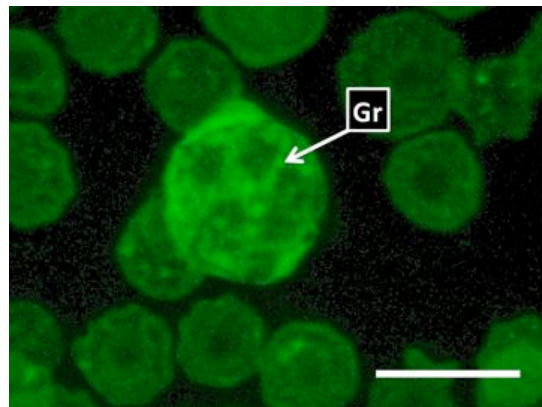


Abbildung 205: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Bei dem eosinophilen Granulozyten sind die Granula (Gr) nur noch schwer zu erkennen. Filamente durchspannen das Zytoplasma.

WB = 10 µm

6.3.2. Postnatal

Auch bei den Kälbern wurden fixierte und unfixierte Ausstriche verwendet. Die Erythrozyten wiesen in den fixierten Proben eine deutlichere Fluoreszenz auf als in den unfixierten, jedoch waren die feinen Filamente nicht so gut zu erkennen wie beim fetalen Blut. Thrombozyten waren nur in den unfixierten Ausstrichen zu sehen. Die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten als auch die Lymphozyten wiesen deutliche Filamente auf. Basophile Granulozyten waren nicht nachweisbar. Monozyten konnten in jedem Ausstrich identifiziert werden und zeigten nur selten eine sehr geringe Reaktion mit den Antikörpern gegen Vimentin.

Tabelle 81: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Vimentin, Kalb

Zytoskelett	Reaktionsstärke				Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten	30%	30 %	40 %	0	100 %
Thrombozyten	0	50 %	50 %	0	100 %
Lymphozyten	0	0	20 %	80 %	100 %
Neutrophile Granulozyten	0	0	40 %	60 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0	0	50 %	50 %	20%
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Monozyten	40 %	60 %	0	0	100 %

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

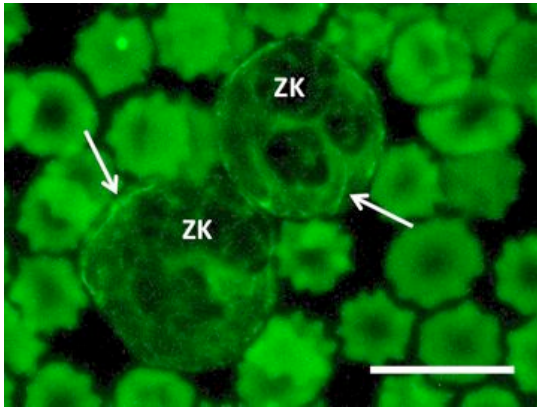


Abbildung 206: Neutrophile Granulozyten, Nachweis von Vimentin, fixiert (Kalb, w, Alter: 23 Std post natum)

Die Filamente färben sich deutlich an (Pfeile).

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

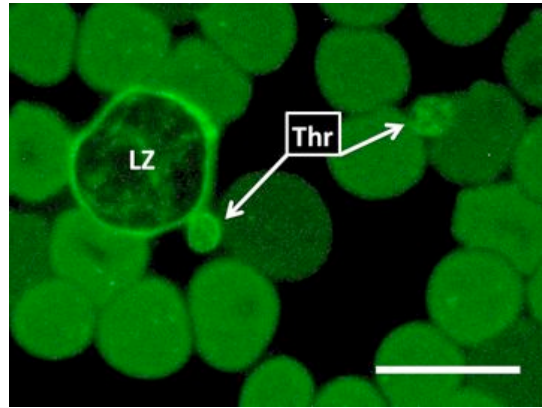


Abbildung 207: Lymphozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert (Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Der Lymphozyt (LZ) lässt sich im Zytoplasma anfärben. Auch die Thrombozyten (Thr) stellen sich positiv dar.

WB = 10 µm

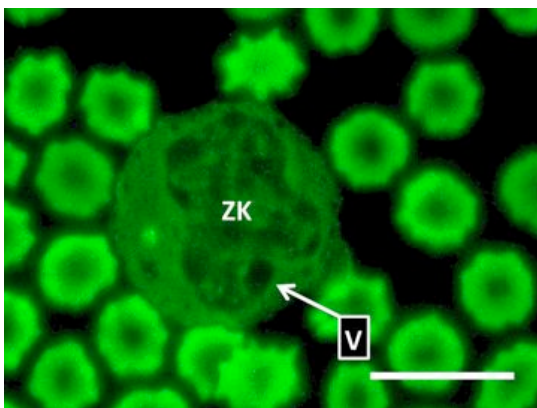


Abbildung 208: Monozyt, Nachweis von Vimentin, fixiert (Kalb, m, Alter: 10 Std post natum)

Der Monozyt weist kaum positive Reaktionen auf. Im Zytoplasma sind Vakuolen (V) zu erkennen. Die Erythrozyten fluoreszieren deutlich stärker.

ZK = Zellkern
WB = 10 µm

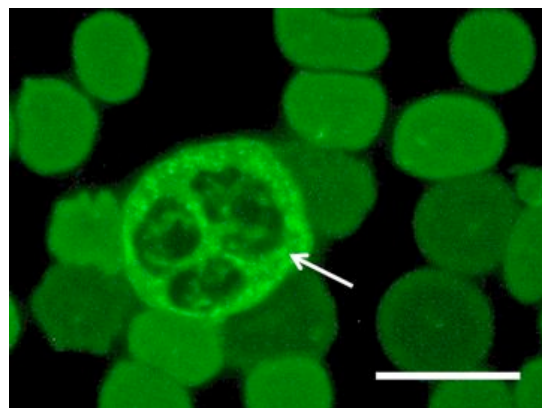


Abbildung 209: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert (Kalb, w, Alter: 12 Std post natum)

Die Granula des Eosinophilen sind kaum noch zu erkennen (Pfeil). Eine deutlich positive Reaktion ist zu sehen.

WB = 10 µm

6.4. Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin**6.4.1. Pränatal**

Es kam zu keiner Bindung von Panzytokeratin an die Blutzellen der Feten.

6.4.2. Postnatal

Es kam ebenfalls zu keiner Bindung von Panzytokeratin an die Blutzellen der Kälber.

6.5. Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin**6.5.1. Pränatal**

In den Erythrozyten, Erythroblasten, Lymphozyten, Lymphoblasten und Monozyten konnte keine positive Reaktion festgestellt werden. Die neutrophilen Granulozyten und Myelozyten wiesen eine schwache bis mittelstarke granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma auf. Die Thrombozyten waren ebenfalls positiv. Zwischen den Granula der eosinophilen Granulozyten konnten diese granulären Strukturen nachgewiesen werden. Basophile Granulozyten waren nicht zu erkennen.

Tabelle 82: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Tubulin, Fetus

Zytoskelett	Reaktionsstärke				Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten	100 %	0	0	0	90 %
Thrombozyten	0	0	0	100 %	90 %
Lymphozyten	100 %	0	0	0	90 %
Neutrophile Granulozyten	0	44,4 %	55,6 %	0	90 %
Eosinophile Granulozyten	0	50 %	50 %	0	20%
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Monozyten	100 %	0	0	0	90 %

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

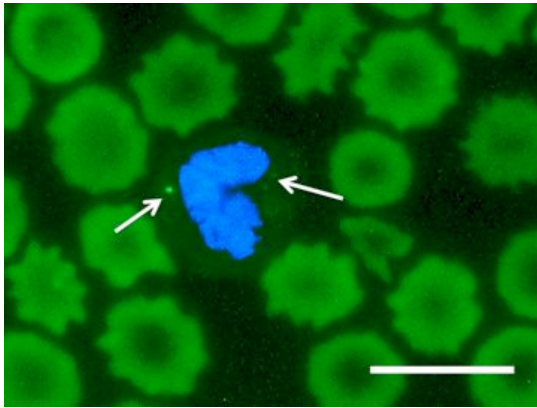


Abbildung 210: Myelozyt, Nachweis von Tubulin
(Fetus, m, SSL 64 cm)

Im Zytoplasma des Myelozyten ist eine granuläre Reaktion zu erkennen (Pfeile).

WB = 10 μ m

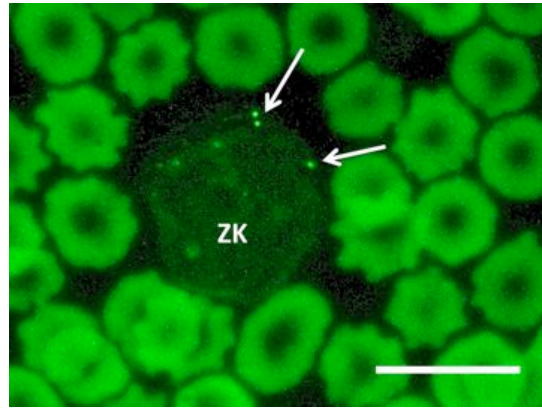


Abbildung 211: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Tubulin
(Fetus, w, SSL 39 cm)

Die Reaktion ist im Zytoplasma des Neutrophilen stärker als bei dem Myelozyten (Pfeile).

ZK = Zellkern
WB = 10 μ m

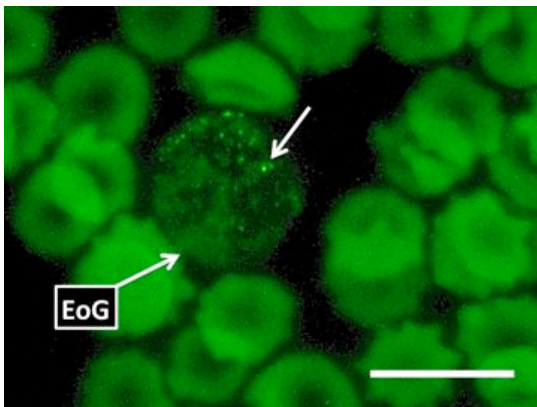


Abbildung 212: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Tubulin
(Fetus, m, SSL 64 cm)

Zwischen den Granula des eosinophilen Granulozyten (EoG) sind kleine fluoreszierende Granula zu sehen (Pfeil).

WB = 10 μ m

6.5.2. Postnatal

Die Bindung von Tubulin-Antikörpern verlief bei den Thrombozyten sehr stark. Die neutrophilen Granulozyten wiesen eine schwache bis starke Reaktion auf. Die Erythrozyten, Lymphozyten und Monozyten banden die Tubulin-Antikörper nicht.

Tabelle 83: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Tubulin, Kalb

Zytoskelett	Reaktionsstärke				Prozentualer Anteil auswertbarer Präparate
	0	1 +	2 ++	3 +++	
Erythrozyten	100 %	0	0	0	100 %
Thrombozyten	0	0	0	100 %	100 %
Lymphozyten	100 %	0	0	0	100 %
Neutrophile Granulozyten	0	30 %	50 %	20 %	100 %
Eosinophile Granulozyten	0	50 %	50 %	0	20%
Basophile Granulozyten	-	-	-	-	-
Monozyten	100 %	0	0	0	100 %

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

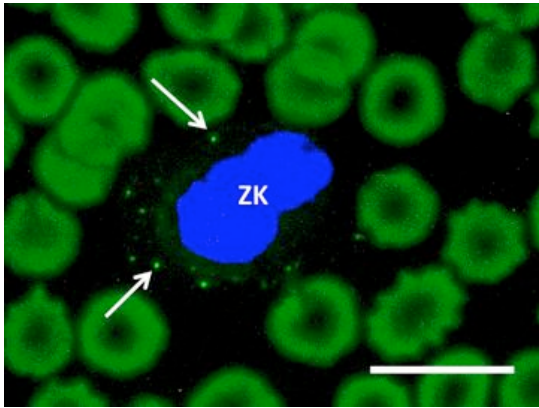


Abbildung 213: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Tubulin
(Kalb, m, Alter: 13 Std post natum)

Im Zytoplasma ist die Reaktion deutlich zu erkennen (Pfeile).

ZK = Zellkern mit DAPI
WB = 10 μ m

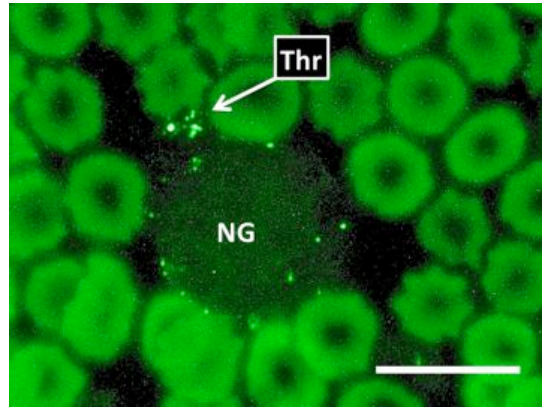


Abbildung 214: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Tubulin
(Kalb, m, Alter: 13 Std post natum)

Der neutrophile Granulozyt (NG) und der Thrombozyt (Thr) weisen eine Bindung auf.

WB = 10 μ m

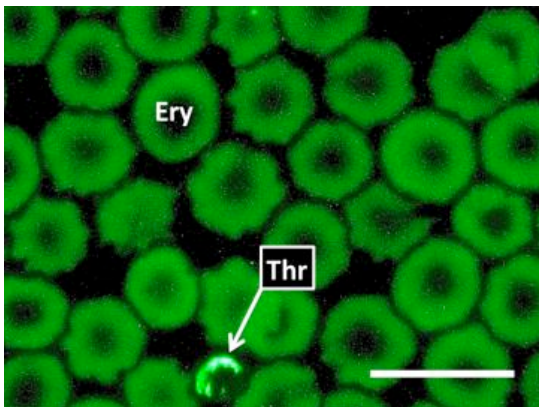


Abbildung 215: Thrombozyt, Nachweis von Tubulin
(Kalb, w, Alter: 12 Std post natum)

Die Erythrozyten (Ery) sind negativ, zeigen aber eine deutliche Autofluoreszenz. Der Thrombozyt (Thr) weist eine positive Reaktion auf.

WB = 10 μ m

7. Enzymhistochemische Untersuchungen

7.1. Peroxidase

7.1.1. Pränatal

Die neutrophilen Granulozyten des fetalen Blutes wiesen eine deutliche schwarz-braune granuläre Färbung beim Nachweis der Peroxidase auf. Die eosinophilen Granulozyten waren ab dem Stadium des Promyelozyten eindeutig anhand den schwarz bis schwarz-violetten Granula zu identifizieren. Alle restlichen Blutzellen zeigten keine positive Reaktion.

Tabelle 84: Auswertung Enzymhistochemie: Peroxidase, Fetus

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Peroxidase	Positiv	Schwarz; Schwarz-violett	Granulär

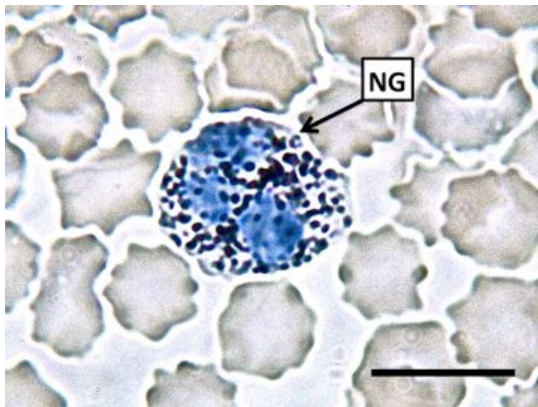


Abbildung 216: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Peroxidase (Fetus, m, SSL 11,2 cm)

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) färben sich schwarz.

SB = 10 µm

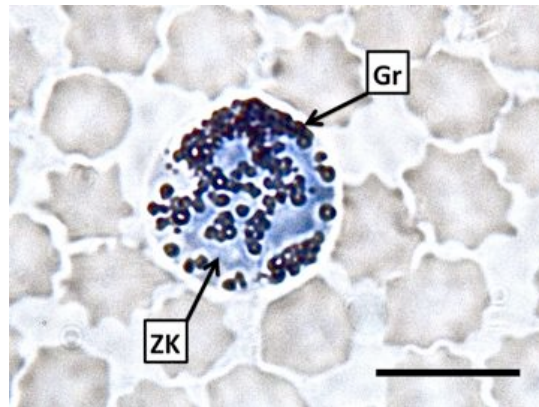


Abbildung 217: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Peroxidase (Fetus, w, SSL 10 cm)

Die Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten weisen eine schwarz-violette Reaktion auf. Der Zellkern (ZK) ist von den Granula teils überdeckt.

SB = 10 µm

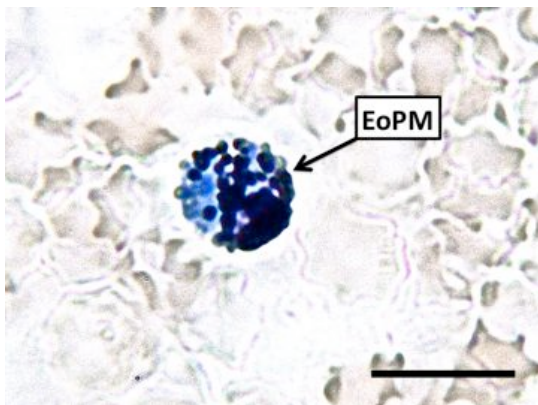


Abbildung 218: Eosinophiler Promyelozyt, Nachweis der Peroxidase (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Bei diesem eosinophilen Promyelozyten (EoPM) liegen die positiv gefärbten Granula besonders dicht.

SB = 10 µm



Abbildung 219: Erythroblast, Nachweis der Peroxidase (Fetus, w, SSL 10 cm)

Der Erythroblast (EB) weist keine Reaktion auf.

SB = 10 µm

7.1.2. Postnatal

Die Peroxidasereaktion in den neutrophilen Granulozyten und in den eosinophilen Granulozyten stellte sich wie die der Feten dar. Zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen kam es zu keinem Unterschied in der Intensität der Reaktion. Die Granula der neutrophilen Granulozyten färbten sich deutlich schwarz an, die der Eosinophilen schwarz-violett. Alle anderen Zellen wiesen keine positive Reaktion auf.

Tabelle 85: Auswertung Enzymhistochemie: Peroxidase, Kalb

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Peroxidase	Positiv	Schwarz; Schwarz-violett	Granulär



Abbildung 220: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Peroxidase (Kalb, m, Alter: 10 Tage post natum)

Die Granula des neutrophilen Granulozyten färben sich schwarz (Pfeile).

SB = 10 µm

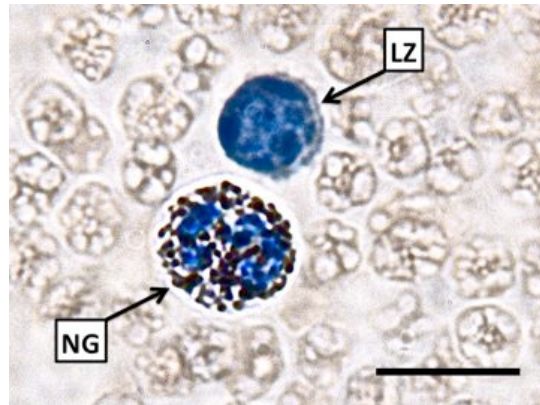


Abbildung 221: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, Nachweis der Peroxidase (Kalb, w, Alter: 4 Tage post natum)

Der neutrophile Granulozyt (NG) weist eine stark positive Reaktion auf. Der Lymphozyt (LZ) ist Peroxidase-negativ.

SB = 10 µm

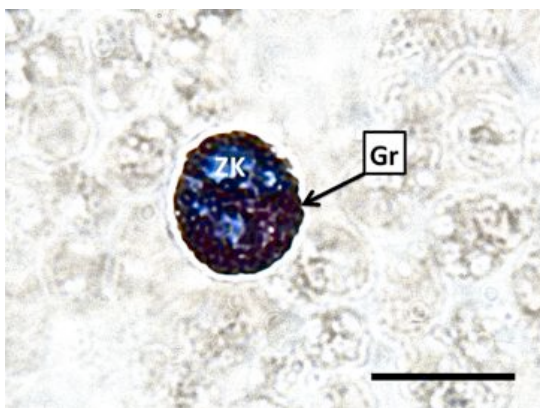


Abbildung 222: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Peroxidase (Kalb, m, Alter: 12 Tage post natum)

Die Peroxidase-positiven Granula (Gr) liegen sehr dicht und überdecken den Zellkern (ZK) fast komplett.

SB = 10 µm

7.2. Alkalische Phosphatase

7.2.1. Pränatal

Die neutrophilen Granulozyten wiesen ein braunes Reaktionsprodukt in den Granula als auch im Zytoplasma auf. Die Anfärbung war von unterschiedlicher Intensität. Es waren neutrophile Granulozyten zu sehen, bei denen die braune Färbung nur schwach war, jedoch auch solche, bei denen der Zellkern fast vollständig durch das Reaktionsprodukt überdeckt wurde. Alle anderen Zellen im Blut des Fetus waren negativ.

Tabelle 86: Auswertung Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase, Fetus

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Alkalische Phosphatase	Positiv	Braun	Granulär; Zytoplasma

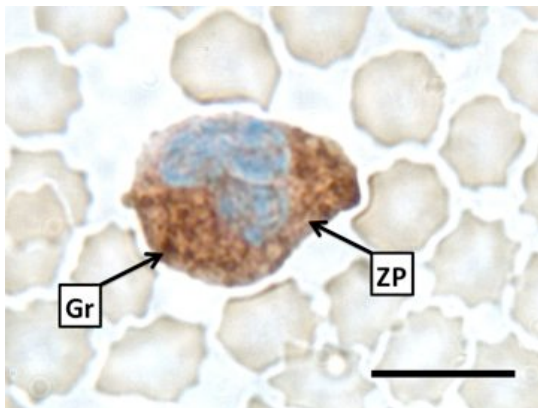


Abbildung 223: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase

(Fetus, w, SSL 20,1 cm)

In den Granula (Gr) als auch im Zytoplasma (ZP) befindet sich das braune Reaktionsprodukt.

SB = 10 µm

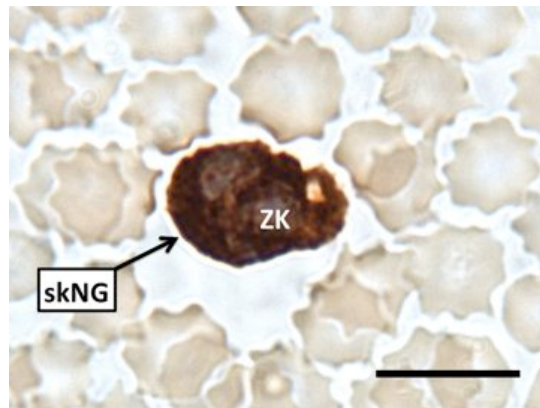


Abbildung 224: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase

(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Bei diesem segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (skNG) ist der Enzymnachweis so intensiv, dass der Zellkern (ZK) kaum noch zu sehen ist.

SB = 10 µm

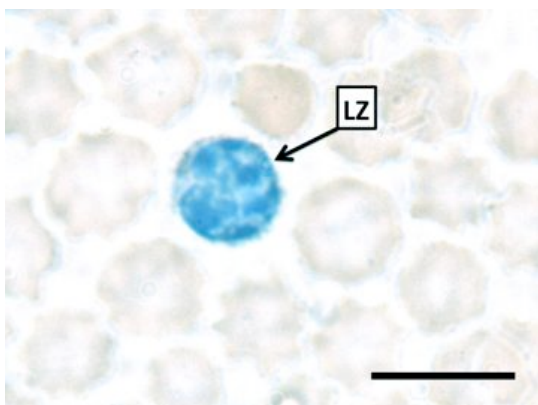


Abbildung 225: Lymphozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase
(Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Der Lymphozyt (LZ) weist keine Reaktion auf.

SB = 10 µm

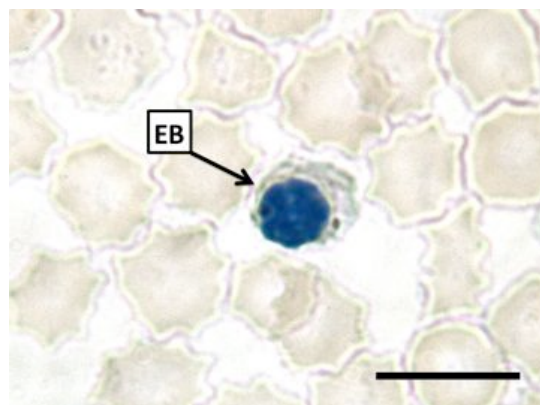


Abbildung 226: Erythroblast, Nachweis der alkalischen Phosphatase
(Fetus, w, SSL 20,1 cm)

Der Erythroblast (EB) ist deutlich negativ.

SB = 10 µm

7.2.2. Postnatal

Die Enzymaktivität war in allen Altersstufen der Kälber gleich. Wie beim Fetus kam es zur Anfärbung in unterschiedlicher Intensität bei den neutrophilen Granulozyten. Alle anderen Zellen waren negativ.

Tabelle 87: Auswertung Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase, Kalb

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Alkalische Phosphatase	Positiv	Braun	Granulär; Zytoplasma

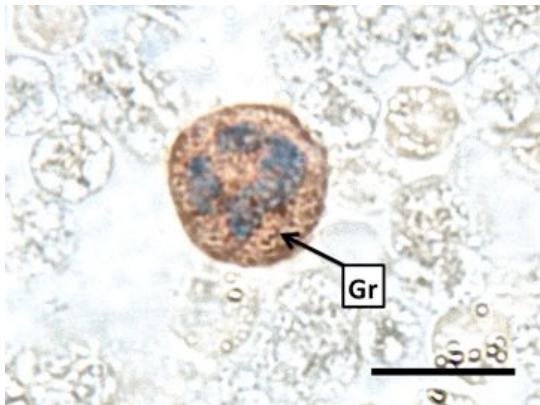


Abbildung 227: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase

(Kalb, w, Alter: 33 Tage post natum)

Die Granula (Gr) als auch das Zytoplasma sind positiv.

SB = 10 µm



Abbildung 228: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase

(Kalb, m, Alter: 5 Tage post natum)

Bei diesem segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (skNG) sind die Granula deutlich zu erkennen.

SB = 10 µm

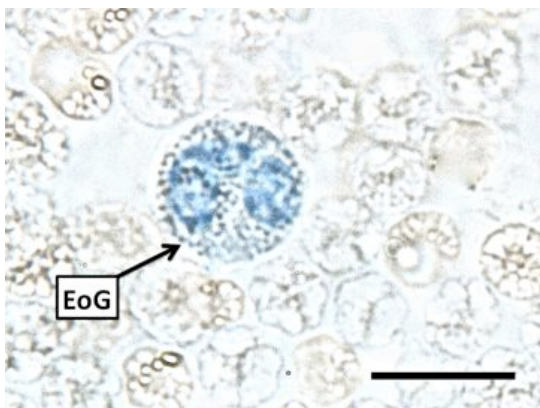


Abbildung 229: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase (Kalb, m, Alter: 30 Tage post natum)

Der eosinophile Granulozyt (EoG) zeigt keine Reaktion.

SB = 10 µm

7.3. Saure Phosphatase

7.3.1. Pränatal

Es waren einige Lymphozyten und Lymphoblasten mit deutlichen rötlichen Reaktionsprodukten zu sehen. Neben diesen positiv reagierenden Lymphozyten waren aber auch Saure-Phosphatase-negative Lymphozyten zu finden. Erythroblasten stellten sich durchgehend negativ dar. Die neutrophilen Granulozyten zeigten meist eine leichte blass-rosa Anfärbung im Zytoplasma. Positive eosinophile sowie basophile Granulozyten konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 88: Auswertung Enzymhistochemie: Saure Phosphatase, Fetus

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Saure Phosphatase	Positiv	Rosa- rot	Zytoplasma

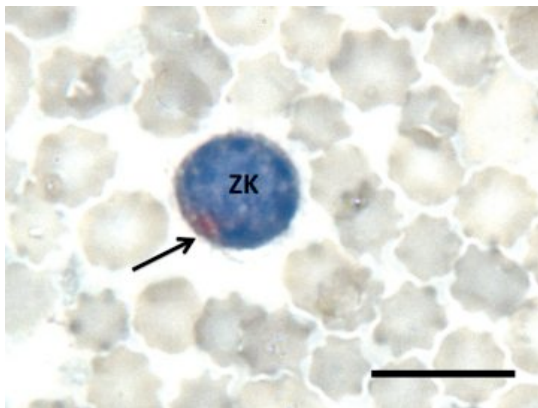


Abbildung 230: Lymphozyt, Nachweis der sauren Phosphatase (Fetus, m, SSL 64 cm)

Der Zellkern (ZK) füllt fast die komplette Zelle aus. In dem schmalen Zytoplasmasaum ist eine positive Färbung zu sehen (Pfeil).

SB = 10 µm

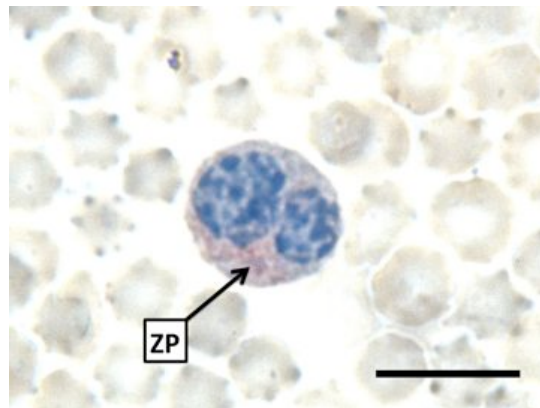


Abbildung 231: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der sauren Phosphatase (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Im Zytoplasma (ZP) ist eine schwache rosa Färbung zu erkennen.

SB = 10 µm

7.3.2. Postnatal

Die Lymphozyten der Kälber wiesen teilweise stark rot-rosa gefärbte Reaktionsprodukte im Zytoplasma auf. Es waren aber auch wie beim Fetus negative Lymphozyten zu sehen. Die neutrophilen Granulozyten zeigten beim Nachweis der sauren Phosphatase durchgehend eine positive Reaktion unterschiedlicher Intensität. Eosinophile Granulozyten waren nur sehr selten zu sehen und wiesen nur eine sehr leichte positive Reaktion auf. Basophile Granulozyten waren negativ. Die Reaktion im Zytoplasma der Monozyten fiel nur sehr schwach positiv aus.

Tabelle 89: Auswertung Enzymhistochemie: Saure Phosphatase, Kalb

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Saure Phosphatase	Positiv	Hellrosa Leuchtend rot	Zytoplasma

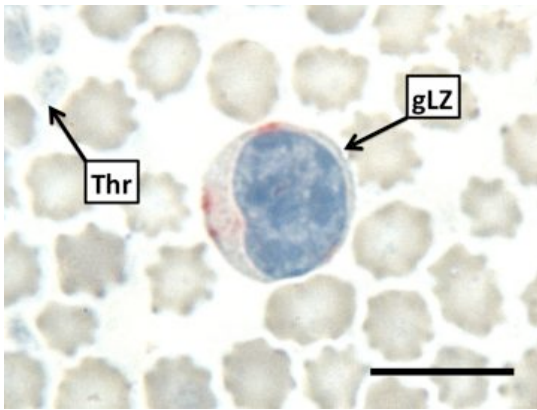


Abbildung 232: Großer Lymphozyt, Nachweis der sauren Phosphatase (Kalb, m, Alter: 30 Tage post natum)

Im Zytoplasma des großen Lymphozyten (gLZ) sind rosafarbene Inseln zu sehen. Links im Bild sind Thrombozyten (Thr) zu sehen, die sich durch die Kernfärbung blassblau anfärben.

SB = 10 µm

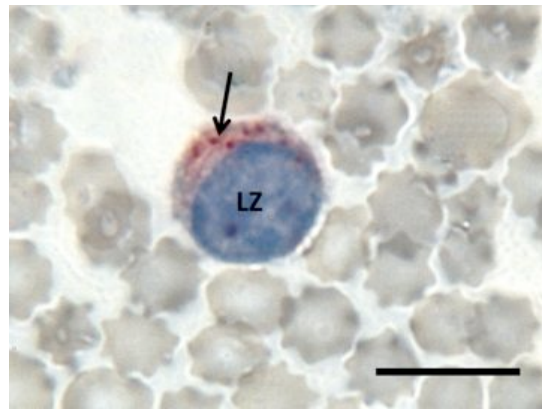


Abbildung 233: Lymphozyt, Nachweis der sauren Phosphatase (Kalb, w, Alter: 41 Tage post natum)

Die positive Reaktion im Zytoplasma ist deutlich zu sehen (Pfeil).

LZ = Lymphozyt
SB = 10 µm

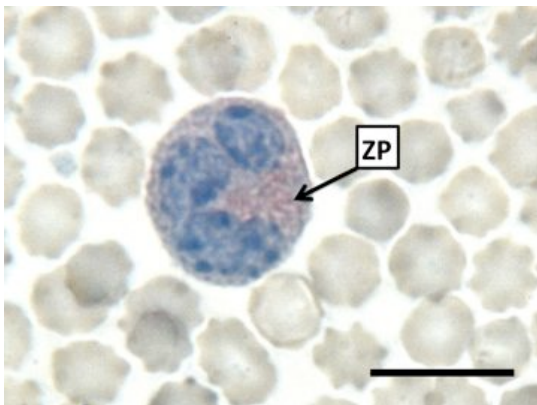


Abbildung 234: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der sauren Phosphatase (Kalb, m, Alter: 12 Tage post natum)

Das Zytoplasma (ZP) ist schwach rosa gefärbt.

SB = 10 µm

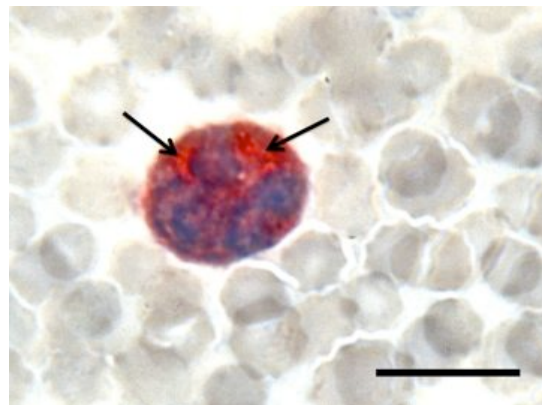


Abbildung 235: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der sauren Phosphatase (Kalb, w, Alter: 33 Tage post natum)

Bei diesem Neutrophilen ist eine sehr starke Reaktion im Zytoplasma zu sehen (Pfeile).

SB = 10 µm

7.4. Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

Mit einem pH Wert von 7,0 und einer Kernfärbung mit Kernechtrot konnte das beste Ergebnis erzielt werden.

7.4.1. Pränatal

Die Lymphozyten, Lymphoblasten und Erythroblasten wiesen keine positive Reaktion beim Nachweis der Chloracetat-Esterase auf. Eosinophile Granulozyten waren ebenfalls negativ. Die neutrophilen Granulozyten wiesen einen feinen blauen Niederschlag im Zytoplasma auf, zudem waren auch die zytoplasmatischen Granula positiv. Basophile Granulozyten waren positiv. Monozyten konnten im Blut der Feten bei dieser enzymhistochemischen Reaktion nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 90: Auswertung Enzymhistochemie: Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase, Fetus

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase	Positiv	Hellblau	Granulär, Zytoplasma



Abbildung 236: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase (Fetus, m, SSL 11,2 cm)

Im Zytoplasma ist der feine blaue Niederschlag zu erkennen (Pfeil), der auf eine deutliche Enzymaktivität hinweist.

SB = 10 μ m

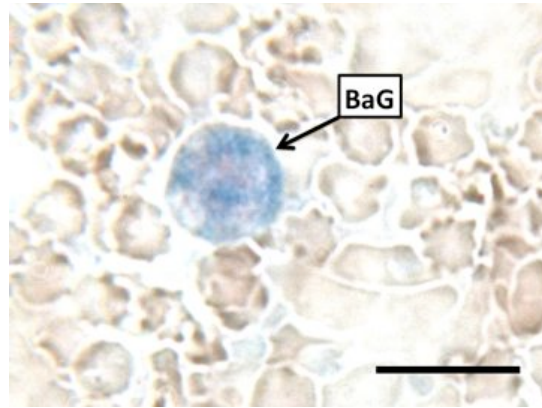


Abbildung 237: Basophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase (Fetus, w, SSL 21,9 cm)

Der basophile Granulozyt (BaG) weist eine deutliche positive Reaktion auf. Der Zellkern ist kaum mehr zu erkennen.

SB = 10 μ m

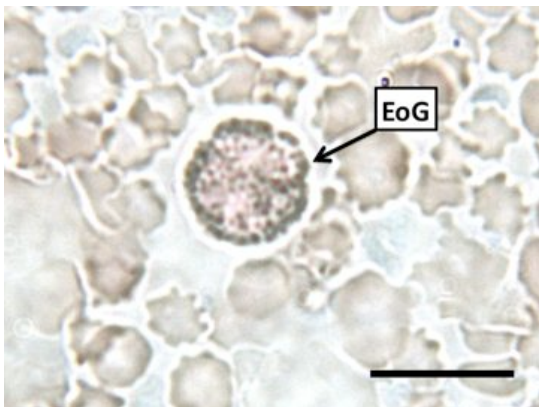


Abbildung 238: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase (Fetus, m, SSL 37,8 cm)

Bei dem eosinophilen Granulozyten (EoG) ist keine positive Reaktion feststellbar.

SB = 10 μ m

7.4.2. Postnatal

Wie im fetalen Blut stellten sich die Lymphozyten, Erythrozyten und eosinophilen Granulozyten negativ dar. Die neutrophilen und basophilen Granulozyten zeigten eine positive Reaktion im Zytoplasma und in den zytoplasmatischen Granula.

Tabelle 91: Auswertung Enzymhistochemie: Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase, Kalb

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase	Positiv	Hellblau	Granulär, Zytoplasma

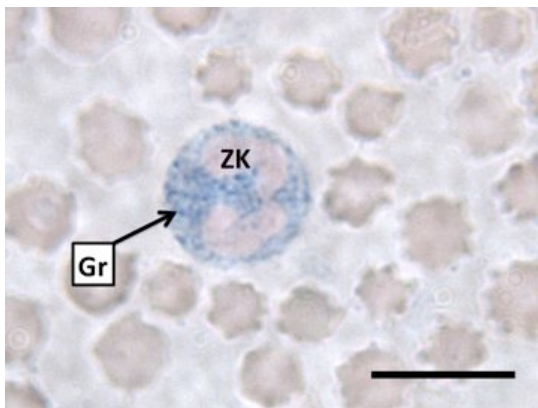


Abbildung 239: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

(Kalb, w, Alter: 20 Tage post natum)

Die positive Reaktion mit den Granula (Gr) ist gut zu erkennen.

SB = 10 µm

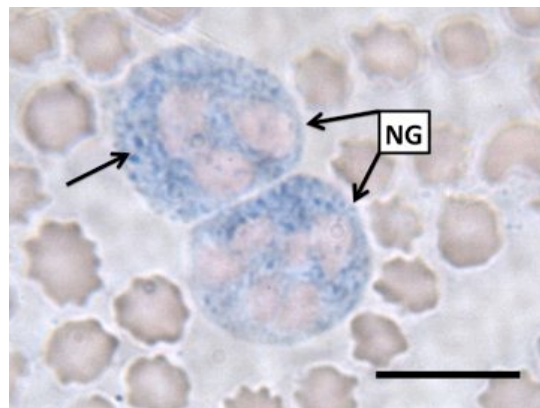


Abbildung 240: Neutrophile Granulozyten, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

(Kalb, m, Alter: 22 Tage post natum)

Die neutrophilen Granulozyten (NG) weisen eine deutliche Chloracetat-Esterase-Aktivität in den Granula (Pfeil) auf.

SB = 10 µm

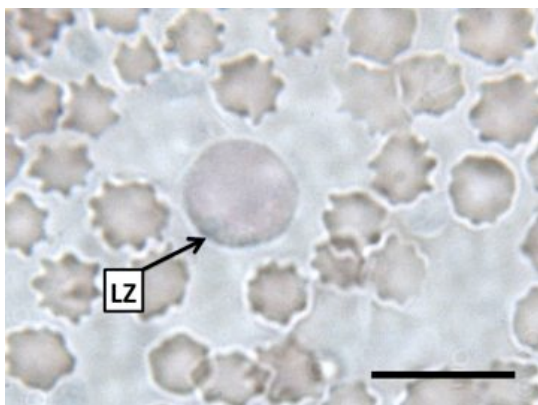


Abbildung 241: Lymphozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

(Kalb, w, Alter: 42 Tage post natum)

Der Lymphozyt (LZ) weist keine Aktivität auf.

SB = 10 µm



Abbildung 242: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase

(Kalb, w, Alter: 42 Tage post natum)

Der eosinophile Granulozyt (EoG) ist negativ.

SB = 10 µm

7.5. α -Naphthyl-Acetat-Esterase

Das beste Ergebnis wurde bei einem pH-Wert von 8,0 erreicht.

7.5.1. Pränatal

Allgemein war die Enzymaktivität beim der α -Naphthyl-Acetat-Esterase in den Blutzellen am schwächsten. Die Lymphozyten und Lymphoblasten zeigten eine schwach positive granuläre Reaktion im Zytoplasma. Auch bei den Monozyten und neutrophilen Granulozyten konnte eine schwach positive Reaktion beobachtet werden. Die eosinophilen Granulozyten wurden als schwach positiv beurteilt. Sie waren schwer zu beurteilen, da die sehr feinen und schwach gefärbten Reaktionsprodukte meist zwischen den Granula lagen oder von diesen überlagert worden sind. Basophile Granulozyten waren negativ.

Tabelle 92: Auswertung Enzymhistochemie: α -Naphthyl-Acetat-Esterase, Fetus

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
α -Naphthyl-Acetat-Esterase	Positiv	Blau-braun	Granulär,

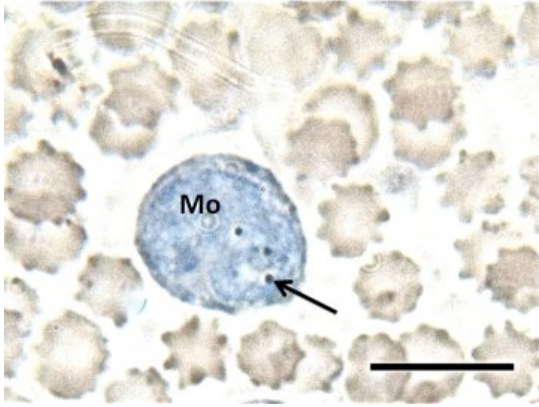


Abbildung 243: Monozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase (Fetus, w, SSL 21,9 cm)

Der Monozyt (Mo) weist feine positive Granula (Pfeil) im Zytoplasma auf.

SB = 10 μ m

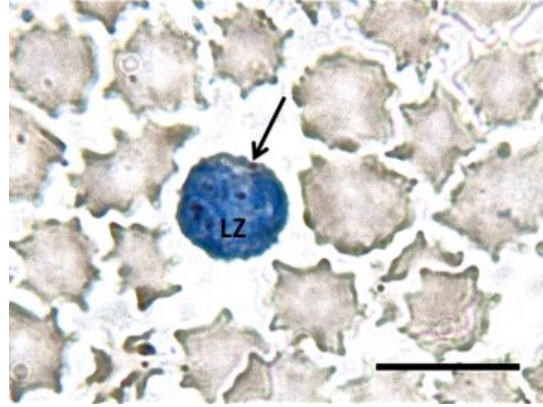


Abbildung 244: Lymphozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Im Zytoplasma des Lymphozyten (LZ) ist eine stark positive Reaktion zu sehen (Pfeil).

SB = 10 μ m

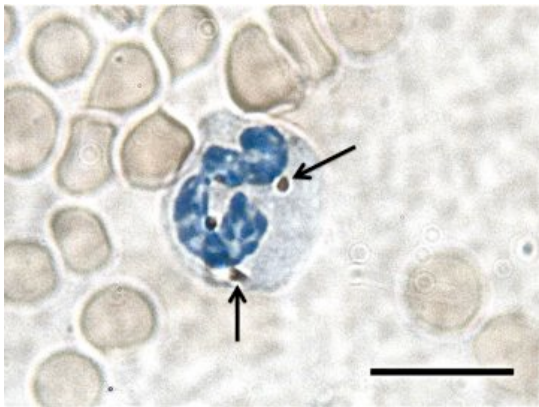


Abbildung 245: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase (Fetus, m, SSL 40,2 cm)

Der neutrophile Granulozyt zeigt eine positive Reaktion bei diesem Enzymnachweis (Pfeile).

SB = 10 μ m

7.5.2. Postnatal

Auch im Kälberblut ließ sich bei den meisten Blutzellen nur eine schwache Aktivität der α -Naphthyl-Acetat-Esterase nachweisen. Monozyten, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten wiesen eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma auf. Die Eosinophilen waren, wie bei den Feten auch, schwer zu beurteilen und wiesen eine schwach-positive Reaktion auf. Basophile Granulozyten waren negativ.

Tabelle 93: Auswertung Enzymhistochemie: α -Naphthyl-Acetat-Esterase, Kalb

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
α -Naphthyl-Acetat-Esterase	Positiv	Blau-braun	Granulär



Abbildung 246: Monozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase (Kalb, m, Alter: 12 Tage post natum)

Im Zytoplasma des Monozyten (Mo) sind die feinen granulären Strukturen zu sehen (Pfeile)

SB = 10 μ m



Abbildung 247: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase (Kalb, m, Alter: 22 Tage post natum)

Der neutrophile Granulozyt weist eine positive Reaktion auf (Pfeile). Der Zellkern (ZK) färbt sich blau.

SB = 10 μ m

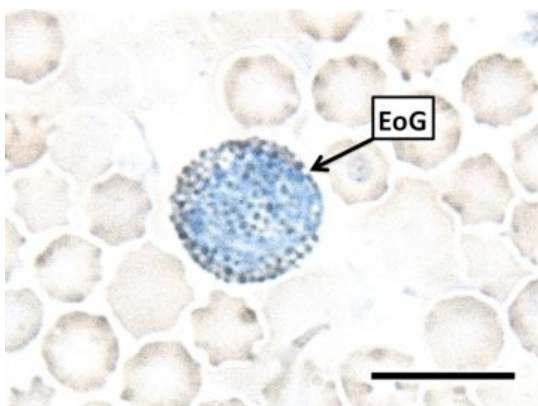


Abbildung 248: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase (Kalb, m, Alter: 12 Tage post natum)

Bei den eosinophilen Granulozyten (EoG) ist eine Beurteilung wegen den dominanten Granula schwierig. Die Reaktion war im Allgemeinen als schwach-positiv zu beurteilen.

SB = 10 μ m



Abbildung 249: Großer Lymphozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase (Kalb, w, Alter: 33 Tage post natum)

Im Zytoplasma des großen Lymphozyten (gLZ) ist eine feine Reaktion zu erkennen (Pfeil).

SB = 10 μ m

7.6. Naphthol-AS-Acetat-Esterase

7.6.1. Pränatal

Bei diesem Enzymnachweis zeigten fast alle Zellen des fetalen Blutes eine positive Reaktion. In einigen Ausstrichen konnte ein körniges Reaktionsprodukt in den Erythrozyten und Thrombozyten festgestellt werden. Die Reaktion in den Zellen der lymphatischen Reihe fielen unterschiedlich aus. Manche Lymphozyten und Lymphoblasten zeigten eine positive Reaktion, es konnten jedoch auch solche gefunden werden, die als negativ zu beurteilen waren. Alle neutrophilen Granulozyten und Monozyten wiesen eine deutliche positive Reaktion auf. Eosinophile Granulozyten und Promyelozyten waren positiv. Bei allen positiven Zellen war körniges blau-braunes Material im Zytoplasma zu finden. Basophile Granulozyten konnten bei diesem Enzymnachweis nicht eindeutig identifiziert werden.

Tabelle 94: Auswertung Enzymhistochemie: Naphthol-AS-Acetat-Esterase, Fetus

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Naphthol-AS-Acetat-Esterase	Positiv	Blau-braun	Granulär, Zytoplasma

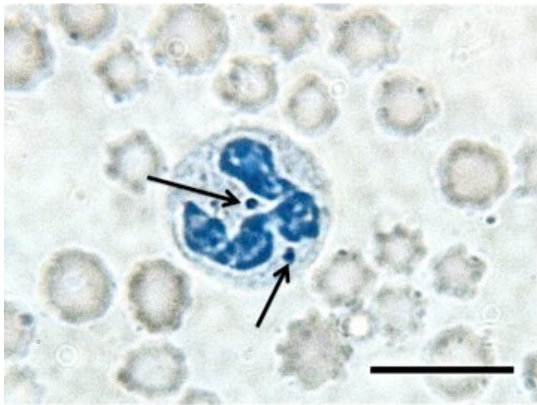


Abbildung 250: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase (Fetus, m, SSL 22,7 cm)

Im Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten sind feine bis grobkörnige Strukturen zu finden (Pfeile).

SB = 10 µm

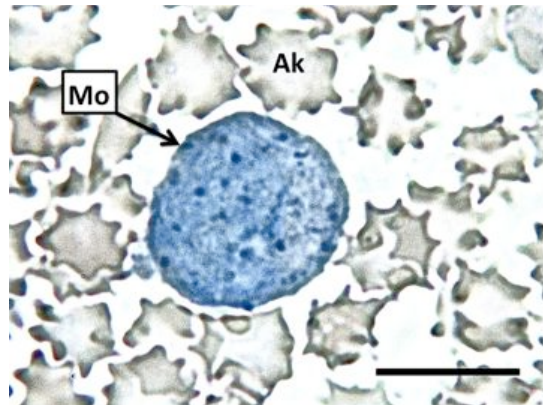


Abbildung 251: Monozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase (Fetus, m, SSL 22,7 cm)

Die Reaktion ist in diesem Monozyten (Mo) besonders gut zu erkennen. Um den Monozyten befinden sich viele Akanthozyten (Ak), die wahrscheinlich durch die Vorbehandlung bedingt sind.

SB = 10 µm

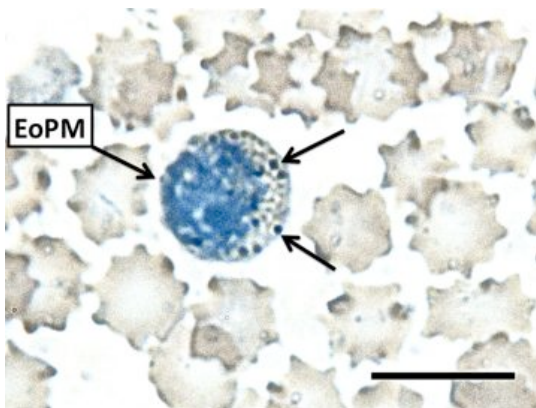


Abbildung 252: Eosinophiler Promyelozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase (Fetus, w, SSL 21,9 cm)

Zwischen den Granula des eosinophilen Promyelozyten (EoPM) befinden sich die granulären Strukturen der Enzymreaktion (Pfeile).

SB = 10 µm

7.6.2. Postnatal

Das Ergebnis des Enzymnachweises beim Kalb ist dem der Feten ähnlich. Die deutlichste positive Reaktion konnte bei den neutrophilen Granulozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten gefunden werden. Die meisten Lymphozyten stellten sich ebenfalls positiv dar, es waren jedoch auch negative Lymphozyten zu finden.

Tabelle 95: Auswertung Enzymhistochemie: Naphthol-AS-Acetat-Esterase, Kalb

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
Naphthol-AS-Acetat-Esterase	Positiv	Blau-braun	Granulär, Zytoplasma

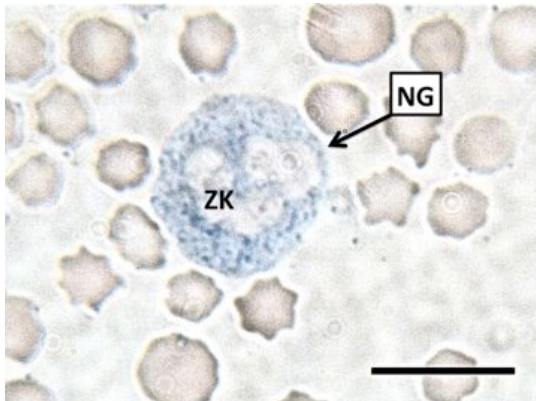


Abbildung 253: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase (Kalb, w, Alter: 41 Tage post natum)

Bei dem neutrophilen Granulozyten (NG) ist der feingranuläre Niederschlag deutlich zu erkennen. Der Zellkern (ZK) ist hier mit Kernechtrot leicht rosa gefärbt.

SB = 10 µm

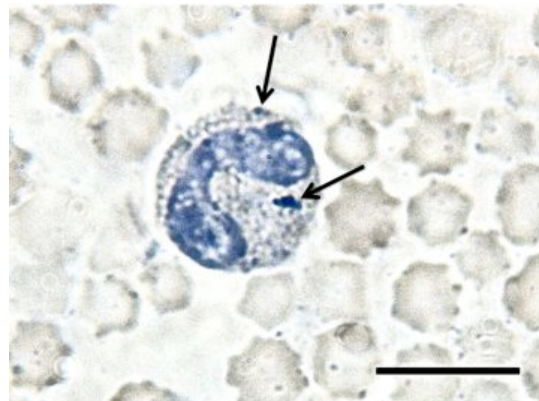


Abbildung 254: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase (Kalb, m, Alter: 30 Tage post natum)

Im Zytoplasma zwischen den Granula befindet sich die angefärbte Enzymreaktion (Pfeile).

SB = 10 µm

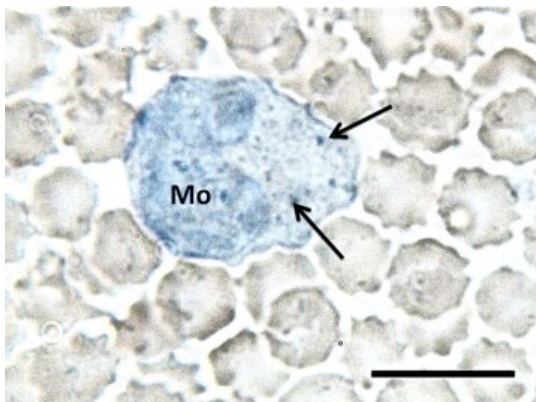


Abbildung 255: Monozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase (Kalb, w, Alter: 41 Tage post natum)

Im Zytoplasma des Monozyten (Mo) ist die deutlich positive Reaktion zu sehen.

SB = 10 µm



Abbildung 256: Lymphozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase (Kalb, m, Alter: 30 Tage post natum)

In dem kleinen Zytoplasmasaum ist eine granuläre Struktur zu sehen (Pfeil), die auch teilweise den Zellkern überlagert.

LZ = Lymphozyt
SB = 10 µm

7.7. β -Glucuronidase

7.7.1. Pränatal

Das Enzym β -Glucuronidase ließ sich bevorzugt in den Lymphozyten und Monozyten nachweisen. Hier war eine positive Reaktion in Form einer rosa- bis roten Färbung des Zytoplasmas zu erkennen. Neutrophile Granulozyten und Myelozyten waren negativ. Es waren aber auch Lymphozyten zu finden, die keine Reaktion aufwiesen. Eosinophile Granulozyten zeigten eine leicht positive Reaktion im Zytoplasma. Basophile Granulozyten waren negativ.

Tabelle 96: Auswertung Enzymhistochemie: β -Glucuronidase, Fetus

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
β -Glucuronidase	Positiv	Rosa-rot	Zytoplasma



Abbildung 257: Lymphozyt, Nachweis der β -Glucuronidase (Fetus, m, SSL 14,5 cm)

Im Zytoplasma des Lymphozyten ist eine rosa Färbung zu erkennen (Pfeil), die auf eine deutliche Enzymaktivität hinweist.

ZK = Zellkern
SB = 10 μ m



Abbildung 258: Monozyt, Nachweis der β -Glucuronidase (Fetus, m, SSL 64 cm)

Das Zytoplasma des Monozyten ist rosa gefärbt und somit β -Glucuronidase positiv.

ZK = Zellkern
SB = 10 μ m

7.7.2. Postnatal

Auch die Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten des Kälberblutes stellten sich positiv dar. Es waren jedoch auch negative Lymphozyten zu sehen. Neutrophile Granulozyten und basophile Granulozyten waren wie beim Fetus negativ.

Tabelle 97: Auswertung Enzymhistochemie: β -Glucuronidase, Kalb

	Enzymaktivität	Art der Anfärbung	Lokalisation
β -Glucuronidase	Positiv	Rosa-rot	Zytoplasma



Abbildung 259: Monozyt, Nachweis der β -Glucuronidase (Kalb, w, Alter: 12 Tage post natum)

Das Zytoplasma des Monozyten ist rosa gefärbt (Pfeil) und damit β -Glucuronidase-positiv.

ZK = Zellkern
SB = 10 μ m

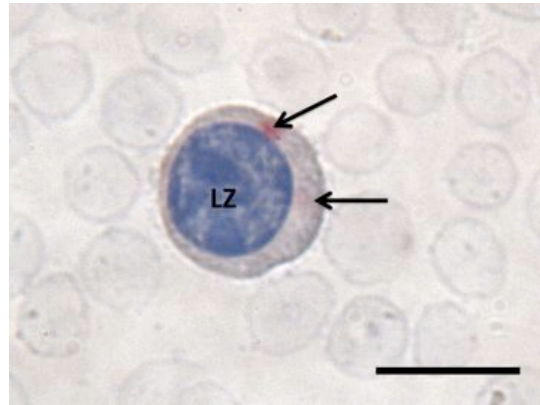


Abbildung 260: Lymphozyt, Nachweis der β -Glucuronidase (Kalb, w, Alter: 12 Tage post natum)

Im Zytoplasma des Lymphozyten (LZ) ist eine deutliche Färbung beim Nachweis der β -Glucuronidase zu erkennen (Pfeile).

ZK = Zellkern
SB = 10 μ m

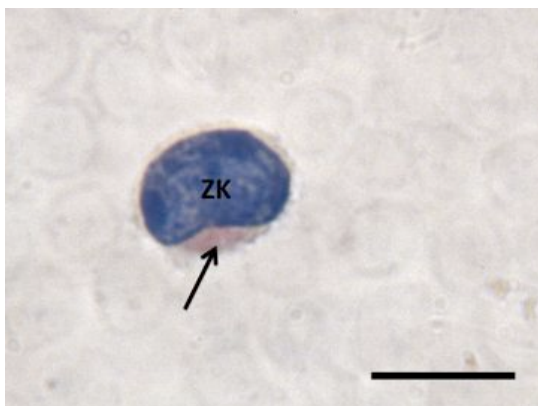


Abbildung 261: Lymphozyt, Nachweis der β -Glucuronidase (Kalb, w, Alter: 12 Tage post natum)

Der Pfeil weist auf die deutliche Enzymreaktion hin.

ZK = Zellkern
SB = 10 μ m

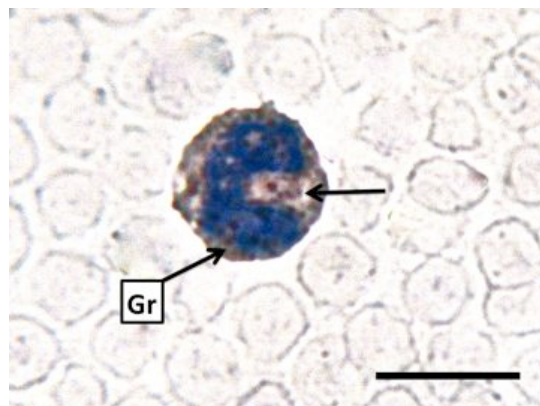


Abbildung 262: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der β -Glucuronidase (Kalb, m, Alter: 22 Tage post natum)

Zwischen den Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten ist das rosafarbene Zytoplasma (Pfeil) zu erkennen.

SB = 10 μ m

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Enzymnachweise noch einmal zusammen:

Tabelle 98: Ergebnisse Enzymhistochemie (eigene Darstellung)

	POX	AP	SP	Cl-Ac-Est	α-Naphthyl	Ac-Est	β-Gluc
Ery	neg	neg	neg	neg	neg	pos/neg	neg
EB	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Thr	neg	neg	neg	neg	neg	pos/neg	neg
LZ	neg	neg	pos	neg	pos	pos/neg	pos/neg
LB	neg	neg	pos	neg	pos	pos/neg	pos
NG	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
My	pos	neg	pos/neg	pos	-	pos	neg
EoG	pos	neg	neg	neg	pos/neg	pos	pos
EoPM	pos	neg	neg	neg	pos/neg	pos	-
BaG	neg	-	-	pos	-	-	-
Mo	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos

(POX=Peroxidase, AP=alkalische Phosphatase, SP=Saure Phosphatase, Cl-Ac-Est=Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase, α -Naphthyl= α -Naphthyl-Acetat-Esterase, Ac-Est=Naphthol-AS-Acetat-Esterase, β -Gluc= β -Glucuronidase, Ery=Erythrozyt, EB=Erythroblast, Thr=Thrombozyt, LZ=Lymphozyt, LB=Lymphozyt, NG=neutrophiler Granulozyt, My=Myelozyt, EoG=eosinophiler Granulozyt, EoPM=eosinophiler Promyelozyt, BaG=basophiler Granulozyt, Mo=Monozyt)

V. DISKUSSION

1. Blutproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blutproben von insgesamt 31 neugeborenen Kälbern und 22 Feten untersucht. Das jüngste Kalb war 15 Minuten alt, das älteste 24 Stunden. Die 31 Tiere umfassten 12 weibliche und 19 männliche Kälber. Die Feten wiesen eine Scheitel-Steiß-Länge von 5,5 cm bis 72 cm auf. Bei zwei der Tiere konnte aufgrund des frühen Entwicklungsstatus das Geschlecht nicht eindeutig identifiziert werden. Von den verbleibenden Feten waren 9 weiblich und 11 männlich. Ab einer SSL von 18,9 cm wurden bei den Feten Blutbilder angefertigt. Die Blutbilder der Kälber und Feten wurden in einem kommerziellen Labor der Tierarztpraxis Fellner erstellt. Bei den Blutproben der Feten, bei denen zu wenig Blut vorhanden war, wurden Ausstriche angefertigt, die später unter dem Mikroskop ausgezählt wurden.

Der von Hubbert und Hollen (1971) beobachtete und dokumentierte Anstieg der Erythrozytenzahlen während der fetalen Entwicklung konnte durch die Erythrozytenwerte der Feten bestätigt werden. Nur bei einem Tier konnte ein niedrigerer Wert als erwartet festgestellt werden. Die Blutbilder der Kälber zeigten, bis auf einige leichte Schwankungen nach oben oder unten, eine sinkende Tendenz in den Erythrozytenwerten, dem Hämoglobin und Hämatokrit. Diese Aussage deckt sich mit den Feststellungen von Tennant et al. aus dem Jahre 1973 sowie von Adams et al. aus dem Jahre 1992, die einen starken Abfall der Gesamterthrozyten während der ersten 24 Stunden dokumentierten (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992). Dieses Phänomen wird auch als physiologische Anämie bezeichnet (Adams et al., 1992). Dieses Erscheinungsbild wurde auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt. Eine Erklärung ist die Absorption von osmotisch wirkendem Kolostrum, die zu einer Blutverdünnung führt (Adams et al., 1992). Auch die Veränderung der Körperflüssigkeiten und die Erweiterung des Plasmavolumens, die während der Aufnahme von Kolostrum auftritt, könnte eine Begründung sein (Tennant et al., 1973). Eine andere Erklärung ist die höhere Sauerstoffkonzentration im Blut der Neugeborenen. Aber auch eine kürzere Lebensdauer der fetalen Erythrozyten, wenig zirkulierendes Erythropoetin oder eine niedrige Nährstoffversorgung mit Eisen wurden als mögliche Ursachen für dieses Phänomen beschrieben (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992).

Während der fetalen Entwicklung kommt es laut Hubbert und Hollen (1971) zu einem Anstieg der Leukozytenzahlen. Auch dieser Befund konnte in meiner Arbeit bestätigt werden.

Die Leukozytenzahlen der neugeborenen Kälber wiesen relativ hohe Werte auf. Je früher die Blutproben entnommen wurden, desto höher waren die Werte. Zu einem späteren Zeitpunkt entnommene Proben wiesen eine sinkende Tendenz auf. Diese Erscheinung ist laut Tennant et al. und Adams et al. auf den Stress und somit hohen Cortisolspiegel während einer normalen Geburt zurück zu führen (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992).

Vom Zeitpunkt der Geburt an bis 24 Stunden danach war die Zahl der neutrophilen Granulozyten deutlich höher als die der Lymphozyten. Diese Beobachtung bestätigt die Aussage von Jain, Tennant et al. und Kramer, nach deren Angaben sich das charakteristische lymphozytäre Blutbild des Rindes erst nach 2 Wochen entwickelt (Tennant et al., 1973) (Jain, 1993) (Kramer, 2000).

Der Befund, dass sich die eosinophilen Granulozyten während der Gravidität vermehren (Hubbert und Hollen, 1971), konnte bei der Auswertung von Ausstrichen der Feten mit einer SSL von 9,1 cm und 72 cm bestätigt werden. Bei dem Fetus mit der SSL 9,1 cm waren kaum eosinophile Granulozyten zu sehen, bei dem Fetus mit einer SSL von 72 cm waren 1-2

eosinophile Granulozyten pro Sichtfeld (Zählkammer) zu beobachten.

Basophile, Eosinophile und Monozyten waren beim neugeborenen Kalb selten zu finden, was sich mit den Aussagen von Tennant et al., Adams et al. und Hubbert und Hollen deckt (Hubert und Hollen, 1971) (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992).

2. Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden folgende Übersichtsfärbungen durchgeführt: Diff-Quick-Färbung, Giemsa-Färbung, May-Grünwald-Färbung und Panoptische Färbung nach Pappenheim. Zum Nachweis saurer und sulfatierter Mukosubstanzen wurde zusätzlich die Alcianblau-Färbung durchgeführt. Die Toluidinblau-Färbung diente dem Nachweis basophiler Granulozyten. Die eosinophilen Granulozyten wurden zusätzlich noch mit der Sirius-Red-Färbung angefärbt. Zum Nachweis von Glykogen, sauren und neutralen Mucopolysacchariden, Mucoproteiden, Glucoproteiden und Lipopolysacchariden wurde die PAS-Färbung durchgeführt.

Die Erythrozyten der Kälber und der Feten stellten sich, wie in der Literatur beschrieben, als bikonkave kernlose Scheiben mit einem Durchmesser von 5-6 μm dar (Hawkey und Dennett, 1990) (Jain, 1993) (Liebich, 1999) (Kramer, 2000) (Sinowatz und Hees, 2000). Im Blut der Feten konnten ab einer SSL von 9 cm auch Vorstufen wie Proerythroblasten, basophile und polychromatische Erythroblasten gefunden werden, was sich mit den Aussagen der Literatur deckt (Rüsse, 1991). Retikulozyten, welche aus dem polychromatischen Erythroblasten durch Abgabe des Kern entstehen (Hees und Tschudi, 1990) (Liebich, 1999), konnten nur in einigen wenigen Ausstrichen gefunden werden. Die sog. Geldrollenbildung, die bei Pferd und Schwein oft gesehen wird (Jain, 1993), konnte in meinen Ausstrichen nicht gefunden werden. Geldrollenbildung ist im Rinderblut nicht als physiologisch anzusehen; sie wird oft als ein Hinweis auf einen Entzündungsvorgang gesehen (Kramer, 2000). Eine „basophile Tüpfelung“, die aufgrund vermehrter Bildung von Erythrozyten auftreten kann (Jain, 1993), war nur in den Erythrozyten von zwei Jungtieren zu sehen. In den meisten Ausstrichen der Feten, aber auch in einigen der Kälber, waren besonders viele stechapfelförmige, auch Akanthozyten genannte Erythrozyten zu sehen. Erythrozyten mit dieser Form sind häufig Artefakte und entstehen, wenn die Präparate eintrocknen oder wenn sie mit hypertonen Lösungen behandelt werden (Hawkey und Dennett, 1990) (Kraft et al., 1997) (Liebich, 1999) (Pschyremel, 2004). Dieses Phänomen weist auch auf die hohe Empfindlichkeit der Blutzellen von Feten und Kälbern hin. Des Weiteren waren in einigen Präparaten sog. Dakryozyten zu finden. Dakryozyten beschreiben tropfenförmige Erythrozyten, die meist nur Artefakte darstellen, jedoch auch physiologisch im Blut junger Ziegen vorkommen (Hees und Tschudi, 1990) (Pschyremel, 2004). All diese Formen werden unter dem Begriff Poikilozytose zusammengefasst, welcher die Abweichung der Erythrozyten von ihrer Normgestalt beschreibt (Hawkey und Dennett, 1990) (Hees und Tschudi, 1990).

Die Thrombozyten der Kälber stellten sich als flache, rund-ovale Gebilde mit einem unregelmäßig geformten Rand dar (Hees und Tschudi, 1990) (Jain, 1993). Sie waren in jedem Ausstrich relativ häufig zu finden. Die verschiedenen Haustierarten weisen eine unterschiedliche Anzahl von Thrombozyten auf. So hat das Pferd die niedrigste Anzahl an Blutplättchen, das Rind jedoch die höchste (Jain, 1993). Die Thrombozyten wiesen eine durchschnittliche Größe von 6-6,5 μm auf, was die Befunde von Meyers et al. von 1982 bestätigt (Meyers et al., 1982). Die Blutplättchen der Rinder gehören zusammen mit denen der Schafe und Pferde zu den kleinsten unter den Haussäugetieren (Jain, 1993). Auch in den Präparaten der Feten waren die Thrombozyten häufig zu finden. Hier lagen sie oft in Gruppen

zusammen, was ein Ausmessen schwierig gestaltete. Das Hyalomer, welches ein System aus Vesikeln und Mikrotubuli einschließt (Liebich, 1999), und das Granulomer, welches die Zellorganellen enthält (Hees und Tschudi, 1990), waren deutlich voneinander abgrenzbar. Die azurophilen Granula des Granulomers war vor allem in der panoptischen Färbung nach Pappenheim und in der Diff-Quick-Färbung sichtbar. Das Hyalomer färbte sich stets blasser an. In der PAS-Färbung kam es zu einer deutlich positiven Reaktion in Hyalomer. Dies deutet auf das Vorhandensein von Glykogen hin (Hees und Tschudi, 1990) (Liebich, 1999) (Sinowatz und Hees, 2000).

Die Lymphozyten werden in der Literatur allgemein in große und kleine Lymphozyten unterteilt (Hees und Tschudi, 1990) (Brown, 1998) (Sinowatz und Hees, 2000) (Kraft, 2005). Beim Rind wird noch ein dritter Typ beschrieben: der mittelgroße Lymphozyt, der eine Größe von 10-18 µm aufweist (Liebich, 1999) (Kramer, 2000). Beim Fetus, als auch beim Kalb, konnten in der Regel kleine und mittlere Lymphozyten gefunden werden. Große Lymphozyten konnten nur in einigen wenigen Ausstrichen beobachtet werden. Ein Problem stellte die Unterscheidung von Lymphoblasten und Erythroblasten dar, die in den meisten Färbungen nur schwer voneinander zu unterscheiden waren. Die Lymphozyten wiesen einen runden, teilweise auch leicht eingebuchteten Zellkern auf, der die Zelle meist vollständig ausfüllte. In einigen Ausstrichen konnten die Befunde von Jain (1993) bestätigt werden, wonach eine Unterscheidung von großen Lymphozyten und Monozyten schwierig ist, da sich diese Lymphozyten ähnlich den Monozyten anfärben und auch Vakuolen besitzen können (Jain, 1993). Manche Autoren beschreiben eine azurophile Granula im Zytoplasma der Lymphozyten (Hawkey und Dennett, 1990) (Hees und Tschudi, 1990). Diese Granula waren besonders gut in der Diff-Quick-Färbung zu erkennen, aber auch in der Giemsa- und Pappenheim-Färbung sichtbar. In der PAS-Färbung stellte sich eine leicht positive Reaktion im Bereich der Granula dar, was die Ergebnisse von Raskin und Valenciano 2000 bestätigt (Raskin und Valenciano, 2000). Diese Reaktion konnte aber nur im Blut der Kälber, nicht jedoch im Blut der Feten beobachtet werden.

Die neutrophilen Granulozyten gehören zu den Zellen, die am häufigsten in den Ausstrichen zu finden waren. Nur in den sehr frühen fetalen Entwicklungsstadien kamen sie etwas seltener vor. Der Myelozyt ist die erste Entwicklungsstufe, in der sich bereits neutrophile, basophile und eosinophile Vorstufen unterscheiden lassen (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Der neutrophile Myelozyt war besonders häufig in den Ausstrichen des fetalen Blutes, aber auch in manchen Blutausstrichen der Kälber zu finden. Die Myelozyten waren deutlich größer als die ausgereiften Granulozyten und wiesen feine Granula im Zytoplasma auf. Jugendliche, stabförmige neutrophile Granulozyten waren im Vergleich zu den segmentkernigen neutrophilen Granulozyten selten in den Ausstrichen zu finden. Dies bestätigt die Beobachtung von Jain (1993), dass die stabförmigen neutrophilen Granulozyten weniger häufig als die basophilen Granulozyten vorkommen (Jain, 1993). Die segmentkernigen Granulozyten besaßen, wie in der Literatur beschrieben, meist 2 bis 4 Kernsegmente, die durch feine Chromatinbrücken zusammengehalten werden (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Diese Chromatinbrücken waren besonders gut durch die Diff-Quick-Färbung im Kälberblut sichtbar zu machen. Die Granula der neutrophilen Granulozyten waren am besten in der May-Grünwald und in der Diff-Quick-Färbung zu erkennen. In der Alcianblau-Färbung konnte, bei einem pH-Wert von 2,5, eine positive Reaktion sowohl bei den Feten als auch bei den Kälbern nachgewiesen werden. Dies deutet auf das Vorkommen von sauren Mukosubstanzen hin (Romeis, 2010). In der PAS-Färbung, die zum Nachweis von Glykogen, sauren und neutralen Mucopolysacchariden, Mucoproteiden, Glucoproteiden und Lipopolysacchariden dient (Stobbe, 1970), kam es zu einer positiven granulären Reaktion.

Diese Reaktion fiel beim Fetus viel schwächer aus als beim Kalb. Allgemein kann man die Granula in primäre und sekundäre Granula unterteilen (Hees und Tschudi, 1990). Die Sekundäre kann beim Rind weiter in eine große und eine kleine Form unterteilt werden (Gennaro et al., 1983).

Die eosinophilen Granulozyten waren besonders gut in der Giemsa-, Pappenheim- und der Eosinophilen-spezifischen Sirius-Red-Färbung zu erkennen. Mit einer durchschnittlichen Größe von 10-15 µm ist der eosinophile Granulozyt der größte Granulozyt (Hees und Tschudi, 1990). Im fetalen Blut war der Zellkern oft nur leicht eingebuchtet und wies noch keine Lappung auf; es könnte sich dabei um Vorstufen dieser Zelle handeln. Im Stadium des Promyelozyten lässt sich der eosinophile Granulozyt zum ersten mal morphologisch von den anderen Granulozytenarten unterscheiden (Young, 2000). Im Blut der Kälber war der Kern, wie schon in früheren Untersuchungen anderer Autoren beschrieben, meist zweigelappt und von den Granula teils bedeckt (Kramer, 2000) (Sinowatz und Hees, 2000). Vergleicht man die Granula der Feten und Kälber mit den eosinophilen Granula von Blutausstrichen des Pferdes, welche am Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie als Dauerpräparate vorhanden waren, so konnte die Aussage von Hees und Tschudi (1990) und Jain (1993) bestätigt werden, dass das Pferd die größten, das Rind hingegen die kleinsten eosinophilen Granula besitzt (Hees und Tschudi, 1990) (Jain, 1993). Die eosinophilen Granulozyten waren sowohl beim Fetus als auch beim Kalb negativ bei der PAS- und Alcianblau-Färbung.

Die basophilen Granulozyten waren nur in der May-Grünwald- und in der Toluidinblau-Färbung eindeutig zu identifizieren. Im Blut der Feten als auch im Blut der Kälber waren sie nur äußerst selten, in manchen Ausstrichen auch gar nicht, zu finden. Dies bestätigt die Aussage von Sinowatz und Hees (2000), die die Basophilen als die am seltensten vorkommende Form der Granulozyten beschreiben (Sinowatz und Hees, 2000). Adams et al. (1992) geben den hohen Cortisolspiegel während der Geburt als Grund für die wenigen basophilen Granulozyten bei neugeborenen Kälbern an (Adams et al., 1992). In der May-Grünwald-Färbung konnten die tiefblauen, großen Granula, die den Kern meist überdecken, deutlich erkannt werden (Hees und Tschudi, 1990) (Sinowatz und Hees, 2000). Jain (1993) beschreibt einen aufgespulten Kern, bei dem die Segmente nicht immer gut zu erkennen sind (Jain, 1993). Auch diese Erscheinung war in meinen Ausstrichen deutlich zu sehen. Die Toluidinblau-Färbung wurde zur spezifischen Darstellung der basophilen Granulozyten durchgeführt. Da die Granula sehr empfindlich sind und sich durch Behandlung mit Wasser leicht lösen (Theml et al., 2002), kam es häufig zum Verlust der Granula in den Ausstrichen. Trotzdem waren die Zellen noch eindeutig zu erkennen. Laut Raskin und Valenciano (2000) lassen sich die Granula der basophilen Granulozyten mit Alcianblau nachweisen (Raskin und Valenciano, 2000). Diese Aussage konnte nicht bestätigt werden. Es konnten keine Basophilen in der Alcianblau-Färbung nachgewiesen werden. Laut Stobbe (1970) zeigen die Granula der basophilen Granulozyten eine intensive Reaktion in der PAS-Färbung (Stobbe, 1970). Dieser Befund trifft auch auf das Blut von Kälbern zu, wo intensiv gefärbte basophile Granula gefunden werden konnten. Bei den basophilen Granulozyten der Feten stellte sich die Reaktion dagegen schwächer dar.

Die Monozyten gehören zusammen mit den Lymphozyten zu den Agranulozyten (Liebich, 1999). Sie werden als die größten Blutzellen beschrieben (Sinowatz und Hees, 2000). Im Blut der Feten konnten die Monozyten und deren Vorstufen anhand des charakteristischen Kerns, der im Stadium der Monoblasten und Promonozyten rund oder eingedrückt bis gefaltet ist (Al-Izzi et al., 1982), identifiziert werden. Monozyten waren allgemein nur sehr selten im fetalen Blut zu finden. Im Blut der neugeborenen Kälber waren sie ebenfalls kaum anzutreffen. Laut Tennant et al. (1973) und Adams et al. (1992) befindet sich der Monozytenwert zum Zeitpunkt der Geburt

auf einem Tiefpunkt und erreicht den Normalwert erst nach 3 Wochen (Tennant et al., 1973) (Adams et al., 1992). Die Monozyten der Kälber wiesen meist einen hufeisenförmigen Kern auf. Fast immer waren die charakteristischen Vakuolen zu erkennen (Al-Izzi et al., 1982). In der Giemsa- und Pappenheim-Färbung waren die im Zytoplasma vorhandenen feinen Granula am besten erkennbar. In der PAS- und Alcianblau-Färbung zeigten die Monozyten dagegen keine Reaktion.

3. Elektronenmikroskopie

Die Größe der ausgereiften Erythrozyten beim Kalb und beim Fetus betrug zwischen 5-6 μm . In der Literatur werden die Erythrozyten des Rindes mit einer Größe von 5,5-5,7 μm beschrieben (Brown, 1998) (Liebich, 1999). Die Erythrozyten waren in unterschiedlicher Form zu finden. Durch das Fehlen eines Kerns sind sie leicht verformbar, was bei der Passage durch die kapillaren Gefäße von großer Bedeutung ist (Hees und Tschudi, 1990) (Liebich, 1999). Des Öfteren war beim Fetus und Kalb eine sog. Napfform der Erythrozyten zu finden, wodurch die Sauerstoffabgabe in den Kapillaren begünstigt wird (Sinowatz und Hees, 2000). Nach der Verformung nimmt der Erythrozyt seine normale Form wieder an (Hees und Tschudi, 1990). Die reifen Erythrozyten in meinen Proben besaßen keine Zellkerne und keine Zellorganellen. Der Inhalt stellte sich homogen dar und wurde von einer glatten Zellmembran umschlossen. Durch das Fehlen der Zellorganellen synthetisieren Erythrozyten kein Hämoglobin mehr (Kolb, 1991). Alle adulten Säugetiere besitzen keinen Zellkern in ihren roten Blutzellen. Die Erythrozyten der Fische, Reptilien und Vögel hingegen besitzen einen Kern (Kolb, 1991). In den Proben der Feten konnten auch unter dem Elektronenmikroskop Erythrozytenvorstufen gefunden werden. Die Erythroblasten hatten eine rund-kugelige Form und eine glatte Zellmembran. Je älter der Erythroblast war, desto kleiner wurde die Zellgröße. Der noch vorhandene Zellkern war rund bis oval und besaß einen glatten Rand. Diese Beobachtungen decken sich auch mit einer Studie von Miura et al. aus dem Jahre 1974, in der die Ultrastruktur des sich entwickelnden Erythrozyten beim Menschen beschrieben wurde. Je jünger der Erythroblast, desto mehr Zellorganellen waren zu finden. Neben dem Zellkern enthält der Normoblast noch einige Mitochondrien und Ribosomen (Kolb, 1991). Im Zytoplasma sind filamentöse oder granuläre Strukturen zu finden, die sich als Hämoglobin herausstellen (Miura et al., 1974). Nach dem Übertritt des Normoblasten in das Blut wird beim Säugetier der Kern ausgestoßen (Kolb, 1991).

Zwischen den Thrombozyten der Feten und Kälber waren keine ultrastrukturellen Unterschiede zu erkennen. Bei beiden Altersgruppen waren die Zellen unregelmäßig discoid geformt und besaßen keinen Zellkern. Dies deckt sich mit den Befunden von White aus dem Jahre 1987 (White, 1987). Die Größe der Thrombozyten bei Feten und Kälbern betrug zwischen 1,2-2 μm , was sich mit den Untersuchungen von Du Plessis et al. aus dem Jahre 1996 deckt (Du Plessis et al., 1996). Im Zytoplasma der Thrombozyten waren mit dem Elektronenmikroskop Granula zu finden. Die sog. α -Granula stellten sich als rundes Gebilde mit homogenen Inhalt dar. Die sog. „dense bodies“ waren weit weniger häufig in den Thrombozyten vorhanden als die α -Granula. Sie waren deutlich an ihrem extrem elektronendichten Kern, der von weniger elektronendichtem Material umgeben wird, zu erkennen (Du Plessis et al., 1996). In menschlichen Thrombozyten ist ein offenes kanalikuläres System (OCS) bei den Thrombozyten zu finden, welches beim Rind fehlt (White, 1987) (Du Plessis et al., 1996). Dieses System war weder beim Fetus noch beim Kalb zu erkennen.

Die Lymphozyten im prä- und postnatalen Blut wiesen eine Größe von 8-15 μm auf. Dies stimmt mit den Angaben von Kramer überein (Kramer, 2000). Die Zellkerne waren meist

unregelmäßig rund geformt und an einigen Stellen eingebuchtet. Einige Lymphozyten wiesen die in der Literatur beschriebenen plumpen Fortsätze an der Zellmembran auf (Hees und Tschudi, 1990). Im Zytoplasma waren die Mitochondrien besonders gut zu erkennen. Ribosomen, Polyribosomen und Granula in unterschiedlicher Zahl waren weitere Zellorganellen im Zytoplasma der Lymphozyten (Hees und Tschudi, 1990).

Im fetalen Blut waren die Vorläuferzellen der neutrophilen Granulozyten gut zu erkennen. Die Myelozyten waren durch die kleinen, runden, spezifischen und elektronendichten Granula charakterisiert. Nach Smith (2000) treten diese Granula erst bei der Umwandlung vom Promyelozyten zu Myelozyten in Erscheinung (Schmith, 2000). Die Myelozyten in den fetalen Proben hatten eine Größe von 10-17 μm . Der Zellkern stellte sich meist rund dar, wobei seine beginnende Eindellung bereits erkennbar war. Die Zellmembran war glatt und wies einige Pseudopodien auf. Im Zytoplasma waren nur zwei der von anderen Autoren beschriebenen drei Granula-Arten sicher zu identifizieren (Gennaro et al., 1983) (Kramer, 2000) (Paape et al., 2003). In den Myelozyten waren die länglichen primären Granula, sowie die spezifischen sekundären Granula deutlich zu sehen. Neben den verschiedenen Granulaarten befand sich auch das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat im Zytoplasma. Mitochondrien waren, wie von Smith (2000) beschrieben, nur in geringer Zahl vorhanden (Schmith, 2000).

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Kälberblutes waren sowohl segmentkernige neutrophile Granulozyten als auch stabkernige neutrophile Granulozyten zu finden. Besonderes Augenmerk wurde von mir wieder auf die Granula gerichtet. Die sog. großen Granula sind spezifisch für die neutrophilen Granulozyten der Rinder, Ziegen und Schafe (Kramer, 2000) (Paape et al., 2003). Dieser Granulatyp war deutlich von den primären und sekundären Granula zu unterscheiden. Die Kerne der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten waren meist in 2 bis 3 Segmente aufgeteilt. Die in der Literatur beschriebenen feinen Chromatinbrücken waren nur sehr selten auf den EM-Bildern zu sehen (Sinowatz und Hees, 2000). Die stabkernigen neutrophilen Granulozyten wiesen einen länglichen bis hufeisenförmigen Kern auf. Die Zellmembran stellte sich glatt dar und wies an einigen Stellen Pseudopodien auf. Die restlichen Zellorganellen stellten sich wie beim Fetus dar; so waren endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und wenig Mitochondrien zu finden.

Eosinophile Granulozyten waren in den elektronenmikroskopischen Präparaten weder im Blut der Feten noch im Blut der Kälber eindeutig zu identifizieren.

Da die basophilen Granulozyten beim Fetus kaum vorkommen, waren sie in den elektronenmikroskopischen Präparaten nicht zu finden. Beim Kalb konnten dagegen basophile Granulozyten identifiziert und beurteilt werden. Die basophilen Granulozyten sind durch ihre charakteristischen großen Granula sicher zu identifizieren. Wie in der Literatur beschrieben, beträgt der Durchmesser der Granula 0,5 – 1,2 μm (Hees und Tschudi, 1990) (Liebich, 1999) (Sinowatz und Hees, 2000). Die basophilen Granulozyten hatten eine durchschnittliche Größe von 9 μm im Durchmesser. Die Zellmembran stellte sich jeweils glatt dar. Das Zytoplasma enthielt daneben einige Mitochondrien, einen deutlich erkennbaren Golgi-Apparat und Zisternen des glatten und rauen endoplasmatischen Retikulums.

Die Monozyten der Kälber stellten sich, wie in der Literatur beschrieben, als die größten Blutzellen dar (Al-Izzy et al., 1982) (Jain, 1993) (Kramer, 2000). Der Zellkern war meist bohnen- oder U-förmig, was die Beschreibungen von Kramer (2000) und Al-Izzy (1982) bestätigt. Das Zytoplasma enthielt, neben den kurzen Zisternen des endoplasmatischen Retikulums, viele Mitochondrien, in denen die Cristae gut zu erkennen waren. Die von Autoren beschriebenen Vakuolen (Al-Izzy et al., 1982) (Jain, 1993) (Kramer, 2000) (Sinowatz und Hees,

2000) waren nur sehr selten zu identifizieren. Die von Autoren genannten Granula waren deutlich zu erkennen (Al-Izzy et al., 1982) (Jain, 1993) (Kramer, 2000) (Sinowatz und Hees, 2000).

4. Glykohistochemie

Im Rahmen der glykohistochemischen Untersuchungen wurde die Bindung von 14 FITC-markierten und 3 biotinylierten Lektinen untersucht. Folgende FITC-markierte Lektine wurden verwendet: ConA, LCA, PSA, PNA, GSL-1, RCA, WGA, WGA_{suc}, DBA, SBA, SJA, UEA-1, PHA-E und PHA-L. Zu den biotinylierten Lektinen zählten: VAA, MAA und SNA. Die Lektine, bei denen es zu keiner oder nur zu einer sehr schwachen Bindung kam, wurden mit Neuraminidase vorbehandelt, um zu prüfen, ob der endständige Zucker durch Sialinsäure maskiert ist. Zu diesen Lektinen zählten: PNA, RCA, DBA, SBA und SJA.

Für die Beurteilung der Zuckerstrukturen wurden die neuesten Erkenntnisse der Lektinforschung von Rüdiger und Gabius (2009), Gabius et al. (2011), Roth (2011) und Habermann et al. (2011) herangezogen.

Die Erythrozyten der Feten und Kälber banden die Lektine meist gleichermaßen stark, nur bei einigen konnte ein leichter Unterschied in Form einer stärkeren Bindung bei den Kälbererythrozyten festgestellt werden. Zu einer deutlich positiven Reaktion kam es bei ConA, VAA, WGA, SNA, UEA-1, MAA und PHA-E. Nur schwach positiv banden die Lektine LCA, PSA, GSL-1, WGA_{suc} und PHA-L an die Erythrozyten. Die Lektine, die mit Neuraminidase behandelt wurden, wurden in 3 Gruppen eingeteilt: Zum einen solche, die ohne Neuraminidasevorbehandlung negativ waren und nach der Behandlung positiv reagierten; zu ihnen zählten PNA und SBA. Dann diejenigen, die auch nach Inkubation mit Neuraminidase nicht an die Blutzellen banden; hier ist DBA zu nennen. Zuletzt die, bei denen die Enzymvorbehandlung zu einer Verstärkung der Bindung führte: RCA und SJA. Im Jahre 1976 stellten Emmerson und Kornfeld fest, dass die Rindererythrozyten, wenn auch in unterschiedlicher Intensität, PHA-E, LCA, WGA und RCA binden (Emerson und Kornfeld, 1976). Diese Erkenntnis konnte durch die deutliche Bindung von PHA-E und WGA und die schwache Bindung von LCA und RCA in meinen Ausstrichen bestätigt werden. In einer späteren Studie von Newman und Uhlenbruck (1977) konnten die Ergebnisse von Emmerson und Kornfeld (1976) jedoch nicht bestätigt werden. Laut diesen Autoren besitzen die Rindererythrozyten keine Bindungsstellen für PHA-E, LCA, RCA, PNA, HPA, ConA und UEA (Newman und Uhlenbruck, 1977). Auch eine frühe Studie von Sumner und Howell aus dem Jahre 1936 zeigt, dass ConA nicht an die Erythrozyten des Rindes bindet (Sumner und Howell, 1936). Die Ergebnisse von Newman und Uhlenbruck in Bezug auf PHA-E, LCA, RCA und ConA und auch die von Sumner und Howell in Bezug auf ConA konnten in meinen Untersuchungen nicht bestätigt werden. In meinen Ausstrichen kam es sowohl beim Fetus als auch beim Kalb zu einer deutlichen Bindung von ConA an die Erythrozytenmembran und auch an das Zytoplasma der Erythrozyten und Erythrozytenvorstufen. Auch im Falle der Lektine UEA und SNA, welche beim Menschen als spezifische Marker für die Blutgruppe H gelten (Khan et al., 2002), konnte eine positive Bindung in den Ausstrichen der Feten und Kälber beobachtet werden. Das für die humane Blutgruppe B spezifische Lektin GSL-1 (Khan et al., 2002) band schwach an die Erythrozyten. Die Ergebnisse im Falle des Lektins PNA waren besonders interessant. Wie bereits erwähnt, beschreiben Newman und Uhlenbruck keine Bindungsstelle für dieses Lektin an den Rindererythrozyten (Newman und Uhlenbruck, 1977). In einer Arbeit von Cooper aus dem Jahre 1984 wird erwähnt, dass auch die Menschenerthrozyten PNA nicht binden. Behandelt man sie jedoch mit Neuraminidase, welche die terminale Sialinsäure abspaltet, so kommt es zu einer deutlichen Bindung (Cooper,

1984). Auch bei meinen Ausstrichen kam es zunächst zu keiner Bindung von PNA. Nach Behandlung mit Neuraminidase von *Vibrio cholerae* band das Lektin jedoch an die Zellmembran der Erythrozyten, was vermuten lässt, dass Rindererythrozyten Galaktose als endständigen Zucker besitzen, der durch Sialinsäure maskiert wird.

Bei meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass die Erythrozyten der Feten und Kälber sowohl Glukose als auch Mannose enthalten. Ebenfalls konnte N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetyl-Galaktosamin, Galaktose und Fukose nachgewiesen werden.

Die Thrombozyten der Feten und Kälber banden die Lektine ConA, PSA und VAA (Kalb) stark. Zu einer deutlich positiven Bindung kam es bei den Lektinen LCA, GSL-1, VAA (Fetus), WGA, MAA, PHA-E. Eine schwache Bindung war bei PNA, RCA, SNA und PHA-L (Kalb) zu beobachten. Durch die Vorbehandlung mit Neuraminidase kam es zu einer Verstärkung der Bindung bei PNA und RCA. Das Lektin SBA band nur nach Vorinkubation mit Neuraminidase. Die Lektine WGA_{suc}, DBA, SJA, UEA-1 und PHA-L (Fetus) zeigten durchgehend keine Bindung. Eine Studie von Patscheke et al. aus dem Jahre 1977 ergab, dass es durch die Lektine SBA und PNA zu einer Agglutination von humanen Erythrozyten kommt. Dieser Effekt tritt aber nur ein, wenn zuvor eine Neuraminidasebehandlung durchgeführt wurde (Patscheke et al., 1977). Diese Ergebnisse decken sich mit meinen Befunden, bei denen nur nach Neuraminidasebehandlung die Bindung von SBA erfolgte und die Bindung von PNA verstärkt wurde. In einer Studie von Naim et al. (1982) wurde gezeigt, dass PNA an den gleichen Rezeptor wie Ristocetin bindet und diese Bindung somit hemmt. Ristocetin ist zusammen mit dem von-Willebrand-Faktor für die Agglutination der Thrombozyten verantwortlich (Naim et al., 1982). In der gleichen Studie wurde beschrieben, dass SBA und RCA keine Auswirkung auf die Erythrozytenagglutination haben (Naim et al., 1982). Die Forschungsgruppe von Ganguly et al. stellte 1979 bereits fest, dass die Bindungseigenschaften des Lektins WGA und Ristocetin ähnlich sind (Ganguly et al., 1979). WGA band bei meinen Ausstrichen positiv an die Thrombozyten.

Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchung der Thrombozyten lassen darauf schliessen, dass sie Mannose/Glukose, Galaktose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure in ihrer Glykokalys enthalten. Die Ausstriche der Feten zeigten im Vergleich zu denen der Kälber, dass die Thrombozyten VAA deutlich schwächer und PHA-L gar nicht binden. Diese Ergebnisse deckten sich nur teilweise mit denen von Woodside und Kocholaty (1960), nach denen die Thrombozyten der Rinder auch Galaktosamine und Fukose enthalten (Woodside und Kocholaty, 1960). Dies konnte ich in meinen Untersuchungen nicht bestätigen.

Die Lymphozyten stellten sich bei den Färbungen mit den Lektinen ConA, PSA, MAA, SNA und PHA-E stark positiv dar. GSL-1 und WGA_{suc} stellten sich nur beim Kalb stark positiv dar. Die Lektine WGA und PHA-L waren ebenfalls positiv. WGA_{suc} stellte sich im fetalen Blut positiv dar. Von den mit VAA gefärbten Ausstrichen war nur die Hälfte als positiv zu beurteilen. Schwach positiv banden die Lektine LCA, GSL-1 beim Fetus, 50% der mit VAA gefärbten Ausstriche und UEA bei den Lymphoblasten der Feten. Manche Ausstriche zeigten eine nur sehr schwache Reaktion mit PNA, die durch die Behandlung mit Neuraminidase verstärkt werden konnte. Auch die Bindung von RCA konnte durch Neuraminidasebehandlung intensiviert werden. Das Lektin DBA stellte sich nur nach Neuraminidasevorbehandlung positiv dar. Die Lektine SBA und SJA waren immer negativ. Meine Ergebnisse stimmten nur teils mit denen früherer Untersuchungen überein. So beschreiben Pearson et al. (1979) eine positive Bindung von ConA, WGA, PNA und SBA (Pearson et al., 1979). PNA war nur in wenigen meiner Ausstriche positiv, konnte aber durch die Neuraminidase verstärkt werden. Zu ähnlichen Befunden kamen auch Newman und Uhlenbruck (1977) im Falle von humanen Blut, das PNA

erst nach der Neuraminidasebehandlung band (Newman und Uhlenbruch, 1977). PNA wird von vielen Autoren als T-Lymphozytenmarker beschrieben (Johansson und Morein, 1983) (Gershwin et al., 1983/1984) (Fossum et al., 1988). Djilali et al. (1987) nennt zusätzlich das Lektin WGA als T-Zell Marker (Djilali et al., 1987). WGA stellte sich in allen Ausstrichen der Feten und Kälber positiv dar. Im Gegensatz hierzu beschreiben Newman und Uhlenbruch keine Bindung von WGA und ConA (Newman und Uhlenbruch, 1977). Dies konnte bei der Auswertung meiner Ausstriche nicht bestätigt werden. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so enthalten die Lymphozyten der bovinen Feten und Kälber viel Mannose/Glukose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure, wobei es teils noch zu einer Verstärkung der Bindung kam, je älter die Tiere waren. Des Weiteren sind nur wenig Galaktose, kaum Fukose und kein N-Acetyl-Galaktosamin vorhanden.

Die neutrophilen Granulozyten wiesen eine stark positive Bindung von ConA, PSA, GSL-1, VAA, WGA, MAA und teilweise auch SNA auf. Positiv waren die Lektine LCA, WGAsuc, UEA, PHA-E, PHA-L und SNA. Nach der Neuraminidasebehandlung konnte eine Verstärkung der Bindung bei PNA, RCA beim Fetus und SJA erzielt werden. Die Lektine DBA, SBA und RCA beim Kalb waren nur nach Neuraminidasevorbehandlung positiv. In einer Studie von Kuehn und Van Epps aus dem Jahre 1980 wurde festgestellt, dass die Lektine ConA, PHA, WGA und PNA an die Zelloberfläche humaner neutrophiler Granulozyten binden und dadurch die Migration dieser Zellen stimulieren. Hierbei war die Bindung und Stimulation mit ConA, PHA und WGA am stärksten (Kuehn und Van Epps, 1980). Diese Beobachtungen konnten auch in den Blutaussstrichen der Feten und Kälber gemacht werden. In einer Studie von Timoshenko et al. (1995) konnte gezeigt werden, dass das Lektin VAA die Fähigkeit besitzt, eine Aggregation der neutrophilen Granulozyten des Menschen hervorzurufen (Timoshenko et al., 1995). Auch in meinen Untersuchungen band VAA deutlich an die neutrophilen Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten der Feten und Kälber enthalten aufgrund der vorliegenden Ergebnisse viel Mannose/Glukose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure. Galaktose, Fukose und N-Acetyl-Galaktosamin sind in geringerer Menge vorhanden.

Die eosinophilen Granulozyten banden die Lektine ConA, LCA und VAA sehr stark. Auch PSA, PNA, WGA, WGAsuc, SJA, SNA, PHA-E und PHA-L reagierten deutlich positiv. Die Lektine GSL-1 und MAA banden nur sehr schwach an die Blutzellen. Durch die Vorbehandlung mit Neuraminidase kam es zu einer Verstärkung der Bindung von RCA und zu einer Bindung von DBA und SBA, die zuvor negativ verlief. In einer Arbeit von Eguchi et al. (1989) wurde eine positive Reaktion der Lektine SBA, DBA und GSL-1 mit der eosinophilen Granula des Menschen beschrieben (Eguchi et al., 1989). Auch Lee et al. (1987) bezeichneten SBA und GSL-1 als Marker für humane eosinophile Granulozyten (Lee et al., 1987). In meinen Untersuchungen konnte dagegen nur eine Bindung von GSL-1 an den Granula nachgewiesen werden. DBA und SBA banden erst nach der Vorbehandlung mit Neuraminidase. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die eosinophilen Granulozyten der Feten und Kälber viel Mannose/Glukose, Galaktose, N-Acetyl-Galaktosamin, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure enthalten.

Die basophilen Granulozyten waren bei den Lektinfärbungen nicht eindeutig von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten zu unterscheiden. Somit kann bei den basophilen Granulozyten keine sichere Aussage bezüglich der Zuckerstrukturen gemacht werden.

Die Monozyten waren oft nur schwer von großen Lymphozyten zu unterscheiden. Im fetalen Blut waren sie in vielen Ausstrichen nicht sicher zu identifizieren. Auch bei den sehr jungen

Kälbern waren sie nur vereinzelt zu sehen. Es kam zu einer durchgehend starken Bindung der Lektine ConA und SNA. Deutlich positiv waren auch die Lektine WGA und PHA-E beim Kalb. PHA-E beim Fetus konnte nicht beurteilt werden, da hier keine Monozyten zu finden waren. Des Weiteren war keine Aussage bezüglich der Lektine VAA und MAA möglich. Zu einer schwachen Bindung kam es bei den Lektinen LCA, PSA, WGA_{suc} und PHA-L. Nach Neuraminidasevorbehandlung reagierten die zuvor negativen Lektine RCA und SBA leicht positiv und bei PNA kam es zu einer Verstärkung der Bindung. Zu keiner Bindung kam es bei den Lektinen GSL-1, DBA, SJA und UEA-1. Über die Monozyten des Rindes gibt es bis jetzt nur wenige Studien. Meine lektinhistochemischen Ergebnisse lassen auf das Vorhandensein von Mannose/Glukose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure, wenig Galaktose und keine Fukose und N-Acetyl-Galaktosamin schließen.

5. Immunzytochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Bindung der Antikörper gegen CD4 und CD8 untersucht, welche für T-Lymphozyten spezifisch sind. Die Antikörper waren mit FITC markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Die Lymphozyten stellen laut Schultz (1973) beim Fetus des Rindes bis zum Tag 120 der Gravidität die einzigen Leukozyten im Blut dar. Nur wenige B-Lymphozyten kommen beim neugeborenen Kalb vor, die Zahl der T-Lymphozyten erhöht sich stark ab dem Tag der Geburt (Schultz, 1973) (Wyatt et al., 1993) (Kampen et al., 2005).

In den Blutausstrichen von Feten zeigten nur sehr wenige Lymphozyten eine Reaktion mit dem CD4-Antikörper. Bei den älteren Feten konnten CD4-positive neutrophile Granulozyten gesehen werden. Bei den Blutausstrichen von Kälbern kam es dagegen zur deutlich positiven Reaktion mit Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. In einer Studie von Davis und Hamilton (1998) wird beschrieben, dass die Monozyten und eosinophilen Granulozyten einiger Spezies CD4 exprimieren (Davis und Hamilton, 1998). Auch Jain beschreibt CD4-Antigene auf bovinen Monozyten (Jain, 1993). Beides konnte in meinen Ergebnissen nicht bestätigt werden. Das Bindungsmuster meiner Antikörper-Färbungen lässt vermuten, dass auf Erythrozyten als auch auf den Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten CD4-Antigene vorhanden sind. Die Begründung, weshalb beim Fetus keine positiven Lymphozyten gefunden wurden, könnte der erst nach der Geburt einsetzende Anstieg der T-Lymphozyten sein.

Der CD8-Antikörper band gleichermaßen mäßig an die Erythrozyten der Feten und Kälber. Durch CD8 lassen sich besonders die zytotoxischen T-Zellen identifizieren (Teale et al., 1987) (Jain, 1993). Bei den Feten als auch bei den Kälbern waren positive Lymphozyten zu finden, wobei die Intensität der Fluoreszenz bei den Kälbern stärker war. Dasselbe Verhalten war bei den neutrophilen Granulozyten zu sehen. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass auf den Erythrozyten, den Lymphozyten und den neutrophilen Granulozyten CD8-Antigene vorhanden sind. Die deutliche und stärkere Bindung von CD8 im Gegensatz zu CD4 bei den Feten könnte darauf hindeuten, dass sich das CD4-Antigen erst später bildet oder dass schon beim Fetus die zytotoxischen T-Zellen überwiegen. Die Unterschiede in der Intensität könnten mit einem Anstieg der CD8-Antigene auf den Blutzellen der Kälber erklärt werden.

6. Zytoskelett

Bei der Darstellung des Zytoskeletts wurden folgende Komponenten nachgewiesen: Aktin (mit Phalloidin-TRITC), Myosin, Vimentin, Panzytokeratin und Tubulin (mit FITC-markierten Antikörpern).

Beim Nachweis von Aktin in den Erythrozyten konnte ein deutlicher Unterschied zwischen Feten und Kälbern festgestellt werden. In den Ausstrichen, in denen Erythroblasten eindeutig zu erkennen waren, konnten im Zytoplasma deutliche Bündel von Aktinfilamenten beobachtet werden. In den ausgereiften Kälbererythrozyten dagegen waren keine Aktinfilamente mehr zu sehen. Beim Nachweis von Myosin konnten beim Fetus als auch beim Kalb feine granuläre Strukturen gesehen werden, welche sich am besten in den unfixierten Ausstrichen zeigten. Vimentin stellte sich als ein Netz aus feinen Filamenten in den Zellen dar. Diese Filamente waren am besten im fetalen Blut bei unfixierten Ausstrichen zu erkennen. Im Blut der Kälber kam es durch Fixierung zu einer starken Autofluoreszenz, was das Erkennen der Filamente schwierig machte. Der Nachweis mit den Antikörpern gegen Panzytokeratin und Tubulin verlief negativ.

Aktin bildet ein sog. kortikales Zytoskelett, das besonders für die Stabilität der Blutzellen als auch für die Motilität der Leukozyten von Bedeutung ist (Khismatullin, 2009). Erythrozyten besitzen auch ein kortikales Zytoskelett, welches aus einem Netzwerk aus Aktin und Spectrin-Proteinen besteht (Gov et al., 2003) (Gov, 2007). In einer Studie von Colin und Schrier (1991) wird auf das Vorhandensein von Myosin in der Erythrozytenmembran von Kindern hingewiesen. Bei adulten Menschen kommt es jedoch bei den Erythrozyten kaum zu einer Reaktion (Colin und Schrier, 1991). Dieser Befund ist mit meinen Ergebnissen beim Rind vergleichbar: Die Erythrozyten der Rinderfeten und Kälber wiesen eine positive Reaktion beim Nachweis von Myosin auf, während adulte Erythrozyten negativ waren.

Die Thrombozyten der Feten und Kälber verhielten sich bei der Darstellung des Zytoskeletts ähnlich. Beim Nachweis von Aktin konnte in allen Ausstrichen ein positives Ergebnis gefunden werden. Der Nachweis von Myosin in den fetalen Thrombozyten war bei fixierten Ausstrichen und einer Konzentration von 1:500 am besten erkennbar. Bei den Kälbern ließ sich dagegen Myosin bei unfixierten Blutzellen besser nachweisen. Dies könnte daran liegen, dass die Thrombozyten im empfindlicheren fetalen Blut beschädigt werden, wenn diese zuvor nicht fixiert werden. Zucker-Franklin und Grusky (1972) und Muhlard et al. (1978) beschreiben eine große Anzahl an Aktin- und Myosinfilamenten, sowohl unter der Plasmamembran, als auch im Zytoplasma der Thrombozyten des Menschen und des Rindes (Zucker-Franklin und Grusky, 1972) (Muhlard et al., 1978). Dies konnte ich in meiner Arbeit bestätigen.

Vimentin stellte sich in allen Ausstrichen, vor allem in den unfixierten, als feine filamentöse Struktur in den Thrombozyten, dar. Tablin untersuchte 1985 humane und bovine Thrombozyten und fand heraus, dass sie sich mit Hilfe von Vimentin immunzytochemisch gut nachweisen lassen. Ruhende Thrombozyten färbten sich in ihrem peripheren Anteil und zeigten auch eine diffuse Färbung des Zytoplasmas (Tablin, 1985) (Tablin und Taube, 1987). Dieses Färbungsmuster kann in meinen Untersuchungen ebenfalls bestätigt werden.

Auch der Nachweis von Tubulin verlief deutlich positiv. Tubulin ist eines der wichtigsten Proteine der Thrombozyten, da es essentiell für die Biogenese, Struktur und Funktion der Thrombozyten ist (Schwer et al., 2001). In den Thrombozyten vom Schwein und vom Menschen konnte es bereits nachgewiesen werden (Castle und Crawford, 1974) (Steiner, 1983).

Der Nachweis von Aktin in den Lymphozyten und Lymphoblasten verlief sowohl beim Fetus als auch beim Kalb deutlich positiv. Es konnten Filamentbündel in unterschiedlicher Dicke nachgewiesen werden. Myosin stellte sich nur sehr schwach dar, beim Kalb waren auch komplett Myosin-negative Lymphozyten zu finden. Besonders deutlich stellten sich dagegen die feinen Intermediärfilamente beim Nachweis von Vimentin dar. Antikörper gegen Tubulin und Panzytokeratin zeigten keine positive Reaktion.

Da Lymphozyten während der Wanderung aus dem Blut in das Gewebe großem mechanischem

Stress ausgesetzt sind, benötigen sie ein besonders stabiles Zytoskelett. Vimentin bildet den Hauptbestandteil dieser ausgeprägten Zellstruktur. Die Vimentinfilamente besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, reguliert zu kollabieren und geben damit der Zelle eine bessere Verformbarkeit (Brown et al., 2001). Atkins und Anderson (1982) stellten Aktin und geringe Mengen Tubulin in den Lymphozyten des Menschen fest (Atkins und Anderson, 1982). Im Falle von Aktin kann das auch in den Lymphozyten des Rindes bestätigt werden. Der Nachweis von Tubulin verlief negativ.

Bei den neutrophilen Granulozyten war der Nachweis von Aktin, Myosin, Vimentin und Tubulin positiv. In den mit Phalloidin-TRITC gefärbten Ausstrichen konnten deutliche Aktin-Filamente in den Neutrophilen und den Myelozyten gesehen werden. Myosin stellte sich im fetalen Blut als granuläre Struktur dar. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit unfixierten Ausstrichen erzielt. Bei den Kälbern konnten sowohl in den fixierten als auch in den unfixierten Ausstrichen granuläre Strukturen und auch stark fluoreszierende Filamente gefunden werden. Vimentin stellte sich in Form eines Netzwerkes aus feinen Filamenten dar. Tubulin war nur schwach positiv.

Tubulin und Aktin sind laut Downey et al. (1995) für die Regulation des Zellvolumens der Leukozyten verantwortlich. Haston (1987) und Egger et al. (2001) wiesen F-Aktin in Neutrophilen und anderen Leukozyten mit Hilfe von TRITC-Phalloidin dar. Mit dieser Technik ließen sich auch in meinen Blutausstrichen die Aktinfilamente gut darstellen. Auch das Vorhandensein von Tubulin sowie von Myosin und Vimentin bei den neutrophilen Granulozyten des Rindes konnte bestätigt werden.

Meine Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch die eosinophilen Granulozyten Myosin, Vimentin und Tubulin beinhalten. Der Nachweis von Aktin stellte sich schwierig dar, da die Filamente die charakteristischen Granula überdeckten und dies eine Identifikation schwierig gestaltete. Basophile Granulozyten waren in keinem der Ausstriche eindeutig zu identifizieren. So kann auch keine genaue Aussage über das Zytoskelett dieser Zelle gemacht werden.

Bei den Monozyten kam es nur zu einer sehr schwachen Bindung des Phalloidins, was darauf schließen lässt, dass F-Aktin zwar in der Zelle vorhanden ist, jedoch deutlich geringer als bei den anderen Leukozyten. Der Nachweis von Myosin verlief dagegen deutlich positiv. Der immunzytochemische Nachweis von Vimentin war fraglich. Der Nachweis von Tubulin und Panzytokeratin verlief bei den Monozyten negativ.

7. Enzymhistochemie

Es wurde auch das Vorhandensein von Peroxidase, alkalischer Phosphatase, saurer Phosphatase, Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase, α -Naphthyl-Acetat-Esterase, Naphthol-AS-Acetat-Esterase und β -Glucuronidase enzymhistochemisch untersucht.

Myelozyten, neutrophilen Granulozyten, eosinophile Promyelozyten und eosinophile Granulozyten wiesen in allen Ausstrichen eine starke Peroxidaseaktivität auf. Laut Borgers und Verheyen (1985) weisen die Granula der Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen und Monozyten während der Entwicklung einen hohen Gehalt an Peroxidase auf, welcher später abnimmt oder ganz verschwindet (Borgers und Verheyen, 1985). In den Ausstrichen des fetalen Blutes konnten keine Peroxidase-positiven Basophilen oder Monozyten gefunden werden. Auch war kein Unterschied in der Intensität der Reaktion zwischen den Feten und Kälbern zu erkennen. Borgers und Verheyen (1985) beschreiben auch die Thrombozyten als Peroxidase

positiv (Borgers und Verheyen, 1985). Dies deckt sich mit den Befunden von Raskin und Valenciano (2000), welche ebenfalls die Rinderthrombozyten, eosinophile Granulozyten und neutrophilen Granulozyten als Peroxidase-positiv dokumentieren (Raskin und Valenciano, 2000). Im Falle der Thrombozyten kann ich dies nicht bestätigen. Da das Blut der Feten als auch das Blut der Kälber sehr empfindlich auf die Ausstriche reagierte, könnte es aber auch zu einer Beschädigung der Thrombozyten gekommen sein, weswegen keine eindeutige Aussage über die Aktivität der Peroxidase möglich ist. Im Falle der Neutrophilen und Eosinophilen konnten aber die Beobachtungen der anderen Autoren bestätigt werden.

Beim Nachweis der alkalischen Phosphatase zeigten nur die ausgereiften neutrophilen Granulozyten eine stark positive Reaktion. Alle anderen Blutbestandteile waren negativ. Somit konnte das Ergebnis einer Studie von Yasuura et al. (1985) bestätigt werden, in der bereits die alkalische Phosphatase in bovinen Neutrophilen nachgewiesen wurde. Die Aussage von Raskin und Valenciano (2000), welche die Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen als positiv beschreiben (Raskin und Valenciano, 2000), konnte nur für die Neutrophilen bestätigt werden.

Die saure Phosphatase war besonders deutlich in den Lymphozyten und Lymphoblasten erkennbar. Auch die neutrophilen Granulozyten und die Myelozyten stellen sich positiv dar. Eosinophile Granulozyten waren nur sehr selten in den Ausstrichen der Kälber zu sehen und wiesen eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma auf. Monozyten stellten sich negativ dar und Basophile waren nicht eindeutig zu identifizieren. Die Ergebnisse bestätigen nur zum Teil die Ergebnisse von Raskin und Valenciano aus dem Jahre 2000. Die Autoren beschreiben auch die Monozyten als schwach positiv (Raskin und Valenciano, 2000), was in meinen Ausstrichen nicht der Fall war. Bis auf die Basophilen, die als negativ beschrieben werden, sind alle anderen Leukozyten bei diesen Autoren ebenfalls schwach positiv, was durch meine Ergebnisse bestätigt werden kann.

In den Ausstrichen der Feten und Kälber stellen sich die neutrophilen Granulozyten, die Myelozyten und die basophilen Granulozyten deutlich positiv beim Nachweis von Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase dar. Die Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten verhielten sich negativ. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend, bis auf die Reaktion bei den Monozyten, mit denen von Raskin und Valenciano (2000). Diese Autoren beschreiben auch die Monozyten als schwach positiv (Raskin und Valenciano, 2000), was bei meinen Ausstrichen nicht der Fall war.

Im Falle der α -Naphthyl-Acetat-Esterase liegen unterschiedliche Ergebnisse aus verschiedenen Studien vor. Yang et al. (1979) und Goddeeris et al. (1986) beschreiben die Lymphozyten und Monozyten des Rindes beim Nachweis dieses Enzyms als positiv (Yang et al., 1979) (Goddeeris et al., 1986). Diese positive Reaktion konnte ich in meinen Ausstrichen ebenfalls beobachten. Bei den neutrophilen Granulozyten beschreiben Raskin und Valenciano (2000) keine positive Reaktion, wohingegen Reddi et al. (1980) multiple rot-braun farbene Granula als Zeichen der positiven Reaktion beschreibt (Reddi et al., 1980) (Raskin und Valenciano, 2000). In den Ausstrichen des fetalen Blutes als auch in denen des Kälberblutes fiel in meinen Untersuchungen der Nachweis deutlich positiv aus. Eosinophile Granulozyten waren aufgrund ihrer dicht gelagerten Granula sehr schwer zu beurteilen, Basophile waren nicht zu erkennen.

Die Ergebnisse des Naphthol-AS-Acetat-Esterase Nachweises lassen darauf schließen, dass alle Blutzellen, mit Ausnahme der Erythroblasten der Feten, dieses Enzym enthalten.

Bereits im Jahre 1987 untersuchte Hurley die β -Glucuronidase im Blut des Rindes. Er konnte zeigen, dass die Neutrophilen, Eosinophilen, Lymphozyten und Monozyten β -Glucuronidase positiv sind (Hurley, 1987). Laut Raskin und Valenciano (2000) weisen Monozyten und Neutrophile nur eine schwache Reaktion auf, Lymphozyten hingegen zeigen eine stärkere (Raskin und Valenciano, 2000). In meinen Ausstrichen können die Ergebnisse hinsichtlich der Lymphozyten und Monozyten bestätigt werden. Die neutrophilen Granulozyten hingegen stellten sich in den Ausstrichen negativ dar. Sowohl bei den Feten als auch bei den Kälbern waren jedoch einige positive eosinophile Granulozyten zu finden.

Beim enzymhistochemischen Nachweis der genannten Enzyme konnten keine gravierenden Unterschiede zwischen den Blutausstrichen von Feten und von Kälbern festgestellt werden. Nur im Fall der alkalischen Phosphatase waren die Vorgänger der Granulozyten im Blut der Feten negativ, während sich die ausgereiften neutrophilen Granulozyten im Blut der Kälber positiv darstellten. Die Erklärung hierfür ist das Vorhandensein des Enzyms in den Endreifungsstufen der Granulozyten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Dissertation war der Vergleich der Blutzellen von bovinen Feten mit Blutzellen neugeborener Kälber. Für diesen Vergleich wurden lichtmikroskopische-, elektronenmikroskopische-, glykohistochemische-, immunzytochemische- und enzymhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Mit den lichtmikroskopischen- und elektronenmikroskopischen Methoden wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Struktur charakterisiert und unterschieden. Die Zuckerstrukturen der Blutzellen wurden mittels FITC-markierter Lektine bestimmt. Durch immunzytochemische Methoden wurde das Auftreten von CD4 und CD8 auf den Blutzellen und verschiedene Komponenten des Zytoskeletts (Vimentin, Tubulin) der Blutzellen der Feten und Kälber untersucht. Mit enzymhistochemischen Methoden wurde eine Reihe von Markerenzymen in den verschiedenen Blutzelltypen lokalisiert.

Für diese Untersuchungen wurden Blutproben von insgesamt 31 neugeborenen Kälbern, die nicht älter als 24 Stunden waren, genommen. Am Schlachthof München wurden zusätzlich 22 Blutproben von Feten mit einer Scheitel-Steiß-Länge von 5,5 – 72 cm entnommen. Neben diesen beiden Gruppen wurde für die enzymhistochemischen Untersuchungen weitere 15 Kälber untersucht.

Es wurden insgesamt 8 verschiedene lichtmikroskopische Färbungen durchgeführt. Hierbei eigneten sich die Diff-Quick- und die Pappenheim-Färbung am besten, um die Erythrozyten- und Lymphozytenvorläuferzellen darzustellen. Hyalomer und Granulomer der Thrombozyten konnten sowohl im fetalen als auch im Blut der Kälber am besten mit diesen beiden Übersichtsfärbungen lokalisiert werden. Des Weiteren waren die Thrombozyten beider Gruppen deutlich PAS-positiv. Die Myelozyten konnten anhand ihres Zellkerns und ihrer Zellform deutlich in der Diff-Quick und Pappenheim-Färbung identifiziert werden. Die neutrophilen Granulozyten und Myelozyten waren PAS-positiv. Mittels Alcianblau bei einem pH von 2,5 konnten saure Mukosubstanzen in beiden Zellen nachgewiesen werden. Mit der Giemsa-, der Pappenheim- und der eosinophilen-spezifischen Färbung Sirius Red waren die eosinophilen Granulozyten und deren Vorläufer im Blut der Feten und Kälber gut erkennbar. Basophile Granulozyten konnten mit Hilfe der May-Grünwald-Färbung und der basophilen-spezifischen Toluidinblau-Färbung identifiziert werden. Die eosinophilen Granulozyten und die basophilen Granulozyten waren in allen Altersgruppen der Kälber gleichermaßen zu finden. Im Blut der Feten waren sie nur sehr selten darstellbar.

In den Präparaten, die unter dem Elektronenmikroskop untersucht wurden, konnten einige, für das Rind spezifische Eigenschaften der Blutzellen erkannt werden. So enthielten die Thrombozyten der Feten und Kälber sog. „dense bodies“ in ihrem Zytoplasma. Neben diesen waren auch die α -Granula zu sehen. Die Vorläuferstufen der neutrophilen Granulozyten, die neutrophilen Myelozyten, waren deutlich im Blut der Feten durch das Auftreten der spezifischen Granula zu identifizieren. In den ausgereiften neutrophilen Granulozyten der Kälber konnten die für bovine neutrophile Granulozyten spezifischen 3 Granulaarten nachgewiesen werden. Die basophilen Granulozyten waren im Blut der Feten nicht zu finden, nur im Blut des Kalbes konnten sie anhand der großen Granula identifiziert werden.

Für die Untersuchungen der Kohlenhydratstrukturen der Blutzellen von bovinen Feten und Kälbern wurden die FITC-markierten Lektine ConA, LCA, PSA, PNA, GSL-1, RCA, WGA, WGA_{suc}, DBA, SBA, SJA, UEA-1, PHA-E und PHA-L verwendet. Des Weiteren fanden die biotinylierten Lektine VAA, MAA und SNA Anwendung. Zu den auffallendsten Unterschieden

zwischen prä- und postnatalem Blut zählten das Fehlen der Bindung von PHA-L an die Thrombozyten der Feten, wohingegen es zu einer deutlichen Bindung an den Granula der Thrombozyten der Kälber kam. VAA band dagegen schwächer an die Thrombozyten der Feten. Zur Darstellung der T-Lymphozyten wurden Antikörper gegen CD4 und der für zytotoxische T-Zellen spezifische Antikörper gegen CD8 verwendet. Ein deutlicher Unterschied konnte beim Nachweis von CD4 festgestellt werden. Beim Fetus kam es zu keiner positiven Reaktion, wohingegen es beim Kalb zu einer deutlichen Bindung an Lymphozyten und neutrophile Granulozyten kam. Der CD8-Antikörper band gleichermaßen an prä- und postnatale Lymphozyten und teils auch an neutrophile Granulozyten.

Zur Darstellung des Zytoskeletts wurden Aktin (mit Phalloidin-TRITC), Myosin, Vimentin, Tubulin und Panzytokeratin (mit FITC-markierten Antikörpern) nachgewiesen. Die Erythroblasten der Feten zeigten beim Nachweis von F-Aktin erkennbare Filamente. In den ausgereiften Erythrozyten der Kälber waren diese Aktin-Filamente nicht mehr zu sehen. Ein Unterschied konnte auch bei den Thrombozyten festgestellt werden. Beim Nachweis von Myosin kam es in den Thrombozyten der Feten zu einer granulären Reaktion in fixierten Ausstrichen. Im Blut der Kälber war diese Reaktion in unfixierten Präparaten deutlicher. Vimentin stellte sich in den prä- und postnatalen Thrombozyten als feines Netz aus Intermediärfilamenten dar. Beim Nachweis von Tubulin in Thrombozyten kam es zu einer granulären Reaktion. Des Weiteren waren die Lymphozyten, Lymphoblasten, neutrophile Granulozyten und neutrophile Myelozyten positiv beim Nachweis von Aktin, Vimentin und Myosin. Zusätzlich stellten sich die neutrophilen Granulozyten und ihre Vorläufer positiv beim Nachweis von Tubulin dar. Myosin, Vimentin und Tubulin war auch in den eosinophilen Granulozyten nachweisbar. Der Nachweis von Aktin war bei den eosinophilen Granulozyten schwierig, da die Filamente teilweise durch die eosinophilen Granula überdeckt wurden.

Für die enzymhistochemischen Untersuchungen wurde das Blut von 9 Feten und weitere Blutproben von 15 Kälbern im Alter von 3-42 Tage post natum untersucht. Es wurden die Enzyme Peroxidase, alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase, α -Naphthyl-Acetat-Esterase, Naphthol-AS-Acetat-Esterase und β -Glucuronidase enzymhistochemisch untersucht. Hierbei kam es nur bei der alkalischen Phosphatase zu einem deutlichen Unterschied zwischen den Altersgruppen. Da dieses Enzym nur in den Endreifungsstufen der neutrophilen Granulozyten nachweisbar ist, waren im fetalen Blut keine alkalische Phosphatase-positiven Zellen zu finden. Bei allen anderen Enzymen waren keine Unterschiede in der Expression der verschiedenen Enzyme bei verschiedenen Altersgruppen feststellbar.

VII. SUMMARY

Ultrastructural and histochemical studies on blood cells of the bovine calf during the pre- and postnatal development.

The aim of this thesis was the comparison of blood cells from bovine fetuses with blood cells of newborn calves. For this comparison light microscopic-, electron microscopic-, glycohistochemical-, immunohistochemical- and enzyme histochemical techniques were used. Light microscopy and transmission electron microscopy were used to characterize and differentiate the cells regarding their morphology. FITC-marked lectins were used to examine carbohydrate residues of blood cells. Immunohistochemical methods were used to examine several antigens (CD4, CD8) as well as the cytoskeleton of blood cells. Enzyme histochemical techniques were used to localize a number of marker enzymes.

For my investigations blood samples of 31 newborn calves (not older than 24 hours) were used. 22 blood samples of bovine fetuses with the crown-rump length ranging from 5,5 cm to 72 cm were collected in local Munich slaughterhouse. Additionally, blood samples of another 15 calves were taken for the enzyme histochemical investigations.

8 different conventional light microscopical stainings were applied. Diff-Quick- and Pappenheim-staining appeared to be the most appropriate methods for histological differentiation of the precursor cells of the erythropoietic and lymphopoietic cell lines. These staining techniques also clearly demonstrated the hyalomer and granulomer of the thrombocytes, which appeared also positive in the Periodic acid Schiff (PAS)-reaction. Using Diff-Quick- and Pappenheim-staining, myelocytes could be easily identified due to their characteristic cell shape and nucleus. Neutrophil granulocytes and myelocytes were also PAS-positive. Using Alcianblue- staining with a pH of 2,5, acid mucosubstances could be detected in both cells. Eosinophil granulocytes and their precursor cells were also clearly seen after Giemsa-, Pappenheim- and Sirius-Red-staining. Basophil granulocytes could be identified using May-Grünwald- and Toluidin-blue-staining. Whereas eosinophils and basophils could be found in all age groups of the calves, they were only rarely identified in blood smears of the fetuses.

Using transmission electron microscopy, some bovine specific characteristics could be detected in the blood cells. So called „dense bodies“ could be found in the thrombocytes of the pre- and postnatal samples. Additionally, α -Granules occurred in the cytoplasm. Neutrophil precursor cells, the neutrophil myelocytes, were clearly detectable in the fetal blood due to their specific granules. In the mature neutrophils, all three types of granules, which are specific for the cattle, were regularly found. Basophils could not be detected in the fetal blood, but were seen in the blood of postnatal animals.

The FITC-labeled lectins ConA, LCA, PSA, PNA, GSL-1, RCA, WGA, WGA_{suc}, DBA, SBA, SJA, UEA-1, PHA-E, and PHA-L were used for the study of the carbohydrate structures of the bovine blood cells from fetuses and calves. Furthermore, several biotinylated lectins (VAA, MAA and SNA) were applied. Significant differences of binding of PHA-L and VAA to thrombocytes were found between pre- and postnatal blood cells. PHA-L did not bind to thrombocytes of the fetuses, whereas a distinct binding of PHA-L to the granules of the thrombocytes of the calves was observed. Binding of VAA to the fetal thrombocytes was weaker than to thrombocytes of the calves.

CD4 antibodies were used for the representation of T-lymphocytes, additionally the CD8 antibodies were used for the detection of the cytotoxic T-cells. A clear difference was detectable using CD4 antibodies. There was no positive reaction in the fetal blood, whereas a distinct binding of CD4 antibodies to lymphocytes and neutrophils of the calves was seen. CD8 antibodies bound to a similar extent to the pre- and postnatal bovine lymphocytes and neutrophils.

Immunocytochemical characterization of the cytoskeleton proteins actin, myosin, vimentin, tubulin and pancytokeratin was performed using the corresponding antibodies. Staining of F-actin was performed with phalloidin-TRITC. With the latter, a clear staining of actin filaments was found in fetal erythroblasts. This staining was no longer detectable in the mature erythrocytes of the calves. In thrombocytes, a distinct immunostaining was found in fetal thrombocytes of the fixed blood smears. Vimentin staining in pre- and postnatal thrombocytes appeared as fine immunopositive filaments. Staining for tubulin was detectable in the thrombocytes. Lymphocytes, lymphoblasts, neutrophils and neutrophil myelocytes were actin-, vimentin- and myosin-positive. Additionally, the neutrophils and their precursor cells were positive after tubulin immune-staining. Myosin, vimentin and tubulin were also detectable in the eosinophils.

Blood samples of 9 fetuses and 15 calves between 3 to 42 days old, were used for the enzyme histochemical investigations. The enzymes tested were peroxidase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, naphthol-AS-D-chloracetat-esterase, α -naphthyl-acetat-esterase, naphthol-AS-acetat-esterase and β -glucuronidase. Only in the case of alkaline phosphatase was there a distinct difference in the staining between the age groups. Alkaline phosphatase was not detectable in the blood cells of the fetuses, it could be clearly demonstrated in the more mature blood cells post natum.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, R., GARRY, F. B., ALDRIDGE, B. M., HOLLAND, M. D. & ODDE, K. G. (1992) Hematologic values in newborn beef calves. *Vet. Res.*, 53, 944-950.
- AL-IZZI, S. A., MAXIE, M. G. & VALLI, V. E. O. (1982) Morphology and cytochemistry of bovine bone marrow mononuclear phagocytes. *Can. J. Comp. Med.*, 46, 130-132.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (2011) *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH Verlag.
- ATKINS, H. & ANDERSON, P. J. (1982) Actin and tubulin of normal and leukaemic lymphocytes. *Biochem. J.*, 207, 535-539.
- AYOUB, I. A. & YANG, T. J. (1996) Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulation in cattle: A longitudinal study *Dev. Comp. Immunol.*, 20, 353-363.
- BAGGIOLINI, M., HORISBERGER, U., GENNARO, R. & DEWALD, B. (1985) Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells. *Lab. Invest.*, 52.
- BARONDES, S. H. (1981) Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 207- 231.
- BIENZLE, D. (2000) Monocytes and Macrophages. IN FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. & JAIN, N. C. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- BIRMINGHAM, J. R. & JESKA, E. L. (1980) The isolation, long-term cultivation and characterization of bovine peripheral blood monocytes. *Immunology*, 41, 807-814.
- BORGERS, M. & VERHEYEN, A. (1985) Enzyme cytochemistry. *Int. Rev. Cytol.*, 95, 163-212.
- BOUW, J. (1977) Present status of animal blood group research. *Vet. Res. Commun.*, 1, 105-110.
- BROWN, E. M. (1998) Blood and Bone Marrow. IN DELLMANN, H. D. & BROWN, E. M. (Eds.) *Textbook of Veterinary Histology*. 3 ed., Lea & Febiger.
- BROWN, M. J., HALLAM, J. A., GUYON, E. C.-. & SHAW, S. (2001) Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J. Immunol.*, 166, 6640-6646.
- CASTLE, A. G. & CRAWFORD, N. (1974) Isolation of tubulin from pig platelets. *FEBS Letters* 51, 195-200.
- CHIEN, J.-L., LI, S.-C., LAINE, R. A. & LI, Y.-T. (1978) Characterization of gangliosides from bovine erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.*, 253, 4031-4035.
- COHEN, I., KAMINSKI, E. & GLASER, T. (1976) Actin and myosin from blood platelets of muscle are potent aggregating agents. *Thromb. Res.*, 8, 383-392.
- COLIN, F. C. & SCHRIER, S. L. (1991) Myosin content and distribution in human neonatal erythrocytes are different from adult erythrocytes. *Blood*, 78, 3052-3055.
- COOPER, A. C. D. (1974) Haematology of normal native cattle in botswana. *Trop. Anim. Health Prod.*, 6, 53-54.
- COOPER, H. S. (1984) Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry. *Human Pathology*, 15, 904-906.
- COORAY, R. & BJÖRCK, L. (1995) Bactericidal activity of the bovine myeloperoxidase system against bacteria associated with mastitis. *Vet. Microbiol.*, 46, 427-434.

- COORAY, R., PETERSSON, C. G. B. & HOLMBERG, O. (1993) Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 38, 261-272.
- DAVIS, W. C., ELLIS, J. A., MACHUGH, N. D. & BALDWIN, C. L. (1988) Bovine pan T-cell monoclonal antibodies reactive with a molecule similar to CD2. *Immunology*, 63, 165- 167.
- DAVIS, W. C. & HAMILTON, M. J. (1998) Comparison of the unique characteristics of the immune system in different species of mammals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 63, 7-13.
- DAY, M. J. (2000) Biology of Lymphocytes and Plasma Cells. IN FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. & JAIN, N. C. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- DEANE, H. W., BARNETT, R. J. & SELIGMAN, A. M. (1960) *Enzymes - Histochemical Methods for the Demonstration of Enzymatic Activity*, Stuttgart, Gustav-Fischer Verlag.
- DIXON, H. B. F. (1981) Defining a lectin. *Nature*, 292, 192.
- DJILALI, S., DACOSTA, B., KESSLER, J.-L. & PARODI, A.-L. (1991) Preparation and characterization of a monoclonal antibody against bovine CD5 lymphocyte surface antigen. *Comparative Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 14, 257- 263.
- DJILALI, S., PARODI, A.-L. & LEVY, D. (1987) Wheat germ agglutinin (WGA): A bovine T-lymphocyte marker. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 16, 151-154.
- DOWNEY, G. P., GRINSTEIN, S., SUE-A-QUAN, A., CZABAN, B. & CHAN, C. K. (1995) Volume regulation in leukocytes: Requirement for an intact cytoskeleton. *J. Cell. Physiol.*, 163, 96-104.
- DU PLESSIS, L., BOTHA, A. J. & STEVENS, K. (1996) Ultrastructure of buffalo, syncerus caffer, platelets: Comparison with bovine and human platelets. *J. Morphol.*, 229, 309 - 314.
- EGGER, G., BURDA, A. & GLASNER, A. (2001) A simple method for measuring the F-actin content of human polymorphonuclear leukocytes in whole blood. *Virchows Arch.*, 438, 394-397.
- EGUCHI, M., OZAWA, T., SUDA, J., SUGITA, K. & FURUKAWA, T. (1989) Lectins for electron microscopic distinction of eosinophils from other blood cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 37, 743-749.
- ELSNER, J., DICHMANN, S., DOBOS, G. J. & KAPP, A. (1996) Actin polymerization in human eosinophils, unlike human neutrophils, depends on intracellular calcium mobilization. *J. Cell. Physiol.*, 167, 548-555.
- EMERSON, W. A. & KORNFELD, S. (1976) Characterization of the oligosaccharide units of the bovine erythrocyte membrane glykoprotein. *Biochemistry*, 15, 1697-1703.
- FLETCHER, M. A., BRUNSCHWIG, J. P., LO, H., CALDWELL, K. E. & LO, T. M. (1982) Biochemical and morphological properties of bovine erythrocyte membrane glykoproteins. *J. Cell. Biochem.*, 19, 157-170.
- FOSSUM, C., BURNY, A., PORTETELLE, D., MAMMERICK, M. & MOREIN, B. (1988) Detection of B and T Cells, with lectins or antibodies, in healthy and bovine leukemia virus - infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 18, 269-278.
- FRANZ, H. (1990) 100 Jahre Lektinforschung- eine Bilanz. *Naturwissenschaften*, 77, 103-109.
- FREIBURGHAUS, J. & JÖRG, A. (1990) Isolation of bovine eosinophils and characterization of their leukotriene formation. *Agents and Actions*, 31, 16-22.
- FREUND, M. & HECKNER, F. (2001) *Praktikum der Mikroskopischen Hämatologie*, Urban & Fischer.
- GABIUS, H.-J. (2009) *The Sugar Code - Fundamentals of Glycosciences*, Wiley- Blackwell.

- GABIUS, H.-J., ANDRÉ, S., JIMÉNEZ-BARBERO, J., ROMERO, A. & SOLÍS, D. (2011) From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *TIBS*, 829, 1-16.
- GANGULY, P., GOULD, N. L. & SIDHU, P. (1979) Interaction of lectins with human platelets effects on platelet stimulation by thrombin and ristocetin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 586, 574-583.
- GASSMANN, M. & LUTZ, T. A. (2010) Zelluläre Bestandteile des Blutes. IN ENGELHARDT, W. V. (Ed.) *Physiologie der Haussäugetiere*. Stuttgart, Enke-Verlag.
- GENNARO, R., DEWALD, B., HORISBERGER, U., GUBLER, H. U. & BAGGIOLINI, M. (1983) A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell. Biol.*, 96, 1651-1661.
- GERSHWIN, L. J., LANCE, P. & ROKITO, A. S. (1983/1984) Comparison of analysis of bovine surface immunoglobulin bearing and peanut agglutinin binding lymphocytes by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 5, 185-196.
- GODDEERIS, B. M., BALDWIN, C. L., OLE-MOIYOI, O. & MORRISON, W. I. (1986) Improved methods for purification and depletion of monocytes from bovine peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol. Methods*, 89, 165-173.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. & SHARON, N. (1980) What should be called a lectin? *Nature*, 285, 66.
- GOLDSTEIN, I. J. & PORETZ, R. D. (1986) Isolation, Physicochemical Characterization and Carbohydrate - Binding Specificity of Lectins. IN LIENER, I. E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. (Eds.) *The Lectins - Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press.
- GOV, N., ZILMAN, A. G. & SAFRAN, S. (2003) Cytoskeleton confinement and tension of the red blood cell membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 90, 228101-1-228101-4.
- GOV, N. S. (2007) Active elastic network: Cytoskeleton of the red blood cell. *Phys. Rev. Lett.*, 75, 1-6.
- GRESELE, P. & FALCINELLI, E. (2005) β 1-tubulin in human platelets: Not simply a structural cell frame. *Blood*, 106, 2229-2230.
- HABERMANN, F. A., ANDRÉ, S., KALTNER, H., KÜBLER, D., SINOWATZ, F. & GABIUS, H.-J. (2011) Galectins as tools for glycan mapping in histology: comparison of their binding profiles to the bovine zona pellucida by confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cell Biol*, 135, 539-552.
- HAIDER, M. J. & SIDDIQUI, H.-U.-R. (1989) Haematology of cattle during summer and winter. *Chemosphere*, 19, 2003-2006.
- HAMAZAKI, H., HOTTA, K. & KONISHI, K. (1975) Comparative studies of human, equine, porcine and bovine erythrocyte membrane sialoglycoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55, 37-44.
- HASTON, W. S. (1987) F-actin distribution in polymorphonuclear leucocytes. *J. Cell. Sci.*, 88, 495-501.
- HAWKEY, C. M. & DENNETT, T. B. (1990) *Farbatlas der Hämatologie*, Hannover, Schlütersche Verlaganstalt und Druckerei.
- HEES, H. & TSCHUDI, P. (1990) Blut und Knochenmark. IN MOSIMANN, W. & KOHLER, T. (Eds.) *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Verlag Paul Parey.
- HEGNER, D. (1968) Isolierung und Enzymbestand von Granula aus polymorphkernigen Leukozyten des peripheren Rinderblutes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349, 544-554.
- HUBBERT, W. T. & HOLLEN, E. J. (1971) Cellular blood elements in the developing bovine fetus. *Vet. Res.*, 32, 1213-1219.
- HUDSON, B. G., WEGENER, L. J., WINGATE, J. M. & CARRAWAY, K. L. (1975) Chemical studies of erythrocyte membrane glycoproteins from several species. *Com. Biochem. Physiol.*, 51, 127-135.

- HUMBLE, R. J. (1954) Blood types in cattle. *Can. J. Comp. Med.*, 18, 379-389.
- HURLEY, W. L. (1987) Assays and activities of glycosidic enzymes in bovine peripheral blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 16, 85- 93.
- JAIN, N. C. (Ed.) (1993) *Essentials of Veterinary Hematology*, Philadelphia, Lea & Febiger.
- JOHANSSON, C. & MOREIN, B. (1983) Evaluation of labeling methods for bovine T and B lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 4, 345-359.
- JÖNS, T. (2001) Zur Bedeutung von Zytoskelett- Membran- Verbindungen für die Gerichtete HCl-Sekretion von Parietalzellen. *Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät*. Berlin, Humboldt-Universität.
- KAMPEN, A., OLSEN, I., TOLLERSRUD, T., STORSET, A. K. & LUND, A. (2005) Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 116, 53-63.
- KASPERS, B. & GÖBEL, T. (2010) Blutstillung und Blutgerinnung. IN ENGELHARDT, W. V. (Ed.) *Physiologie der Haussäugetiere*. Stuttgart, Enke Verlag.
- KENDRICK, J. W. (1976) Immune response of the bovine fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 169, 1122.
- KHAN, F., KHAN, R., SHERWANI, A., MOHMOOD, S. & AZFER, M. (2002) Lectins as markers for blood grouping. *Med Sci Monit.*, 8, RA293-300.
- KHISMATULLIN, D. B. (2009) The cytoskeleton and deformability of white blood cells *Curr. Top. Membr.*, 64, 47-105.
- KOCOUREK, J. (1986) Historical Background. IN LIENER, I. E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. (Eds.) *The Lectins-Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press.
- KOCOUREK, J. & HOREJSI, V. (1981) Defining a lectin. *Nature*, 290, 188.
- KOLB, G. M. H. (1991) *Vergleichende Histologie: Cytologie und Mikroanatomie der Tiere*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- KOLB, E. & SEEHAWER, J. (1998) Die Entwicklung des Immunsystems und des Vitamingehalts beim Rinderfetus und beim Kalb. *Tierärztliche Umschau* 53, 723-730.
- KRAFT, W. (2005) Hämatologie. IN KRAFT & DÜRR (Eds.) *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 6 ed., Schattauer.
- KRAMER, J. W. (2000) Normal Hematology of Cattle, Sheep, and Goats. IN JAIN, N. C. (Ed.) *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- KUEHN, C. & EPPS, D. E. V. (1980) Lectin-mediated induction of human neutrophil chemotaxis, chemokinesis, and cap formation. *Infection and Immunity*, 29, 600-608.
- LEE, M. C., TURCINOV, D. & DAMJANOV, I. (1987) Lectins as markers for eosinophilic leukocytes. *Histochemistry*, 86, 269-273.
- LIEBICH, H.-G. (1999) *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*, Stuttgart, Schattauer.
- LÖFFLER, G. (2008) *Basiswissen Biochemie*, Springer-Verlag.
- LOJDA, Z., GOSSRAU, R. & SCHIEBLER, T. H. (1976) *Enzymhistochemische Methoden*, Wiley-VCH Verlag.

- LUPPA, H., AMBROSIUS, H. & STORCH, W. (1986) Immunreaktionen in der Histochemie. IN GRAUMANN, W. & NEUMANN, K. (Eds.) *Handbuch der Histochemie*. Gustav Fischer Verlag.
- MACHUGH, N. D., MBURU, J. K., CAROL, M. J., WYATT, C. R., ORDEN, J. A. & DAVIS, W. C. (1997) Identification of two distinct subsets of bovine γ δ T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology*, 92, 340-345.
- MACKAY, C. R. & HEIN, W. R. (1989) A large proportion of bovine T cells express the γ δ T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int. Immunol.*, 1, 540-545.
- MAHLBERG, R., GILLES, A. & LÄSCH, A. (2005) *Hämatologie-Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe*, Wiley-VCH Verlag.
- MEYERS, K. M., HOPKINS, G., HOLMSEN, H., BENSON, K. & PRIEUR, D. J. (1982) Ultrastructure of resting and activated storage pool deficient platelets from animals with the chédiak-higashi syndrome. *Am. J. Physiol.*, 106, 364 - 377.
- MIURA, A. B., SHIBATA, A., AKIHAMA, T., ENDO, Y. & SAITO, Y. (1974) Ultrastructure of the developing erythrocytes. *Tohoku J. exp. Med.*, 112, 299-313.
- MONSIGNY, M., SENE, C., OBRENOVITCH, A., ROCHE, A.-C., DELMOTTE, F. & BOSCHETTI, E. (1979) Properties of succinylated wheat-germ agglutinin. *Eur. J. Biochem.*, 98, 39-45.
- MUHLARD, A., ELDOR, A. & KAHANE, I. (1978) Distribution of myosin, actin and actin-binding protein in membrane and soluble fraction of human blood platelets. *FEBS Letters*, 92, 85-88.
- NAESSENS, J. (1996) Surface Ig on B- lymphocytes from cattle and sheep. *Int. Immunol.*, 9, 349-354.
- NAIM, H. Y., CLEMETSON, K. J. & LÜSCHER, E. F. (1982) Effects of galactose-binding lectins on human blood platelets: identity of the peanut agglutinin receptor with the von willebrand factor receptor. *Thromb. Res.*, 26, 431-441.
- NEWMAN, R. A. & UHLENBRUCK, G. G. (1977) Investigation into the occurrence and structure of lectin receptors on human and bovine erythrocyte, milk-fat globule and lymphocyte plasma-membrane glykoproteins. *Eur. J. Biochem.*, 76, 149- 155.
- NIELSEN, H. V., JOHNSEN, A. H. & SCHIOTZ, P. O. (2004) Expression of actin and tubulins in purified human basophil leukocytes upon stimulation with IL-3. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 133, 340-347.
- OSBURN, B. I., STABENFELDT, G. H., ARDANS, A. A., TREES, C. & SAWYER, M. (1974) Perinatal immunity in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 164, 295-298.
- PAAPE, M. J., BANNERMAN, D. D., ZHAO, X. & LEE, J.-W. (2003) The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, 34, 597-627.
- PATSCHEKE, H., BROSSMER, R. & WÖRNER, P. (1977) D-galactose-binding lectins induce a differential response of blood platelets. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 75, 200-206.
- PEARSON, T. W., ROELANTS, G. E., LUNDIN, L. B. & WITHEY, K. S. M. (1979) The bovine lymphoid system: Binding and stimulation of peripheral blood lymphocytes by lectins. *J. Immunol. Methods*, 26, 271-282.
- PENEDO, M. C. T. (2000) Red Blood Cell Antigens and Blood Groups in the Cow, Pig, Sheep, Goat and Llama. IN FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. & JAIN, N. C. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- PSCHYREMBEL (2004) Klinisches Wörterbuch. *Pschyrembel*. Berlin, de Gruyter.
- RASKIN, R. E. & VALENCIANO, A. (2000) Cytochemistry of normal leukocytes. IN FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. & JAIN, N. C. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.

- REDDI, M. V., RAJAN, A., SULOCHANA, S. & NAJR, M. K. (1980) Demonstration of acid alpha naphthyl acetat esterase activity in bovine leucocytes in the peripheral blood smear. *Current Science*, 945.
- ROCHA, J. L., SANDERS, J. O., CHERBONNIER, D. M., LAWLOR, T. J. & TAYLOR, J. F. (1998a) Blood groups and milk and type traits in dairy cattle: After forty years of research. *J. Dairy Sci.*, 81, 1663-1680.
- ROCHA, J. L., SANDERS, J. O., CHERBONNIER, D. M., LAWLOR, T. J. & TAYLOR, J. F. (1998b) Trait-based analysis in dairy cattle using blood group polymorphisms. *J. Dairy Sci.*, 81, 1681-1689.
- ROMEIS (2010) *Romeis Mikroskopische Technik*, Spektrum-Akademischer Verlag.
- ROTH, J. A. & KAEBERLE, M. L. (1981) Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2, 157-174.
- ROTH, J. (2011) Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem Cell Biol*, 136, 117-130.
- RÜDIGER, H. (1978) Lectine, Pflanzliche zuckerbindende Proteine. *Naturwissenschaften*, 65, 239- 244.
- RÜDIGER, H. (1981) Lectine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. *Chemie in unserer Zeit*, 5, 155-162.
- RÜDIGER, H. (1982) Phythemagglutinins. *J. Med. Plant. Res.*, 46, 3-9.
- RÜDIGER, H. (1998) Plant lectins-more than just tools for glykoscienceists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.*, 161, 130-152.
- RÜDIGER, H. & GABIUS, H.-J. (2009) Plant lectins. IN GABIUS, H.-J. (Ed.) *The sugar code. Fundamentals of glykoscienceis*. Weinheim, Wiley-VCH.
- RÜDIGER, H. & GABIUS, H.-J. (2001) Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj. J.*, 18, 589- 613.
- RÜSSE, I. (1991) Blut und Blutgefäße. IN RÜSSE, I. & SINOWATZ, F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Verlag Paul Parey.
- RYDER, M. I., NIEDERMAN, R. & TAGGART, E. J. (1982) The cytoskeleton of human polymorphonuclear leukocytes: Phagocytosis and degranulation. *The Anatomical Record*, 203, 317-327.
- SCHMID, D. O. & BUSCHMANN, H. G. (1985) *Blutgruppen bei Tieren*, Stuttgart, Enke-Verlag.
- SCHULTZ, R. D. (1973) Developmental aspects of the fetal bovine immune response: A review. *Cornell Vet.*, 63, 507-535.
- SCHULTZ, R. D., DUNNE, H. W. & HEIST, C. E. (1971) Breed difference in the immune response of newborn calves. *Am. J. Vet. Res.*, 32, 1337-1341.
- SCHWER, H. D., LECINE, P., TIWARI, S., JR, J. E. I., HARTWIG, J. H. & SHIVDASANI, R. A. (2001) A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr. Biol.*, 11, 579-586.
- SCOTT, M. A. & STOCKHAM, S. L. (2000) Basophils and Mast Cells. IN FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. & JAIN, N. C. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- SHARON, N. & LIS, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glykobiology*, 14, 53-62.
- SINOWATZ, F. & HEES, H. (2000) *Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, Deutscher Ärzteverlag.

- SMITH, G. S. (2000) Neutrophils. IN FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. & JAIN, N. C. (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- STEINER, M. (1983) Membrane-bound tubulin in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta.*, 729, 17-22.
- STOBBE, H. (1970) *Hämatologischer Atlas*, Akademie Verlag.
- STÖBER, M. & GRÜNDER, H.-D. (1990) Blut. IN ROSENBERGER, G. (Ed.) *Die Klinische Untersuchung des Rindes*. Parey-Verlag.
- STORMONT, C. (1962) Current status of blood groups in cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 97, 251-268.
- SUMNER, J. B. & HOWELL, S. F. (1936) The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. *J. Bact.*, 32, 227-237.
- TABLIN, F. (1985) Identification of vimentin in human and bovine platelets. *J. Cell. Biol.*, 101, 16a.
- TABLIN, F. & TAUBE, D. (1987) Platelet intermediate filaments: Detection of a vimentinlike protein in human and bovine platelets. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 8, 61-67.
- TATSUMI, N., SHIBATA, N., OKAMURA, Y., TAKEUCHI, K. & SENDA, N. (1973) Actin and myosin a from leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 305, 433-444.
- TEALE, A. J., BALDWIN, C. L., MORRISON, W. I., ELLIS, J. & MACHUGH, N. D. (1987) Phenotypic and functional characteristics of bovine T lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 17, 113-123.
- TENNANT, B., HARROLD, D., GUERRA, M. R.-., KENDRICK, J. W. & LABEN, R. C. (1973) Hematology of the neonatal calf: Erythrocyte and leukocyte values of normal calves. *Cornell Vet.*, 64, 516- 532.
- THEML, H., DIEM, H. & HAFERLACH, T. (2002) *Taschenatlas der Hämatologie*, Thieme.
- THOMSEN, H., REINSCH, N., XU, N., LOOFT, C., GRUPE, S., KÜHN, C., BROCKMANN, G. A., SCHWERIN, M., HORN, B. L.-., HIENDLEDER, S., ERHARDT, G., MEDJUGORAC, I., RUSS, I., FÖRSTER, M., BRENIG, B., REINHARDT, F., REENTS, R., BLÜMEL, J., AVERDUNK, G. & KALM, E. (2002) Mapping of the bovine blood group systems J, N^c, R^c and Z show evidence for oligo-genetic inheritance. *Animal Genetics*, 33, 107-117.
- TIMOSHENKO, A. V., CHERENKEVICH, S. N. & GABIUS, H. J. (1995) Viscum album agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. *Biomed & Pharmacother*, 49, 153-158.
- VAN-DAMME, J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. (1998) *Handbook of Plant Lectins-Properties and Biomedical Applications*, Wiley-VCH Verlag.
- WEISS, R., EICHNER, R. & SUN, T.-T. (1984) Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases : A 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes *J. Cell. Biol.*, 98, 1397-1406.
- WHITE, J. G. (1987) The secretory pathway of bovine platelets. *Blood*, 69, 8.
- WONG, A. J., KIEHART, D. P. & POLLARD, T. D. (1984) Myosin from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 260, 46-49.
- WOODSIDE, E. E. & KOCHOLATY, W. (1960) Carbohydrates of human and bovine platelets. *Blood*, 16, 1173-1183.
- WYATT, C. R., MADRUGA, C., CLUFF, C., PARISH, S., HAMILTON, M. J., GOFF, W. & DAVIS, W. C. (1993) Differential distribution of $\gamma\delta$ T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40, 187-199.

- YANG, T. J., JANTZEN, P. A. & WILLIAMS, L. F. (1979) Acid alpha-naphthyl acetat esterase: Presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes *Immunology*, 38, 85-93.
- YASUURA, S., NAGAOKA, I. & YAMASHITA, T. (1985) Characterization of alkaline phosphatase from bovine polymorphonuclear neutrophils *Comp. Biochem. Physiol.*, 82 B, 595-598.
- YOUNG, K. M. (2000) Eosinophils. *Schlam's Veterinary Hematology*. Lippincott William & Wilkins.
- ZHANG, R. & BROWN, F. L. H. (2008) Cytoskeleton mediated effective elastic properties of model red blood cell membranes. *J. Chem. Phys.*, 129, 1-38.
- ZUCKER-FRANKLIN, D. & GRUSKY, G. (1972) The actin and myosin filaments of human and bovine platelets. *J. Clin. Invest.*, 51, 419-430.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Zusammensetzung des Blutes</i>	2
<i>Abbildung 2: Entwicklung des Neutrophilen:Lymphozytenverhältnis</i>	3
<i>Abbildung 3: Avidin-Biotin-Methode</i>	51
<i>Abbildung 4: Antikörper-Färbung</i>	53
<i>Abbildung 5: Proerythroblast, Diff-Quick-Färbung</i>	68
<i>Abbildung 6: Basophiler Erythroblast, Giemsa Färbung</i>	68
<i>Abbildung 7: Thrombozytengruppe, Pappenheim-Färbung</i>	70
<i>Abbildung 8: Thrombozyten, Pappenheim-Färbung</i>	70
<i>Abbildung 9: Thrombozyten, Diff-Quick-Färbung</i>	70
<i>Abbildung 10: Thrombozyt, PAS-Färbung</i>	70
<i>Abbildung 11: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung</i>	71
<i>Abbildung 12: Großer Lymphozyt, Giemsa-Färbung</i>	71
<i>Abbildung 13: Kleiner Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung</i>	72
<i>Abbildung 14: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung</i>	72
<i>Abbildung 15: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung</i>	73
<i>Abbildung 16: Lymphozyt, Giemsa-Färbung</i>	73
<i>Abbildung 17: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung</i>	73
<i>Abbildung 18: Lymphozyt, PAS-Färbung</i>	73
<i>Abbildung 19: Myelozyt, Diff-Quick-Färbung</i>	75
<i>Abbildung 20: Neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung</i>	75
<i>Abbildung 21: Myelozyt, Pappenheim-Färbung</i>	75
<i>Abbildung 22: Neutrophiler Granulozyt, PAS-Färbung</i>	75
<i>Abbildung 23: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5</i>	76
<i>Abbildung 24: Neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung</i>	77
<i>Abbildung 25: Neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung</i>	77
<i>Abbildung 26: Segmentkerniger und stabkerniger neutrophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung</i>	77
<i>Abbildung 27: Neutrophiler Granulozyt, PAS- Färbung</i>	77
<i>Abbildung 28: Neutrophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5</i>	78
<i>Abbildung 29: Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung</i>	79
<i>Abbildung 30: Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung</i>	79
<i>Abbildung 31: Eosinophiler Granulozyt, Sirius-Red-Färbung</i>	79
<i>Abbildung 32: Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung</i>	80
<i>Abbildung 33: Eosinophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung</i>	80
<i>Abbildung 34: Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung</i>	81
<i>Abbildung 35: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung</i>	81
<i>Abbildung 36: Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung</i>	82
<i>Abbildung 37: Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung</i>	82
<i>Abbildung 38: Basophiler Granulozyt, PAS-Färbung</i>	82

Abbildung 39: Monozyt, Diff-Quick-Färbung.....	83
Abbildung 40: Monozyt, Giemsa-Färbung	83
Abbildung 41: Monozyt, Pappenheim-Färbung.....	83
Abbildung 42: Monozyt, Pappenheim-Färbung.....	83
Abbildung 43: Monozyt, Giemsa-Färbung	84
Abbildung 44: Monozyt, Pappenheim-Färbung.....	84
Abbildung 45: Monozyt, Pappenheim-Färbung.....	84
Abbildung 46: Erythroblast und Thrombozyt	85
Abbildung 47: Erythrozyten	86
Abbildung 48: Thrombozyten und Erythrozyten	87
Abbildung 49: Thrombozyten.....	88
Abbildung 50: Thrombozyten.....	89
Abbildung 51: Thrombozyten.....	89
Abbildung 52: Lymphozyt und Thrombozyten.....	90
Abbildung 53: Lymphozyt	91
Abbildung 54: Lymphozyt	92
Abbildung 55: Neutrophiler Myelozyt.....	93
Abbildung 56: Neutrophiler Granulozyt.....	93
Abbildung 57: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt.....	94
Abbildung 58: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt.....	95
Abbildung 59: Basophiler Granulozyt	96
Abbildung 60: Monozyt.....	97
Abbildung 61: Monozyt.....	98
Abbildung 62: Myelozyt, ConA-FITC	101
Abbildung 63: Lymphozyt und Thrombozyt, ConA-FITC	101
Abbildung 64: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyten, ConA-FITC	103
Abbildung 65: Lymphozyt, ConA-FITC	103
Abbildung 66: Erythroblast, LCA-FITC	105
Abbildung 67: Myelozyt, LCA-FITC.....	105
Abbildung 68: Eosinophiler Granulozyt, LCA-FITC.....	105
Abbildung 69: Neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC.....	105
Abbildung 70: Neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC.....	107
Abbildung 71: Segmentkerniger und stabkerniger neutrophiler Granulozyt, LCA-FITC	107
Abbildung 72: Eosinophiler Granulozyt, LCA-FITC.....	107
Abbildung 73: Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC	109
Abbildung 74: Myelozyt, PSA-FITC	109
Abbildung 75: Neutrophiler Granulozyt, PSA-FITC	111
Abbildung 76: Großer Lymphozyt, PSA-FITC.....	111
Abbildung 77: Kleiner Lymphozyt und Thrombozyt, PSA-FITC	111
Abbildung 78: Myelozyt, PNA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	115
Abbildung 79: Lymphozyten, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	115
Abbildung 80: Myelozyt und Erythroblast, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	115
Abbildung 81: Monoblast, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	115
Abbildung 82: Eosinophiler Granulozyt, PNA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase	118
Abbildung 83: Lymphozyt, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	118
Abbildung 84: Basophiler Granulozyt, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	118

Abbildung 85: Neutrophiler Granulozyt, PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	118
Abbildung 86: Erythroblast, RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	122
Abbildung 87: Erythroblasten, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	122
Abbildung 88: Myelozyt, RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	122
Abbildung 89: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	122
Abbildung 90: Lymphozyt, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	123
Abbildung 91: Monozyt, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	123
Abbildung 92: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase	126
Abbildung 93: Neutrophiler Granulozyt, RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	126
Abbildung 94: Eosinophiler Granulozyt, RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase	126
Abbildung 95: Erythroblasten, VAA-Biotin und Avidin-FITC.....	128
Abbildung 96: Myelozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC	128
Abbildung 97: Lymphozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC.....	128
Abbildung 98: Neutrophiler Granulozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC	130
Abbildung 99: Lymphozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC.....	130
Abbildung 100: Eosinophiler Granulozyt, VAA-Biotin und Avidin-FITC	130
Abbildung 101: Thrombozyten, VAA-Biotin und Avidin-FITC	130
Abbildung 102: Erythroblast, WGA-FITC.....	133
Abbildung 103: Neutrophiler Granulozyt, WGA-FITC	133
Abbildung 104: Eosinophiler Granulozyt, WGA-FITC	133
Abbildung 105: Lymphozyt, WGA-FITC.....	133
Abbildung 106: Neutrophiler Granulozyt, WGA-FITC	135
Abbildung 107: Lymphozyt, WGA-FITC.....	135
Abbildung 108: Erythroblast, WGAs-FITC	137
Abbildung 109: Lymphoblast, WGAs-FITC.....	137
Abbildung 110: Myelozyt, WGAs-FITC	137
Abbildung 111: Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC.....	137
Abbildung 112: Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC.....	139
Abbildung 113: Neutrophiler Granulozyt, WGAs-FITC.....	139
Abbildung 114: Lymphozyt, WGAs-FITC	139
Abbildung 115: Kleiner Lymphozyt, WGAs-FITC	139
Abbildung 116: Lymphozyt, GSL-1-FITC.....	142
Abbildung 117: Erythroblasten, GSL-1-FITC	142
Abbildung 118: Myelozyt, GSL-1-FITC.....	142
Abbildung 119: Neutrophiler Granulozyt, GSL-1-FITC.....	142
Abbildung 120: Neutrophiler Granulozyt, GSL-1-FITC.....	144
Abbildung 121: Lymphozyt, GSL-1-FITC.....	144
Abbildung 122: Lymphoblast und Myeloblast, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	146
Abbildung 123: Erythroblast, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	146
Abbildung 124: Neutrophiler Granulozyt, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	146
Abbildung 125: Eosinophiler Granulozyt, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	148
Abbildung 126: Neutrophile Granulozyten, DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	148
Abbildung 127: Myelozyt, SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	151
Abbildung 128: Erythroblast, SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	151
Abbildung 129: Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	151
Abbildung 130: Erythroblast, SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase	151

Abbildung 131: Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	154
Abbildung 132: Lymphozyt, SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	154
Abbildung 133: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase....	154
Abbildung 134: Neutrophiler Granulozyt, SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	154
Abbildung 135: Neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	157
Abbildung 136: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase....	157
Abbildung 137: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt, SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase....	159
Abbildung 138: Neutrophiler Granulozyt, SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	159
Abbildung 139: Lymphozyt und Erythroblast, SNA-Biotin und Avidin-FITC.....	161
Abbildung 140: Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC.....	161
Abbildung 141: Großer Lymphozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC.....	161
Abbildung 142: Myelozyt und Erythroblast, SNA-Biotin und Avidin-FITC.....	161
Abbildung 143: Lymphozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC.....	163
Abbildung 144: Neutrophiler Granulozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC.....	163
Abbildung 145: Eosinophiler Granulozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC.....	163
Abbildung 146: Monozyt, SNA-Biotin und Avidin-FITC.....	163
Abbildung 147: Myelozyt, UEA-1-FITC.....	165
Abbildung 148: Lymphoblast, UEA-1-FITC.....	165
Abbildung 149: Neutrophiler Granulozyt, UEA-1-FITC.....	167
Abbildung 150: Neutrophiler Granulozyt, UEA-1-FITC.....	167
Abbildung 151: Lymphozyt und Myelozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC.....	170
Abbildung 152: Neutrophiler Granulozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC.....	170
Abbildung 153: Neutrophiler Granulozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC.....	170
Abbildung 154: Erythroblast oder Lymphoblast, MAA-Biotin und Avidin-FITC.....	170
Abbildung 155: Neutrophiler Granulozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC.....	172
Abbildung 156: Lymphozyt, MAA-Biotin und Avidin-FITC.....	172
Abbildung 157: Neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC.....	174
Abbildung 158: Myelozyt, PHA-E-FITC.....	174
Abbildung 159: Lymphozyt, PHA-E-FITC.....	174
Abbildung 160: Myelozyt und Erythroblast, PHA-E-FITC.....	174
Abbildung 161: Neutrophiler Granulozyt, PHA-E-FITC.....	176
Abbildung 162: Lymphozyt, PHA-E-FITC.....	176
Abbildung 163: Monozyt, PHA-E-FITC.....	176
Abbildung 164: Myelozyt, PHA-L-FITC.....	178
Abbildung 165: Lymphozyt, PHA-L-FITC.....	178
Abbildung 166: Myelozyt, PHA-L-FITC.....	178
Abbildung 167: Erythroblast, PHA-L-FITC.....	178
Abbildung 168: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, PHA-L-FITC.....	180
Abbildung 169: Lymphozyt, PHA-L-FITC.....	180
Abbildung 170: Neutrophile Granulozyten, PHA-L-FITC.....	180
Abbildung 171: Neutrophiler Granulozyt, CD4-FITC.....	183
Abbildung 172: Neutrophiler Granulozyt, CD4-FITC.....	185
Abbildung 173: Lymphozyt, CD4-FITC.....	185
Abbildung 174: Neutrophiler Granulozyt, CD8-FITC.....	187
Abbildung 175: Lymphozyt, CD8-FITC.....	187
Abbildung 176: Neutrophiler Granulozyt, CD8-FITC.....	189

Abbildung 177: Lymphozyt, CD8-FITC.....	189
Abbildung 178: Erythroblast, Phalloidin-TRITC	191
Abbildung 179: Lymphozyt, Phalloidin-TRITC	191
Abbildung 180: Neutrophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC.....	191
Abbildung 181: Myelozyt, Phalloidin-TRITC	191
Abbildung 182: Lymphozyt und Thrombozyt, Phalloidin-TRITC.....	193
Abbildung 183: Lymphozyt, Phalloidin-TRITC	193
Abbildung 184: Neutrophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC.....	193
Abbildung 185: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt, Phalloidin-TRITC.....	193
Abbildung 186: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, fixiert.....	195
Abbildung 187: Neutrophile Granulozyten, Nachweis von Myosin, 1:250, fixiert.....	195
Abbildung 188: Lymphoblast und Myelozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, unfixiert.....	195
Abbildung 189: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, unfixiert.....	195
Abbildung 190: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, fixiert.....	196
Abbildung 191: Monozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, fixiert.....	196
Abbildung 192: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, unfixiert.....	196
Abbildung 193: Erythroblast, Nachweis von Myosin, 1:500, unfixiert.....	196
Abbildung 194: Lymphozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, unfixiert	198
Abbildung 195: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, fixiert.....	198
Abbildung 196: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, fixiert.....	198
Abbildung 197: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:250, unfixiert.....	198
Abbildung 198: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, unfixiert.....	199
Abbildung 199: Neutrophiler Granulozyt und Thrombozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, unfixiert.....	199
Abbildung 200: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, fixiert.....	199
Abbildung 201: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Myosin, 1:500, fixiert.....	199
Abbildung 202: Lymphoblasten, Nachweis von Vimentin, unfixiert.....	201
Abbildung 203: Lymphozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert.....	201
Abbildung 204: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert.....	201
Abbildung 205: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert.....	201
Abbildung 206: Neutrophile Granulozyten, Nachweis von Vimentin, fixiert.....	203
Abbildung 207: Lymphozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert.....	203
Abbildung 208: Monozyt, Nachweis von Vimentin, fixiert.....	203
Abbildung 209: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Vimentin, unfixiert.....	203
Abbildung 210: Myelozyt, Nachweis von Tubulin.....	205
Abbildung 211: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Tubulin	205
Abbildung 212: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis von Tubulin	205
Abbildung 213: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Tubulin	207
Abbildung 214: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis von Tubulin	207
Abbildung 215: Thrombozyt, Nachweis von Tubulin.....	207
Abbildung 216: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Peroxidase	208
Abbildung 217: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Peroxidase	208
Abbildung 218: Eosinophiler Promyelozyt, Nachweis der Peroxidase	208
Abbildung 219: Erythroblast, Nachweis der Peroxidase.....	208
Abbildung 220: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Peroxidase	209
Abbildung 221: Neutrophiler Granulozyt und Lymphozyt, Nachweis der Peroxidase.....	209
Abbildung 222: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Peroxidase	209

Abbildung 223: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase.....	210
Abbildung 224: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase	210
Abbildung 225: Lymphozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase.....	210
Abbildung 226: Erythroblast, Nachweis der alkalischen Phosphatase	210
Abbildung 227: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase.....	211
Abbildung 228: Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase	211
Abbildung 229: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der alkalischen Phosphatase.....	211
Abbildung 230: Lymphozyt, Nachweis der sauren Phosphatase	212
Abbildung 231: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der sauren Phosphatase.....	212
Abbildung 232: Großer Lymphozyt, Nachweis der sauren Phosphatase	213
Abbildung 233: Lymphozyt, Nachweis der sauren Phosphatase	213
Abbildung 234: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der sauren Phosphatase.....	213
Abbildung 235: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der sauren Phosphatase.....	213
Abbildung 236: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase.....	215
Abbildung 237: Basophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase.....	215
Abbildung 238: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase.....	215
Abbildung 239: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase.....	216
Abbildung 240: Neutrophile Granulozyten, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase.....	216
Abbildung 241: Lymphozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase	216
Abbildung 242: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase.....	216
Abbildung 243: Monozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase.....	218
Abbildung 244: Lymphozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase	218
Abbildung 245: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase	218
Abbildung 246: Monozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase.....	219
Abbildung 247: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase.....	219
Abbildung 248: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase.....	219
Abbildung 249: Großer Lymphozyt, Nachweis der α -Naphthyl-Acetat-Esterase.....	219
Abbildung 250: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase	221
Abbildung 251: Monozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase.....	221
Abbildung 252: Eosinophiler Promyelozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase.....	221
Abbildung 253: Neutrophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase.....	222
Abbildung 254: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase.....	222
Abbildung 255: Monozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase.....	222
Abbildung 256: Lymphozyt, Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase	222
Abbildung 257: Lymphozyt, Nachweis der β -Glucuronidase	223
Abbildung 258: Monozyt, Nachweis der β -Glucuronidase.....	223
Abbildung 259: Monozyt, Nachweis der β -Glucuronidase.....	224
Abbildung 260: Lymphozyt, Nachweis der β -Glucuronidase	224
Abbildung 261: Lymphozyt, Nachweis der β -Glucuronidase	224
Abbildung 262: Eosinophiler Granulozyt, Nachweis der β -Glucuronidase.....	224

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Physiologische Blutwerte des neugeborenen Kalbes vom Zeitpunkt der Geburt bis 24 Stunden danach</i>	5
<i>Tabelle 2: Physiologische Werte des Fetus am Tage 100-120 und 231-Geburt</i>	6
<i>Tabelle 3: Blutgruppen beim Rind</i>	7
<i>Tabelle 4: Übersicht der Lektine</i>	23
<i>Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Kälber</i>	39
<i>Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Kälber für die Enzymhistochemie</i>	40
<i>Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Feten</i>	40
<i>Tabelle 8: Übersicht der verwendeten FITC-markierten Pflanzenlektine</i>	47
<i>Tabelle 9: Verwendete Hemmzucker</i>	49
<i>Tabelle 10: Übersicht der verwendeten biotinylierten Lektine, modifiziert nach Gabius und Habermann</i>	52
<i>Tabelle 11: Verwendete Antikörper</i>	53
<i>Tabelle 12: Übersicht der Blutbilder der Kälber</i>	66
<i>Tabelle 13: Übersicht der Blutbilder der Feten</i>	67
<i>Tabelle 14: Übersichtsfärbungen Erythrozytenvorstufen, Fetus</i>	68
<i>Tabelle 15: Übersichtsfärbungen Erythrozyten, Kalb</i>	69
<i>Tabelle 16: Übersichtsfärbungen Thrombozyten, Fetus und Kalb</i>	69
<i>Tabelle 17: Übersichtsfärbungen Lymphozyten und Lymphoblasten</i>	71
<i>Tabelle 18: Übersichtsfärbungen Lymphozyten, Kalb</i>	72
<i>Tabelle 19: PAS-Färbung, Kalb</i>	72
<i>Tabelle 20: Übersichtsfärbungen neutrophiler Granulozyten und Myelozyten, Fetus</i>	74
<i>Tabelle 21: PAS-Färbung und Alcianblau-Färbung neutrophile Granulozyten, Fetus</i>	74
<i>Tabelle 22: Übersichtsfärbungen neutrophile Granulozyten, Kalb</i>	76
<i>Tabelle 23: PAS-Färbung neutrophiler Granulozyt, Kalb</i>	76
<i>Tabelle 24: Übersichtsfärbung eosinophile Granulozyten, Fetus</i>	78
<i>Tabelle 25: Übersichtsfärbungen eosinophile Granulozyten, Kalb</i>	80
<i>Tabelle 26: Übersichtsfärbungen basophile Granulozyten, Fetus</i>	80
<i>Tabelle 27: PAS-Färbung basophiler Granulozyt, Fetus</i>	81
<i>Tabelle 28: Übersichtsfärbungen basophile Granulozyten, Kalb</i>	81
<i>Tabelle 29: PAS-Färbung basophile Granulozyten, Kalb</i>	81
<i>Tabelle 30: Übersichtsfärbungen Monozyten und Monoblasten, Fetus</i>	83
<i>Tabelle 31: Übersichtsfärbungen Monozyten, Kalb</i>	84
<i>Tabelle 32: Auswertung Lektin: ConA-FITC, Fetus</i>	100
<i>Tabelle 33: Auswertung Lektin: ConA-FITC, Kalb</i>	102
<i>Tabelle 34: Auswertung Lektine: LCA-FITC, Fetus</i>	104
<i>Tabelle 35: Auswertung Lektine: LCA-FITC, Kalb</i>	106
<i>Tabelle 36: Auswertung Lektine: PSA-FITC, Fetus</i>	108
<i>Tabelle 37: Auswertung Lektine: PSA-FITC, Kalb</i>	110
<i>Tabelle 38: Auswertung Lektine: PNA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus</i>	113
<i>Tabelle 39: Auswertung Lektine: PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus</i>	114
<i>Tabelle 40: Auswertung Lektine: PNA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb</i>	116
<i>Tabelle 41: Auswertung Lektine: PNA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb</i>	117
<i>Tabelle 42: Auswertung Lektine: RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus</i>	120
<i>Tabelle 43: Auswertung Lektine: RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus</i>	121

Tabelle 44: Auswertung Lektine: RCA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb.....	124
Tabelle 45: Auswertung Lektine: RCA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb.....	125
Tabelle 46: Auswertung Lektine: VAA-Biotin, Fetus.....	127
Tabelle 47: Auswertung Lektine: VAA-Biotin, Kalb.....	129
Tabelle 48: Auswertung Lektine: WGA-FITC, Fetus.....	132
Tabelle 49: Auswertung Lektine: WGA-FITC, Kalb.....	134
Tabelle 50: Auswertung Lektine: WGAs-FITC, Fetus.....	136
Tabelle 51: Auswertung Lektine: WGAs-FITC, Kalb.....	138
Tabelle 52: Auswertung Lektine: GSL-1-FITC, Fetus.....	141
Tabelle 53: Auswertung Lektine: GSL-1-FITC, Kalb.....	143
Tabelle 54: Auswertung Lektine: DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus.....	145
Tabelle 55: Auswertung Lektine: DBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb.....	147
Tabelle 56: Auswertung Lektine: SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus.....	149
Tabelle 57: Auswertung Lektine: SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus.....	150
Tabelle 58: Auswertung Lektine: SJA-FITC ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb.....	152
Tabelle 59: Auswertung Lektine: SJA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb.....	153
Tabelle 60: Auswertung Lektine: SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Fetus.....	156
Tabelle 61: Auswertung Lektine: SBA-FITC nach Vorbehandlung mit Neuraminidase, Kalb.....	158
Tabelle 62: Auswertung Lektine: SNA-Biotin, Fetus.....	160
Tabelle 63: Auswertung Lektine: SNA-Biotin, Kalb.....	162
Tabelle 64: Auswertung Lektine: UEA-1-FITC, Fetus.....	164
Tabelle 65: Auswertung Lektine: UEA-1-FITC, Kalb.....	166
Tabelle 66: Auswertung Lektine: MAA-Biotin, Fetus.....	169
Tabelle 67: Auswertung Lektine: MAA-Biotin, Kalb.....	171
Tabelle 68: Auswertung Lektine: PHA-E-FITC, Fetus.....	173
Tabelle 69: Auswertung Lektine: PHA-E-FITC, Kalb.....	175
Tabelle 70: Auswertung Lektine: PHA-L-FITC, Fetus.....	177
Tabelle 71: Auswertung Lektine: PHA-L-FITC, Kalb.....	179
Tabelle 72: Auswertung Antikörper: CD4-FITC, Fetus.....	182
Tabelle 73: Auswertung Antikörper: CD4-FITC, Kalb.....	184
Tabelle 74: Auswertung Antikörper: CD8-FITC, Fetus.....	186
Tabelle 75: Auswertung Antikörper: CD8-FITC, Kalb.....	188
Tabelle 76: Auswertung Zytoskelett: Phalloidin-TRITC, Fetus.....	190
Tabelle 77: Auswertung Zytoskelett: Phalloidin-TRITC, Kalb.....	192
Tabelle 78: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Myosin, Fetus.....	194
Tabelle 79: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Myosin, Kalb.....	197
Tabelle 80: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Vimentin, Fetus.....	200
Tabelle 81: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Vimentin, Kalb.....	202
Tabelle 82: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Tubulin, Fetus.....	204
Tabelle 83: Auswertung Zytoskelett: Nachweis von Tubulin, Kalb.....	206
Tabelle 84: Auswertung Enzymhistochemie: Peroxidase, Fetus.....	208
Tabelle 85: Auswertung Enzymhistochemie: Peroxidase, Kalb.....	209
Tabelle 86: Auswertung Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase, Fetus.....	210
Tabelle 87: Auswertung Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase, Kalb.....	211
Tabelle 88: Auswertung Enzymhistochemie: Saure Phosphatase, Fetus.....	212
Tabelle 89: Auswertung Enzymhistochemie: Saure Phosphatase, Kalb.....	212

<i>Tabelle 90: Auswertung Enzymhistochemie: Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase, Fetus</i>	<i>214</i>
<i>Tabelle 91: Auswertung Enzymhistochemie: Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase, Kalb</i>	<i>216</i>
<i>Tabelle 92: Auswertung Enzymhistochemie: α-Naphthyl-Acetat-Esterase, Fetus</i>	<i>217</i>
<i>Tabelle 93: Auswertung Enzymhistochemie: α-Naphthyl-Acetat-Esterase, Kalb</i>	<i>219</i>
<i>Tabelle 94: Auswertung Enzymhistochemie: Naphthol-AS-Acetat-Esterase, Fetus</i>	<i>220</i>
<i>Tabelle 95: Auswertung Enzymhistochemie: Naphthol-AS-Acetat-Esterase, Kalb</i>	<i>222</i>
<i>Tabelle 96: Auswertung Enzymhistochemie: β-Glucuronidase, Fetus</i>	<i>223</i>
<i>Tabelle 97: Auswertung Enzymhistochemie: β-Glucuronidase, Kalb</i>	<i>224</i>
<i>Tabelle 98: Ergebnisse Enzymhistochemie</i>	<i>225</i>

3. Verzeichnis der Gebrauchslösungen

LICHTMIKROSKOPIE

Herstellung der verdünnten Giemsa-Lösung:

Es wird eine Verdünnung von 1:20 hergestellt. Hierzu wird 1 ml der Giemsa-Stammlösung in 20 ml Aqua dest. gelöst.

Herstellung der Alcianblau-Färbelösung pH 2,5:

In der angerührten 3%igen Essigsäurelösung werden 5 g Alcianblau 8 GX Certistain® (MERCK, Darmstadt) unter Rühren gelöst.

Herstellung der Alcianblau-Färbelösung pH 1:

5 g Alcianblau 8 GX Certistain® (MERCK, Darmstadt) wurden in 500 ml 0,1 N Salzsäure gelöst.

Herstellung der Kernechtrotlösung:

10 g Aluminiumsulfat werden in 100 ml Aqua dest. gelöst. Nach Erhitzen der Lösung wurden 0,1 g Kernechtrot Certistain® (MERCK, Darmstadt) eingerührt, bis sich der Farbstoff gelöst hat. Nach abkühlen der Lösung wurde sie in eine Küvette filtriert.

Herstellung der Toluidinblau-Färbelösung:

1 g Toluidinblau wird in 100 ml Methanol gelöst.

Herstellung der Sirius Red-Färbelösung:

500 mg Sirius Red werden in 45 ml Aqua bidest. und 50 ml Ethanol absolut gelöst. Danach werden 1 ml NaOH 1% und 4 ml NaCl 20% hinzugegeben und in eine Küvette filtriert.

Herstellung des SO₂ Wassers:

Zuerst werden 3 ml konzentrierte Salzsäure mit 27 ml Aqua dest. vermischt. Danach werden 3 g Natriumdisulfid in 30 ml Aqua dest. gelöst. Die beiden Flüssigkeiten werden vermischt und in 600 ml Leitungswasser gegeben. Das hergestellte SO₂ Wasser wird auf 3 Küvetten aufgeteilt.

Herstellung der wässrigen Perjodsäurelösung:

1 g Perjodsäurepulver wird in 200 ml Aqua dest. gelöst

ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Herstellung der Bleicitratlösung nach Reynolds:

Es wird zuerst Natriumcitrat Stock hergestellt indem man 35,7 g Natriumcitrat $\text{Na}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$ (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. löst. Dann wird Bleinitrat Stock hergestellt indem man 33,1 g Bleinitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. löst. Dann werden 3 ml des Natriumcitrat Stock, 2 ml Bleinitrat Stock, 16 ml Aqua dest., 4 ml NaOH (1M) (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. gegeben und gemischt.

Herstellung des Cacodylat- Puffer:

8,56 g Cacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England) werden in 200 ml Aqua dest. gelöst. Für einen Puffer mit 0,2 M und pH 7,2 werden 50 ml dieser Lösung mit 4,2 ml HCl (0,2 M) (MERCK, Darmstadt) und 100 ml Aqua dest. gemischt. Für 0,1 M und pH 7,2 werden 50 ml des Cacodylat- Puffer 0,2 M mit pH 7,2 und 50 ml Aqua dest. gemischt.

Herstellung des Epon:

16 ml Poly/bed 812 (Polyscience), 10 ml DDSA (Polyscience), 9 ml NMA (Polyscience) und 0,3- 0,5 ml DMP- 30 (Polyscience) werden gemischt. Alle Reagenzien stammen von POLYSCIENCES INC., Warrington, USA.

Herstellung der Fixierlösung nach Karnovsky:

1. 10 g Paraformaldehyd (MERCK, Darmstadt) werden in 100 ml Aqua dest. gelöst und 6 Tropfen NaOH (0,1 M) zugegeben.
2. Die Stammlösung wird hergestellt indem man 20 ml der Lösung 1 mit 50 ml Cacodylat-Puffer (0,2 M) mischt und 0,05 g Kalziumchlorid, wasserfrei (Serva, Heidelberg) zugibt.
3. Die Gebrauchslösung erhält man indem man 10 ml der Stammlösung mit 1037 ml 2,5% iger Glutaraldehyd (AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England) mischt.

Herstellung der Kontrastierlösung:

Die Osmiumtetroxid-Lösung 2% wird durch Mischen von 2 ml 4%igen Osmiumtetroxid (Polyscience) mit 2 ml Cacodylat- Puffer (0,1 M) hergestellt. Die Kaliumferrocyanid- Lösung 3% wird durch Mischen von 0,3 g Kaliumferrocyanid (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen) mit 10 ml Cacodylat-Puffer (0,1 M) hergestellt. Anschließend werden jeweil 4 ml der beiden Lösungen gemischt.

GLYKOHISTOCHEMIE

Herstellung des PBS-Puffer:

42,5 g NaCl, 6,35 g Na₂HPO₄ 2H₂O(Di-Na-hydrogenphosphat-dihydrat) und 1,95 g NaH₂PO₄ H₂O (Natrium-hydrogenphosphat-monohydrat) werden in 5 Litern Aqua demin. gelöst. Danach wird der pH auf 7,4-7,6 eingestellt.

Herstellung der FITC-markierten Lektinlösung:

In einem schwarzen Eppendorfgefäß werden 1ml PBS und 5 µl Lektin miteinander vermischt. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Licht an die Lösung kommt.

Herstellung der Lektin-Hemmstoff-Lösungen:

1. ConA, LCA und PSA: in 1 ml PBS werden 5 µl Lektin und 84,8 g Hemmzucker gelöst
2. WGA: es wird eine Lösung im Verhältnis von Lektinlösung zu Hemmzucker von 1:4 hergestellt
3. PHA-E: Zu 1 ml der hergestellten Lektinlösung werden 24 µl der Essigsäure gegeben

Herstellung des Natrium-Acetatpuffers pH 5,5:

13,6 g des Natrium-Acetat werden in 1l Aqua demin. gelöst. Dann wird der pH-Wert mit 10% iger Essigsäure auf 5,5 eingestellt.

Herstellung des Natrium-Acetatpuffers mit Calciumchlorid pH 5,0:

8,2 g Natrium-Acetat und 0,294 g Calciumchlorid werden in 1l Aqua demin. gelöst. Der pH wird mit 1M HCl auf pH 5,0 eingestellt und alles auf 37°C bis 40°C erhitzt. Später wird zu 1 ml dieser Lösung 3 µl der Neuraminidase gegeben.

Herstellung der Lektinlösung für MAA-1 und SNA:

Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt jeweils 10 µg/ml. 5 µl der Lektinlösung werden zu 1 ml PBS in ein weißes Eppendorfgefäß gegeben. Dieses wird gut vermischt.

Herstellung der Lektinlösung für VAA:

Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt 2 µg/ml. In 1 ml PBS werden 20 µl der Lektinlösung gelöst.

Herstellung der Streptavidin-FITC-Lösung für Lektine:

In einem schwarzen Eppendorfgefäß werden 3 µl Streptavidin-FITC in 1497 µl PBS gelöst. Wichtig ist hierbei, dass kein Licht an die Lösung kommt.

IMMUNZYTOCHEMIE

Herstellung der Antikörperlösung für CD 8:

5 µl der AK-Lösung wurden mit 995 µl Antikörper-Diluent (DAKO, Hamburg) in einem weißen Eppendorfgefäß vermischt und bis zum Verbrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

Herstellung der Antikörperlösung für CD 4:

10 µl der AK-Lösung wurden mit 990 µl AK-Diluent (DAKO, Hamburg) vermischt.

Herstellung der Sekundärantikörperlösung für CD 8 und CD 4:

50 µl der Anti-Maus-FITC Lösung wurden mit 950 µl PBS vermischt.

ZYTOSKELETT

Herstellung der Phalloidin-TRITC-Lösung:

Die Phalloidin-TRITC-DMSO-Lösung ist in einer Konzentration von 500 µg/ml vorhanden. In ein schwarzes Eppendorfgefäß werden 3 µl dieser Lösung zu 1497 µl Antibody Diluent gegeben und gemischt.

Herstellung der Myosin-Lösung mit der Konzentration 1:500 :

3 µl der Myosin-Lösung werden in 1497 µl Antibody-Diluent gelöst.

Herstellung der Myosin-Lösung mit der Konzentration 1:250 :

6 µl der Myosin-Lösung werden in 1494 µl Antibody-Diluent gelöst.

Herstellung des Sekundärantikörpers für Myosin:

5 µl des Anti-Kaninchen-FITC werden in einem schwarzen Eppendorfgefäß in 1495 µl PBS gelöst und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Herstellung des Primär-AK Vimentin:

Es wird eine Verdünnung von 1:500 hergestellt. 3µl der Vimentin-Lösung werden mit 1497 µl Antibody-Diluent gemischt.

Herstellung des Sekundär-AK Vimentin und Tubulin:

Es wird eine Verdünnung von 1:20 hergestellt. 75 µl des Sekundär-AK werden mit 1425 µl PBS gemischt.

Herstellung Primär-AK Panzytokeratin:

15 µl des Primär- AK werden mit 1485 µl Antibody Diluent vermischt

Herstellung Primär-AK Tubulin:

Der Primär AK ist in einer Konzentration von 2 µg/ml vorhanden. 10 µl des Primär-AK werden mit 1000 µl Antibody Diluent vermischt

ENZYMISTOCHEMIE

Herstellung der Färbelösung für Peroxidase:

1. Eine Flasche 4-Chlor-1-Naphthol in 15 ml Ethanol lösen und in eine Färbeküvette geben.
2. Unter Rühren 45 ml Aqua dest., 10 Tropfen Tris (hydroxymethyl-aminomethan)-HCl-Puffer und 2 Tropfen Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugeben.

Herstellung der Färbelösung für Alkalische Phosphatase:

LÖSUNG A: 4 gestrichene Messlöffel Tris (hydroxymethyl)-aminomethan werden in 100 ml destilliertes Wasser gegeben.

LÖSUNG B: Eine Flasche 1-Naphthylphosphat-Natriumsalz werden in 15 ml der Lösung A gegeben.

LÖSUNG C: 1 Flasche Variamin[®]-Blausalz B wird in 45 ml der Lösung A gegeben.

Lösung C wird nun zu Lösung B in eine Färbeküvette gegeben.

Herstellung der Färbelösung für Saure Phosphatase:

1. 2 ml Naphthol AS-OL Phosphorsäure und 3 gestrichene Messlöffel Natriumacetat werden in einen Erlenmeyerkolben mit 60 ml Aqua dest. gegeben.
2. In einem Eppendorfgefäß werden 4-5 Tropfen Pararosanilin-HCl-Lösung (2N) mit 4-5 Tropfen Nitritlösung gemischt
3. Die Mischung aus dem Eppendorfgefäß wird nach 1 Minute zu der Mischung im Erlenmeyerkolben gegeben
4. Die erstellte Lösung wird nun in eine Küvette filtriert

Herstellung des 10%igen Methanol-Formol:

9 Teile Methanol (MERCK, Darmstadt) wird zu einem Teil Formaldehyd 37% (ROTH, Karlsruhe) gegeben.

Herstellung der Färbelösung für Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase:

40 mg Naphthol-AS-D-Chloracetat werden in 4 ml Aceton gelöst und danach tropfenweise der Pufferlösung hinzugefügt. Dann werden 100 mg Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride salt) in der Pufferlösung gelöst. Dies wird nun in eine Küvette filtriert. Die Färbelösung wird in 3 verschiedenen pH-Werten hergestellt.

Herstellung des Phosphatpuffers:

4,45 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (MERCK, Darmstadt) werden in 250 ml Aqua dest. gelöst. Danach werden in einem 2ten Gefäß 3,45 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (MERCK, Darmstadt) in 250 ml Aqua dest. gelöst. Die beiden die erste Lösung wird mit der zweiten Lösung so lange titriert bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist.

Herstellung der Färbelösung für α -Naphthyl-Acetat-Esterase:

1. Zu 0,2 ml Aceton werden 10 mg 2-Naphthyl-Acetat gegeben
2. 40 ml 0,1M Phosphatpuffer werden zugegeben und gerührt bis die Trübung verschwindet
3. 50 mg Fast Blue Salt werden zugegeben und geschüttelt
4. Die Lösung wird in eine Küvette filtriert

Herstellung der Färbelösung für Naphthol-AS-Acetat-Esterase:

1. 8 mg Naphthol-AS-Acetat werden in 1 ml Aceton gelöst
2. Diese Lösung wird tropfenweise unter starkem Schütteln zu 80 ml 0,1M Phosphatpuffer gegeben
3. Danach werden in dieser Lösung 160 mg Fast Blue BB Salt gelöst
4. Dies wird nun in eine Küvette filtriert

Herstellung des hexazotierten Pararosanilin:

400 mg Pararosanilinchlorid werden in 8 ml Aqua dest. gelöst. Dann werden 2 ml konzentriertes HCl zugesetzt. Danach wird eine 4%ige wässrige Natriumnitritlösung hergestellt indem man 4 g Natriumnitrit in 100 ml Aqua dest. löst. Diese beiden Lösungen werden kurz vor der Verwendung zu gleichen Teilen gemischt wobei sich eine gelbe Färbung einstellt.

Herstellung der 0,2 M Natriumacetatlösung:

1,312 g Natriumacetat wasserfrei (MERCK, Darmstadt) werden in 80 ml Aqua dest. gelöst.

Herstellung der Färbelösung für β -Glucuronidase:

Es werden 19 ml des 0,2M Natriumacetats und 1 ml hexazotiertes Pararosanilin gemischt und mit Hilfe von NaOH und HCl auf einen pH von 5 eingestellt. Dann werden 8 mg Naphthol AS-BI β -D-Glucuronid in 1 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Die beiden Lösungen werden vermischt und in einen Erlenmeyerkolben gegeben.

X. DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil F. Sinowatz für die Möglichkeit zu dieser Dissertation, für die freundliche Unterstützung und die gute Betreuung danken. Ich bedanke mich ebenso bei allen Mitarbeitern des histologischen Instituts, insbesondere bei Frau Neumüller, Frau Scholz und Frau Rußmeier, die mir immer hilfsbereit zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Doktorandenkollegin Frau K. Merten bedanken, die mir mit ihrem Ehrgeiz und ihrer Hilfe stets unermüdbar zur Seite stand. Ebenso danke ich Frau J. Scholz und Herrn A. Weißmüller für die lustigen Stunden im Labor.

Ein großes Dankeschön gilt der Familie Kirmayr, die mich großartig bei der Probennahme unterstützt hat und einige Stunden mit mir in ihrem Stall verbracht hat. Ohne sie wäre diese Arbeit nur schwer zu verwirklichen gewesen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Christian für seine tatkräftige Unterstützung, seine tägliche Aufmunterungen und seine Stunden am Computer die er für die Formatierung dieser Arbeit aufgebracht hat.

Dem Team der Tierarztpraxis Fellner: Christine, Flo, Manu und Judith danke ich für die Hilfe bei der Bearbeitung und Auswertung der Blutbilder.

Ein sehr großer Dank gilt Hermann, der mir so unermüdlich mit den Korrekturen half.

Meinen Schwestern, Neffen und Schwägern danke ich für Aufheiterungen, Gespräche, Unterkunft, Verpflegung und alles was sie in dieser Zeit für mich getan haben.

Meine Eltern möchte ich von ganzen Herzen für die Möglichkeit zu diesem Studium und zu dieser Arbeit danken. Sie sind immer für mich da, haben stets ein offenes Ohr und sind in jeder Situation eine unschätzbar große Hilfe.