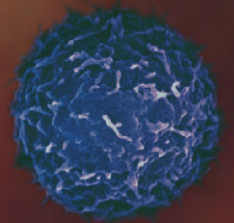


**DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN  
DER LEUKOZYTENPHÄNOTYPEN AUS  
DEM BLUT VON SCHWEINEN UNTER  
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG  
POSTOPERATIVER VERÄNDERUNGEN**



**ANDREA GEIST**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin und klinische  
Laboratoriumsdiagnostik der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Andreas Moritz

und

der Zentralen Klinischen Forschung der Universitätsklinik  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Jörg Haberstroh

**Durchflusszytometrische Untersuchungen der Leukozytenphänotypen  
aus dem Blut von Schweinen unter besonderer  
Berücksichtigung postoperativer Veränderungen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Andrea Geist**

Tierärztin aus Mannheim-Neckarau

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. Moritz

Prof. Dr. Haberstroh

Tag der Disputation:

11.04.2006

*Meinen Eltern und Uwe gewidmet*

# **Inhalt**

|          |                                                                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                                                                | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Literaturübersicht</b>                                                                        | <b>2</b>  |
| 2.1      | <i>Zelluläre Elemente des Immunsystems</i>                                                       | 2         |
| 2.2      | <i>Expression von Leukozyten-Marker</i>                                                          | 4         |
| 2.3      | <i>Funktionsweise des FACS</i>                                                                   | 8         |
| 2.4      | <i>Heterogenität des Immunsystems</i>                                                            | 11        |
| 2.5      | <i>Veränderungen des Immunsystems unter dem Einfluss von<br/>Narkose und operativem Eingriff</i> | 19        |
| 2.6      | <i>Das Immunsystem des Schweines</i>                                                             | 23        |
| <b>3</b> | <b>Fragestellung</b>                                                                             | <b>31</b> |
| <b>4</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                     | <b>32</b> |
| 4.1      | <i>Studienaufbau und Gruppeneinteilung</i>                                                       | 32        |
| 4.2      | <i>Laboraüstung, Reagenzien und Antikörper</i>                                                   | 33        |
| 4.3      | <i>Anästhesie und Katheterimplantation</i>                                                       | 33        |
| 4.3.1    | Anästhesiezubehör und Geräte                                                                     | 33        |
| 4.3.2    | Verbrauchsmaterial                                                                               | 34        |
| 4.3.3    | Pharmaka                                                                                         | 35        |
| 4.4      | <i>Datenverwaltung und Statistik</i>                                                             | 36        |

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.5 Versuchstiere</b>                                                            | <b>36</b> |
| 4.5.1 Schweine                                                                      | 36        |
| 4.5.2 Haltungsbedingungen                                                           | 37        |
| <b>4.6 Versuchsprotokoll</b>                                                        | <b>37</b> |
| 4.6.1 Präoperative Phase                                                            | 37        |
| 4.6.2 Prämedikation und Operationsvorbereitung                                      | 37        |
| 4.6.3 Aufrechterhaltung der Anästhesie                                              | 38        |
| 4.6.4 Katheterimplantation                                                          | 38        |
| 4.6.5 Blutprobengewinnung                                                           | 39        |
| 4.6.6 Vorgehen bei der Versuchsgruppe zur Untersuchung postoperativer Veränderungen | 39        |
| 4.6.7 Postoperative Versorgung                                                      | 39        |
| 4.6.8 Versorgung im Stall                                                           | 40        |
| 4.6.9 Postoperative Blutprobenentnahme                                              | 40        |
| <b>4.7 Probenaufbereitung</b>                                                       | <b>40</b> |
| 4.7.1 Blutbild                                                                      | 40        |
| 4.7.2 Durchflusszytometrie                                                          | 41        |
| <b>4.8 Datenverarbeitung und Statistik</b>                                          | <b>41</b> |
| 4.8.1 Statistische Auswertung                                                       | 41        |
| 4.8.2 Darstellung der Ergebnisse                                                    | 42        |

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5 Ergebnisse</b>                                                                 | <b>43</b> |
| <b>5.1 Gesamtgruppe</b>                                                             | <b>43</b> |
| <b>5.1.1 Blutbild und Differentialblutbild</b>                                      | <b>43</b> |
| <b>5.1.2 Leukozytenphänotypisierung</b>                                             | <b>44</b> |
| 5.1.2.1 SWC3a positive Leukozyten                                                   | 44        |
| 5.1.2.2 SWC3a positive Monozyten                                                    | 45        |
| 5.1.2.3 SLA-DR positive Lymphozyten                                                 | 45        |
| 5.1.2.4 SLA-DR positive Monozyten                                                   | 46        |
| 5.1.2.5 CD1 positive Lymphozyten                                                    | 47        |
| 5.1.2.6 CD2 positive Lymphozyten                                                    | 48        |
| 5.1.2.7 CD4 positive Lymphozyten                                                    | 48        |
| 5.1.2.8 CD8 positive Lymphozyten                                                    | 49        |
| 5.1.2.9 Das Verhältnis CD4 zu CD8 positive Lymphozyten<br>(Ratio CD4/CD8)           | 50        |
| 5.1.2.10 Zusammenfassung der Gesamtgruppe                                           | 50        |
| <b>5.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb der Gesamtgruppe</b>           | <b>51</b> |
| <b>5.2.1 Blutbild und Differentialblutbild</b>                                      | <b>51</b> |
| <b>5.2.2 Leukozytenphänotypisierung</b>                                             | <b>51</b> |
| 5.2.2.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den SWC3a positiven<br>Leukozyten   | 51        |
| 5.2.2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den SWC3a positiven<br>Monozyten    | 52        |
| 5.2.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den SLA-DR positiven<br>Lymphozyten | 53        |
| 5.2.2.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den SLA-DR positiven<br>Monozyten   | 54        |



|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.2.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den CD1 positiven Lymphozyten                                    | 55        |
| 5.2.2.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den CD2 positiven Lymphozyten                                    | 56        |
| 5.2.2.7 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den CD4 positiven Lymphozyten                                    | 57        |
| 5.2.2.8 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den CD8 positiven Lymphozyten                                    | 58        |
| 5.2.2.9 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der CD4/CD8 Ratio                                                | 59        |
| 5.2.3 Zusammenfassung der geschlechtsspezifischen Unterschiede innerhalb der Gesamtgruppe                        | 59        |
| <b>5.3 <i>Postoperative Veränderungen im weißen Blutbild und Leukozytenphänotysierungen bei sechs Tieren</i></b> | <b>60</b> |
| <b>5.3.1 Postoperative Veränderungen in Blutbild und Differentialblutbild</b>                                    | <b>60</b> |
| <b>5.3.2 Postoperative Veränderungen der Leukozytenphänotypisierung bei sechs Schweinen</b>                      | <b>63</b> |
| 5.3.2.1 Postoperative Veränderungen der SWC3a positiven Leukozyten                                               | 63        |
| 5.3.2.2 Postoperative Veränderungen der SWC3a positiven Monozyten                                                | 64        |
| 5.3.2.3 Postoperative Veränderungen der SLA-DR positiven Lymphozyten                                             | 65        |
| 5.3.2.4 Postoperative Veränderungen der SLA-DR positiven Monozyten                                               | 66        |
| 5.3.2.5 Postoperative Veränderungen der CD1 positiven Lymphozyten                                                | 67        |
| 5.3.2.6 Postoperative Veränderungen der CD2 positiven Lymphozyten                                                | 68        |
| 5.3.2.7 Postoperative Veränderungen der CD4 positive Lymphozyten                                                 | 69        |
| 5.3.2.8 Postoperative Veränderungen der CD8 positive Lymphozyten                                                 | 70        |
| 5.3.2.9 Postoperative Veränderungen der CD4/CD8 Ratio                                                            | 71        |
| <b>5.3.3 Zusammenfassung der postoperativen Veränderungen</b>                                                    | <b>71</b> |

|          |                                                   |            |
|----------|---------------------------------------------------|------------|
| <b>6</b> | <b>Diskussion</b>                                 | <b>72</b>  |
| 6.1      | <i>Untersuchungsziel</i>                          | 72         |
| 6.2      | <i>Methodik</i>                                   | 74         |
| 6.3      | <i>Ergebnisse</i>                                 | 77         |
| 6.3.1    | Gesamtgruppe                                      | 77         |
| 6.3.2    | Postoperative Veränderungen                       | 87         |
| 6.4      | <i>Aussagekraft und Verwendung der Ergebnisse</i> | 95         |
| <b>7</b> | <b>Zusammenfassung</b>                            | <b>96</b>  |
| <b>8</b> | <b>Summary</b>                                    | <b>98</b>  |
| <b>9</b> | <b>Anhang</b>                                     | <b>100</b> |
| 9.1      | <i>Literaturverzeichnis</i>                       | 100        |
| 9.2      | <i>Verzeichnis der Abkürzungen</i>                | 121        |
| 9.3      | <i>Verzeichnis der Einheiten</i>                  | 123        |



## **1 Einleitung**

Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode zur Charakterisierung von Zellpopulationen des Immunsystems und wird in der Humanmedizin seit Jahrzehnten bei der Untersuchung immunologischer und immunpathologischer Vorgänge eingesetzt.

Bislang war der Einsatz der Durchflusszytometrie in der Tiermedizin durch die geringe Anzahl an kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern und die kostspielige Methode weitgehend begrenzt.

In den letzten Jahren sind eine Reihe monoklonaler Antikörper gegen Leukozytenantigene des Schweines entwickelt und charakterisiert worden, so dass es möglich geworden ist, systematisch das Vorkommen und die Verteilung von Leukozytenpopulationen zu untersuchen. Untersuchungen des Immunstatus können zur Diagnose von Erkrankungen wie primären oder infektiösen Immundefekten und zur Therapiekontrolle genutzt werden.

Das Interesse am Immunsystem des Schweines hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Insbesondere eine bessere Kenntnis der immunologischen und immunpathologischen Vorgänge bei Infektionskrankheiten kann zu neuen Therapie- oder Prophylaxemöglichkeiten führen und somit helfen, die großen wirtschaftlichen Verluste zu mindern, die durch Infektionskrankheiten entstehen.

Neben der Bedeutung von Schweinen als landwirtschaftliche Nutztiere, spielt auch der Einsatz des Schweines als Modell bei humanmedizinischen Fragestellungen eine Rolle für das steigende wissenschaftliche Interesse am porcinen Immunsystem.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Zelluläre Elemente der Immunabwehr

Um den Organismus vor möglichen Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten, mechanischen Traumen, chemischen Noxen oder Tumoren zu schützen, greifen spezifische und unspezifische bzw. angeborene und erworbene Immunantworten ineinander (JANEWAY 2002).

Die **unspezifische Reaktion** ist angeboren (SCHLIESSER 1990). Sie beruht neben den physikalisch-chemischen Barrieren der Haut und Epithelien v.a. auf phagozytierenden Zellen, die Fremdstoffe wie Mikroorganismen aufnehmen und vernichten, unabhängig davon, ob der Organismus zuvor schon einmal mit dem Fremdstoff in Kontakt gekommen ist (SCHLIESSER 1990). Zu den zellulären Vertretern der unspezifischen Abwehr zählen **Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen** und **natürliche Killerzellen**, während T- und B-Lymphozyten als Vermittler der erworbenen oder **spezifischen Immunabwehr** gelten (TOMPKINS und TOMPKINS 2000, JUNGI 2000a).

Humorale, zirkulierende Faktoren, wie Komplementfaktoren, wirken als Verstärker bei der Erkennung von Antigenen und unterstützen auf diese Weise die Phagozytoseaktivität insgesamt (SCHLIESSER 1990). Dieser Vorgang wird als Opsonisation bezeichnet (SCHLIESSER 1990).

Seit den 50er Jahren wurde die zentrale Rolle der **Lymphozyten** in der Immunologie beobachtet. Sie gelten als wichtigste Zellen der spezifischen Immunabwehr (JANEWAY 2002). Nach JANEWAY (2002) gehen alle adaptiven Immunantworten von den Lymphozyten aus.

T-Lymphozyten vermitteln die antigenspezifische, zelluläre Immunität, während B-Lymphozyten nach Umwandlung in Plasmazellen Antikörper produzieren und somit für die humorale Immunität verantwortlich sind (JANEWAY 2002, JUNGI 2000a). Antikörper binden an antigene Strukturen, aktivieren das Komplementsystem und verstärken die Phagozytose durch Makrophagen (JANEWAY 2002, JUNGI 2000a).

Während B-Lymphozyten lösliche Antigene erkennen können, brauchen T-Lymphozyten eine Antigen-Präsentation durch Antigen präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC), die auf der Oberfläche dieser Zellen in Verbindung mit den Molekülen des Hauptgewebe Kompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) liegen müssen (JUNGI 2000b , BJORKMAN *et al.* 1987).

Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse-I-Moleküle kommen mit wenigen Ausnahmen (z.B. Nervenzellen) auf allen kernhaltigen Zellen vor, MHC-Klasse-II-Moleküle sind auf APC wie z.B. B-Zellen, Monozyten, Makrophagen zu finden (JUNGI 2000c).

### 2.2 Expression von Leukozyten – Markern

Leukozyten und andere Zellen haben die Fähigkeit, auf ihrer Oberflächenmembran Oberflächenmoleküle zu exprimieren (JANEWAY 2002).

Im Laufe ihrer Entwicklung zeigen Lymphozyten eine unterschiedliche Ausprägung an Oberflächenmolekülen, die auch als Differenzierungsantigene bezeichnet werden (JUNGI 2000b). Sie werden ebenso wie die entsprechenden Antikörper in Differenzierungsgruppen (*cluster of differentiation*, CD) zusammengefaßt (JANEWAY 2002). Zur Zeit sind über 200 humane Leukozytenmarker charakterisiert, deren Funktionen zum Teil noch nicht bekannt sind (JANEWAY 2002). Auf speziesspezifische Besonderheiten beim Schwein wird in Kapitel 2.5 eingegangen.

Die unterschiedliche Expression von Oberflächenantigenen ermöglicht eine Differenzierung der Lymphozyten in verschiedene Subpopulationen, z.B. durch einen Fluoreszenzaktivierte-Zellen-Sortierer (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) (JANEWAY 2002).

Die Expression von **CD1-Molekülen** ist charakteristisch für unreife Thymozyten in der Thymusrinde und B-Lymphozyten (JANEWAY 2002).

Sie tragen keine CD2-, CD4-, CD8-Moleküle (CD2/CD4/CD8 negativ) (JANEWAY 2002).

Im nächsten Entwicklungsstadium finden sich sowohl CD4- wie CD8-Moleküle auf der Oberfläche, so dass die Thymozyten nun als CD4/CD8 doppelt positive Zellen (DP-Zellen oder CD4/CD8<sup>++</sup>-Zellen) bezeichnet werden (JANEWAY 2002, PESCOVITZ *et al.* 1994).

Mit fortschreitender Differenzierung entscheidet sich, ob die Thymozyten weiter CD4- oder CD8-Moleküle tragen. Beim Menschen sind nahezu alle T-Lymphozyten im peripheren Blut entweder CD4 positiv (CD4<sup>+</sup>) oder CD8 positiv (CD8<sup>+</sup>) (JANEWAY 2002). Erfolgt ein

Reifungssignal, durchlaufen die Thymozyten weitere Reifungsschritte und werden somit positiv selektioniert (JANEWAY 2002).

Wenn die T-Zell-Rezeptoren der Thymozyten mit hoher Affinität am Selbst-MHC und körpereigenen Peptiden binden, wird dagegen ein programmierter Zelltod (Apoptose) ausgelöst (JANEWAY 2002). Dieser Vorgang wird als negative Selektion oder klonale Deletion bezeichnet (JANEWAY 2002). Damit wird eine Selbsttoleranz erreicht (JANEWAY 2002). Die klonale Selektion bezeichnet eine selektive, durch Antigenkontakt induzierte Vermehrung und Aktivierung antigenspezifischer Lymphozyten (JUNGI 2000a). Im Laufe ihrer Entwicklung wandern die Thymozyten aus der Thymusrinde zum Mark. Nur etwa 5% erreichen diese Phase. Die meisten Thymozyten gehen vorher durch Apoptose zugrunde (JANEWAY 2002).

Alle reifen T-Lymphozyten tragen neben verschiedenen anderen Molekülen außerdem die Moleküle **CD2** und **CD3**, die auch als Pan-T-Zell-Marker bezeichnet werden (JANEWAY 2002).

**CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten** werden als wichtige regulierende Zellen des Immunsystems betrachtet (JANEWAY 2002). Ihre regulierende Funktion beruht auf der Sekretion von Zytokinen (JUNGI 2000c). Wenn CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten durch Kontakt mit MHC-Klasse-II auf antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden, teilen sie sich vermehrt und geben ein breites Spektrum an Zytokinen ab (JUNGI 2000b, TOMPKINS und TOMPKINS 2000). Durch diese Zytokine und direkte Zellinteraktion aktivieren sie nun Makrophagen und B-Lymphozyten, weshalb CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auch als **T-Helfer Zellen** (TH-Lymphozyten) bezeichnet werden (JUNGI 2000c).



Die Art der Zytokinproduktion unterscheidet zwei Typen von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, da sie jeweils ein charakteristisches Spektrum an Zytokinen produzieren, wobei sie gegenseitig als Antagonisten gelten (JUNGI 2000c):

**TH<sub>1</sub>-Lymphozyten** geben Interleukin 2 (IL-2) und Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ) ab und fördern die Proliferation und die Funktion aller Lymphozyten (JUNGI 2000c). Ausgelöst wird diese Reaktion, wenn es bei der initialen Interaktion zwischen Antigen, APC und CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu einem hohen Level von IL-12 und IFN $\gamma$  und nur zu einem geringem Level IL-4 kommt (TOMPKINS und TOMPKINS 2000).

**TH<sub>2</sub>-Lymphozyten** stimulieren B-Lymphozyten, die sich dann weiter zu Plasmazellen differenzieren. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und das transformierende Wachstumshormon Beta (TGF $\beta$ ) werden von TH<sub>2</sub>-Lymphozyten abgegeben, wenn die Antigen-APC-CD4<sup>+</sup>-Interaktion zu einem hohen Level an IL-4 geführt hat (TOMPKINS und TOMPKINS 2000).

Viele Studien haben gezeigt, dass eine Immunantwort durch TH<sub>1</sub>-Lymphozyten bei der Bekämpfung von intrazellulären Parasiten, Bakterien und Viren zu finden ist, während die charakteristische Immunreaktion bei extrazellulären Bakterien und Parasiten sowie bei Umweltallergenen durch TH<sub>2</sub>-Lymphozyten ausgelöst wird (TOMPKINS und TOMPKINS 2000). Diese Regel wird als **TH<sub>1</sub>-TH<sub>2</sub>-Paradigma** bezeichnet. Allerdings gibt es in zahlreichen Fällen Ausnahmen von dieser Regel, zum Beispiel während einer Infektion mit Lentiviren, die eine Freisetzung der Zytokine von sowohl TH<sub>1</sub>- wie TH<sub>2</sub>-Lymphozyten induziert (TOMPKINS und TOMPKINS 2000). Die Informationen über das TH<sub>1</sub>-TH<sub>2</sub>-Paradigma, die hauptsächlich in experimentellen Infektionen an Nagern gewonnen wurden, werden zudem kritisch in bezug auf die Übertragbarkeit beim Menschen diskutiert (DAWSON *et al.* 2005).

Intrazelluläre Antigene, wie Viren oder Tumorantigene, werden nach proteolytischem Abbau zusammen mit dem MHC-Klasse-I von APC präsentiert und von **CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten** erkannt (JANEWAY 2002). CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten entwickeln daraufhin zytotoxische Aktivität, weshalb sie auch **Killerzellen** oder zytotoxische Lymphozyten genannt werden (JANEWAY 2002). Bei parasitären Infektionen wurde ein Ansteigen der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Blut gezeigt, während bei bakteriellen Infektionen ein Einwandern von aktivierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in das infizierte Gewebe beobachtet wurde (BERNDT und MÜLLER 1995, DILLENDER und LUNNEY 1993).

Dabei setzen die aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten Perforine frei, die Löcher in die Oberfläche von antigenbeladenen Zellen bohren und exprimieren einen FAS-Liganden, der an den Fas-Rezeptor der Zielzelle bindet und damit den programmierten Zelltod (Apoptose) auslöst (JUNGI 2000c).

Die Funktionen und Reaktionen einzelner Leukozytenfraktionen konnten durch Etablierung neuer Messmethoden untersucht werden Für immunologische Untersuchungen werden CD-Oberflächenantigene analysiert, die wie zuvor dargestellt auf Leukozyten exprimiert werden. Die zuvor mit Antikörper markierten Zellen werden mittels eines Durchflusszytometers, z.B. FACS (engl. *Fluorescence-activated cell sorter*) sichtbar gemacht, dessen Funktionsweise in folgenden beschrieben wird.

### **2.3 Funktionsweise des FACS**

Ein Durchflusszytometer ist ein optisches Meßsystem, mit dem Streulicht und Fluoreszenzsignale einzelner Partikel analysiert werden, die sich in einem Flüssigkeitsstrom befinden (SCHMITZ und ROTHE 1994).

Die Hauptbestandteile eines Durchflusszytometers sind ein Flüssigkeitssystem, ein optisches System und ein Computer. Eine Partikelsuspension wird so zu einem Analysepunkt geleitet, dass alle Zellen innerhalb eines Flüssigkeitstrahls einzeln nacheinander das optische System passieren und von einem fokussierenden Lichtstrahl beleuchtet werden (SCHMITZ und ROTHE 1994).

Durch den Kontakt eines Partikels mit dem Lichtstrahl entstehen bestimmte optische Signale mit unterschiedlicher Qualität wie Fluoreszenz und Lichtstreuung. Durch das optische System werden die Signale jeder einzelnen Zelle gemessen und anschließend aus der Summe der Einzelzellmessung eine Analyse der Zellsuspension berechnet (SCHMITZ und ROTHE 1994).

Es werden Größe, die interne Zellstruktur und die Fluoreszenzen der einzelnen Zellen gemessen, wobei die Fluoreszenz durch die die Zelle markierenden Antikörper hervorgerufen wird, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind.

Die Signale mehrerer Tausend Zellen pro Probe werden im Computer gespeichert und in sogenannten Histogrammen zusammengefasst (SCHMITZ und ROTHE 1994).

Dabei sind auf der Y-Achse die Anzahl der Zellen und auf der X-Achse die Fluoreszenzintensität aufgetragen (siehe Abbildung 1).

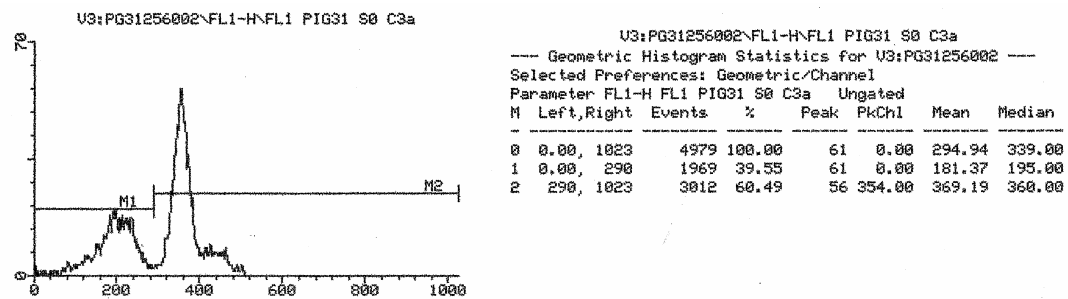


Abbildung 1 Histogramm von Schwein 31, SWC3a

Im sogenannten Dot Plot können alle Zellen einer Messung anhand verschiedener Parameter dargestellt werden. Auf der Y-Achse ist das Seitwärtsstreulicht aufgetragen, das mit der Granularität korreliert. Die X-Achse entspricht dem Vorwärtsstreulicht. Es korreliert mit der Größe des Partikels (SCHMITZ und ROTHE 1994).

Ein Punkt charakterisiert jeweils eine Zelle. Je nach Struktur der Zelle und der daraus resultierenden Lichtstreuung ist sie auf dem Diagramm lokalisiert. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterscheiden sich durch ihre unterschiedlichen Strukturen und haben deshalb im Dot Plot verschiedene Lokalisationen.

So ist es möglich, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten anhand der Lokalisation zu identifizieren, da jede Subpopulation ihr eigenes typisches Muster aufweist (SCHMITZ und ROTHE 1994).

Durch das sogenannte Gating, dem Definieren von Auswertefenstern durch Ziehen von Linien am Computer, können sie in „Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozytenwolken“ eingeteilt werden (SCHMITZ und ROTHE 1994).

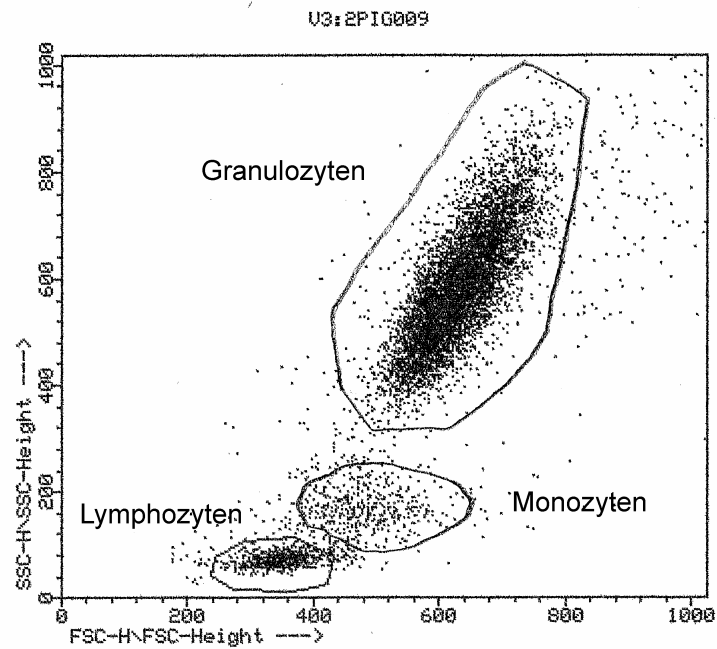


Abbildung 2: Dot Plot von Schwein 9

Auf diese Weise können die verschiedenen Zellpopulationen innerhalb einer Messung separat ausgewertet werden (siehe Abbildung 2).

### **2.4 Heterogenität des Immunsystems**

Das Immunsystem ist kein starres System. Die zirkulierenden Bestandteile des Immunsystems können sich in Anzahl und Verteilung als Reaktion auf verschiedene Einflüsse verändern (KRAFT *et al.* 1999). Bei Bedarf werden einzelne Bestandteile oder Zellpopulationen vermehrt produziert, freigesetzt oder verbraucht.

Hinzu kommt, dass sich die Zellen auf ihrem Weg von der Bildungsstätte zum Wirkort nur eine kurze Zeit im peripheren Blut aufhalten (KRAFT *et al.* 1999). Die im peripheren Blut gemessenen Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen variieren daher stark (KRAFT 1999a).

Das Wissen um Normalverteilung der immunologisch relevanten Zellen von gesunden Menschen und Tieren ermöglicht es dem Kliniker, bei einzelnen Patienten oder Patientengruppen die Ätiopathogenese der Veränderung zu definieren, den Verlauf zu beobachten und die Prognose zu beurteilen, allerdings immer im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Patienten (KRAFT 1999a). Quantitative und qualitative Veränderungen des Blutbildes erlauben in vielen Fällen Rückschlüsse auf den Stand verschiedener Erkrankungen. Allerdings ist es nach KRAFT falsch, einen außerhalb der Referenzwerte liegenden Wert *eo ipso* als krankhaft zu bezeichnen (1999a).

Kenntnisse über physiologische und pathologische Abweichungen sind daher notwendig. Aus diesem Grund werden in der Humanmedizin große Populationen untersucht und Normalwerte für bestimmte Gruppen erstellt (ZEMAN *et al.* 1988; TOLLERUD *et al.* 1990; ROBINSON *et al.* 1996; BARTLETT *et al.* 1998; REGECSZY *et al.* 2001).

Bei der Anzahl der Leukozyten ebenso wie bei der Expression von Oberflächenantigenen spielen Dispositionen wie **Alter**, **Geschlecht** und **genetische Unterschiede** eine große Rolle (ZEMAN *et al.* 1988, FLAHERTY *et al.* 1997, SEIKI und SAKABE 1997, BARTLETT *et al.* 1998, KRAFT 1999a, REGECSZY *et al.* 2001).

Das Immunsystem entwickelt sich mit dem Antigenkontakt. Es kommt während Kindheit und Jugend zunächst zu einem steigenden und dann mit zunehmendem Alter zu einem abnehmenden zellulären Immunstatus (THORN 2000). Hormonelle Faktoren können die Ausprägung der Leukozyten beeinflussen und werden als Ursache für solche Entwicklungen diskutiert. Zum Beispiel ist bekannt, dass sich bei Menschen hormonelle Veränderungen während Wachstum und Entwicklung durch Wachstumshormone wie *Growth Hormon* (GH), GH releasing Hormon und Somatostatin auf das Immunsystem auswirken können (CAMPELL und SCANES 1995). Periphere Lymphozyten beim Menschen besitzen Rezeptoren für diese Hormone (CAMPELL und SCANES 1995).

Es gibt einen genetischen Einfluss auf die zelluläre Immunität, so dass verschiedenen Tierrassen oder Populationen Unterschiede in der Verteilung der immunologischen Zellen zeigen (BARTLETT *et al.* 1998, NGYUEN *et al.* 1998, BYRNE *et al.* 2000).

Ein Vergleich zwischen zwei Studien mit Beagle- und Mischlingshunden ergab einen niedrigeren Anteil an CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und einen höhere Anteil an B-Lymphozyten bei den Mischlingen (BYRNE *et al.* 2000).

Ferkel der Rasse *Large White* zeigten gegenüber Ferkeln der Rasse Duroc signifikant niedrigere Werte der CD2<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen (NGYUEN *et al.* 1998). Beim Menschen wird beispielsweise eine niedrigere Anzahl an Leukozyten und aktivierten T-Lymphozyten bei Afro-Amerikanern gegenüber Latinos gefunden (BARTLETT *et al.* 1998).

**Externe Faktoren** können ebenfalls Anzahl und Verteilung von Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen beeinflussen. Dazu gehören Streß, zum Beispiel im Zusammenhang mit Blutentnahme, Tageszeit, Jahreszeit, körperlicher Arbeit, Medikamenten, Umweltbedingungen u.a. (NYBERG *et al.* 1988, ESPERSEN *et al.* 1990, KENDALL *et al.* 1990, MORROW-TESCH *et al.* 1994, KRAFT 1999a, EVANS 2000, THORN 2000).

Während **pathologischer Vorgänge** im Organismus kommt es zu Reaktionen des Immunsystems. Zum einen kann das Immunsystem selbst auf krankhafte Veränderungen reagieren, z.B. bei Infektionen (JANEWAY 2002). Zum anderen werden Bestandteile des Immunsystems als Folge von bestimmten Erkrankungen beeinflusst, z.B. bei malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems (KELLER und FREUDIGER 1993).

Veränderungen des weißen Blutbildes werden schon seit langem als Parameter zur Beurteilung des Gesundheitszustandes eines Individuums genutzt (KRAFT 1999a). Bei der Interpretation der Werte sollte man beachten, dass es sich jeweils um eine „Momentaufnahme“ handelt und es im Laufe einer Erkrankung zu unterschiedliche Stadien mit z.T. gegenläufigen Werten kommen kann.

Bei bakteriellen Infektionen, auch in Form von lokalen Infektionsherden, kann eine Erhöhung der Leukozytenzahl (Leukozytose) beobachtet werden (KELLER und FREUDIGER 1993).

Lokale Eiterherde und klinisch akut verlaufende Infektionskrankheiten beim Schwein führen zu einer hohen Anzahl an stabkernigen neutrophilen Granulozyten, die auch als „Links-“, oder „Kernlinksverschiebung“ bezeichnet wird (HEINRITZI und PLONAIT 2001).

Andererseits führt ein vermehrter Verbrauch im Lauf einer akuten bakteriellen Infektion auch zu einer Reduktion der Leukozytenzahl (Leukopenie) (KELLER und FREUDIGER 1993).

Ebenso kommt es während Virusinfektionen zu Leukopoesestörungen, die als Folge eine Leukopenie bewirken. Bei der Schweinepest tritt typischerweise eine anhaltende Leukopenie



(< 10 Tsd/ $\mu$ L) bei gleichzeitiger Verminderung der Lymphozyten (Lymphozytopenie) und der neutrophilen stabkernigen Granulozyten (Neutropenie) auf und kann bei Verdacht neben anderen Befunden unterstützend zur Diagnosestellung herangezogen werden (HEINRITZI und PLONAIT 2001).

In der Humanmedizin werden seit langem **typische Veränderungen einzelner Lymphozytenpopulationen** für die klinische Diagnostik genutzt (PALELLA *et al.* 1998, EASTERBROOK *et al.* 2000, MOORE und VERNAU 2000, SIPSAS und SFIKAKIS 2004, ONDOA *et al.* 2005, LOKO *et al.* 2005). Vor allem Erkrankungen und Infektionen des Immunsystems selbst können auf diese Weise untersucht werden.

So wird die Immunophänotypisierung in der Humanmedizin als ein wichtiges Diagnostikum für lymphoproliferative Erkrankungen genutzt, insbesondere bei Leukämien (MOORE und VERNAU 2000). Sie ist essentiell für eine präzise, reproduzierbare und klinisch relevante Einteilung der Tumorformen, was wiederum entscheidend für Prognose und Therapie ist (MOORE und VERNAU 2000). Auch Prognoseabschätzung und Therapiekontrolle einer Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) werden über die Immunophänotypisierung durchgeführt (PALELLA *et al.* 1998, EASTERBROOK *et al.* 2000, SIPSAS und SFIKAKIS 2004, ONDOA *et al.* 2005, LOKO *et al.* 2005).

Da die Infektion von Katzen mit dem feline Immunodefizienz Virus (FIV) analog zu der Infektion des Menschen mit dem HIV verläuft, sind über FIV eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden (ACKLEY *et al.* 1990, BARLOUGH *et al.* 1993, HOFFMANN-LEHMANN *et al.* 1997, WILLETT *et al.* 1997, ELDER *et al.* 1998, LOCKRIDGE *et al.* 2000, MATTEUCCI *et al.* 2000, FINERTY *et al.* 2001, GOTO *et al.* 2002, HOSIE *et al.* 2002, TOMPKINS *et al.* 2002, UHL *et al.* 2002, KUBES *et al.* 2003, PISTELLO *et al.* 2003, AVERY und HOOVER 2004, HUEBNER *et al.* 2004, TERWEE *et*

al. 2005). Die Bestimmung der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Ratio eignet sich zur Therapiekontrolle bei FIV Infektionen (ACKLEY *et al.* 1990, HOFFMANN-LEHMANN *et al.* 1997, HUEBNER *et al.* 2004).

Inzwischen werden auch für die veterinärmedizinische Praxis durchflusszytometrische Laboruntersuchungen der peripheren Lymphozyten, T-, B-, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen von Hunden, Katzen und Pferden angeboten (Labor LABOKLIN). Bei FeLV und FIV positiven Katzen dienen sie zur Verlaufskontrolle und zur Bestimmung der momentanen Phase der Erkrankung (ACKLEY *et al.* 1990, HOFFMANN-LEHMANN *et al.* 1997, HUEBNER *et al.* 2004).

MARTI beschreibt mit SCID (*severe combined immunodeficiency*, schwere kombinierte Immundefizienz), BLAD (bovine Leukozytenadhäsionsdefizienz) und cLAD (canine Leukozytenadhäsionsdefizienz) Erkrankungen, die nur mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden können (2000). Da für diese primären Immundefekte eine genetische Veranlagung besteht, kann nach durchflusszytometrischen Analysen versucht werden, züchterischen Maßnahmen zu ergreifen (MARTI 2000, CREEVI *et al.* 2003, BAUER *et al.* 2004, NAGAHATA 2004)

Eine Reihe von Studien beschäftigte sich mit Infektionen in Schweinebeständen, die zu großen wirtschaftlichen Verlusten in der Landwirtschaft führen (BARNARD *et al.* 2005, CHAMORRO *et al.* 2005, DARWICH *et al.* 2004, TINGESTEDT und NIELSEN 2004, BAUTISTA *et al.* 2003, SANCHES-TORRES *et al.* 2003, KRAKOWA *et al.* 2002, SUMMERFIELD *et al.* 2001, FACHINGER *et al.* 2000, SEGALLES *et al.* 2000). Durchflusszytometrische Untersuchungen sollen die Proliferation und Funktion einzelner porciner Zellpopulationen in immunpathologischen Vorgängen klären. Ziel dieser Untersuchungen ist es, mit dem Verständnis über Vorgänge der Immunabwehr neue Strategien zur Bekämpfung von Infektionen beim Schwein zu entwickeln.

In immunohistochemischen Untersuchungen über die Funktion von T-Lymphozyten bei Infektionen des Schweins mit Porcinen Reproduktions- und Respirationsyndromvirus (*porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV) konnten TINGSTEDT und NIELSEN die wichtige Rolle von zytotoxischen Lymphozyten in der PRRSV-spezifischen Immunantwort in der Lunge nachweisen. (2004). Die Anzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen in der Lunge von intrauterin mit dem PRRSV infizierten Schweinen ist deutlich erhöht bei gleichzeitig geringer Anzahl CD4<sup>+</sup> Zellen (TINGSTEDT und NIELSEN 2004). LOHSE und Mitarbeiter stellten dagegen fest, dass eine experimentelle Reduzierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut während der frühen Infektionsphase mit dem PRRSV nicht zu einer stärkeren Erkrankung oder einer verminderten Viruselimination führt (2004). Der Mechanismus und die Beteiligung der einzelnen T-Zelltypen ist hier noch nicht geklärt, aber durchflusszytometrische Untersuchungen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufklärung des Pathomechanismus von PRRS.

In der akuten Phase der Infektion mit dem Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virus kommt es zu einer signifikanten Lymphopenie mit Beteiligung der untersuchten T Zellfraktionen CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (BAUTISTA *et al.* 2003). Um die Wirkung eines Notfallimpfstoffes gegen MKS zu untersuchen, nutzten BARNARD und Mitarbeiter ebenfalls durchflusszytometrische Analysen (2005). Sie konnten zeigen, dass es trotz Anstieg der MKS –Virus-spezifischen Antikörper und T-Zell Aktivität nach der Impfung nicht zu Veränderungen der Lymphozytenpopulationen kam (BARNARD *et al.* 2005).

Bei Infektionen mit Viren, die einen Tropismus zu bestimmten Zelllinien (z.B. der monozytären Linie) haben, ist das Interesse am Mechanismus der Pathogenese ebenfalls sehr groß (CHAMORRO *et al.* 2005). Infektionen mit dem Klassischen Schweinepest-Virus führen bereits vor der Virämie zu einem Abfall von CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup> T Zellen (SUMMERFIELD *et al.* 2001).

Das Expressionsmuster von CD Molekülen bei Monozytensubpopulationen weist auf spezielle Funktionen dieser Zellen bei Virusinfektionen hin (CHAMORRO *et al.* 2005, SANCHES-TORRES *et al.* 2003). Monozyten, die CD163 exprimieren, unterscheiden sich von CD163<sup>-</sup> Monozyten durch verschiedene Zytokinproduktion und ihre Anfälligkeit gegenüber dem Afrikanischen Schweinepest-Virus (CHAMORRO *et al.* 2005, SANCHES-TORRES *et al.* 2003). Diese Zellen scheinen eine besondere pro-inflammatorische Rolle zu spielen, da sie eine höher TNF- $\alpha$  Produktion und einen höheren Anteil an Adhäsionsmolekülen haben (CHAMORRO *et al.* 2005).

Bei Schweinen, die mit dem porcinen Circovirus 2 infiziert sind, fällt die Zahl der Lymphozyten, insbesondere der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und B-Lymphozyten, signifikant ab, während bei unveränderter Gesamtleukozytenzahl die Zahl der Monozyten und neutrophilen Granulozyten signifikant ansteigt (DARWICH *et al.* 2004, SEGALLES *et al.* 2000). Sogar eine Verminderung der infizierten Zellen durch Immunsuppression z.B. mittels Medikamenten wie Cyclosporin wird als therapeutische Option diskutiert (DARWICH *et al.* 2004, KRAKOWA *et al.* 2002).

FACHINGER und Mitarbeiter untersuchten in vitro acht inaktivierte Pockenvirusstämme auf ihre Fähigkeiten, das angeborene und spezifische Immunsystem des Schweines zu aktivieren (2000). So konnten sie zeigen, dass Durchflusszytometrie und zellensortierende Methoden geeignet sind, T-Helferzellen als wichtigste Zellenfraktion zu identifizieren, die auf inaktivierte Pockenviren reagieren (FACHINGER *et al.* 2000).

Auch bei chemischen Einwirkungen auf den Organismus kommt es zu Reaktionen des zellulären Immunsystems, wie z.B. bei chronischen Vergiftungen mit Schwermetallen, wie Quecksilber und Blei, bei denen ebenfalls unterschiedliche Veränderungen des lymphozytären Immunsystems festzustellen sind, die darauf schließen lassen, dass es an der

Elimination der Toxine beteiligt ist (MOSZCZYNSKI *et al.* 1995, 1998, VOJDANI *et al.* 1992; BASARAN und UNDEGER 2000).

Während das weiße Blutbild schon seit langem in der Veterinärmedizin interpretiert und zur Diagnosestellung genutzt wird, kann nun mit Hilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen auch der zelluläre Immunstatus sicher kontrolliert werden.

### **2.5 Veränderungen des Immunsystems unter dem Einfluss von Narkose und operativem Eingriff**

Veränderungen des Immunstatus durch operative Eingriffe sind beim Menschen seit langem bekannt (LASSEN *et al.* 1956, BRUCE und KOEPKE 1966, LECKY 1975, SLADE *et al.* 1975, COHEN und BATRA 1980, BÖERNER und HEMPELMANN 1982, THOMSON 1987, FAIST *et al.* 1992 und 1996, MARKEWITZ *et al.* 1992, HAUPT *et al.* 1998, HEIMLICH *et al.* 1999, TAKALA *et al.* 2004). Die Auswirkungen einer chirurgischen Intervention auf den gesamten Organismus wird in der Literatur unter dem Begriff „Postaggressionssyndrom“ zusammengefasst. Neben Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes, des Magen-Darm-Traktes, des Nervensystems und der Blutgerinnung werden auch Veränderungen des Immunsystems gesehen (FAIST *et al.* 1992 und 1996, MARKEWITZ *et al.* 1992, HEIMLICH *et al.* 1999).

Es kommt zu einer Reduktion der Immunfunktion, die auch als sekundäre oder passagere Immunsuppression bezeichnet wird, wobei fast alle Komponenten des unspezifisch und spezifisch zellulären und humoralen Systems betroffen sind (FAIST *et al.* 1992 und 1996, MARKEWITZ *et al.* 1992, HEIMLICH *et al.* 1999). Untersuchungen beim Menschen konnten postoperativ Immunsuppressionen feststellen (THOMSON 1987, HAUPT *et al.* 1998), wobei die Einschränkung der Immunantwort mit der Dauer des chirurgischen Eingriffes steigt. HEIMLICH und Mitarbeiter fanden bei tumorchirurgischen Eingriffen im Kopf-Hals-Bereich einen direkten Zusammenhang zwischen Narkosedauer bzw. Ausmaß der Gewebeschädigung und der postoperativ festgestellten Immunsuppression (1999).

Diese eingeschränkte Immunfunktion macht sich klinisch in einer erhöhten Infektionsanfälligkeit und vermehrtem Tumorwachstum bemerkbar (THOMSON 1987,

LECKY 1975). Problematisch werden diese Veränderungen bei Infektionen, die bei einer inadäquaten Immunreaktion im schlimmsten Fall in einer Sepsis münden können.

Die Dauer dieser Veränderungen und die Prognose für den Patienten hängt dabei ab vom Umfang der Operation, der Eigenheit des pathologischen Prozesses und dem Immunstatus des Patienten (THOMSON 1987, LECKY 1975).

Als Ursache für diese Immunsuppression infolge des Operationstraumas werden Stress, Anästhetika, Gewebeschädigung, Blutverlust und eventuelle Endotoxämie angenommen (FAIST *et al.* 1992). Verschiedene mechanische, pharmakologische und immunmodulierende Effekte während eines operativen Eingriffs wirken immunsuppressiv auf die natürlichen Barrieren, die unspezifische und spezifische Abwehr (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2. Effekt von Narkose und Operation auf das humane Immunsystem

|                      |                                          |                                                       |
|----------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Natürliche Barrieren | Atropin                                  | Speichel-/Tränenproduktion ↓                          |
|                      | Endotrachealtubus                        | Ziliaraktivität Trachea ↓<br>Schleimhautläsionen      |
|                      | Anästhetika                              | Ziliaraktivität Respirationstrakt ↓                   |
|                      | Anästhetika                              | Schweiß und Talgproduktion ↓                          |
|                      | Operativer Eingriff                      | Hautbarriere wird zerstört                            |
| Unspezifische Abwehr | Anästhetika                              | Migration/Chemotaxis von Granulozyten und Monozyten ↓ |
|                      | Inhalationsanästhetika                   | Leukozytenzahl ↓                                      |
|                      | Katecholamine                            | Leukozytenzahl ↑                                      |
|                      | ? korreliert mit der Dauer des Eingriffs | Phagozytose ↓                                         |
| Spezifische Abwehr   | Streß und präoperative Angst             | Funktion der Lymphozyten ↓                            |
|                      | ? korreliert mit der Dauer des Eingriffs | Lymphozytenzahl ↓                                     |

↓ = sinkt, ↑ = steigt, ? = genaue Ursache unbekannt

Es scheint sinnvoll, bei den Ursachen für postoperative Immunsuppressionen zumindest zwischen dem Einfluß von präoperativem Streß, Anästhetikaeinfluß und chirurgischem Trauma zu unterscheiden.

Es ist allerdings in klinischen Untersuchungen schwierig zu unterscheiden, welche Wirkung die einzelnen Einflussgrößen haben, da das Ausmaß der Gewebeschädigung und einzelne chirurgische Maßnahmen in der Regel individuell sehr unterschiedlich sind.

Häufig ist nicht genau zu klären, was das Immunsystem mehr beeinflusst: perioperativer Stress, auch z.B. durch Schmerzen, Anästhesie oder der operative Eingriff. Bei den meisten humanmedizinischen Studien sind Untersuchungen beispielsweise mit mehrstündigen Narkose für Kontrollgruppen nicht möglich.

Narkotika und Lokalanästhetika können verschiedene Zellfunktionen beeinflussen, wobei die Hemmung der Membranfunktion, Mobilitätsstörungen von Lymphozyten und Granulozyten sowie Veränderungen in der Mitoserate von T-Lymphozyten die wichtigste Rolle im postoperativen Geschehen spielt (NEUMANN *et al.* 1985).

Traumatischer Stress beeinflusst nicht nur einzelne Zelltypen, sondern bewirkt den Verlust der intakten regulierenden Interaktion zwischen Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten (FAIST *et al.* 1996).

Dabei werden insbesondere Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) als Schlüsselsubstanzen diskutiert (MARKEWITZ *et al.* 1992). Durch das von den Monozyten infolge der Gewebeschädigung freigesetzte PGE<sub>2</sub> kommt es zu einer quantitativen und qualitativen Einschränkung der Lymphozytenfunktion (HEIMLICH *et al.* 1999).

Andere Autoren sehen die Hauptursache der perioperativen Immunsuppression in der endokrin-metabolischen Veränderungen durch eine gesteigerte Sekretion von katabolen Hormonen (KEHLET 1989).

Trotz Unterschieden in Bezug auf Narkoseart und -dauer, Art des Eingriffs, Alter und Immunstatus der Probanden, haben allerdings alle Studien gemein, dass es zu einer postoperativen Immunsuppression kommt (FAIST *et al.* 1992 und 1996, MARKEWITZ *et*



*al.* 1992, HEIMLICH *et al.* 1999, THOMSON 1987, LECKY 1975, HAUPT *et al.* 1998, BÖERNER und HEMPELMANN 1982).

Es finden sich in der Literatur keine Arbeiten, die sich mit den Auswirkungen eines operativen Eingriffes auf die Verteilung von Lymphozytenpopulationen des Schweines beschäftigen.

Das Schwein als Modell in der Forschung bei humanmedizinischen Fragestellungen eingesetzt. Häufig sind operative Eingriffe unter Narkose notwendig.

Dabei spielt in einigen Studien auch die Reaktion des Immunsystems eine wichtige Rolle. Während es beim Menschen eine Reihe von Untersuchungen über immunologische Reaktionen nach chirurgischen Eingriffen gibt, ist darüber bislang beim Schwein wenig bekannt (THOMSON 1987, LECKY 1975, BÖERNER und HEMPELMANN 1982, THOMSON 1987, FAIST *et al.* 1992 und 1996, MARKEWITZ *et al.* 1992, HAUPT *et al.* 1998, HEIMLICH *et al.* 1999).

Damit ein Vergleich mit Reaktionen des humanen Immunsystems z.B. für Fragestellungen in Transplantationsversuchen möglich wird, sind Untersuchungen über die Folgen eines operativen Eingriffes auf das Immunsystem beim Schwein notwendig.

## 2.6 Das Immunsystems des Schweines

*Die Morphologie der Leukozyten des Schweines entspricht der anderer Spezies (THORN 2000).* Beim Schwein ist die Leukozytenzahl höher als bei anderen Haussäugetieren. Alter, Geschlecht Jahreszeit, zirkadianer Rhythmus, physiologischer Zustand, Umgebungsbedingungen, soziale Interaktion und Fütterung beeinflussen das weiße Blutbild (EVANS 2000).

| Autor<br>Anzahl               | Rasse/<br>Alter                     | Leukoz.<br>In Tsd./ $\mu$ l | Differentialblutbild |                          |                     |                       |                       |
|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
|                               |                                     |                             | Neutroph.            | Lymphoz.                 | Monoz.              | Eos G.                | Baso G.               |
| KRAFT 1999                    |                                     | 10-22                       | 10-39%               | 49-85%                   | 0-5%                | 0-6%                  | 0-2%                  |
| THORN 2000                    |                                     | 11-22                       | 28-47%               | 39-62%                   | 2-10%               | 0,5-11%               | 0-2%                  |
| EVANS<br>(n=114)              | 2000 Kreuzung                       | 6-32,5                      | 1,2-<br>25,7%        | 1,0-<br>22,8%            | 0-3,9%              | 0-5,2%                | 0                     |
| SIEVERDING<br>2000            | Absatz-<br>ferkel                   | 8,7-37,9                    |                      | 2,2-16,0<br>Tsd/ $\mu$ l | 0-6<br>Tsd/ $\mu$ l | 0-1,8<br>Tsd/ $\mu$ l | 0-0,5<br>Tsd/ $\mu$ l |
| HEINRITZI und<br>PLONAIT 2001 | Deutsche<br>Landrasse/<br>Edelschw. | 10,5-21,3                   | 10,2-<br>38,8%       | 49,4-<br>85,4%           | 0-4,8%              | 0-6,2%                |                       |

Tabelle 1 Literaturangaben des Weißen Blutbildes beim Schwein

Leukoz.- = Leukozyten; Neutroph. = Neutrophile segmentkernige Granulozyten; Lymphoz. = Lymphozyten; Monoz. = Monozyten; Eos. G. = Eosinophile Granulozyten; Baso. G. = Basophile Granulozyten; Edelschw.= Edelschwein

Die Anzahl der Gesamtleukozyten ist zum Zeitpunkt der Geburt bei Schweinen hoch, fällt unmittelbar nach der Geburt, um dann im Lauf der ersten fünf Wochen anzusteigen (EVANS 2000; THORN 2000; KRAFT 1999b). Das neutrophile Blutbild, das bei neugeborenen

Ferkeln zu finden ist, verschiebt sich zugunsten der Lymphozyten (EVANS 2000; THORN 2000; KRAFT 1999b).

Bei neugeborenen Ferkeln beträgt der Anteil der Neutrophilen 65 bis 70%, der Anteil der Lymphozyten beträgt 20% der Leukozyten. In der folgenden Zeit steigt der Anteil der Lymphozyten, so dass die Tiere in einem Alter von 6 Monaten ein Verhältnis von 1:2 (Neutrophile : Lymphozyten) haben (THORN 2000).

Dieser Vorgang dauert nach KRAFT (1999b) einige Tage, nach THORN (2000) einige Monate. Beim erwachsenen Tier ist ein lymphozytäres Blutbild zu finden (KRAFT 1999b). . Beim gesunden Schwein kann die Lymphozytengröße stark variieren (5-18 µm im Durchmesser), aber die Mehrheit der Lymphozyten ist mit 5-7 µm im Durchmesser eher klein (EVANS 2000).

Unterschiede im weißen Blutbild zwischen verschiedenen Rassen, auch zwischen Miniatur- und anderen Schweinen sind vorhanden, aber geringfügig (EVANS 2000). Allerdings sind bei Schweinen physiologischerweise deutliche Abweichungen der Blutmeßwerte zu sehen, sowohl zwischen verschiedenen Individuen als auch innerhalb eines Individuums zu verschiedenen Meßzeitpunkten.

Männliche Schweine haben eine höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten und damit insgesamt mehr Leukozyten. (EVANS 2000). THORN (2000) sieht hingegen keinen signifikanten Einfluss des Geschlechts auf das weiße Blutbild beim Schwein. Deutsche Landschweine in einem Alter von 2-6 Monaten haben niedrigere Leukozytenzahlen als Hanford Miniaturschweine, wobei insgesamt zwischen verschiedenen Rassen nur geringfügige Unterschiede gesehen werden (EVANS 2000). Spezifiziert pathogenfrei und keimfrei gehaltene Schweine haben erwartungsgemäß eine niedrigere Anzahl an Leukozyten

und einen geringeren Anteil an neutrophilen Granulozyten und Monozyten als konventionell gehaltene Tiere.

Laut PABST und TREPEL (1975) sind die Lymphozyten beim jungen Schwein in lymphoiden und nicht lymphoiden Organen wie folgt verteilt: Thymus 44%, Milz 9%, mesenteriale Lymphknoten 17%, zervikale Lymphknoten 9%, andere periphere Lymphknoten 3%, darmassoziierte Lymphozyten 5%, Tonsillen 2%, Knochenmark 5%, Blut 3%, Lunge 0,2% und im restlichen Gewebe 3%.

Nach BINNS (1982) liegt der Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten im Blut bei 10 bis 20%, die der T-Zelllinie bei 40 bis 70%. Weitere 30 bis 40% ohne charakteristische Oberflächeneigenschaften werden von ihm als Null -Zellen bezeichnet.

Im *International Swine CD Workshop* werden porcine monoklonale Antikörper (mAK) charakterisiert und analog zur Nomenklatur des humanen Immunsystems in Cluster zusammengefasst (SAALMÜLLER 1998).

Der Begriff *Swine Leukocyte Antigen* (SLA) wird analog zum Begriff *Human Leukocyte Antigen* (HLA) verwendet und bezeichnet den MHC beim Schwein (LUNNEY und PESCOVITZ 1987, SAALMÜLLER 1996). 2004 wurde ein Komitee der Internationalen Gesellschaft für die Genetik von Tieren gegründet, das alle veröffentlichten Daten über DNS-Sequenzen des SLA nutzt, um eine systematische Nomenklatur der Gene und Allele des Schweine MHCs zu erstellen (SMITH *et al.* 2005).

Die Oberflächenantigene werden als CD-Moleküle bezeichnet, wenn neben der Gewebsverteilung, der Funktion und dem Molekulargewicht auch die Desoxyribonukleinsäure- oder Aminosäuresequenz eine hohe Analogie zu den bekannten humanen CD-Molekülen aufweisen (SAALMÜLLER *et al.* 1998). Verschiedene

monoklonale porcine Antikörper kreuzreagieren nach Angaben von SCHUBERTH und Mitarbeitern (1998) mit Leukozyten vom Hund.

Bei Oberflächenmolekülen, von denen keine vergleichbaren Moleküle im humanen System bekannt sind, wird die Bezeichnung *Swine Workshop Cluster* (SWC) gebraucht (SAALMÜLLER 1996, SAALMÜLLER *et al.* 1998).

Das CD1-Antigen wird auf porcinen B-Lymphozyten gefunden (SAALMÜLLER 1996).

Auf porcinen Thymozyten und T-Lymphozyten wird das CD2-Molekül exprimiert (BINNS 1978, HAMMERBERG und SCHÜRIG 1986).

In Ermangelung eines porcinen mAK gegen den CD3-Komplex, der erst seit 1996 bekannt ist, wurde die Population der T-Lymphozyten beim Schwein anders als beim Menschen häufig über die Bestimmung der CD2<sup>+</sup>-Zellen festgestellt (SAALMÜLLER *et al.* 1998).

Das CD4-Molekül wird bei Schweinen wie bei anderen Tierarten auf Thymozyten und peripheren T-Lymphozyten mit Helferfunktion gefunden (PESCOVITZ *et al.* 1985). Monoklonale Antikörper gegen das CD4a-Epitop inhibieren die MHCII restringierte funktionale Aktivität der T-Helferzellen. Auf myeloiden Zellen und B-Lymphozyten sind keine CD4-Moleküle zu finden.

Die Subpopulation der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ist eine homogene Gruppe, bei der alle Zellen CD2-, CD3- und CD5-Antigene exprimieren (SAALMÜLLER 1998).

Porcine Thymozyten und T-Lymphozyten mit zytotoxischer Aktivität tragen CD8-Moleküle (JONJIC und KOSZINOWSKI 1984). Die zytolytische T-Zellaktivität kann von monoklonalen Antikörpern blockiert werden, die gegen bestimmte Epitope des CD8-Antigens gerichtet sind (SAALMÜLLER 1998). Die Zellen der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

können aufgrund ihrer immunologischen Funktion und Antigenexpression weiter unterteilt werden. Die Dichte des CD8-Antigens auf der Zelloberfläche variiert. Zellen mit einer niedrigen CD8-Dichte exprimieren im Gegensatz zu Zellen mit einer hohen CD8-Dichte weder CD5- noch CD6-Antigene und besitzen eine spontane nicht-MHC-restringierte zytolytische Aktivität (SAALMÜLLER 1998). Die Fraktion mit einer starken Expression von CD8-Antigenen beinhaltet Vorläuferzellen der allo-antigen-spezifischen zytolytischen T-Lymphozyten und der MHC-I-restringierten virus-antigen-spezifischen zytolytischen T-Lymphozyten (SAALMÜLLER 1998).

Beim Schwein können im Thymus mittels der beiden Differenzierungsantigene CD4 und CD8 vier Subpopulationen unterschieden werden.  $CD4^-CD8^-$ -Thymozyten werden aufgrund ihrer Morphologie als thymische Vorläuferzellen angesehen, während  $CD4^+CD8^-$ -,  $CD4^+CD8^-$ - und  $CD4^+CD8^+$ -Zellen als reife Thymozyten bezeichnet werden können (SAALMÜLLER 1998).

Die Verteilung der extrathymischen T-Lymphozytensubpopulationen weist beim Schwein Besonderheiten auf (PESCOWITZ *et al.* 1994, SUMMERFIELD *et al.* 1996, SAALMÜLLER und BRYANT 1994). Neben den  $CD4^+CD8^-$ -T-Lymphozyten mit dem Phänotyp der klassischen T-Helferzellen und den  $CD4^+CD8^+$ -T-Lymphozyten, eine Fraktion, die die „Natürlichen Killerzellen“ und die klassischen MHC-I-restringierten zytolytischen T-Lymphozyten enthält, treten zwei weitere T-Lymphozytensubpopulationen auf:  $CD4^-CD8^-$ -T-Lymphozyten und  $CD4^+CD8^+$ -T-Lymphozyten (SAALMÜLLER und BRYANT 1994). Es handelt sich bei den  $CD4^-CD8^-$ -T-Lymphozyten um eine heterogene Fraktion, die durch Expression weiterer Differenzierungsantigene in weitere Subfraktionen unterteilt werden

kann. CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Lymphozyten zeigen in vitro eine zytolytische Aktivität, die allerdings nicht MHC-restringiert ist (SAALMÜLLER 1998).

Extrathymische CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden in einer höheren Konzentration bislang nur beim Schwein gefunden (PESCOWITZ *et al.* 1994). Sie unterscheiden sich von den CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Thymozyten sowohl in ihrer Morphologie wie auch durch ein geändertes Expressionsmuster weiterer Oberflächenantigene. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zeigen in vitro ähnliche Reaktivität in einer primären Immunreaktion wie CD4-T-Helfer-Zellen (PESCOWITZ *et al.* 1994).

Einige Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Fraktion der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten des Schweines T-Helfer-Gedächtniszellen enthalten (SUMMERFIELD *et al.* 1996). OBER und Mitarbeiter (1998) konnten bei Schweinen nach wiederholter Immunisierung mit einem Impfstoff gegen Pseudorabies Virus (PVR) zeigen, dass die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ruhende B-Lymphozyten anregen, PRV spezifische Antikörper zu produzieren und somit bei der sekundären Immunantwort eine Rolle spielen.

Der prozentuale Anteil dieser Zellpopulationen ist altersabhängig. Bei juvenilen Schweinen findet sich ein hoher Anteil CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Lymphozyten und nur wenige CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, während ältere Tiere kaum CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Lymphozyten, dagegen um so mehr CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten besitzen (SAALMÜLLER 1998).

Gnotobiotische Schweine besitzen kaum CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, was darauf schließen läßt, dass es sich bei der Entwicklung dieser Population um eine postnatale antigenabhängige Reifung handelt.

Es konnte zudem in vitro die extrathymische Reifung von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Lymphozyten zu CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Helferzellen gezeigt werden (SAALMÜLLER *et al.* 2002).

Monozyten bzw. Zellen der myeloiden Reihe exprimieren ein Oberflächenantigen mit einem Molekulargewicht von 200 kDa, das auch als SWC3-Antigen bezeichnet wird.

Dieses Antigen ist für myeloide Zellen spezifisch (SAALMÜLLER *et al.* 1998) und läßt sich mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern markieren.

Viele Studien beschäftigen sich mit den Veränderungen infolge von Krankheiten, z.B. experimentell induzierten parasitären, bakteriellen oder Virusinfektionen vor allem mit dem Ziel, die Entwicklung von Medikamenten und Impfstoffen zu ermöglichen (DILLENDER und LUNNEY 1993, NIELSEN und BOETNER 1997, OBER *et al.* 1998, PAULY *et al.* 1998, SAALMÜLLER *et al.* 1999, FACHINGER *et al.* 2000, SEGALES *et al.* 2000, WATERS *et al.* 2000, HEINEN *et al.* 2001, SUMMERFIELD *et al.* 2001, BAUTISTA *et al.* 2002, KRAKOWA *et al.* 2002, BAUTISTA *et al.* 2003, SANCHES-TORRES *et al.* 2003, DARWICH *et al.* 2004, TINGESTEDT und NIELSEN 2004, BARNARD *et al.* 2005, CHAMORRO *et al.* 2005).

Vergleicht man die zu diesem Thema veröffentlichten Untersuchungen in der Literatur, so finden sich nur wenige Arbeiten, die sich mit der Verteilung der Lymphozytenpopulation beim gesunden Schwein beschäftigen (JOLING *et al.* 1994; YANG und PARKHOUSE 1996; THIELKE *et al.* 1999, BOEKER *et al.* 1999). Die Daten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Einige Autoren konzentrieren sich dabei auf Tiere aus spezifisiert pathogenfreier Haltung (SPF-Haltung) oder auf Schweinerassen wie Minipigs, die für viele wissenschaftliche Fragestellungen interessant sind (JOLING *et al.* 1994, BOEKER *et al.* 1999, THIELKE *et al.* 1999).



| Autor                      | Alter       | T-Lymphozyten in % |          |          | B-Lymphozyten in % |
|----------------------------|-------------|--------------------|----------|----------|--------------------|
|                            |             | CD2                | CD4      | CD8      |                    |
| Boeker <i>et al.</i> 1999  | 9-12 Monate | 50,6<br>25,5       | ±        |          | 8,4                |
| Joling <i>et al.</i> 1994  | 1 Woche     | 37 ± 9             | 29 ± 19  | 15 ± 5   | 15 ± 13            |
|                            | 4 Wochen    | 49 ± 9             | 36 ± 6   | 22 ± 5   | 21 ± 8             |
|                            | 10 Wochen   | 62 ± 8             | 37 ± 6   | 29 ± 6   | 20 ± 6             |
|                            | 40 Wochen   | 65 ± 7             | 33 ± 10  | 28 ± 11  | 17 ± 4             |
| Yang und Parkhouse 1996    | 4 Mon       |                    |          |          | 31,3 ± 6,9         |
|                            | 8 Mon       |                    |          |          | 25,3 ± 8,8         |
|                            | 12 Mon      |                    |          |          | 22,9 ± 11,8        |
|                            | 16 Mon      |                    |          |          | 23,4 ± 5,9         |
| Thielke <i>et al.</i> 1999 |             | 54,6 ± 9           | 25,8 ± 4 | 31,1 ± 7 |                    |
| Terzic <i>et al.</i> 2002  | 12 Wochen   |                    | 9,7 ± 6  | 8,0 ± 2  |                    |

Tabelle 2 Literaturangaben über Lymphozytenphänotypen beim gesunden Schwein

Die Probandenzahl bei Untersuchungen der porcinen Lymphozytensubpopulationen ist häufig gering. BOEKER und Mitarbeiter (1999) untersuchten 6 Schweine, THIELKE und Mitarbeitern (1999) 8 Schweine und JOLING und Mitarbeiter (1994) 12 Schweine.

Eine grössere Gruppe von gesunden Schweinen wurde bislang noch nicht auf die Verteilung der Leukozytenphänotypen untersucht, obwohl die Kenntnis über Zellfraktionen und deren Verteilung notwendig ist, um einerseits den Gesundheitsstatus einzelner Tiere oder Bestände und um andererseits die immunologischen Reaktionen innerhalb von Versuchsreihen einschätzen zu können.

### **3 Fragestellung**

Kenntnisse der physiologischen Zustände des zellulären Immunsystems sind beim Schwein nur in geringen Umfang bekannt. Sie sind die Voraussetzung für das Verständnis von immunologischen Abläufen. Eine systematische Untersuchung über das Vorkommen und die Verteilung von Leukozytenpopulationen beim jungen gesunden Schwein fehlt bislang.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Verteilung der Granulozyten- und Lymphozytenpopulationen von Schweinen einer einheitlichen Altersgruppe anhand der Durchflusszytometrie darzustellen.

Neben der Analyse der Daten einer gesunden Gruppe mit den geschlechtsspezifischen Unterschieden sollen bei einem kleinen Teil der Gruppe auch der Einfluss von Narkose und chirurgischem Eingriff auf das weiße Blutbild und die Lymphozytenpopulationen untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit soll daher folgende Fragen beantworten:

- Wie ist die prozentuale Verteilung der Leukozyten im weißen Blutbild, der Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen beim Hybridschwein der Kreuzung Deutsche Landrasse/Edelschwein mit Pietrain in einem Alter von drei Monaten?
- Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Anzahl und Verteilung der Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen?
- Inwieweit kommt es zu Veränderung des weißen Blutbildes und der lymphatischen Zellreihen nach Narkose und operativem Eingriff?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Studienaufbau und Gruppeneinteilung

Bei 40 Hybridmastschweinen (*Deutsche Landrasse/Edelschwein x Pietrain*), die in einem Zeitraum von 2 Jahren für anderweitige, experimentelle Fragestellungen invasiv instrumentiert werden mussten, wurde das weiße Blutbild untersucht und eine Leukozytenphänotypisierung durchgeführt.

- a) In der Gesamtgruppe wurden alle 40 Schweine im Alter von drei Monaten untersucht. 34 Tiere der Gesamtgruppe waren weiblich. Sechs Tiere waren männlich und kastriert. Allen Tieren wurden operativ Katheter in die Vena jugularis externa implantiert. Unmittelbar anschließend wurde den Tieren aus dem Katheter Blut entnommen und untersucht.
- b) Zur Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede wurden die Ergebnisse der Geschlechter innerhalb der Gesamtgruppe einander gegenübergestellt.
- c) Sechs Tiere der Gesamtgruppe wurden nach dem operativen Einbringen des Katheters in den Stall gebracht. Diesen Tieren wurden 24 Stunden nach der ersten Messung nochmals Blut abgenommen und untersucht. Alle Tiere dieser Gruppe waren weiblich. Diese Versuchsgruppe zur Untersuchung postoperativer Veränderungen dient der Beobachtung von Veränderungen durch die durchgeführten Manipulationen der Anästhesie und Operation. Dazu wurden die Ergebnisse der Messung unmittelbar nach Katheterimplantation mit den Ergebnissen der postoperativen Messung verglichen.

Der Versuch war beim Regierungspräsidium Freiburg unter dem Aktenzeichen 35-9185.81/1/128.3 und unter der Nummer G-98/19 genehmigt.

## **4.2 Laborausrüstung, Reagenzien und Antikörper**

Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg)

Zentrifuge (Hettich/RP, Hettich, Tuttlingen)

Multipipette (Eppendorf, Hamburg)

Rundbodenreagenzröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)

Phosphat-Buffered-Saline (PBS, Biochrom KG, Berlin)

FACST<sup>TM</sup> Lysing Solution (Becton Dickenson, San Jose, CA, USA)

Die nachfolgenden Antikörper wurden von der Firma PharMingen, Heidelberg bezogen:

| <i>Bezeichnung</i>  | <i>Klon</i> | <i>Antigen</i> |
|---------------------|-------------|----------------|
| Anti-Pig SLA-DR mAK | 1053h2-18-1 | SLA-DR         |
| Anti-Pig SWC3a mAK  | 74-22-15A   | SWC3a          |
| Anti-Pig CD1 mAK    | 76-7-4      | CD1            |
| Anti-Pig CD2a mAK   | 1038h-8-31  | CD2            |
| Anti-Pig CD4a mAK   | 74-12-4     | CD4            |
| Anti-Pig CD8 mAK    | 76-2-11     | CD8            |

## **4.3 Anästhesie und Katheterimplantation**

### **4.3.1 Anästhesiezubehör und Geräte**

Endotrachealtubus (Hi-Contour<sup>®</sup> mit Niederdruckcuff 6-7 mm ID, Mallinckrodt Medical, Irland)

Handbeatmungsbeutel (Resutator<sup>®</sup>, Drägerwerke AG, Lübeck)

Laryngoskop (Wiskonsin 300 mm, RFQ-Medizintechnik, Tuttlingen)

Magensonde (Magensonde für Rüscher, Waiblingen)

Narkosegerät (Cato<sup>®</sup>, Drägerwerke AG, Lübeck)

Blutgasanalysegerät (ABL 500, Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark)

EKG- und Pulsoxymeter (Satlite Plus<sup>®</sup>, DHatex Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland)

Hämoximeter (OSM 3, Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark)

Hochfrequenz-Elektro-Chirurgiegerät (System 200, Martin, Tuttlingen)

Infusionspumpe (Infusomat<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Perfusorpumpe (Perfusomat<sup>®</sup> F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

##### 4.3.2 Verbrauchsmaterial

Blutentnahmesystem (Multiadapter<sup>®</sup> und Monovette<sup>®</sup> EDTA-K, 1,2 ml, Fa. Saerstedt, Nümbrecht)

Dreiwegehahn (Discofix<sup>®</sup> -3, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Einführbesteck-Set (Introducer-Set, 8.5 Fr, Arrow, Reading, USA)

Einmalspritzen (1ml, 2ml, 5ml, 10ml und 20ml, B. Braun, Melsungen)

Elastische Binden (BMP-Idealbinden S, 10 cm, Beiersdorf AG, Hamburg)

Hahnbank (Discofix<sup>®</sup>-Hahnbank, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Heidelberger Verlängerung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Kanülen ("Sterican<sup>®</sup>"(20G), B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Mullkompressen (ESKompressen<sup>®</sup>, Hartmann, Heidenheim)

Nahtmaterial (Dexon<sup>®</sup> II 2/0 und Novafil<sup>®</sup> 2/0, Braun-Dexon, Spangenberg)

Infusionsleitung (Original Infusomat<sup>®</sup>leitung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

#### 4. Material und Methoden

---

Pflaster (Leukoplast<sup>®</sup>, Fa. Beiersdorf AG, Hamburg)

Perfusionsspritzen (Original Perfusor<sup>®</sup> Spritzen 50ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Perfusionsleitungen (Original Perfusor<sup>®</sup> Leitung (Luerlock) 150cm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Polyurethankatheter (Cavafix<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Pulmonalkatheter (Swan-Ganz<sup>®</sup>, 7Fr Thermodilutonskatheter, Baxter, Unterschleißheim)

Punktionskanüle (16 G Abbocath<sup>®</sup>, Abboth, Wiesbaden)

Venenverweilkanüle (Vasofix<sup>®</sup> Braunüle 20 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

#### 4.3.3 Pharmaka

Fentanyl (Fentanyl<sup>TM</sup>-Janssen, Janssen, Neuss)

Flunitrazepam (Rohypnol<sup>®</sup>, Roche, Grenzach-Whylen)

Heparin (Liquemin<sup>®</sup>, Roche, Grenzach-Whylen)

Kaliumchlorid-Lösung (Kaliumchlorid 7,45 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia Upjohn, Erlangen)

Physiologische Kochsalzlösung (Schiwa<sup>®</sup> Perfuflac, Schiwa GmbH, Glandorf)

Polyvidon-Iod-Lösung (Betaisodona<sup>®</sup>-Lösung, Mundipharma, Limburg)

Propofol (Disoprivan<sup>®</sup> 1 %, Zeneca, Plankstadt)

Vecuronium (Norcuron<sup>®</sup>, Organon-Teknika, Eppelheim)

Vollelektrolytlösung (Ringerlösung<sup>®</sup>, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen)

## **4.4 Datenverwaltung und Statistik**

Datenverwaltung (Excel 97 und Word 97 für Windows 98, Microsoft® Corp. Central Europe, Unterschleißheim)

Statistik- und Grafikprogramm (GraphPad Prism 3.00, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)

## **4.5 Versuchstiere**

### **4.5.1 Schweine**

Die Tiere stammten von einem der Universität zuliefernden Schweinezuchtbetrieb. Es handelte sich bei den Schweinen um eine Hybridkreuzung (F<sub>2</sub> -Generation), bei der die Muttertiere Kreuzungen der Rassen *Deutsche Landrasse* und *Edelschwein* waren (F<sub>1</sub> -Generation). Die Vatertiere gehörten ausschliesslich zur Rasse *Pietrain*.

Vor Versuchsbeginn wurden alle Tiere allgemein klinisch auf ihren Gesundheitszustand hin untersucht. In den Versuch wurden ausschließlich klinisch unauffällige Tiere genommen.

Die Tiere besaßen ein durchschnittliches Gewicht von  $26,3 \pm 3,5$  kg. Die sechs männlichen kastrierten Schweine hatten ein durchschnittliches Gewicht von  $27,2 \pm 1,5$  kg, während die 34 weiblichen Schweine im Mittel  $26,1 \pm 3,8$  kg wogen. Die sechs Tiere, bei denen postoperativ das Blut aus dem zentralvenösen Katheter entnommen wurde, hatten ein Gewicht von  $24,0 \pm 3,9$  kg. Das Gewicht wurde unmittelbar vor der Narkose ermittelt.

##### 4.5.2 Haltungsbedingungen

Der Versuch fand im tierexperimentellen Bereich der Chirurgischen Forschung des Chirurgischen Klinikums der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg statt.

Die Tiere wurden in einem gekachelten vollklimatisierten Raum (Fläche 5,5 m<sup>2</sup>, Höhe 2,7 m) auf Spaltenboden einzeln bei einer Raumtemperatur von  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , einer Luftfeuchtigkeit von 60-65% und einem Tag/Nachtzyklus von 12 Stunden (hell: von 7.00 bis 19.00 Uhr) gehalten. Die Luft wurde 6 mal stündlich ausgetauscht.

## **4.6 Versuchsprotokoll**

##### 4.6.1 Präoperative Phase

Acht Tage vor Versuchsbeginn wurden die Tiere vom Züchter geholt und wie beschrieben im Tiertrakt untergebracht. Diese Zeit diente der Gewöhnung an die neue Umgebung, die Manipulationen und den direkten Kontakt zu Menschen.

24 Stunden vor der Operation wurde das Futter abgesetzt. Wasser wurde durchgehend ad libidum angeboten.

##### 4.6.2 Prämedikation und Operationsvorbereitung

Zur Sedation erhielten die Tiere intramuskulär 0,2 mg/kg KGW (Körpergewicht) Flunitrazepam (Rohypnol<sup>®</sup>) und 20 mg/kg KGW Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>). Anschließend wurde eine Venenverweilkanüle (18 G Vasofix<sup>®</sup>) in eine Ohrvene gelegt und mit Pflaster gesichert.



Nach Präoxygenierung mit reinem Sauerstoff (9L/Min) über 5 Minuten, wurde die Narkose nach Bedarf mit 2-3 mg/kg KGW Propofol (Disoprivan®) i.v. eingeleitet. Die orotracheale Intubation erfolgte in Rückenlage mit einem Endotrachealtubus unter laryngoskopischer Kontrolle. Bis zum Anschließen an das Beatmungsgerät wurden die Tiere mit einem Handbeatmungsbeutel manuell beatmet. Eine Magensonde wurde peroral in den Magen vorgeschoben.

##### 4.6.3 Aufrechterhaltung der Anästhesie

Die Narkose wurde als kombinierte Inhalations-Injektionsanästhesie mit O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O (FiO<sub>2</sub> 0,3), 0,1-0,2 mg/kg KGW/h Flunitrazepam i.v., 2-3 mg/kg KGW/h Propofol i.v.; 0,003-0,005 mg/kg KGW/h Fentanyl (Fentanyl™-Janssen) i.v. und 0,4 mg/kg KGW/h Vecuronium (Norcuron®) weitergeführt.

Die Injektionsanästhetika wurden mit Hilfe von Perfusoren via Hahnenbank intravenös gegeben. Als Trägerlösung und zur Volumensubstitution erhielten die Schweine 10 mL/kg KGW/h Ringer-Lösung intravenös über eine Infusionspumpe.

Das Narkosemonitoring umfasste die in- und expiratorischen Atemgase, Elektrokardiogramm, Pulsoxymetrie, Blutgasanalyse und Hämoximetrie.

##### 4.6.4 Katheterimplantation

Die Katheterimplantation erfolgte nach Scheren und Desinfektion der Haut mit Polyvidon-Lösung unter sterilen Bedingungen.

Die linksseitige Vena jugularis externa und Arteria carotis communis wurden chirurgisch dargestellt und mittels Seldinger Technik wurde eine Katheterschleuse (Einführbesteck-Set

8,5 Fr) in die Vene bzw. ein Polyurethankatheter (Cavafix®) in die Arterie eingeführt. Beide Katheter wurden mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial (Novavil® 3/0) am Gefäß fixiert. Die Katheter wurden mit Dreiwegehähnen versehen und an ein Druckspülsystem mit physiologischer Kochsalzlösung angeschlossen.

##### 4.6.5 Blutprobengewinnung

Die Blutentnahme zur Bestimmung des weißen Blutbildes und für die durchflusszytometrische Analyse erfolgte unmittelbar nach Katheterisierung der Vena jugularis externa. Dazu wurde jeweils Blut in eine 1,2 ml EDTA-K Monovette mit aufgesetztem Multiadapter aufgezogen. Die Proben wurden vor der weiteren Bearbeitung maximal 8 Stunden bei 4 °C gelagert.

##### 4.6.6 Vorgehen bei der Versuchsgruppe zur Untersuchung postoperativer Veränderungen

Nach dem Implantieren des Katheters und der Probenentnahme erfolgte bei diesen Tieren ein Wundverschluß.

##### 4.6.7 Postoperative Versorgung

Die Katheterenden mit den Dreiwegehähnen wurden mittels selbstklebendem Verband so platziert, dass sie im Nackenbereich des Tieres aus dem Verband kamen und so vor Manipulationen durch das Tier geschützt waren. Die Narkose wurde in üblicher Weise ausgeleitet.

##### 4.6.8 Versorgung im Stall

Im Stall wurden die Katheter über die Dreiwegehähne mittels vorgespülter Perfusorleitungen an eine Dauerinfusion mit heparinisierten Ringerlösung (100 I.E. Heparin/ml Ringerlösung) angeschlossen.

Das Tier wurde mit einer beweglichen Aufhängevorrichtung zur Stalldecke versehen, an der der Katheter befestigt wurde. Damit konnte ein Schutz vor Verschmutzung und Zerstörung bei weitgehender Bewegungsfreiheit des Tieres erreicht werden.

Nach dem vollständigen Erwachen erhielten die Tiere Futter.

##### 4.6.9 Postoperative Blutprobenentnahme

24 Stunden nach der ersten intraoperativen Blutabnahme wurde den wachen Tieren ein weiteres Mal Blut abgenommen. Die Blutabnahme erfolgte vormittags ebenso wie der operative Eingriff.

## **4.7 Probenaufbereitung**

##### 4.7.1 Blutbild

Die EDTA - Monovetten zur Bestimmung des großen Blutbildes wurden sofort zum Klinischen Labor Clotten Freiburg gebracht und dort mittels ADVIA<sup>®</sup> 120 (Bayer AG, Leverkusen) untersucht.

##### 4.7.2 Durchflusszytometrie

Die weitere Probenaufbereitung erfolgte unmittelbar nach der Probengewinnung. In ein Rundbodenreagenzröhrchen wurden 100 µl Vollblut und 20 µl Antikörper (siehe 3.2.2) pipettiert und gut gemischt. Danach wurde die Probe bei Raumtemperatur im Dunkeln 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der Erythrozytenlysisgebrauchslösung zugegeben und gemischt. Die Probe wurde wiederum bei Raumtemperatur im Dunkeln 15 Minuten inkubiert und anschließend eine Minute bei Raumtemperatur mit 1600 Umdrehungen pro Minute (U/Min) (500 x G) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wie oben beschrieben wurde der Waschvorgang wiederholt.

Nach abschließender Aufnahme des Zellpellets in 300 µl PBS erfolgte die Messung mit dem FACScan, wobei zunächst Isotypkontrollen durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse wurden ausgedruckt, mit dem Kalkulationsprogramm Microsoft Excel 97 in Tabellenform geordnet und anschließend statistisch ausgewertet.

## **4.8 Datenverarbeitung und Statistik**

### 4.8.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Statistikprogramm Graph Pad Prism Version 3.00. Zu jedem untersuchten Parameter wurden der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD), das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes (95% CI), der Median, der höchste Wert ( $x_{\text{Max}}$ ), der niedrigste Wert ( $x_{\text{Min}}$ ) und die Anzahl der Tiere

(n) bestimmt. Außerdem wurden alle Messungen auf eine Normalverteilung nach GAUSS mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft.

Obwohl die Tierzahl sowohl beim geschlechtsspezifischen (6 männliche versus 34 weibliche Tiere) wie beim postoperativen Vergleich (6 Tiere) gering war, wurde eine statistische Analyse dieser Werte mit dem Student-t-Test durchgeführt. Der Test auf geschlechtsspezifische Unterschiede erfolgte als ungepaarter, der Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte erfolgte als gepaarter Test.

##### 4.8.2 Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Gesamtgruppe wurden graphisch als Box-Plots dargestellt. Hierbei werden die Daten in 4 Bereiche (Quartile) mit der gleichen Anzahl an Werten aufgeteilt. Die Quartile werden dabei durch das 25% Perzentil, das 50% Perzentil und das 75% Perzentil getrennt. Die Box eines Plots wird vom 25% bzw. 75% Perzentil begrenzt. In diesem Interquartilbereich liegen 50% der Werte. Die innere Linie eines Plots stellt den Median dar (50% Perzentil). Die „Whiskers“ geben den obersten und untersten Wert und damit den Wertebereich („Range“) wieder. Bei einer geringen Tierzahl ( $n < 6$ ) werden lediglich Median und der Maximum- bzw. Minimumwert angegeben.

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden als Balkendiagramme dargestellt.

Die zwei Messzeitpunkte von den sechs Tieren, die auf postoperative Veränderungen untersucht wurden, sind in Liniendiagrammen dargestellt. Der „Basalwert“ bezeichnet hierbei den ersten gemessenen Wert. „Postoperativ“ wird die Messung nach 24 Stunden genannt. Zur besseren Beurteilung der graphischen Darstellung sind die Werte zusätzlich in tabellarischer Form angegeben.

## 5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vierzig Hybridmastschweine untersucht. Die allgemeine klinische Untersuchung ergab keine Hinweise auf eine Allgemeinerkrankung. Die Dauer des operativen Eingriffes bis zur Probenentnahme betrug durchschnittlich eine Stunde. Narkose und Eingriff verliefen bei allen Tieren ohne Komplikationen.

Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse jeweils wie folgt beschrieben:

5.1 Gesamtgruppe, 5.2 Vergleich der männlichen kastrierten und weiblichen Tiere der Gesamtgruppe und 5.3 Gruppe zur Untersuchung postoperativer Veränderungen.

### 5.1 Gesamtgruppe

#### 5.1.1 Blutbild und Differentialblutbild

Die Ergebnisse der Blutbildbestimmung sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse des Blutbildes

|                  | Einheiten    | MW    | SD    | 95% CI      | X <sub>Min</sub> | X <sub>Max</sub> |
|------------------|--------------|-------|-------|-------------|------------------|------------------|
| Erythrozyten     | Mio/ $\mu$ l | 5,93  | 0,6   | 5,66 - 6,20 | 4,9              | 7,3              |
| Thrombozyten     | Tsd/ $\mu$ l | 215,4 | 122,6 | 160 - 271   | 55               | 638              |
| Leukozyten       | Tsd/ $\mu$ l | 13,84 | 4,4   | 12,2 - 15,5 | 4,5              | 24,6             |
| Lymphozyten      | % der Leuko. | 43,9  | 12,3  | 39,2 - 48,6 | 15,0             | 69,0             |
|                  | Tsd/ $\mu$ l | 5,91  | 2,34  | 5,03 – 6,81 | 2,3              | 11,9             |
| Neutr. Granuloz. | % der Leuko. | 48,7  | 12,2  | 44,0 - 53,4 | 24,0             | 73,0             |
|                  | Tsd/ $\mu$ l | 6,85  | 3,16  | 5,65 - 8,05 | 1,5              | 18,0             |
| Eosinophile G.   | % der Leuko. | 2,41  | 2,0   | 1,66 - 3,17 | 0                | 8                |
|                  | Tsd/ $\mu$ l | 0,33  | 0,26  | 0,23 – 0,43 | 0                | 0,98             |
| Basophile G.     | % der Leuko. | 0,58  | 0,6   | 0,34 - 0,81 | 0                | 3                |
|                  | Tsd/ $\mu$ l | 0,09  | 0,12  | 0,04 - 0,14 | 0                | 0,66             |
| Monozyten        | % der Leuko. | 2,21  | 1,5   | 1,62 - 2,79 | 0                | 6                |
|                  | Tsd/ $\mu$ l | 0,38  | 0,29  | 0,23 – 0,45 | 0                | 1,32             |

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, 95% CI = Vertrauensintervall mit 95%, X<sub>Min</sub> = minimaler Wert, X<sub>Max</sub> = maximaler Wert, Leuko. = Leukozyten, Neutr. Granuloz. = neutrophile Granulozyten, Basophile G. = basophile Granulozyten, Eosinophile G. = eosinophile Granulozyten, Mio = Millionen, Tsd = Tausend

### 5.1.2 Leukozytenphänotypisierung

Die statistische Analyse zeigte bei allen Leukozytenphänotypen eine Normalverteilung nach Gauss. Bei einigen Leukozytenphänotypisierungen war die Anzahl der gemessenen Ereignisse (Events) von Einzeltieren geringer als 300. Diese Tiere wurden nicht ausgewertet, da die Ergebnisse nicht aussagekräftig sind.

#### 5.1.2.1 SWC3a positive Leukozyten

Die SWC3a positiven Leukozyten weisen ein 95%-Konfidenzintervall von 62,01 bis 70,40% auf. Der Mittelwert aller Tiere beträgt 66,20% mit einer Standardabweichung von 12,8%. Abbildung 3 stellt die SWC3a positiven Leukozyten dar. Zwei der 40 untersuchten Tiere wurden aufgrund niedriger Eventzahlen nicht ausgewertet.

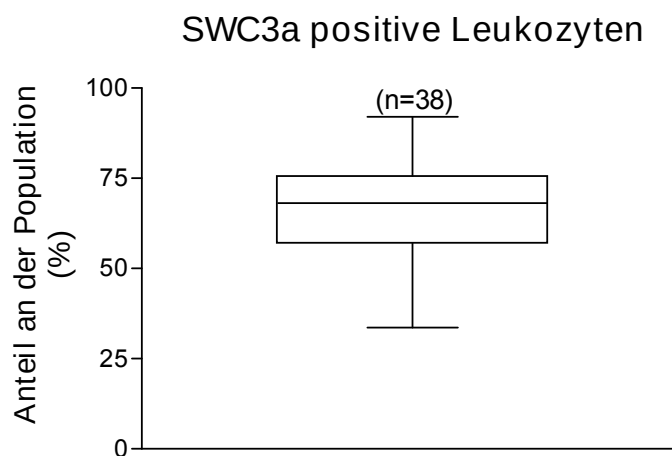


Abbildung 3

#### 5.1.2.2 SWC3a positive Monozyten

Der Anteil der SWC3a positive Monozyten wurde nach dem Definieren eines Monozyten-Gates bestimmt. Abbildung 4 stellt die SWC3a positive Monozyten dar, wobei fünf Tiere aufgrund niedriger Eventzahlen nicht ausgewertet werden konnten (n=35).

Die Werte der SWC3a<sup>+</sup> Monozyten variieren stark mit einem Konfidenzintervall zwischen 50,05 und 63,54 %.

Der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für die SWC3a<sup>+</sup> Monozyten beträgt  $56,79 \pm 19,6\%$ .

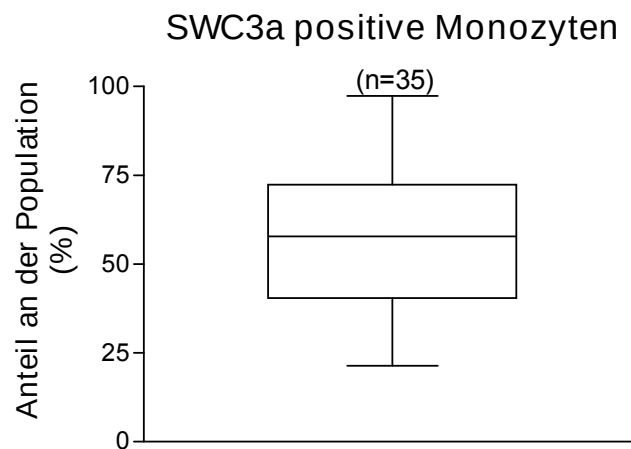


Abbildung 4

#### 5.1.2.3 SLA-DR positive Lymphozyten

Der Anteil der SLA-DR positive Lymphozyten wurde nach dem Festlegen eines Lymphozyten-Gates festgestellt.



In Abbildung 5 sind die Ergebnisse von 37 untersuchten Tieren wiedergegeben. Drei Tiere konnten aufgrund niedriger Eventzahlen nicht ausgewertet werden.

Der Anteil der SLA-DR exprimierenden Lymphozyten liegt in einem 95%-Konfidenzintervall von 32,24 bis 37,81% bei einem Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von  $35,02 \pm 8,4\%$ .

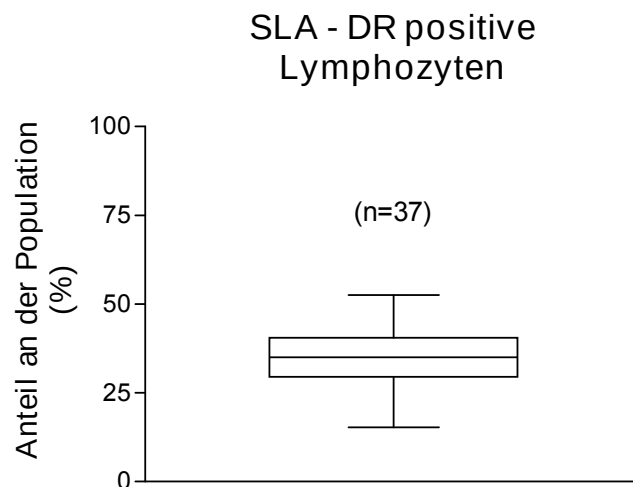


Abbildung 5

### 5.1.2.4 SLA-DR positive Monozyten

Durch Festlegen eines Monozyten-Gates wurden die prozentualen Anteile der SLA-DR exprimierenden Monozyten bestimmt. Aufgrund niedriger Eventzahlen musste auch hier auf die Auswertung von 4 Tieren verzichtet werden.

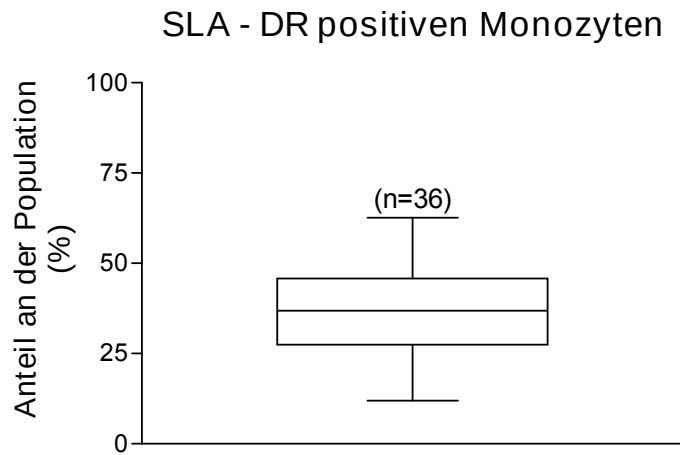


Abbildung 6

Der Mittelwert liegt bei  $37,50 \pm 13,09\%$ . Das Konfidenzintervall liegt zwischen 33,07 und 41,93 %.

#### 5.1.2.5 CD1 positive Lymphozyten

Schwierigkeiten bei der Lieferung des Antikörpers führten dazu, daß 12 Tiere nicht auf den Anteil der CD1 positiven Lymphozyten untersucht wurden.

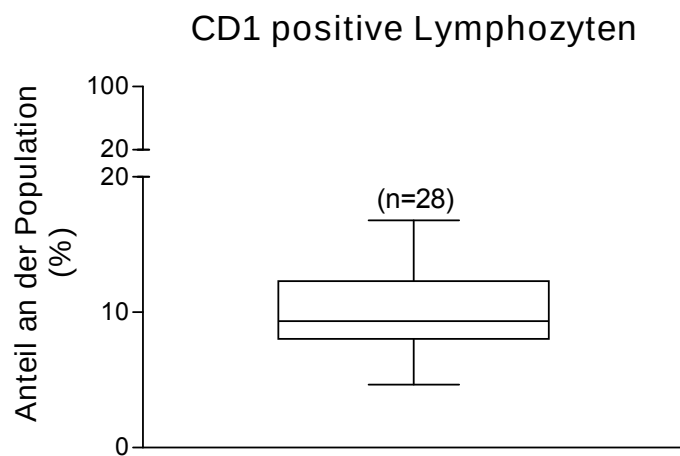


Abbildung 7

Für die auswertbaren Proben ergibt sich ein Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von  $10,03 \pm 2,91\%$  mit einem 95%-Vertrauensbereich von 8,90 bis 11,16%. Die Analyse der CD1 positiven Lymphozyten ist in Abbildung 7 dargestellt.

### 5.1.2.6 CD2 positive Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der CD2 positive Lymphozyten konnte bei allen 40 Tieren bestimmt werden. Das 95%-Konfidenzintervall liegt zwischen 43,18 und 51,59%. Der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung liegt bei  $47,38 \pm 13,15\%$ .

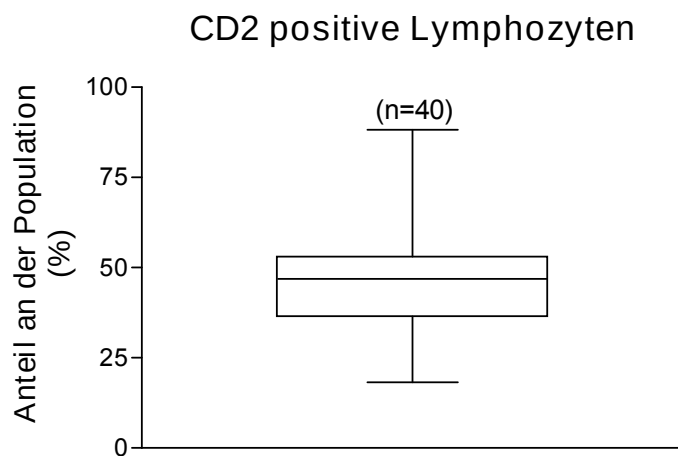


Abbildung 8

### 5.1.2.7 CD4 positive Lymphozyten

Erhebliche individuelle Schwankungen mit Extremwerten von 5,88% und 66,22% sind bei den CD4 positive Lymphozyten zu finden.

Das 95%-Konfidenzintervall liegt zwischen 26,33 bis 33,18%. Der Mittelwert der CD4 positive Lymphozyten  $\pm$  Standardabweichung beträgt  $29,76 \pm 10,7\%$ .

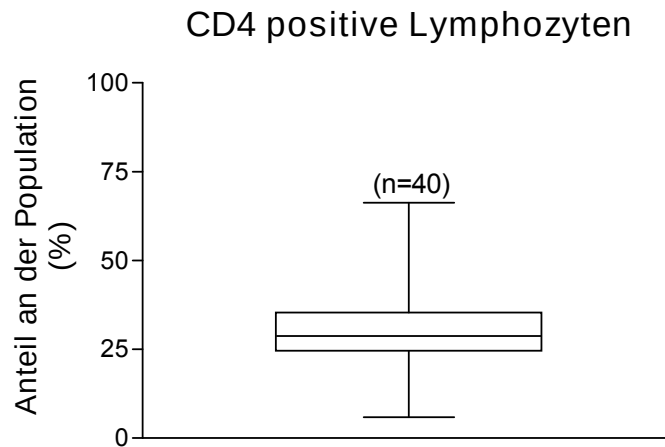


Abbildung 9

#### 5.1.2.8 CD8 positive Lymphozyten

Der Mittelwert der CD8 positive Lymphozyten beträgt  $18,3 \pm 11,04\%$  (n=40). Der 95%-Vertrauensbereich liegt zwischen 14,77 und 21,83 %.

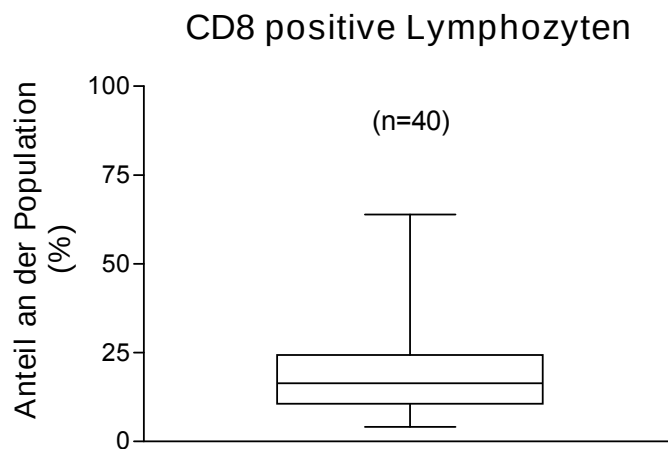


Abbildung 10

### 5.1.2.9 Das Verhältnis CD4 zu CD8 positive Lymphozyten (Ratio CD4/CD8)

Das Verhältnis CD4 zu CD8 positive Lymphozyten konnte bei 40 Schweinen errechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: Verhältnis der CD4 positive/CD8 positive Lymphozyten bei 40 Schweinen

| <b>Ratio<br/>CD4/CD8</b> | MW   | SD   | 95% CI      | X <sub>Min</sub> | X <sub>Max</sub> |
|--------------------------|------|------|-------------|------------------|------------------|
|                          | 2,08 | 1,21 | 1,69 – 2,46 | 0,60             | 6,02             |

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, 95% CI = 95%-Konfidenzintervall, X<sub>Min</sub> = minimaler Wert, X<sub>Max</sub> = maximaler Wert

### 5.1.2.10 Zusammenfassung der Gesamtgruppe

In der Tabelle 5 sind die Daten der untersuchten Schweine bezüglich ihrer Leukozyten- und Lymphozytenphänotypen zusammengefaßt.

Tabelle 5: Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen bei den untersuchten Schweinen

| <b>Antigen</b>                     | <b>SWC3a<br/>Leukoz</b> | <b>SWC3a<br/>Mono</b> | <b>SLA-DR<br/>Lymph</b> | <b>SLA-DR<br/>Mono</b> | <b>CD1</b>      | <b>CD2</b>       | <b>CD4</b>       | <b>CD8</b>       |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>Pop. in %</i>                   | 66,20                   | 56,79                 | 35,02                   | 37,50                  | 10,03           | 47,38            | 29,76            | 18,30            |
| <i>MW und SD</i>                   | +/- 12,8                | +/- 19,6              | +/- 8,4                 | +/- 13,1               | +/- 2,9         | +/-13,2          | +/-10,7          | +/-8,4           |
| <i>Konfidenz-<br/>interval 95%</i> | 62,01 -<br>70,40        | 50,05 -<br>63,54      | 32,24 -<br>37,81        | 33,07 -<br>41,93       | 8,90 -<br>11,16 | 43,18 -<br>51,59 | 26,33 -<br>33,18 | 14,77 -<br>21,83 |

Lymph= Lymphozyten, Mono = Monozyten, Leukoz = Leukozyten, Pop. = Population, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

## 5.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb der Gesamtgruppe

### 5.2.1 Blutbild und Differentialblutbild

Die Parameter des weissen Blutbildes der sechs kastrierten männlichen und der 34 weiblichen Tiere der Gesamtgruppe ergaben keinerlei statistische Unterschiede.

### 5.2.2 Leukozytenphänotypisierung

#### 5.2.2.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den SWC3a positiven Leukozyten

Die weiblichen Tiere zeigen im Mittel einen höheren Anteil an SWC3a positiven Leukozyten. Der Unterschied ist nicht signifikant ( $p=0,5031$ ). Der Mittelwert der SWC3a positiven Leukozyten beträgt bei den weiblichen Tieren  $66,75 \pm 13,20 \%$  ( $n=33$ ), bei den kastrierten männlichen Tieren  $62,58 \pm 9,71 \%$  ( $n=5$ ).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

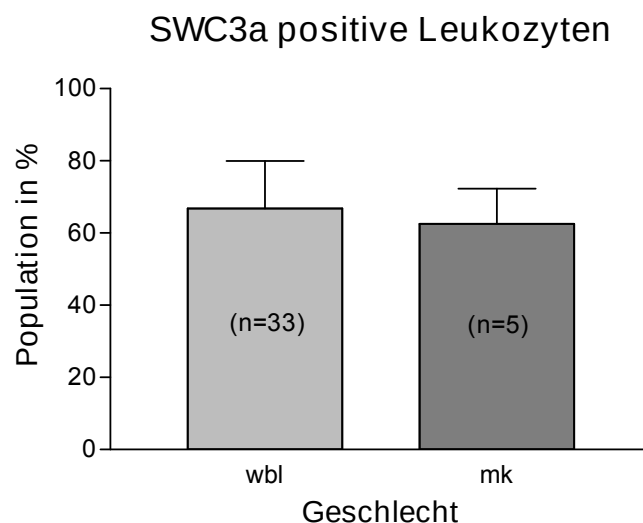


Abbildung 11: Geschlechtsspezifische Unterschiede der SWC3a<sup>+</sup> Leukozyten ( $p = 0,5031$ )

In der Gruppe der weiblichen Tiere liegt der Median bei 69,32%. Das Minimum beträgt 33,65%, das Maximum beträgt 92,0%.

In der Gruppe der männlichen Tiere beträgt der Median 60,49%. Der minimale Wert ist 50,48%, während der maximale Wert 76,45% ist.

### 5.2.2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den SWC3a positiven Monozyten

Zwischen den Geschlechtern ist kein signifikanter Unterschied der SWC3a positiven Monozyten festzustellen ( $p=0,9324$ ). Der Mittelwert beträgt bei den weiblichen Tieren ( $n=30$ )  $56,68 \pm 19,37\%$ , bei den kastrierten männlichen Tieren ( $n=5$ )  $57,48 \pm 23,65\%$  wie in Abbildung 12 zu sehen ist.

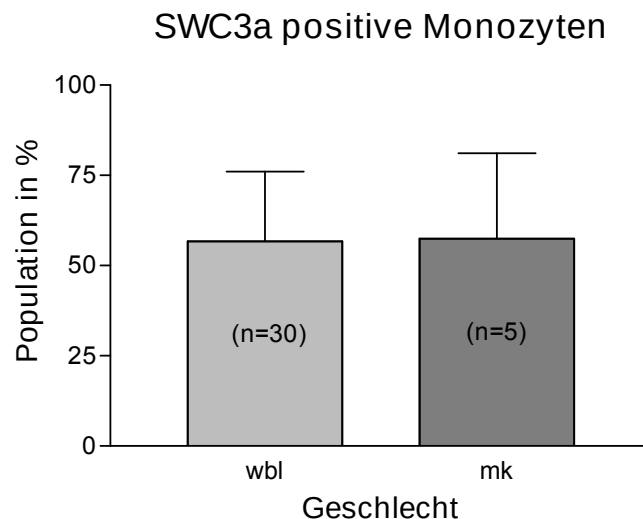


Abbildung 12: Geschlechtsspezifische Unterschiede der SWC3a<sup>+</sup> Monozyten ( $p=0,9342$ )

Der Median in der weiblichen Gruppe liegt bei 58,3%. Die Einzelwerte schwanken stark. Das Minimum dieser Gruppe beträgt 21,37%, das Maximum 97,35%. In der Gruppe der

männlichen Tiere beträgt der Median 56,45%. Das Minimum ist 25,62%, das Maximum beträgt 88,86%.

### 5.2.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den SLA-DR positiven Lymphozyten

Der Mittelwert der SLA-DR positiven Lymphozyten der weiblichen Tiere (n=32) beträgt  $35,02 \pm 8,7\%$ . Der Mittelwert der SLA-DR positiven Lymphozyten der kastrierten männlichen Tiere (n=5) beträgt  $35,06 \pm 6,6\%$ . Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren ( $p=0,9918$ ).

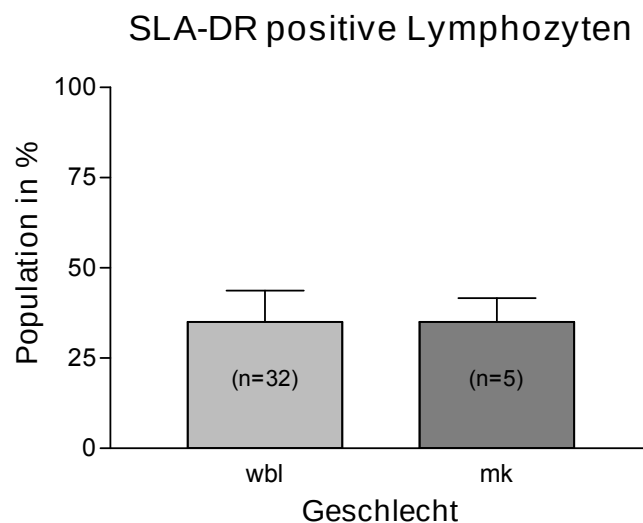


Abbildung 13: Geschlechtsspezifische Unterschiede der SLA-DR<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p=0,9918$ )

Abbildung 13 zeigt die Daten als Balkendiagramm. Die Gruppe der weiblichen Tiere zeigt einen Median von 35,09%. Das Minimum ist 15,25%, das Maximum 52,50%. In der Gruppe der männlichen Tiere liegt der Median bei 33,90%. Das Minimum beträgt 29,14%, das Maximum beträgt 44,92%.



#### 5.2.2.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den SLA-DR positiven Monozyten

Die weiblichen Schweine haben im Mittel einen höheren Anteil an SLA-DR tragenden Monozyten. Der Mittelwert beträgt bei den kastrierten männlichen Tieren  $32,89 \pm 14,0\%$  ( $n=5$ ), bei den weiblichen Tieren  $38,25 \pm 13,0\%$  ( $n=31$ ) der Monozyten. Der Unterschied ist nicht signifikant ( $p=0,4037$ ).

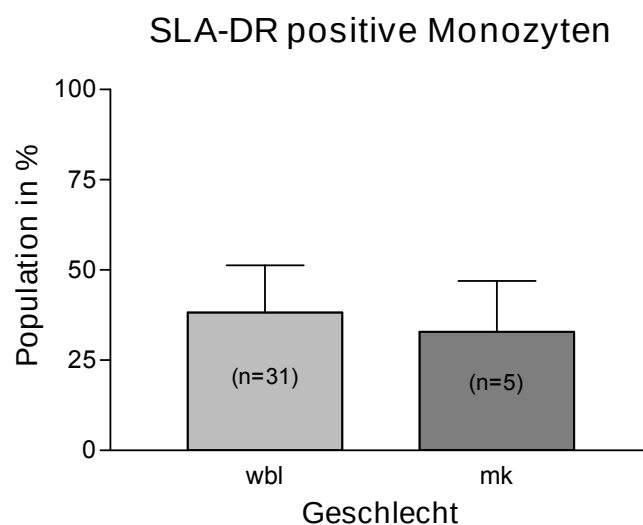


Abbildung 14: Geschlechtsspezifische Unterschiede der SLA-DR<sup>+</sup> Monozyten ( $p=0,4037$ )

Abbildung 14 zeigt die Fraktion der SLA-DR positiven Monozyten der kastrierten männlichen und der weiblichen Tiere im Vergleich.

Bei den weiblichen Tiere gibt es einen Median von 37,4%. Der niedrigste Wert beträgt 13,54%, das höchste 62,6%.

In der Gruppe der männlichen Tiere liegt der Median bei 33,9%. Das Minimum beträgt 11,99%, das Maximum beträgt 47,36%.

#### 5.2.2.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den CD1 positiven Lymphozyten

Bei den weiblichen Tieren wurde ein höherer Anteil an CD1 positiven Lymphozyten gefunden, der statistisch nicht signifikant ist ( $p=0,6182$ ). Der Mittelwert beträgt bei den weiblichen Tieren  $9,90 \pm 3,0\%$  ( $n=23$ ), bei den kastrierten männlichen Tieren  $10,63 \pm 2,45\%$  ( $n=5$ ). Abbildung 15 zeigt beide Gruppen im Vergleich. Die Y-Achse des Diagramms ist den Werten angepaßt.

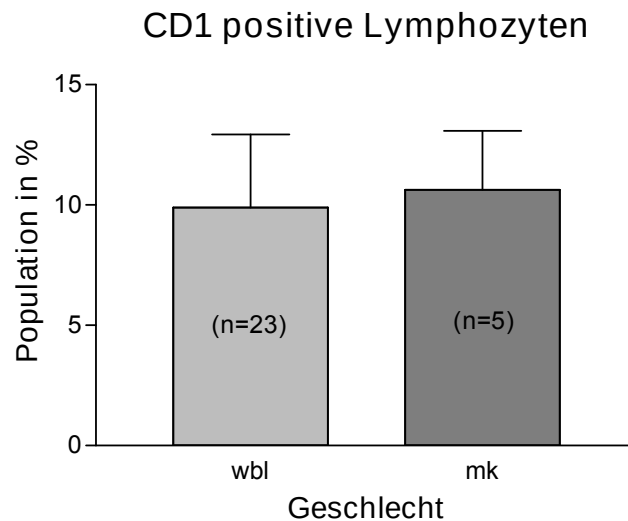


Abbildung 15: Geschlechtsspezifische Unterschiede der CD1<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p=0,6182$ )

Der Median liegt in der Gruppe der weiblichen Tiere bei 9,25% mit einem Minimum von 4,66% und einem Maximum 16,80%.

In der Gruppe der männlichen Tiere beträgt der Median 9,93%. Das Minimum beträgt 7,99%, das Maximum beträgt 14,15%.

#### 5.2.2.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den CD2 positiven Lymphozyten

Einen etwas höheren Anteil an CD2 positiven Lymphozyten im Durchschnitt haben die männlichen Tiere, wobei der Unterschied nicht signifikant ist ( $p=0,6947$ ). Der Mittelwert beträgt bei den weiblichen Tieren  $47,04 \pm 13,8\%$ , bei den kastrierten männlichen Tieren  $49,36 \pm 9,4\%$  (Abbildung 16).

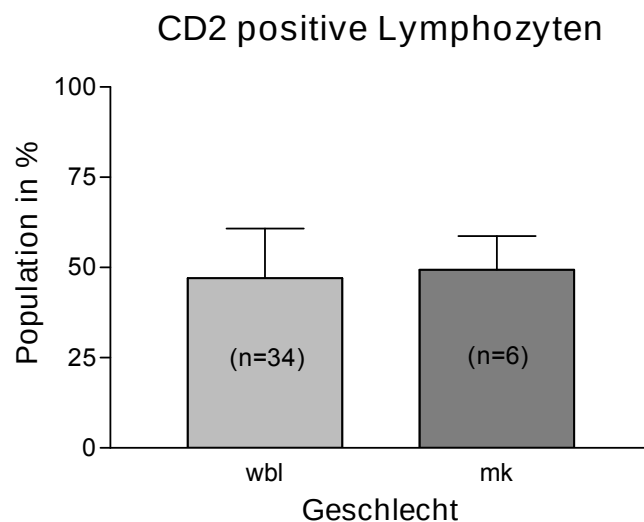


Abbildung 16: Geschlechtsspezifische Unterschiede der CD2<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p=0,6947$ )

Der Gruppe der weiblichen Tiere zeigt einen Median von 46,48% mit einem Minimum von 18,22%. Das Maximum beträgt 88,19% und liegt damit über dem Höchstwert der männlichen Gruppe von 67,06%.

In der Gruppe der männlichen Tiere liegt der Median bei 47,19%. Das Minimum der männlichen Gruppe beträgt 39,68%.

### 5.2.2.7 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den CD4 positiven Lymphozyten

Der Mittelwert beträgt bei den weiblichen Tieren  $29,92 \pm 11,4\%$ , bei den kastrierten männlichen Tieren  $28,83 \pm 5,5\%$  und ist damit nahezu gleich. Zwischen beiden Geschlechtern besteht kein signifikanter Unterschied ( $p=0,8217$ ). Aus Abbildung 17 ist erkennbar, dass in der Gruppe der weiblichen Tiere eine hohe Standardabweichung zu verzeichnen ist, während sie bei den männlichen Tieren geringer ist.

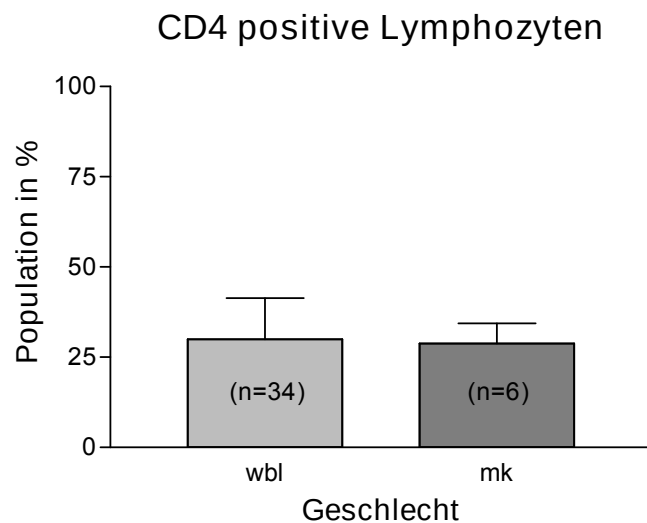


Abbildung 17: Geschlechtsspezifische Unterschiede der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p=0,8217$ )

Der Median liegt in der Gruppe der weiblichen Tiere bei 29,20%. Das Minimum beträgt 5,88%, das Maximum beträgt 66,22%.

In der Gruppe der männlichen Tiere liegt der Median bei 28,38%. Das Minimum beträgt 21,51%, das Maximum beträgt 37,43%.

#### 5.2.2.8 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei den CD8 positiven Lymphozyten

Aus Abbildung 18 geht hervor, dass kein signifikanter Unterschied der CD8 positiven Lymphozyten zwischen den Geschlechtern gefunden werden kann ( $p=0,9835$ ). Bei den weiblichen Tieren ( $n=34$ ) weist im Gegensatz zu den männlichen kastrierten ( $n=6$ ) eine hohe Standardabweichung auf individuelle Schwankungen hin.

Der Mittelwert des Anteils an CD8 positiven Lymphozyten beträgt bei den weiblichen Tieren  $18,32 \pm 11,7\%$ , bei den kastrierten männlichen Tieren  $18,22 \pm 7,4\%$ .

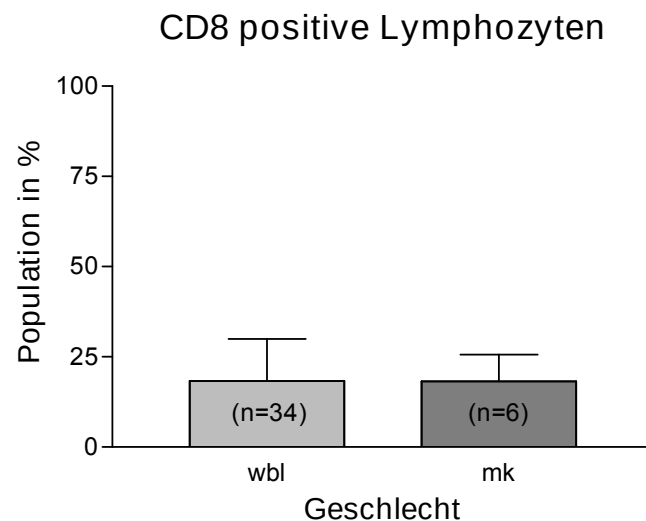


Abbildung 18: Geschlechtsspezifische Unterschiede der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p=0,9835$ )

Der Median der weiblichen Gruppe von 15,94% liegt leicht unter dem der männlichen Gruppe mit 16,42%.

Das Minimum in der weiblichen Gruppe beträgt 4,12%, das Maximum 63,88%.

In der Gruppe der männlichen Tiere ist der tiefste Wert 10,81%, der Höchstwert 28,83%.

### 5.2.2.9 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der CD4/CD8 Ratio

Der Mittelwert der CD4/CD8 Ratio beträgt bei den weiblichen Tieren  $2,13 \pm 1,3\%$  (n=34), bei den kastrierten männlichen Tieren  $1,78 \pm 0,68\%$  (n=6). Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Geschlechtern ist nicht festzustellen ( $p=0,5225$ ). Die Daten sind in Abbildung 19 in einem Scatter-Diagramm aufgetragen. Der Mittelwert ist durch den Strich dargestellt. Es ist eine rechtsschiefe Verteilung der CD4/CD8 Ratio bei den weiblichen Tieren zu sehen.

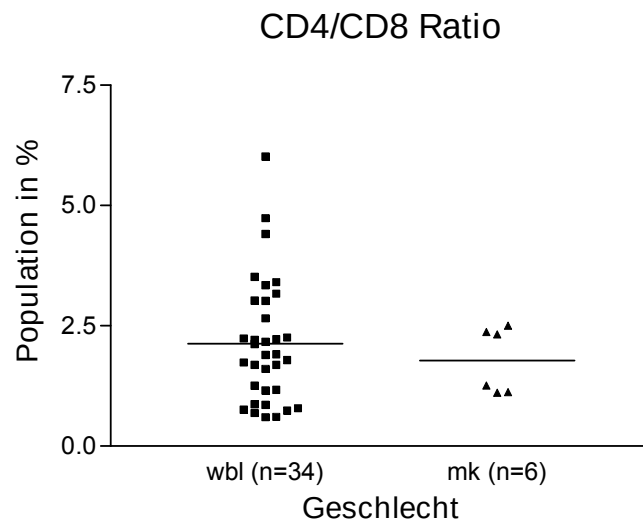


Abbildung 19: Geschlechtsspezifische Unterschiede der Ratio  $CD4^+ / CD8^+$  Lymphozyten ( $p=0,5225$ )

### 5.2.3 Zusammenfassung der geschlechtsspezifischen Unterschiede innerhalb der Gesamtgruppe

Bei keinem der untersuchten Parameter wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den männlichen und den weiblichen Schweinen gefunden.

### 5.3 Postoperative Veränderungen im weißen Blutbild und Leukozytenphänotypisierungen bei sechs Tieren

Die sechs weiblichen Tiere, die postoperativ beobachtet wurden, erholten sich gut in den ersten Stunden nach dem Eingriff. Bei allen wurden die Katheter gut toleriert, und es kam zu keinen postoperativen Komplikationen. Es wurden keine Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens durch den Eingriff festgestellt.

#### 5.3.1 Postoperative Veränderungen in Blutbild und Differentialblutbild

Tabelle 15: Postoperative Veränderungen des Blutbildes

|                          |                         | Basalwert (n=6) |       | Postoperativ (n=6) |      |
|--------------------------|-------------------------|-----------------|-------|--------------------|------|
|                          | Einheit                 | <b>MW</b>       | SD    | <b>MW</b>          | SD   |
| Leukozyten               | Tsd/ $\mu$ l            | <b>13,35</b>    | 6,45  | <b>14,72</b>       | 3,62 |
| Lymphozyten              | %                       | <b>34,0</b>     | 16,53 | <b>45,17</b>       | 8,33 |
|                          | Absolut in Tsd/ $\mu$ l | <b>3,85</b>     | 1,29  | <b>6,62 *</b>      | 1,95 |
| Neutrophile Granulozyten | %                       | <b>57,33</b>    | 13,63 | <b>44,0</b>        | 9,61 |
|                          | Absolut in Tsd/ $\mu$ l | <b>8,18</b>     | 5,43  | <b>6,37</b>        | 1,55 |
| Basophile Granulozyten   | %                       | <b>0,32</b>     | 0,41  | <b>0,53</b>        | 0,45 |
|                          | Absolut in Tsd/ $\mu$ l | <b>0,04</b>     | 0,05  | <b>0,08</b>        | 0,06 |
| Eosinophile Granulozyten | %                       | <b>2,17</b>     | 2,99  | <b>7,00 *</b>      | 5,06 |
|                          | Absolut in Tsd/ $\mu$ l | <b>0,32</b>     | 0,38  | <b>1,10 *</b>      | 0,82 |
| Monozyten                | %                       | <b>1,0</b>      | 0,5   | <b>1,8</b>         | 2,6  |
|                          | Absolut in Tsd/ $\mu$ l | <b>0,17</b>     | 0,21  | <b>0,34</b>        | 0,48 |

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, \* = signifikant gegenüber dem Basalwert

In Tabelle 15 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Differentialblutbildes der sechs Tieren aufgelistet, wobei „Basalwert“ der Messung nach Katheterimplantation und „postoperativ“ der Messung 24 Stunden nach der ersten Messung entspricht.

Im folgenden sind die Mittelwerte des Differentialblutbildes in den Abbildungen 20 bis 24 als Balkendiagramme aufgetragen. Die Skala der y-Achse ist zur besseren Beurteilung den Werten angepasst.

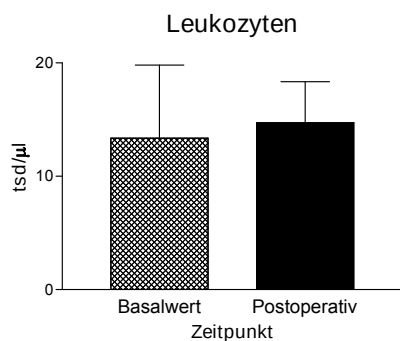


Abbildung 20: Leukozyten ( $p=0,5603$ )

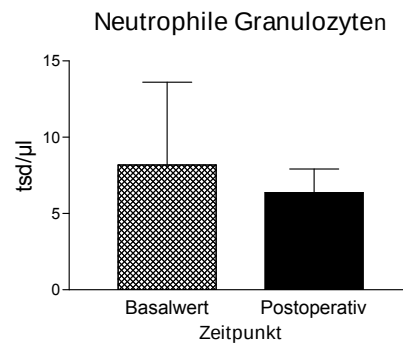


Abbildung 21: neutrophile Granulozyten ( $p=0,4955$ )

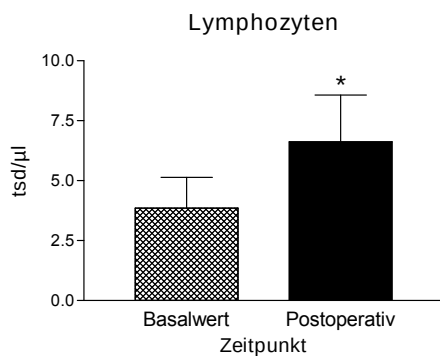


Abbildung 22: Lymphozyten ( $p=0,0107$ )

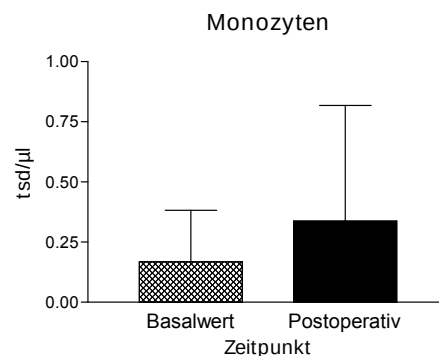


Abbildung 23: Monozyten ( $p=0,2127$ )



Bei der Leukozytenzahl ist postoperativ keine Veränderung festzustellen. Es kommt postoperativ zu einem Abfall des Mittelwertes der neutrophilen Granulozyten, der statistisch nicht signifikant ist ( $p=0,4955$ ).

Die absolute Anzahl an Lymphozyten steigt postoperativ signifikant an ( $p=0,0107$ ), allerdings nicht der prozentuale Anteil der Lymphozyten ( $p=0,3064$ ).

Aus Abbildung 23 lässt sich ersehen, dass es postoperativ zu einem Anstieg der Monozyten kommt, der ebenfalls nicht statistisch signifikant ist. Die Standardabweichung ist zu beiden Zeitpunkten sehr groß.

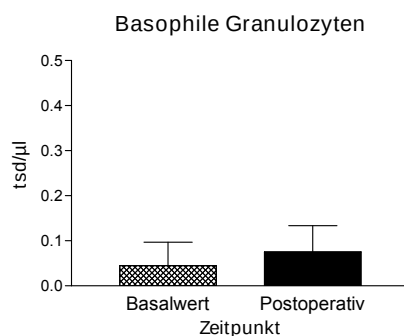


Abbildung 24: basophile Granulozyten ( $p=0,4338$ )

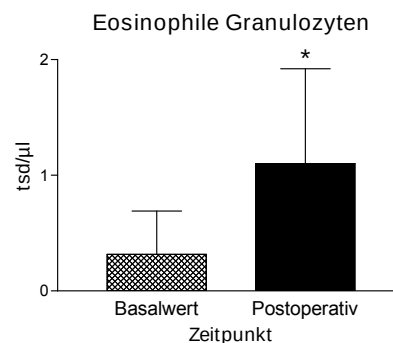


Abbildung 25: eosinophile Granulozyten ( $p=0,0358$ )

Bei den basophilen Granulozyten kann postoperativ kein signifikanter Anstieg festgestellt werden.

Die eosinophilen Granulozyten steigen signifikant an (absolut:  $p=0,0358$  und relativ:  $p=0,0476$ ). Die Standardabweichung ist zu beiden Zeitpunkten hoch, wie in Abbildung 25 zu sehen ist.

### 5.3.2 Postoperative Veränderungen der Leukozytenphänotypisierung bei sechs Schweinen

#### 5.3.2.1 Postoperative Veränderungen der SWC3a positiven Leukozyten

Der Mittelwert fällt von  $74,66\% \pm 14,84\%$  auf  $68,32\% \pm 9,36\%$ , wobei die Veränderung nicht signifikant ist. Abbildung 26 zeigt die Mittelwerte der SWC3a positiven Leukozyten.

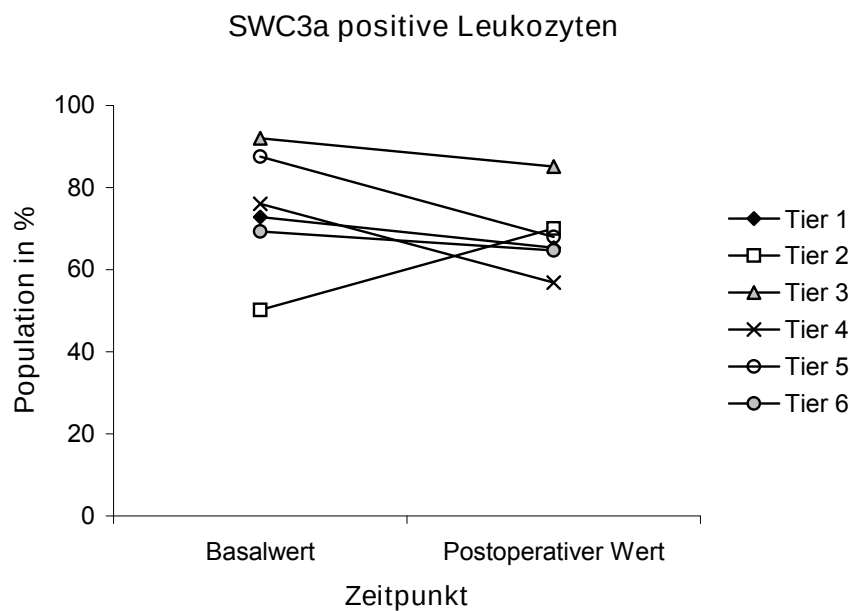


Abbildung 26: Postoperative Veränderungen der SWC3a Leukozyten ( $p=0,3289$ )

In Tabelle 16 sind die Einzelwerte zu sehen. Nur bei Tier 2 kommt es zu einem Anstieg. Auch bei den Gesamtleukozyten fällt Tier 2 durch einen deutlichen postoperativen Anstieg von 4.94 auf 11.50 Tausend/ $\mu\text{l}$  auf. Klinisch war das Tier unauffällig.

Tabelle 16: Postoperative Veränderungen der SWC3a<sup>+</sup> Leukozyten in %

| Leukozyten in % | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert       | 72,85  | 50,17  | 92,0   | 76,06  | 87,58  | 69,32  |
| postoperativ    | 65,35  | 70,01  | 85,1   | 56,86  | 67,95  | 64,66  |

### 5.3.2.2 Postoperative Veränderungen der SWC3a positiven Monozyten

Postoperativ kommt es zu einem geringfügigen nicht signifikanten Anstieg ( $p=0,8087$ ) von  $66,37\% \pm 21,80\%$  auf  $70,05\% \pm 17,08\%$ , wobei bei vier der fünf ausgewerteten Tiere eine verminderte Expression von SWC3a Molekülen auf Monozyten festzustellen ist. Abbildung 27 zeigt die Mittelwerte der SWC3a positiven Monozyten.

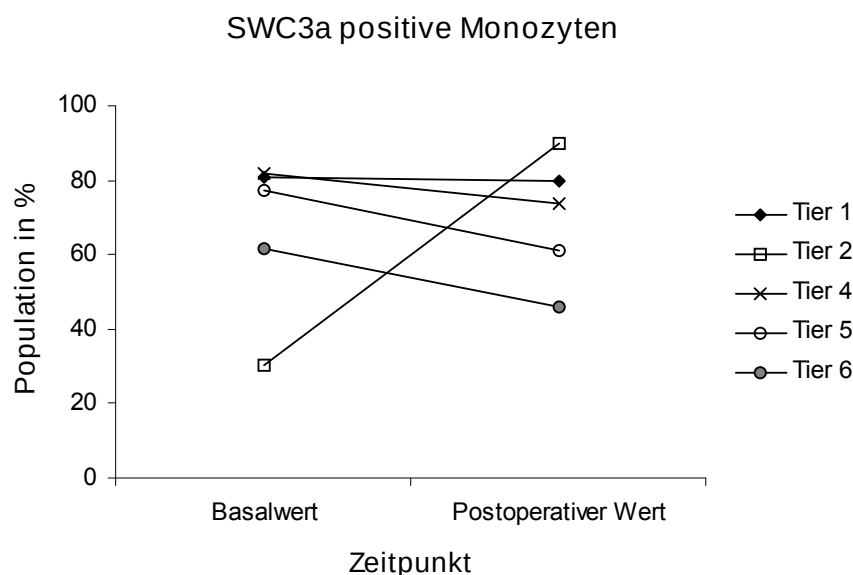


Abbildung 27: Postoperative Veränderungen der SWC3a Monozyten ( $p=0,8087$ )

In Tabelle 17 sind die Einzelwerte zu sehen. Von Tier drei sind keine Daten vorhanden. Bei Tier zwei kommt es im Gegensatz zu den anderen Tieren postoperativ zu einem massiven Anstieg der SWC3a positiven Monozyten.

Tabelle 17: Postoperative Veränderungen der SWC3a<sup>+</sup> Monozyten in %

| Leukozyten in % | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert       | 81,03  | 30,23  | n.v.   | 81,78  | 77,31  | 61,51  |
| postoperativ    | 79,86  | 89,75  | n.v.   | 73,83  | 60,99  | 45,83  |

n.v.= Daten nicht vorhanden

### 5.3.2.3 Postoperative Veränderungen der SLA-DR positiven Lymphozyten

Aus der Abbildung 28 läßt sich ersehen, dass die untersuchten Tiere postoperativ einen geringeren Anteil an SLA-DR positiven Lymphozyten ( $29,41\% \pm 15,5\%$ ) gegenüber dem Basalwert ( $34,16\% \pm 10,6\%$ ) haben. Diese Änderung ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,3269$ ).

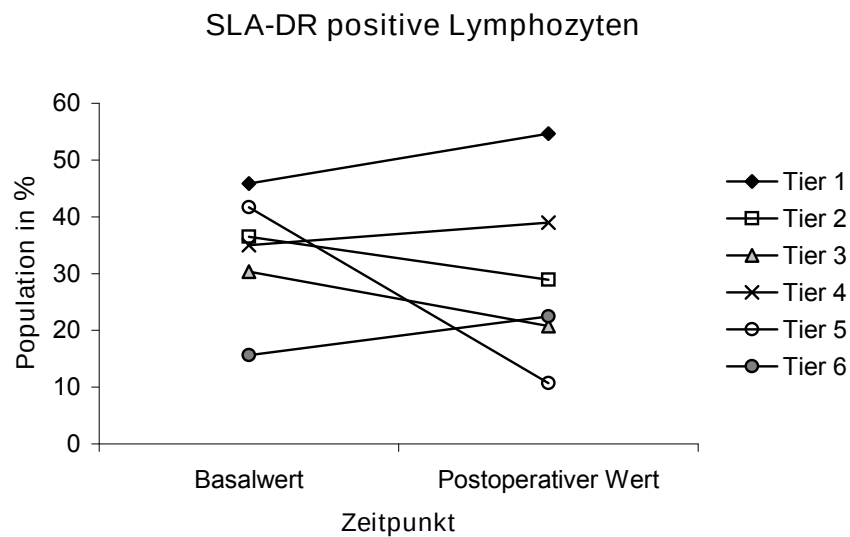


Abbildung 28: Postoperative Veränderungen der SLA-DR<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p = 0,3269$ )

In Tabelle 18 sind die Einzelwerte zu sehen. Bei drei Tieren kommt es postoperativ zu einem Abfallen, bei drei Tieren zu einem Ansteigen der Werte.

Tabelle 18: Postoperative Veränderungen der SLA-DR<sup>+</sup> Lymphozyten in %

| Leukozyten in % | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert       | 45,86  | 36,48  | 30,37  | 34,98  | 41,67  | 15,62  |
| postoperativ    | 54,64  | 28,93  | 20,75  | 38,96  | 10,69  | 22,48  |

### 5.3.2.4 Postoperative Veränderungen der SLA-DR positiven Monozyten

Der Anteil der SLA-DR positiven Monozyten steigt im Mittel postoperativ von  $34,19\% \pm 10,7\%$  auf  $36,47\% \pm 21,5\%$  (Abbildung 29). Die Veränderungen sind statistisch nicht signifikant ( $p=0,7704$ ).

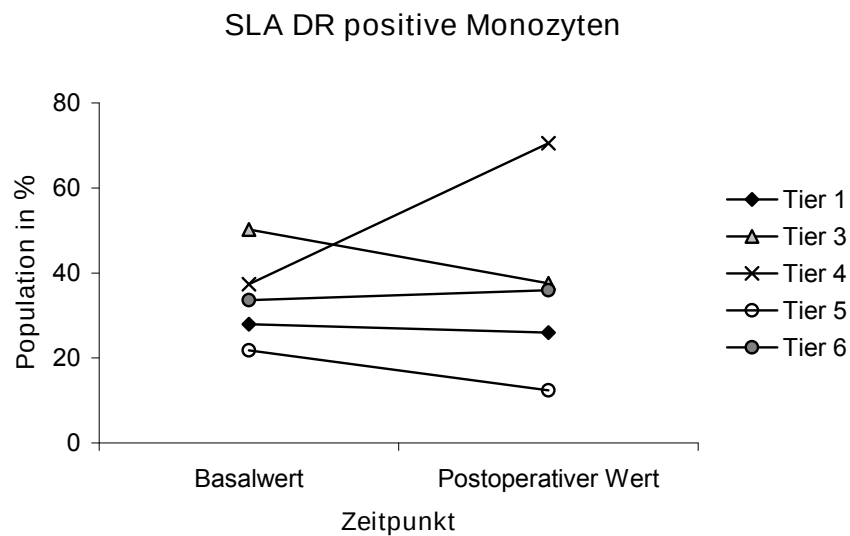


Abbildung 29: Postoperative Veränderungen der SLA-DR<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p = 0,7704$ )

Die Daten in Tabelle 19 zeigen, dass es keinen einheitlichen Trend der SLA-DR positiven Monozyten gibt. Während sie bei Tier drei sinken, kommt es bei Tier vier zu einem deutlichen Anstieg. Von Tier zwei liegen keine Daten vor.

Tabelle 19: Postoperative Veränderungen der SLA-DR<sup>+</sup> Monozyten in %

| Leukozyten in % | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert       | 27,94  | n.v.   | 50,25  | 37,35  | 21,79  | 33,62  |
| postoperativ    | 25,97  | n.v.   | 37,55  | 70,54  | 12,37  | 35,91  |

n.v.= Daten nicht vorhanden

### 5.3.2.5 Postoperative Veränderungen der CD1 positiven Lymphozyten

Postoperativ kommt es zu einem Abfallen der Anzahl von CD1 positiven Zellen. Abbildung 30 zeigt die Mittelwerte der CD1 positiven Lymphozyten, die bei insgesamt lediglich vier Tieren untersucht werden konnten. Bei den untersuchten Tieren kommt im Mittel zu einem Abfall von  $9,5\% \pm 3,8\%$  auf  $4,18\% \pm 3,5\%$ . Eine statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Tierzahl nicht möglich.

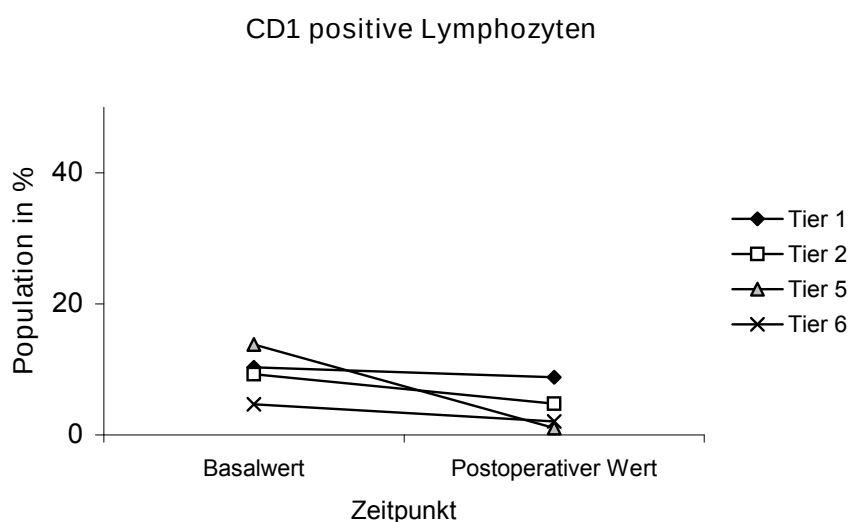


Abbildung 30: Postoperative Veränderungen der CD1<sup>+</sup> Lymphozyten

Alle vier Tiere zeigen eine Verminderung der CD1 Expression auf Lymphozyten, wie aus Tabelle 20 hervorgeht. In Tabelle 20 sind die Einzelwerte zu sehen. Die Tiere 3 und 4 wurden aufgrund von Lieferschwierigkeiten der Antikörper nicht untersucht.

Tabelle 20: Postoperative Veränderungen der CD1<sup>+</sup> Lymphozyten in %

| Leukozyten<br>in % | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert          | 10,32  | 9,25   | n.v.   | n.v.   | 13,81  | 4,66   |
| postoperativ       | 8,81   | 4,77   | n.v.   | n.v.   | 1,07   | 2,07   |

n.v. = Daten nicht vorhanden

### 5.3.2.6 Postoperative Veränderungen der CD2 positiven Lymphozyten

Es können keine statistisch signifikanten postoperativen Veränderungen der CD2 positiven Lymphozyten gesehen werden ( $p=0,9302$ ).

Der Anteil der CD2 positiven Zellen beträgt im Mittel zur ersten Messung  $42,09\% \pm 13,1\%$  und postoperativ  $42,58\% \pm 11,7\%$ .

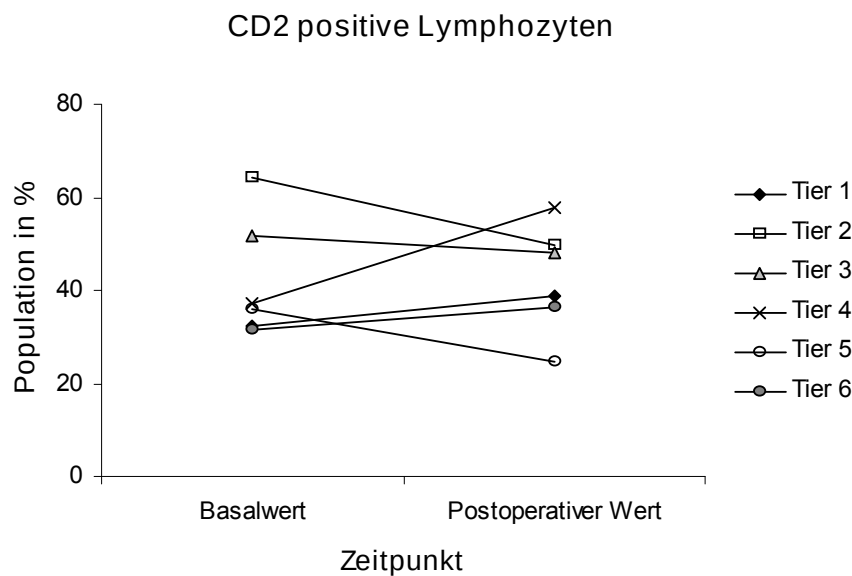


Abbildung 31: : Postoperative Veränderungen der CD2<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p = 0,9302$ )

In Tabelle 21 sind die Einzelwerte zu sehen. Bei drei Tieren kommt es zu einem Sinken, bei drei Tieren zu einem Ansteigen der Zahl an CD 2 positiven Zellen.

Tabelle 21: Postoperative Veränderungen der CD2<sup>+</sup> Lymphozyten in %

| Leukozyten in % | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert       | 32,29  | 64,11  | 51,82  | 37,06  | 35,88  | 31,38  |
| postoperativ    | 38,74  | 49,65  | 48,15  | 57,81  | 24,69  | 36,43  |

### 5.3.2.7 Postoperative Veränderungen der CD4 positive Lymphozyten

Postoperativ ist ein Sinken der CD4 positiven Lymphozyten von  $27,53\% \pm 5,5\%$  auf  $24,24\% \pm 4,6\%$  zu beobachten (Abbildung 32). Statistisch ist es nicht signifikant ( $p=0,2770$ ).

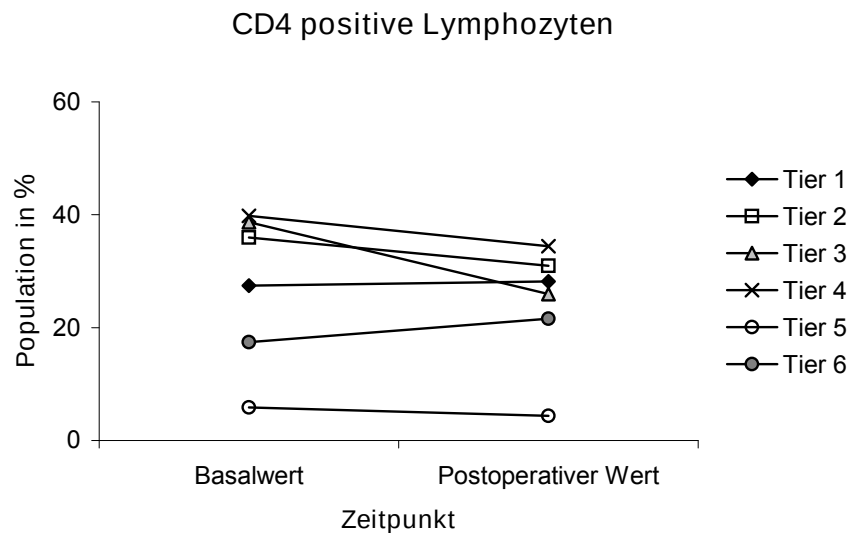


Abbildung 32: Postoperative Veränderungen der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p = 0,2270$ )

In Tabelle 22 sind die Einzelwerte zu sehen. Tier fünf hat mit 5,88% positiven Lymphozyten einen Basalwert, der deutlich unter dem Mittelwert liegt. Postoperativ sinkt bei diesem Tier der Anteil der CD4 positiven Zellen auf 4,35%. Eine klinisch sichtbare Veränderung konnte bei diesem Tier nicht festgestellt werden.

Tabelle 22: Postoperative Veränderungen der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten in %

| Leukozyten<br>in % | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert          | 27,45  | 35,99  | 38,66  | 39,80  | 5,88   | 17,41  |
| postoperativ       | 28,17  | 30,94  | 25,95  | 34,44  | 4,35   | 21,60  |



### 5.3.2.8 Postoperative Veränderungen der CD8 positive Lymphozyten

Die CD8 positiven Lymphozyten bleiben mit  $12,76\% \pm 4,2\%$  zu  $12,87\% \pm 3,8\%$  postoperativ nahezu unverändert, wobei bei drei Tieren ein Ansteigen und bei zwei Tieren ein Abfallen der CD8 positiven Lymphozyten beobachtet werden kann. Beide Zeitpunkte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,9535$ ).

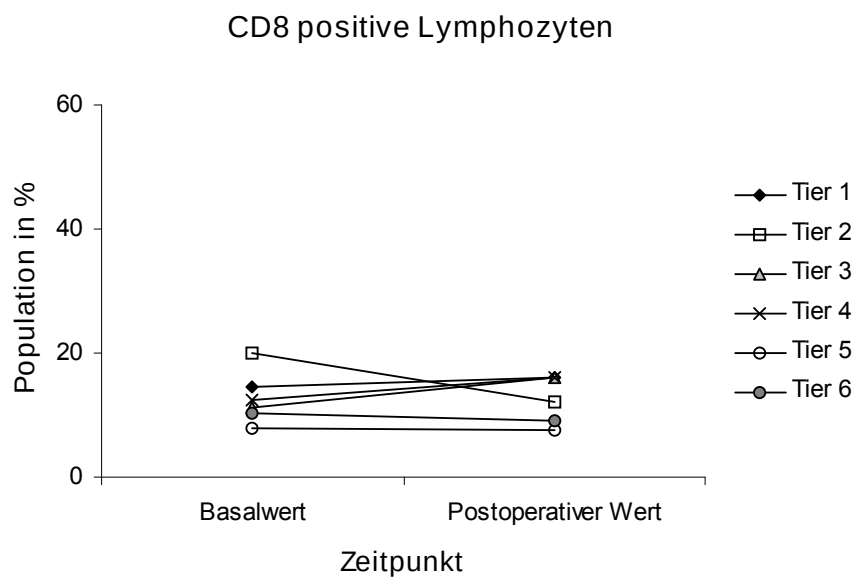


Abbildung 33: Postoperative Veränderungen der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten ( $p = 0,9535$ )

Bei einem Tier ändert sich dieser Wert kaum (Tabelle 23). Die Mittelwerte beider Messzeitpunkte liegen unter dem Mittelwert der Gesamtgruppe, der bei 18,3% liegt.

Tabelle 23: Postoperative Veränderungen der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten in %

| Leukozyten in % | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert       | 14,42  | 20,12  | 11,33  | 12,57  | 7,76   | 10,33  |
| postoperativ    | 16,01  | 12,12  | 15,96  | 16,21  | 7,68   | 9,23   |

### 5.3.2.9 Postoperative Veränderungen der CD4/CD8 Ratio

In Tabelle 24 sind die Einzelwerte der CD4/CD8 Ratio der sechs untersuchten Tiere zu sehen. Es gibt keine signifikanten statistisch messbaren Unterschiede zwischen beiden Zeitpunkten.

Tabelle 24: Postoperative Veränderungen der CD4/CD8 ratio (p = 0,5016)

| CD4/CD8 Ratio | Tier 1 | Tier 2 | Tier 3 | Tier 4 | Tier 5 | Tier 6 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Basalwert     | 1,904  | 1,789  | 3,412  | 3,166  | 0,758  | 1,685  |
| postoperativ  | 1,760  | 2,553  | 1,626  | 2,125  | 0,566  | 2,340  |

### 5.3.3 Zusammenfassung der postoperativen Veränderungen

Insgesamt wurde postoperativ ein signifikanter Anstieg der Lymphozyten und der eosinophilen Granulozyten bei den untersuchten sechs Tieren gesehen. Keine der Leukozytensubpopulationen hingegen zeigten 24 Stunden nach einem operativen Eingriff signifikante Veränderungen, wobei bei einzelnen Tieren deutliche Veränderungen zu beobachten waren.

## 6 Diskussion

### 6.1 Untersuchungsziel

Ziel dieser Untersuchung ist es, die Leukozyten- und Lymphozytenphänotypisierung in einer definierten Probandengruppe von jungen Hybridmastschweinen festzustellen.

Voraussetzung für den Vergleich zwischen Untersuchungsergebnissen verschiedener Autoren sind zunächst einheitliche Methoden. Allgemein anerkannte Referenzwerte beim Schwein für die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen gibt es bisher ebenso wenig wie ein standardisiertes Aufarbeitungs- und Analyseverfahren, das von allen Untersuchern gleichermaßen angewendet wird.

KRAFT (1999a) beschreibt den Referenzbereich als „einen quantitativen Wert eines bestimmten Untersuchungsmerkmals oder -parameters (besser: Meßgröße), der unter exakt definierten Bedingungen von einer ausreichend beschriebenen Gruppe von Probanden gewonnen und mit einer bestimmten mathematisch-statistischen Methode ermittelt wurde“. Die Probandengruppe sollte dabei der Gesamtheit der untersuchten Spezies möglichst ähnlich sein, beispielsweise in Alter, Rasse und Geschlecht.

EVANS (2000) empfiehlt, für wissenschaftliche Forschungsarbeiten mit Schweinen jeweils Kontrollgruppen mit zu untersuchen und die Untersuchungsbedingungen einheitlich zu halten. Er betrachtet es als sinnvoll, hämatologische Referenzintervalle für Studien zu entwickeln, die jeweils spezifisch für die Probandengruppe und deren Zusammensetzung zum Beispiel bezüglich Altersgruppen, Geschlecht und Haltung gelten.

Untersuchungen liegen häufig nur mit geringen Gruppengrößen vor. Für die Beurteilung der Daten wären Reihenuntersuchungen an gesunden Tieren verschiedener Rassen, Altersgruppen und Geschlechtern wünschenswert.

Da es sich bei der untersuchten Gruppe nicht um den Querschnitt der Schweinepopulation, sondern um ausgewählte Tiere einer bestimmten Rasse in einer bestimmten Altersstufe handelt, kann das Ergebnis nicht zur Ermittlung von Referenzwerten, wohl aber als Vergleichsgröße herangezogen werden.

## 6.2 Methodik

### Versuchsgruppen

Die Untersuchungen wurden bei Hybridmastschweinen aus demselben Bestand mit gleichen Aufzuchtbedingungen und in derselben Altersgruppe durchgeführt. Die Tiere waren durchgehend Kreuzungen der Rassen *Deutsche Landrasse/Edelschwein x Pietrain*.

Zur Untersuchung kamen Blutproben von Tieren, die im Verlauf von 2 Jahren für andere experimentelle Fragestellungen in den Versuch genommen wurden.

Daher muß innerhalb des langen Untersuchungszeitraumes trotz standardisierter Aufzuchtbedingungen von individuellen Schwankungen der immunologischen Prägung durch unterschiedliche antigene Erfahrungen im Aufzuchtbetrieb ausgegangen werden.

Die geringe Anzahl an männlichen Tieren für die Fragestellung nach geschlechtsspezifischen Unterschieden muss ebenfalls als kritisch angesehen werden. Da die Blutproben innerhalb anderer experimenteller Studien gewonnen wurden, konnte hier kein Einfluss auf das Geschlecht der Tiere genommen werden.

Hingegen waren die Anästhesie, das operative Vorgehen und die Entnahme der Blutproben streng standardisiert und können daher als gleichbleibende Faktoren betrachtet werden.

### Versuchsbedingungen

Der Transport, die Veränderungen der Umgebung und die Futterumstellung sind für Schweine mit Stress verbunden, der Veränderungen im biochemischen, metabolischen, endokrinologischen und immunologischen Gleichgewicht bewirken kann (NYBERG *et al.* 1988, EDFORS-LILJA *et al.* 2000, HEINRITZI und PLONAIT 2001).

Ein direkter Zusammenhang zwischen Stress bzw. Angst und Veränderungen des Immunstatus ist seit langem bekannt. Das Immunsystem und das neuro-endokrine System

beeinflussen sich wechselseitig. Sie sind über gemeinsam genutzte Rezeptoren und Liganden eng miteinander verbunden. Stress führt zu einer Aktivierung des sympatho-adrenergen Systems und damit zur Freisetzung von Katecholaminen. Die Freisetzung von Kortisol hat einen Einfluss auf die Anzahl der im Blut zirkulierenden Leukozyten.

Durch Injektion von Dexamethason läßt sich bei Pferden experimentell eine Leukozytose bei gleichzeitiger Lymphozytopenie provozieren (OSBALDISTON und JOHNSON 1972; LANE *et al.* 1990).

Bei Schweinen wurde die Freisetzung von Kortisol infolge Transport- und Rangordnungsstress beobachtet (NYBERG *et al.* 1988; EDFORS-LILJA *et al.* 2000).

Um den Effekt durch Stress möglichst gering zu halten, wurden die Tiere in der vorliegenden Untersuchung zur Eingewöhnung einige Tage vor Versuchsbeginn in den Tiertrakt der Chirurgischen Forschung der Universitätsklinik Freiburg gebracht. Anschließend wurde auf ruhigen und stressfreien Umgang mit den Tieren geachtet. Durch Einzeltierhaltung wurde der Stress durch Rangordnungskämpfe vermieden.

Weitere Einflüsse wie der zirkadiane Rhythmus des Hormonspiegels und die Art der Blutentnahme können sich ebenfalls auf die untersuchten Parameter auswirken. Das wurde insofern berücksichtigt, als dass die Probenentnahmen stets zu gleicher Tageszeit erfolgten. Mögliche jahreszeitliche Schwankungen wurden wegen der konstanten Klima- und Lichtbedingungen im Stall nicht beachtet.

### **Probenaufbereitung für die Durchflusszytometrie**

Nach RENZI und GINNS (1987) beeinflusst die Methode der Probenvorbereitung für eine Durchflusszytometrie die gemessenen Lymphozytenpopulationen. Die Unterschiede in den

Protokollen der veröffentlichten Studien machen es zum Teil schwierig, die Daten verschiedener Autoren zu vergleichen.

Eine standardisierte Methode der Probenaufbereitung, wie von DEAN und PAXTON und Mitarbeitern gefordert, ist aber eine wesentliche Voraussetzung für den Vergleich mit veröffentlichten Daten (DEAN *et al.* 1991, PAXTON *et al.* 1989).

Das National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) gibt in seinen Richtlinien als Antikoagulantien EDTA, Heparin und Citrat Dextran für Blutproben in der Durchflusszytometrie an (CALVELLI *et al.* 1993). Für durchflusszytometrische Untersuchungen beim Menschen wird empfohlen, Blutproben in EDTA-beschichteten Probenröhrchen zu sammeln (CALVELLI *et al.* 1993). In der vorliegenden Studie wurden daher die Blutproben mit EDTA-Monovetten abgenommen.

Es gibt neben Unterschieden in der Art der Probenentnahme (mit / ohne Anästhesie, Methode der Gerinnungshemmung) auch verschiedene Methoden der weiteren Aufbereitung der Zellen (Lymphozytenpräparation, Unterschiede zwischen den benutzten Antikörpern). DEAN und Mitarbeiter (1991) verglichen Vollblutlyse und Dichtegradientseparation und fanden unterschiedliche Ergebnisse der Lymphozytenpopulationen von Katzen.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode der Zellseparation erfolgte durch Vollblutlyse, die das NIAID als obligatorisch bei der Durchflusszytometrie für humane Blutproben bezeichnet hat (CALVELLI *et al.* 1993).

## 6.3 Ergebnisse

### 6.3.1 Gesamtgruppe

Die **Leukozytenzahl** bei den Schweinen der eigenen Studie betrug  $14,7 \pm 3,8$  Tsd/ $\mu$ l. Dieses Ergebnis reiht sich in die veröffentlichten Daten für Schweine ein, die BICKHARDT (1980) mit 10,5 bis 21,3 Tsd/ $\mu$ l für erwachsene Schweine der Rassen *Deutsche Landrasse* und *Edelschwein* angibt, während bei KRAFT (1999b) 10-22 Tsd/ $\mu$ l und bei THORN (2000) 11-22 Tsd/ $\mu$ l angegeben sind.

Dabei ist zu beachten, dass es sich bei den untersuchten Tieren nicht um adulte, sondern um juvenile Schweine im Alter von etwa 3 Monaten handelte. Daten für juvenile Schweine sind begrenzt. Nach EVANS (2001) beträgt die Spanne für Leukozyten bei 2-7 Monate alten Schweinen 13,0-22,0 Tsd/ $\mu$ l. SIEVERDING (2000) nennt für Absatzferkel eine Leukozytenkonzentration von 8,7-37,9Tsd/ $\mu$ l, für Masttiere 11,6-32,9Tsd/ $\mu$ l.

Gerade in den ersten Lebensmonaten kommt es zu deutlichen Veränderungen im weißen Blutbild, insbesondere durch Zunahme der Leukozytenzahl und Verschiebung des Verhältnisses von neutrophilen Granulozyten zu Lymphozyten (EVANS 2001, THORN 2001, KRAFT 1999b). Erst mit einem Alter von 8-9 Monaten entspricht das weiße Blutbild junger Schweine den Werten von adulten Tieren (EVANS 2001). Das spiegelt sich auch in den Ergebnissen des Differentialblutbildes wider.

Die **neutrophilen segmentkernigen Granulozyten** lagen mit einem Anteil von  $47,9 \pm 12,1\%$  der Leukozyten über den Werten von KRAFT (1999b) mit 10-39% und THORN (2000) mit 28-47%. Die absoluten Werte der neutrophilen Granulozyten lagen mit  $6,85 \pm 3,16$  Tsd/ $\mu$ l innerhalb der Werte, die in der Literatur angegeben sind. KRAFT (1999b) gibt 1-8,2 Tsd/ $\mu$ l



für segmentkernige neutrophile Granulozyten an, während HEINRITZI und PLONAIT (2001) 0,6-7,4 Tsd/ $\mu$ l als Normalbereich nennen.

Mit einem Alter von 3 Monaten befinden sich die untersuchten Tiere wie beschrieben in einer Entwicklungsphase des Immunsystems, so dass eine im Vergleich zu adulten Tieren hohe Anzahl an Neutrophilen als physiologisch anzusehen ist. Physiologische Neutrophilien können auch zum Beispiel durch Aufregung, Furcht, fremde Umgebung, Verdauung, Muskularbeit oder fortgeschrittene Trächtigkeit entstehen (KELLER und FREUDIGER 1993, KRAFT 1999a).

Grundsätzlich und altersunabhängig können auch pathologische Ursachen wie Entzündungen, Infektionen und Tumore aber zu einer Erhöhung der Leukozytenzahl (Leukozytose) und/oder der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten (Neutrophilie) führen (KELLER und FREUDIGER 1993, KRAFT 1999a). Für derartige pathologische Veränderungen gab es bei den in dieser Studie untersuchten Schweinen jedoch kein klinisches Korrelat.

Die absolute **Lymphozytenzahl** lag bei  $5,91 \pm 2,34$  Tsd/ $\mu$ l. BICKHARDT (1980) sowie HEINRITZI und PLONAIT (2001) nennen einen Normalbereich von 6,3 bis 15,5 Tsd/ $\mu$ l, KRAFT (1999b) gibt 6 bis 16 Tsd/ $\mu$ l für gesunde erwachsene Tiere an. SIEVERDING (2000) nennt für Absatzferkel einen Normalbereich von 2,2 bis 16,0 Tsd/ $\mu$ l. Der Anteil der Lymphozyten in dieser Studie betrug  $43,8 \pm 12,1\%$  der Leukozyten. Damit lag der Mittelwert unter dem Referenzbereich, den BICKHARDT (1980) sowie HEINRITZI und PLONAIT (2001) mit 49,4 bis 85,4% und KRAFT (1999b) mit 49 bis 85% angeben, wobei wie oben beschrieben bei jungen Tiere in einer normalen Entwicklung eine niedrigere Lymphozytenzahl als bei adulten Tieren zu finden ist. Vereinzelt lagen die Werte deutlich unter den in der Literatur angegebenen Normalwerten für erwachsene Tiere. Bei einem Tier war sogar eine deutliche Lymphozytopenie von 15% zu finden.

Als Ursachen für Lymphozytopenien sind bei allen Haussäugetieren akute Streßsituationen, akute Infektionskrankheiten, angeborene oder erworbene Immundefizienz, chronische Niereninsuffizienz, Immunsuppression, Cushing-Syndrom oder iatrogen immunsuppressiver Therapie, Bestrahlungs-, Zytostatika-, Kortikosteroid- oder ACTH-Therapie genannt (KRAFT 1999b). Beim Schwein ist neben bakteriellen und viralen Infektionen als Ursachen von Lymphozytopenien auch Streß beschrieben (EVANS 2000).

In der vorliegenden Untersuchung hat bei einzelnen Tieren wahrscheinlich der Stress durch Transport und Adaptation an die veränderte Umgebung zu den beobachteten Veränderungen der Lymphozytenzahl geführt.

Der Anteil der **Monozyten** lag in der vorliegenden Untersuchung bei  $0,38 \pm 0,29$  Tsd/ $\mu$ l, das entspricht  $2,6 \pm 1,4\%$  der Leukozyten. Bei KRAFT (1999b) ist für das Schwein ein Anteil von 0-1 Tsd/ $\mu$ l, entsprechend 0-5% angegeben, während bei BICKHARDT (1980) ein Bereich von 0-1 Tsd/ $\mu$ l, entsprechend 0 bis 4,8% genannt wird. Damit lagen die Ergebnisse der vorliegenden Studie im Normbereich.

Ähnliches galt für die **eosinophilen Granulozyten** mit einem Mittelwert von  $2,83 \pm 1,9\%$  der Leukozyten, die jeweils innerhalb der Referenzbereiche lagen, die in der Literatur angegeben sind. Bei HEINRITZI und PLONAIT (2001) liegen die Werte zwischen 0 und 6,2%, während sie bei KRAFT (1999b) 0-6% und bei EVANS (2000) 0-5,2% betragen. Die absolute Zahl der eosinophilen Granulozyten belief sich auf  $0,33 \pm 0,26$  Tsd/ $\mu$ l. KRAFT (1999b) nennt hier 0-1,5 Tsd/ $\mu$ l und HEINRITZI und PLONAIT (2001) gehen von 0-1,2 Tsd/ $\mu$ l aus.

Die **basophilen Granulozyten** zeigten einen Mittelwert von  $0,09 \pm 0,12$  Tsd/ $\mu$ l und entsprechen  $0,65 \pm 0,6\%$  der Leukozyten. KRAFT (1999b) gibt 0-0,05 Tsd/ $\mu$ l an. Nach

SIEVERDING (2000) beträgt der Normalbereich für basophile Granulozyten beim Masttier 0-0,7 Tsd/ $\mu$ l und beim Absatzferkel 0-0,5 Tsd/ $\mu$ l.

Die Ursachen für die **Abweichungen der Parameter des weissen Blutbildes** können sowohl im jugendlichen Alter der Tiere, wie auch in Stressreaktionen vor der Untersuchung liegen. Die Kombination von Stress mit physischer Belastung kann beim Schwein zu einer starken Änderung der Blutergebnisse führen (BICKHARDT 1980). Allein durch psychischen Streß bei der Probenabnahme kommt es zu einem sofortigen Anstieg aller Blutzellen infolge Adrenalinausschüttung und Milzentspeicherung (THORN 2000).

Die Anzahl der Leukozyten und Neutrophilen kann innerhalb von 2 Minuten auf das zwei bis dreifache ansteigen (THORN 2000). Bei Schweinen kann eine deutliche Veränderung des weißen Blutbildes nach Fütterung beobachtet werden. EVANS (2000) beschreibt einen Anstieg von 12 bis 50% der porcinen Neutrophilen in einem Zeitraum unmittelbar bis fünf Stunden nach Fütterung. Nach 12 Stunden erreicht das weiße Blutbild wieder die Ausgangswerte (EVANS 2000). Eine fütterungsbedingte Neutrophilie kann in dieser Studie ausgeschlossen werden, da die von uns untersuchten Tiere einheitlich länger als 12 Stunden nüchtern waren.

Unter Stress kann es zu einer Ausschüttung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten aus dem marginalen Granulozyten Pool (MGP) ins periphere Blut kommen. Die Ausschwemmung der neutrophilen Granulozyten aus dem MGP beruht dabei auf veränderten Blutdruckverhältnissen und Blutströmungseigenschaften (EVANS 2000).

Umstände, die beim Schwein eine Stress Antwort (engl. *stress response*) bewirken können, sind Transport, Veränderung der Umgebungs- oder Körpertemperatur, Schmerz, Trauma, Operation und Geburt (EVANS 2000). Nach HEINRITZI und PLONAIT (2001) ist der

Blutentnahmestress bei Schweinen die bedeutsamste Ursache für eine physiologische Variation der hämatologischen Werte.

Während der Anteil der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten als Folge einer Stresssituation abnimmt, steigt Anzahl und Prozentzahl der Neutrophilen, so dass es zu einer Umkehr der Neutrophilen:Lymphozyten-Ratio kommen kann (EVANS 2000).

In dieser Untersuchung scheinen die Abweichungen der Parameter des weissen Blutbildes mit dem jugendlichen Alter der Tiere zusammenzuhängen. Möglicherweise hat bei einzelnen Tieren auch der Stress durch Transport und veränderte Umgebung (trotz der Versuche diesen Stress zu vermeiden) zu den beobachteten Veränderungen wie der deutlichen Lymphozytopenie geführt.

Der Anteil der **CD1<sup>+</sup>-Lymphozyten** im peripheren Blut betrug bei den Schweinen in der vorliegenden Untersuchung  $10,0 \pm 2,9\%$ .

BOEKER und Mitarbeiter (1999) ermittelten anders als in der vorliegenden Untersuchung den Anteil der B-Lymphozyten über Bestimmung der Immunglobuline (Ig) und stellten bei 9 bis 12 Monate alten Schweinen der Rasse Göttinger Minipigs einen Mittelwert von 8,4% fest. JOLING und Mitarbeiter (1994) fanden hingegen deutlich höhere Werte an Ig positiven Zellen bei spezifiziert pathogenfrei (SPF) gehaltenen Schweinen der Kreuzung Holländische Landrasse x Edelschwein. Sie beobachteten Werte zwischen  $20 \pm 6\%$  bei 10 Wochen alten Tieren und  $17 \pm 4\%$  bei 10 Monate alten Tieren.

YANG und PARKHOUSE (1996) identifizierten ebenfalls die B-Lymphozytenpopulation über Bestimmung der Ig positiven Zellen und fanden insgesamt höhere Werte. Sie konnten Werte von 32,4% bei 4 Wochen alten Schweinen bis 23,4% bei 16 Monate alten Tieren feststellen. Ein direkter Vergleich dieser Daten ist aufgrund der unterschiedlichen Messmethoden nicht möglich.

Während der Anteil der  $CD1^{+}$ -Lymphozyten mit 12,9% bei gesunden Hunden (BYRNE *et al.* 2000) vergleichbar mit denen der untersuchten Schweine ist, zeigen andere Tierarten deutlich höhere Werte. So wurde bei Katzen (24,1%) und Schafen (29,6%) ein höherer Anteil an  $CD1^{+}$ -Zellen gemessen (BYRNE *et al.* 2000, SMITH *et al.* 1994). Beim gesunden Menschen liegt der Anteil der B-Lymphozyten bei 2-5% (GAEHTGENS *et al.* 1999).

Die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen hat beim Schwein demnach ein eigenes Muster, das sich von denen des Menschen und anderer Tierarten unterscheidet. Das wird auch bei den weiteren untersuchten Zellpopulationen sichtbar.

Der Anteil der  **$CD2^{+}$ -Lymphozyten** lag in der eigenen Untersuchung bei  $47,38 \pm 13,2\%$ .

Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit den Angaben von BOEKER und Mitarbeiter (1999), die bei 9 bis 12 Monate alten gesunden Göttinger Minipigs einen Mittelwert der  $CD2^{+}$ -Zellpopulation von  $50,6 \pm 25,5\%$  gefunden haben. THIELKE und Mitarbeiter (1999) stellten bei 8 Monate alten Göttinger Minipigs einen Anteil von  $54,6 \pm 8,7\%$  an  $CD2^{+}$ -Zellen fest.

Bei anderen Tierarten wurden insgesamt höhere Werte an  $CD2^{+}$ -Zellen gefunden. Allerdings schwanken auch hier die Angaben zwischen den Autoren. DEAN und Mitarbeiter (1991) geben den Wert für Pan T-Lymphozyten mit  $54,8 \pm 11,4\%$  bei gesunden Katzen an, während NOVOTNEY und Mitarbeiter (1990) 66,4% Pan T-Lymphozyten bei gesunden Katzen gefunden haben.

Beim Menschen wird der Anteil der T-Lymphozyten über Bestimmung des  $CD3^{+}$ -Moleküls untersucht. Nach GAETHGENS und Mitarbeitern (1999) liegt er beim gesunden Menschen bei 20-35%.

Die gemessene **CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation** von  $29,76 \pm 10,72\%$  bei den Tieren der eigenen Untersuchung ordnet sich in die in der Literatur bekannten Werte für gesunde Schweine ein, die zwischen  $25,8 \pm 3,8\%$  (THIELKE *et al.* 1999) und  $37 \pm 6\%$  liegen (JOLING *et al.* 1994).

JOLING und Mitarbeiter (1994) fanden zwischen  $29 \pm 19\%$  bei 1 Wochen alten und  $33 \pm 10\%$  an CD4<sup>+</sup>-Zellen bei 40 Wochen alten gesunden Schweinen der Kreuzung Holländische Landrasse x Edelschwein unter SPF-Bedingungen.

Auch bei anderen Tierarten wurden schon bei gesunden Tieren zum Teil erhebliche Schwankungen innerhalb einer Tiergruppe festgestellt. BYRNE und Mitarbeiter (2000) fanden CD4<sup>+</sup>-Zellen für den gesunden Hund in einem Bereich von 31,5% bis 66%, während SMITH und Mitarbeiter (1994) beim gesunden Schaf Werte zwischen 8 und 22% CD4<sup>+</sup>-Zellen angeben.

Bei Katzen schwanken die Mittelwerte der CD4<sup>+</sup>-Populationen in der Literatur zwischen 25% (ACKLEY *et al.* 1990) und  $42,0 \pm 12,7\%$  (TOTH *et al.* 1992). BYRNE und Mitarbeiter gaben einen Bereich von 30,3% bis 54,7% für CD4<sup>+</sup>-Zellen bei der gesunden Katze an (BYRNE *et al.* 2000). HOFFMANN-FEZER und Mitarbeiter (1991) formulierten, dass die CD4<sup>+</sup>-Lymphozytenpopulationen bei Katzen eine Schwankungsbreite von 20% bis 50% hatten. NOVOTNEY und Mitarbeiter (1990) geben in ihrer Studie den 5. bzw. 95. Perzentil ebenfalls mit 19,9 bzw. 50% für die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten bei der gesunden Katze an.

Auch beim Menschen sind unterschiedliche Werte angegeben. GAETHGENS und Mitarbeiter (1999) nennen einen Wert von 15-30% CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten beim gesunden Menschen. In einer Studie an gesunden Afro-Amerikanern und Latino-Amerikanern im Alter zwischen 12 und 18 Jahren finden BARTLETT und Mitarbeiter (1998) einen Anteil der CD4<sup>+</sup>-Zellen an den Leukozyten von  $42,98 \pm 7,38\%$ .

Der Mittelwert der **CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation** lag in der vorliegenden Studie bei  $18,3 \pm 11,0\%$ . Die Werte dieser Arbeit liegen damit niedriger als die in der Literatur angegebenen Werte für diese Spezies. So gaben THIELKE und Mitarbeiter (1999) für Göttinger Minipigs  $31,1 \pm 6,6\%$  CD8<sup>+</sup>-Zellen an. JOLING und Mitarbeiter (1994) beschreiben bei 1-wöchigen Schweinen der Kreuzung Holländische Landrasse x Edelschwein Werte von  $15 \pm 5\%$ , während die Werte bei 4 Wochen alten Tieren auf  $22 \pm 5\%$  und bei 10 Wochen alten Schweinen auf  $29 \pm 6\%$  stiegen. Bei Katzen lagen die Angaben über Mittelwerte der CD8<sup>+</sup>-Populationen zwischen  $13,4 \pm 4\%$  (HOFFMANN-FEZER *et al.* 1991),  $27,7\%$  (NOVOTNEY *et al.* 1990) und  $28,7 \pm 11,4\%$  (MILLER-EDGE und WORLEY 1992). BARTLETT und Mitarbeitern (1998) beschreiben beim gesunden jungen Menschen  $20,95 \pm 5,46\%$  CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, während GAEHTGENS und Mitarbeiter (1999) einen Anteil von 5-15% formulieren.

Die **CD4/CD8-Ratio** wich mit  $2,08 \pm 1,21$  von den Daten ab, die BINNS (1982) für Schweine mit 0,6 angab. Auch hier sind erhebliche Unterschiede in der relevanten Literatur zu finden. JOLING und Mitarbeiter (1994) beschreiben für 4 Wochen alte Schweine in SPF-Haltung eine CD4/CD8-Ratio von  $1,74 \pm 0,41$ , bei 10 Wochen alten Tieren eine Ratio von  $1,33 \pm 0,37$  bedingt durch das stärkere Ansteigen der CD8<sup>+</sup>-Population.

$35,02 \pm 8,4\%$  der Lymphozyten trugen in der eigenen Untersuchung den Komplex **SLA-DR**. Die Monozyten der untersuchten Schweine waren zu  $37,50 \pm 13,1\%$  SLA positiv. BOEKER und Mitarbeiter (1999) fanden bei Göttinger Minipigs  $14,8\%$  SLA-DR<sup>+</sup>-Lymphozyten und liegen damit deutlich unter dem in dieser Untersuchung gefundenen Wert. Bei einer Studie über die Immunfunktion beim gesunden Menschen fanden BARTLETT und Mitarbeiter

(1998) einen Unterschied der HLA-DR<sup>+</sup> Lymphozyten bei Afro-Amerikanern mit  $5,62 \pm 3,9\%$  gegenüber  $7,82 \pm 3,2\%$  bei Latino-Amerikanern.

In der vorliegenden Untersuchung waren  $66,20 \pm 12,8\%$  der Leukozyten **SWC3a** positiv. Die Monozyten der untersuchten Schweine trugen zu  $56,79 \pm 19,6\%$  den SWC3a-Komplex. Vergleichbare Untersuchungen wurden in der veröffentlichten Literatur nicht gefunden.

Die **Unterschiede zu den veröffentlichten Daten** können zum einen in der unterschiedlichen Gruppenzusammensetzung durch verschiedene Rassen, Haltungsformen und Altersunterschiede der Schweine, zum anderen im unterschiedlichen Versuchsaufbau und in unterschiedlichen Vorbereitungs- und Analysemethoden begründet sein.

Der Einfluss des Alters auf das Immunsystem ist seit langem bekannt. Das Immunsystem des Schweines entwickelt sich mit dem Antigenkontakt. JOLING und Mitarbeiter (1994) konnten bei SPF gehaltenen Schweinen eine deutliche Veränderung der Lymphozytenpopulationen bei Ferkeln im Lauf der ersten 40 Lebenswochen sehen. Es kommt zu einem Anstieg der CD2<sup>+</sup>-Lymphozyten von 37% im Alter von 1 Woche auf 65% nach 40 Wochen. Die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten steigen im Lauf der ersten 10 Lebenswochen von 29% auf 37% an. Nach 40 Wochen fällt der Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auf 33%. Ähnlich sind die Ergebnisse bei den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, die von anfangs 15% in der ersten Lebenswoche auf 29% steigen. Es wird ein Einfluß des Alters auf die Lymphozytenzahl vermutet (JOLING *et al.* 1994). Der Anstieg der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten beginnt später und dauert eine längere Zeitspanne als der Anstieg der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (JOLING *et al.* 1994). Die niedrigen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten bei den untersuchten Schweinen sind auch eine Erklärung für die von der Literatur abweichende CD4/CD8-Ratio.

Neben dem Antigenkontakt werden auch hormonelle Faktoren als Ursache für die Entwicklung der Leukozyten diskutiert. Zum Beispiel ist bekannt, dass sich bei Menschen hormonelle Veränderungen während Wachstum und Entwicklung durch Wachstumshormone



wie Growth Hormon (GH), GH releasing Hormon und Somatostatin auf das Immunsystem auswirken können. Periphere Lymphozyten beim Menschen besitzen Rezeptoren für diese Hormone (CAMPELL und SCANES 1995).

Es gibt Untersuchungen über Unterschiede in der zellulären Immunität bei verschiedenen Tierrassen bzw. genetisch verwandten Populationen. Beim Menschen wird beispielsweise eine niedrigere Anzahl an Leukozyten und aktivierten T-Lymphozyten bei Afro-Amerikanern gegenüber Latinos gefunden (BARTLETT *et al.* 1998). Ferkel der Rasse *Large White* zeigten gegenüber Ferkel der Rasse Duroc signifikant niedrigere Werte der CD2<sup>+</sup> - und CD4<sup>+</sup>-Zellen (NGYUEN *et al.* 1998).

Die Haltungsform spielt nach JOLING und Mitarbeitern (1994) ebenfalls eine Rolle bei der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen. Unterschiede zwischen Schweinen, die in SPF Haltung oder konventionell gehalten werden, lassen einen Einfluß des Antigenkontaktes vermuten. Besonders die Fraktion der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten scheint davon beeinflusst zu werden (JOLING *et al.* 1994).

Es wurden in dieser Untersuchung keine Unterschiede im Blutbild zwischen den männlichen und den weiblichen Tieren und somit kein **Einfluss des Geschlechtes** gefunden. Das entspricht den Daten von BARTLETT und Mitarbeitern (1998), die keine geschlechtsspezifischen Unterschiede des Differentialblutbildes beim Menschen gefunden haben.

Auch die Ergebnisse der Leukozytenphänotypen zeigen keine Unterschiede zwischen männlichen kastrierten und weiblichen Tieren. Individuelle Schwankungen scheinen eine wichtigere Rolle zu spielen als der Einfluß des Geschlechts. In Studien beim Menschen konnten hingegen Unterschiede der Leukozytenphänotypen beobachtet werden (TOLLERUD *et al.* 1990, CASSON *et al.* 1993, BARTLETT *et al.* 1998).

BARTLETT und Mitarbeiter (1998) fanden einen signifikant höheren Anteil an B-Lymphozyten bei Männern gegenüber Frauen in einer Studie mit 206 Probanden. Zum gleichen Ergebnis kommt eine Studie von TOLLERUD und Mitarbeitern (1990). In verschiedenen Studien wurden bei Männern niedrigere Werte bei den  $CD4^+$  T-Lymphozyten gefunden (CASSON *et al.* 1993, BARTLETT *et al.* 1998, TOLLERUD *et al.* 1990). BARTLETT und Mitarbeiter (1998) fanden ebenfalls einen höheren Anteil an HLA positiven Lymphozyten bei Männern. Allerdings waren in dieser Untersuchung bei den Mittelwerten einiger Leukozytensubpopulationen Tendenzen zu erkennen, die den Ergebnissen der Literatur beim Menschen entsprechen.

Östrogen und Progesteron beeinflussen direkt und indirekt die Immunität beim Menschen. So haben Untersuchungen beim Menschen gezeigt, dass Sexualhormone Veränderungen der T-Zell-Population im Thymus bewirken können und einen Einfluss auf die Lymphozytenzahl haben (SEIKI und SAKABE 1997; BARTLETT *et al.* 1997). KIESS und Mitarbeiter (1991) berichten von Unterschieden zwischen unbehandelten männlichen Patienten mit Hypogonadismus und gesunden Männern bei dem Anteil der  $CD4^+$ -Lymphozyten, einer Lymphozytensubpopulation. Ein Einfluss des Testosteronlevel auf die zelluläre Immunität beim Menschen wird vermutet (KIESS *et al.* 1991). Die untersuchten männlichen Schweine waren kastriert und produzierten dementsprechend weniger Sexualhormone, was wiederum hormonell bedingte Unterschiede zwischen den Geschlechtern in dieser Untersuchung beeinflusste. Möglicherweise sind die untersuchten Tiere außerdem zu jung, um eine ausreichende Menge der entscheidenden Sexualhormone zu bilden. Jedoch ist die vorliegende Anzahl an Schweinen für eine gesicherte Aussage zu gering. Eventuell lässt eine größere Anzahl adulter nicht kastrierter Tiere einen Zusammenhang der Leukozytensubpopulationen mit dem Geschlecht erkennen.

### 6.3.2 Postoperative Veränderungen

In der vorliegenden Untersuchung stiegen die **Leukozyten** postoperativ von 13,4 auf 14,7 Tsd/ $\mu$ l und liegen damit zu beiden Messzeitpunkten im Normalbereich für Schweine (KRAFT 1999b, THORN 2000, EVANS 2000, SIEVERDING 2000, HEINRITZI und PLONAIT 2001).

Die **neutrophilen Granulozyten** fielen von  $57,3 \pm$  auf 44,0% bzw. von 8.180 auf 6.370 Zellen/ $\mu$ l. Bereits die Basalwertmessung liegt deutlich über dem Durchschnitt in der Gesamtgruppe und über den Normbereichen in der Literatur (KRAFT 1999b, THORN 2000, EVANS 2000, HEINRITZI und PLONAIT 2001). Mit Maximalwerten in dieser Gruppe von 73% bzw. 17.958 neutrophilen Granulozyten/ $\mu$ l ist bei einem Tier zum Zeitpunkt der Basalwertmessung eine deutliche Neutrophilie festzustellen, die möglicherweise mit Stress während der präoperativen Zeit und der Anästhesieeinleitung zusammenhängt. Die Anzahl der Neutrophilen kann innerhalb von 2 Minuten auf das zwei bis dreifache ansteigen (THORN 2000). Postoperativ normalisieren sich die Werte in physiologische Bereiche. Eine längerer Beobachtungszeitraum wäre sicherlich interessant gewesen.

Die **eosinophilen Granulozyten** stiegen signifikant von 2,2 auf 7,0% bzw. von 320 auf 1100 Zellen/ $\mu$ l. Auffallend dabei ist, dass postoperativ bei zwei Tieren die eosinophilen Granulozyten deutlich erhöht sind (12%) und auch über den Werten in der Literatur liegen (KRAFT 1999b, THORN 2000, EVANS 2000, SIEVERDING 2000, HEINRITZI und PLONAIT 2001).

Ein vermehrtes Auftreten von eosinophilen Granulozyten wird bei Allergien und Parasitosen nach dem Anstieg von Immunglobulin E beobachtet (ROTH *et al.* 1992). Da die untersuchten

Schweine keine Parasiten hatten, ist eher ein entzündliches Geschehen als Ursache für das vermehrte Auftreten der Eosinophilen zu vermuten. Durch die Synthese von Interleukin-5 und dem Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) bei Entzündungsreaktionen durch die Eosinophilen selbst kommt es zu einer positiven Rückkopplung, bei der Zahl und Funktion der Eosinophilen erhöht werden (BROIDE *et al.* 1992). Diese Vermutung widerspricht den Angaben aus der Literatur, in denen postoperativ Immunsuppressionen mit Eosinopenie beschrieben sind (HEIMLICH *et al.* 1999, MATTILA-VUORI *et al.* 2000).

Die **basophilen Granulozyten** stiegen von 0,3 auf 0,5%, wobei die Standardabweichung mit 0,4 bzw. 0,5 sehr hoch ist und somit der Anstieg wenig aussagekräftig ist.

Bei den **Monozyten** kam es postoperativ zu einem Anstieg von 1,0 auf 1,8% mit ebenfalls hoher Standardabweichung. Ergebnisse von basophilen Granulozyten und Monozyten liegen zu beiden Messzeitpunkten im Normbereich (KRAFT 1999b, THORN 2000, EVANS 2000, SIEVERDING 2000, HEINRITZI und PLONAIT 2001).

Es wurde ein deutlicher Anstieg von 34,0 auf 45,2% bzw. 3.850 auf 6.620 **Lymphozyten**/ $\mu$ l festgestellt, wobei der Basalwert deutlich unter dem Wert der Gesamtgruppe und den Angaben anderer Autoren liegt (KRAFT 1999b, THORN 2000, EVANS 2000, HEINRITZI und PLONAIT 2001).

Wie beschrieben, kommt es als Folge einer Stresssituation zu einem Anstieg in Anzahl und Prozentzahl der Neutrophilen und zu einem Abfall der Lymphozyten, so dass es zu einer Umkehr der Neutrophilen:Lymphozyten-Ratio kommen kann (EVANS 2000). Dieses Bild ist bei der Basalwertmessung zu sehen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Basalwertmessung das Bild einer möglicherweise stressinduzierten Lymphozytose und Neutrophilie zeigen, die sich postoperativ normalisieren. 24 Stunden postoperativ ist anhand des weißen Blutbildes keine Immunsuppression feststellbar.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wird in vielen Untersuchungen postoperativ die Reduktion einzelner Leukozytenfraktionen gesehen, insbesondere Leukozyten und Lymphozyten sind reduziert (LASSEN *et al.* 1956, BRUCE und KOEPKE 1966, PARBROOK 1967, SLADE *et al.* 1975, HEIMLICH *et al.* 1999, MATTILA-VUORI *et al.* 2000, TAKALA *et al.* 2004).

Nach Narkosen mit Lachgas oder Halothan wurde ein signifikanter Abfall der zirkulierenden Leukozyten beobachtet (LASSEN *et al.* 1956, BRUCE und KOEPKE 1966, PARBROOK 1967). Blutverluste und Verdünnungseffekte durch Volumenersatz reduzieren zunächst die Gesamtzellzahl, wobei i.d.R. binnen Stunden durch Nachschub aus den Knochenmarksreserven für Ausgleich gesorgt wird (HEIMLICH *et al.* 1999).

1975 beschrieben SLADE und Mitarbeiter eine Immunodepression während und nach Nierentransplantationen in Form einer Lymphopenie, reduzierter T- und B-Lymphozytenzahl und einem verzögerten Intracutantest (SLADE *et al.* 1975).

MATTILA-VUORI und Mitarbeitern (2000) fanden bei Kindern postoperativ einen Abfall der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten. HEIMLICH und Mitarbeiter (1999) beschreiben eine postoperative Lymphopenie und Einschränkung der Lymphozytenfunktion bei gleichzeitiger Monozytose.

Im Lauf einer 6stündigen Inhalationsnarkose mit Sevofluran beobachteten TAKALA und Mitarbeiter (2004) einen signifikanten Abfall der Gesamtleukozytenzahl im Blut bei

Schweinen. Während einer 6stündigen Injektionsnarkose mit Thiopentone hingegen stieg die Leukozytenzahl nach 2 Stunden wieder auf den Ausgangswert. Die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten im Blut sank ebenfalls während der Sevoflurannarkose, signifikant im Vergleich zur Thiopentoneanästhesie. TAKALA und Mitarbeiter (2004) erklären die verminderte Leukozytenzahl mit einer verstärkten Leukozytenadhäsion oder durch Umverteilung der Leukozyten. Dagegen fanden COHEN und BATRA (1980) nach Bronchoskopie und Lungenlavage in Narkose bei Hunden und Affen einen Anstieg der Leukozyten bzw. der neutrophilen Granulozyten im Blut, was möglicherweise als inflammatorische Reaktion auf die Bronchoskopie zu interpretieren ist.

In verschiedenen Studien werden postoperativ bzw. postanästhetisch Immunsuppressionen beschrieben, die in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden konnten (LASSEN *et al.* 1956, BRUCE und KOEPKE 1966, LECKY 1975, SLADE *et al.* 1975, COHEN und BATRA 1980, BÖERNER und HEMPELMANN 1982, THOMSON 1987, FAIST *et al.* 1992 und 1996, MARKEWITZ *et al.* 1992, HAUPT *et al.* 1998, HEIMLICH *et al.* 1999, TAKALA *et al.* 2004). Wie beschrieben kann eine Ursache dafür in der bereits zum Basalwertmessung bestehenden Stressreaktion liegen.

Weitere Gründe für die zum Teil auch in der Literatur widersprüchlichen Daten könnten in den unterschiedlichen Studiendesigns liegen, z.B. durch Differenzen im Ausmaß des chirurgischen Eingriffes, Blutverluste oder dem Verdünnungseffekt durch Volumenersatz.

Wie die Ergebnisse des weißen Blutbildes weichen auch die Werte der **Leukozytensubpopulationen** zum Zeitpunkt der Basalwertmessung von den Werten der Gesamtgruppe ab, allerdings nicht von den postoperativ gemessenen Ergebnissen.

Auffällig waren die niedrigen Werten bereits zur ersten Messung verglichen mit den Daten der Gesamtgruppe und den Angaben aus der Literatur, insbesondere bei den CD1<sup>+</sup> T-Zellen und CD2<sup>+</sup> T-Zellen. Bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen fiel ein Tier auf, dessen Werte mit 5,88 intra- zu 4,35% postoperativ deutlich vermindert waren. Eine Erklärung für diesen Befund oder klinische Folgen für dieses Tier wurden nicht festgestellt.

Zusammenfassend konnten in dieser Untersuchung postoperativ keine signifikanten Änderungen festgestellt werden.

Die Angaben in der Literatur beziehen sich v.a. auf den Menschen und weichen von dem vorliegendem Ergebnis ab (MARKEWITZ *et al.* 1992, FAIST *et al.* 1996, BRAND *et al.* 1998, HEIMLICH *et al.* 1999, MATTILA-VUORI *et al.* 2000)

Zu den durch Trauma verursachten Veränderungen zählen neben einem Sinken der CD4<sup>+</sup> Lymphozytenzahl und CD4/CD8 Ratio auch die starke Verminderung der HLA-DR Expression auf Makrophagen (FAIST *et al.* 1996). BRAND und Mitarbeiter untersuchten bei Patienten den Einfluss von Eingriffen am Bewegungsapparat auf das Immunsystem und stellten insgesamt keine Unterschiede in Lymphozytenzahl, CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen zwischen den Werten vor und 50 Minuten nach Einleitung fest, was darauf deutet, dass die Effekte durch Narkose und Eingriff erst nach einem gewissen Zeitraum sichtbar werden (1998).

HEIMLICH und Mitarbeiter fanden bei einer Operationsdauer von weniger als sieben Stunden bei tumorchirurgischen Eingriffen nach 24 Stunden keine Veränderungen der Gesamtlymphozytenzahl sowie der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation (1999). Bei einer Operationsdauer von mehr als sieben Stunden dagegen kam es zu einem signifikanten Abfall der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen 24 Stunden nach OP-Ende. Innerhalb von Tagen stiegen diese Werte wieder auf die Ursprungswerte an (HEIMLICH *et al.* 1999). Dem stehen andere

Veröffentlichung gegenüber, in denen nach umfangreichen Eingriffen keine Veränderungen von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten beschrieben wurden.

So fanden MARKEWITZ und Mitarbeiter einen signifikanten Abfall der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der CD4/CD8 Ratio, aber keine Veränderungen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Tag nach herzchirurgischen Eingriffen (1992).

Auch beim Schwein wurden Veränderungen durch operative Eingriffe beobachtet. NGYUEN und Mitarbeiter untersuchten den Effekt von offener und laparoskopischer Cholezystektomie auf die zelluläre Immunität am Schwein mittels Hauthypersensitivitätstest (Delayed-type hypersensitivity skin test, DTH) und T-Zell Proliferationstest in einer Studie mit 20 weiblichen Hausschweinen. Sie stellten bei beiden chirurgischen Methoden eine Suppression der Immunität fest (1999).

Allerdings sind auch Aktivierungen einzelner Zellfraktionen beschrieben worden. Bei Kindern wurde 24 Stunden nach einem elektiven chirurgischen Eingriff ein signifikanter Abfall der Gesamtlymphozytenzahl, der Pan-T-Lymphozyten, der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen sowie ein Anstieg der HLA-DR<sup>+</sup> Lymphozyten und B-Lymphozyten gemessen (MATTILA-VUORI *et al.* 2000).

Je nach experimentellem Ansatz sind in der Literatur teilweise widersprüchliche Angaben über die postoperativen Veränderungen des Blutbildes und der Lymphozytenphänotypen beim Menschen zu finden. Die Probandengruppen und das Ausmaß des chirurgischen Eingriffes, Blutverluste und Verdünnungseffekte durch Volumenersatz differieren ebenso wie der Messzeitraum nach dem Insult.

Die geringe Tierzahl in der vorliegenden Untersuchung macht eine Auswertung der Daten schwierig. Erschwerend kommt hinzu, dass bereits die Ergebnisse des weißen Blutbildes



darauf hinweisen, dass mindestens einige der Tiere zum Zeitpunkt der Basalwertmessung nicht unbelastet sind.

Möglicherweise ist das auch der Grund dafür, dass die in der Literatur gefundene Immunsuppression nach Anästhesie und chirurgischem Eingriff in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden konnte, obwohl ebenfalls bei einigen Tieren Tendenzen von Immunzellreduktion bzw. -aktivierung gefunden werden konnten.

## **6.4 Aussagekraft und Verwendung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben bestätigt, dass die Schwankungsbreite von Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen auch in einer gesunden Schweinepopulation recht groß ist. Die teilweise starken individuellen Unterschiede spiegeln die Variabilität und Heterogenität des Immunsystems wider.

Aufgrund der vorliegenden Daten scheint es sinnvoll, die Verteilung der Leukozyten, insbesondere der Lymphozyten- und Monozytensubpopulationen innerhalb weit gefasster Grenzen anzugeben. HEINRITZI und PLONAIT (2001) empfehlen für die Beurteilung des Blutbildes beim Schwein die oberen und unteren Grenzen des „Normalbereiches“ keinesfalls als absolute Trennlinie zwischen physiologischen und pathologischen Meßwerten anzusehen. Die vorliegenden Daten weichen teilweise von den veröffentlichten Daten erwachsener Schweine ab, so dass die Vermutung einer altersbedingten immunologischen Entwicklung bestätigt werden konnte.

Meiner Ansicht nach ist es sinnvoll, bei Veröffentlichungen und Vergleichen verschiedener Studien das Alter und das Geschlecht der untersuchten Tiere anzugeben.

Die Daten können als Vergleichswerte für junge Schweine genutzt werden, wobei Abweichungen nicht zwangsläufig auf einen pathologischen Zustand hinweisen und entsprechend vorsichtig interpretiert werden müssen.

## 7. Zusammenfassung

Zur Evaluierung der Leukozytenphänotypen wurden Blutproben bei 40 Hybridschweinen im Alter von drei Monaten durchflusszytometrisch analysiert. Neben dem weißen Blutbild wurden mittels Durchflusszytometrie die Expression von SWC3a-Antigenen auf Leukozyten, die Expression von CD1, CD2, CD4, CD8 - und SLA-Antigenen auf Lymphozyten sowie die Expression von SLA- sowie SWC3a- Antigenen auf Monozyten untersucht.

Die Blutproben wurden den anästhetisierten Schweinen über einen unmittelbar zuvor in die linke *Vena jugularis externa* implantierten Katheter entnommen. Zur Untersuchung der geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden die Daten der sechs männlichen kastrierten Schweine mit denen der 34 weiblichen Tiere verglichen. Bei sechs Tieren erfolgte eine weitere Blutabnahme nach 24 Stunden, um eine Aussage über die postoperativen Veränderungen treffen zu können.

Bei den 40 untersuchten Tieren exprimieren  $66,20 \pm 12,8\%$  der im Blut zirkulierenden Leukozyten SWC3a. Die Lymphozyten waren zu  $10,03 \pm 2,9\%$  CD1 positiv, zu  $47,38 \pm 13,2\%$  CD2 positiv, zu  $29,76 \pm 10,7\%$  CD4 positiv und zu  $18,30 \pm 8,4\%$  CD8 positiv.  $35,02 \pm 8,4\%$  der Lymphozyten waren SLA-DR positiv. Die Monozyten trugen zu  $37,50 \pm 13,1\%$  den SLA-DR Komplex und zu  $56,79 \pm 19,6\%$  das SWC3a Molekül.

Beim Vergleich des Blutbildes und der Lymphozytenpopulationen zwischen den Geschlechtern konnte kein Unterschied zwischen den männlichen und den weiblichen Tieren festgestellt werden.

24 Stunden postoperativ wurden neben einem Anstieg der Lymphozyten ( $34,0 \pm 16,5\%$  vs.  $45,2 \pm 8,3\%$ ) ein Anstieg der eosinophilen Granulozyten ( $2,17 \pm 3,0$  auf  $7,0 \pm 5,1\%$ ) beobachtet. Die anderen Leukozytenfraktionen und die Lymphozytenpopulationen veränderten sich nicht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Leukozytenphänotypisierung mittels Durchflußzytometrie beim Schwein durchführbar ist. Die Ergebnisse spiegeln jedoch nur einen Teil des aktuellen Immunstatus wider und müssen immer im strengen Kontext mit allen Einflussgrößen wie Rasse, Haltung, klinischem Bild, Narkose etc. betrachtet werden.

## 8. Summary

### **Investigation of Leukocyte Subsets in the Blood of Pigs by Flow Cytometry with special Reference to postoperative Changes**

Blood samples of 40 pigs at 3 month of age were analyzed by flow cytometry to evaluate leukocyte subsets. Beside the white blood, count expression of SWC3a antigen on leukocytes, of CD1, CD2, CD4, CD8 and SLA antigen on lymphocytes and expression of SLA-DR and SWC3a antigen on monocytes were analyzed.

The blood samples had been taken from the anaesthetised pigs via a catheter implanted in the left *vena jugularis externa* immediatly prior to this procedure. For the examination of differences related to gender the results of 6 male spayed pigs were compared to the results of 34 female pigs. To make a prediction of postoperative changes blood samples were collected from 6 animals after 24 hours.

$66,20 \pm 12,8\%$  of the circulating leukocytes in the blood of the 40 animals expressed SWC3a.  $10,03 \pm 2,9\%$  of the circulating lymphocytes were CD1 positive,  $47,38 \pm 13,2\%$  CD2 positive,  $29,76 \pm 10,7\%$  CD4 positive,  $18,30 \pm 8,4\%$  CD8 positive, and  $35,02 \pm 8,4\%$  SLA-DR positive.  $37,50 \pm 13,1\%$  of monocytes expressed SLA-DR complex and  $56,79 \pm 19,6\%$  expressed SWC3a.

No differences in the white blood count and the leukocyte subsets relating to gender were found.

24 hours after surgery an enhancement of the proportion of lymphocytes ( $34,0 \pm 16,5\%$  vs.  $45,2 \pm 8,3\%$ ) and eosinophile granulocytes ( $2,17 \pm 3,0\%$  vs.  $7,0 \pm 5,1\%$ ) was seen, while no changes were found for the leukocyte subsets.

## *8. Summary*

---

Summarising, it can be stated that leukocyte phenotyping using flow cytometry is feasible in pigs. The results, however, reflect only a part of the current immune status of the animals and must always be considered within the strict context involving all influencing parameters such as breed, animal management, clinical picture, anaesthetics, etc.

## 9. Anhang

### 9.1 Literaturverzeichnis<sup>1</sup>

ACKLEY, C.D., E.A. HOOVER und M.D. COOPER (1990):

Identification of a CD4 homologue in the cat.

Tissue Antigens **35**, 92-98

ANDERSEN, J.K., H. TAKAMATSU, C.A.L. OURA, S.M. BROOKES, L. PULLEN, und R.E.M. PARKHOUSE (1999):

Systematic characterization of porcine ileal Peyer's patch, I.

Apoptosis-sensitive immature B cells are the predominant cell type.

Immunology **98**, 612-621

AVERY, P. und E.A. HOOVER (2004):

Gamma interferon/interleukin-10 balance in tissue lymphocytes correlates with down modulation of mucosal feline immunodeficiency virus infection.

J. Virol. **78**, 4011-4019

BARLOUGH, J.E., T.W. NORTH, C.L. OXFORD, K.M. REMINGTON, S. DANDEKAR, M.N. ELLIS und N.C. PEDERSEN (1993):

Feline immunodeficiency virus infection of cats as a model to test the effect of certain selection pressures on the infectivity and virulence of resultant lentivirus variants.

Antivir. Res. **22**, 259-272

BARNARD, A.L., A. ARRIENS, S. COX, P. BARNETT, B. KRISTENSEN, A. SUMMERFIELD und K.C. MCCULLOUGH (2005):

Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease.

Vaccine **23**, 1037-1047

---

<sup>1</sup> Zeitschriftentitelabkürzungen gemäß List of Journals Indexed in Index Medicus

BARTLETT, J.A., S.J. SCHLEIFER, M.K. DEMETRIKOPOULOS, B.R. DELANEY, S.C. SHIFLETT und S.E. KELLER (1998):

Immune function in healthy adolescents.

Clin. Diagn. Lab. Immunol. **5**, 105-113

BASARAN N. und U. UNDEGER (2000):

Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers.

Am. J. Ind. Med. **38**, 349-354

BAUTISTA, E.M., G.S.FERMAN und W.T.GOLDE (2003):

Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV).

Vet. Immunol. Immunopathol. **92**, 61-73

BAUER, T.R., Y.C GU, K.E. CREEVY, L.M. TUSCHONG, L. EMBREE, S.M. HOLLAND, R.A. SOKOLIC und D.D. HICKSTEIN (2004):

Leukocyte adhesion deficiency in children and Irish setter dogs.

Pediatr Res. 55(3), 363-367

BERNDT, A. und G. MÜLLER (1993):

Occurrence of T lymphocytes in perivascular regions of the lung after intratracheal infection of swine with *Pasteurella multocida*.

Vet. Immunol. Immunopathol. **49**, 143-159

BIANCHI, A.T.J. und P.J. VAN DER HEIJDEN (1994):

Antigen presenting cells and B cells in the pig.

Vet. Immunol. Immunopathol. **43**, 63-68

BICKHARDT, K. (1980):

Laborwerte beim Schwein.

In: Schulze, W., K. Bickhardt, W. Bollwahn, G.v. Mickwitz und H. Plonait (Hrsg.):

Klinik der Schweinekrankheiten, Verlag M. und H. Schaper, Hannover, 394-395



BINNS, R.M. (1978):

Sheep erythrocyte rosettes in pigs, sheep, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran.

J. Immunol. Methods **21**, 197-210.

BINNS, R.M. (1982):

Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig.

Vet. Immunol. Immunopathol. **3**, 95-146.

BINNS, R.M. und R. PABST (1994):

Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig.

Vet. Immunol. Immunopathol. **43**, 79-87.

BJORKMAN, P.J., M.A. SAPER, B. SAMRAOUDI, W.S. BENNETT, J.L. STROMINGER und D.C. WILEY (1987):

Structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-A2.

Nature **329**, 506-512

BOEKER, M., R. PABST und H.J. ROTHKÖTTER (1999):

Quantification of B, T and Null lymphocyte subpopulations in the blood and lymphoid organs of the pig.

Immunobiology **201**, 74-87

BOERNER, U. und G. HEMPELMANN (1982):

Beeinflussung des Immunsystems durch anästhesiologische und chirurgische Maßnahmen.

Beitr. Infusionstherapie klin. Ernähr **9**, 34-40

BRAND, J.-M. , H. KIRCHNER, C. POPPE, P. SCHMUCKER (1998):

Zytokinfreisetzung und Verteilung mononukleärer Zellen im peripheren Blut unter dem Einfluß der Allgemeinnarkose.

Anaesthesist. **47**, 379-386

BROIDE, D.H., M.M. PAINE und G.S. FIRESTEIN (1992):

Eosinophils express interleucin-5 and granulocyte macrohages-colony-stimulating factor mRNA at sides of allergic inflammations in asthmatics.

J. Clin. Invest. **90**, 1414-1424

BRUCE, D.C. u. J.A. KOEPKE (1966):

Changes in granulopoesis in the rat associated with prolonged halothan anesthesia. Anesthesiology **27**, 811-817

BURKHARD, M.J., L.A. OBERT, L.L. ONEIL, L.J. DIEHL AND E.A. HOOVER (1997):

Mucosal transmission of cell-associated and cell-free feline immunodeficiency virus.

AIDS Res. Hum. Retrovir. **13**, 347-355

BYRNE, K.M. , H.W. KIM, B.P. CHEW, G.A. REINHARDT und M.G. HAYEK (2000):

A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes.

Vet. Immunol. Immunopathol. **73**, 167-182

CALVELLI, T. , T.N. DENNY, H. PAXTON, R. GELMAN und J. KAGAN (1993):

Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infection Diseases, Division of AIDS.

Cytometry **14**, 702-715

CAMPBELL, R.M. und C.G. SCANES (1995):

Endocrine peptides 'moonlighting' as immune modulators: roles for somatostatin and GH-releasing factor.

J. Endocrinol. **147**, 838-396

CASSON, P.R., R.N. ANDERSEN, H.G. HERROD, F.B. STENTZ, A.B. STRAUGHN, G.E. ABRAHAM, J.E. BUSTER (1993):

Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women.

Am. J. Obstetrics Gynec. **169** (6), 1536-1539

CREEVY K.E., T.R. BAUER, L.M. TUSCHONG, L.J. EMBREE, L. COLENDIA, K. COGAN, M.F. STAROST, M.E. HASKINS und D.D. HICKSTEIN (2003):

Canine leukocyte adhesion deficiency colony for investigation of novel hematopoietic therapies.

Vet. Immunol. Immunopathol. 94 (1-2), 11-22

DARWICH L., J. SEGAL'ES, M. DOMINGO und E. MATEU (2002):

Changes in the CD4+, CD8+, CD4/CD8 double positive cells and IgM+ cell subsets in peripheral blood mononuclear cells from postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs and age matched uninfected wasted and healthy pigs, correlates with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues.

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 236–242

DARWICH, L., J. SEGAL'ES und E. MATEU (2004):

Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by *Porcine circovirus* 2: an immune riddle.

Arch. Virol. 149, 857–874

DAWSON H.D., B. ETHIOPIA, S. NISHI, G. SOLANO-AGUILAR, M. MORIMOTO, A. ZHAO, K.B. MADDEN, T.K. LEDBETTER, J.P. DUBEY, T. SHEA-DONOHUE, J.K. LUNNEY und J.F. URBAN (2004):

Localized multigene expression pattern support an evolving Th1/Th2 – like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*.

Infect. Immun. 73 (2), 1116-1128

DEAN, G.A., S.A. QUACKENBUSH, C.D. ACKLEY, M.D. COOPER und E.A. HOOVER (1991):

Flow cytometric analysis of T lymphocyte subsets in cats.

Vet. Immunol. Immunopathol. 28, 327-335

DILLENDER, M.J. und J.K. LUNNEY (1993):

Characteristics of T lymphocyte cell lines established from NIH minipigs challenge inoculated with *Trichinella spiralis*.

Vet. Immunol. Immunopathol. 35, 301-319

EASTERBROOK, P.J., L.M. YU, E. GOETGHEBEUR, F. BOAG, K. MCLEAN und B. GAZZARD (2000):

Ten-year trends in CD4 cell counts at HIV and AIDS diagnosis in a London HIV clinic.  
AIDS 4(5), 561-571.

EDFORS-LILJA, I., E. WATTRANG, L. ANDRESSON und C. FOSSUM (2000):

Mapping quantitative trait loci for stress induced alterations in porcine leukocyte numbers and functions.

Anim. Genet. **31**,186-193

ELDER, J.H., G.A. DEAN, E.A. HOOVER, J.A. HOXIE, M.H. MALIM, L. MATTES, J.C. NEIL, T.W. NORTH, E.E. SPARGER, M.B. TOMPKINS, W.A. TOMPKINS, J.YAMAMOTO, N. YUHKI, N.C. PEDERSEN und R.H.MILLER (1998):

Lessons from the cat: feline immunodeficiency virus as a tool to develop intervention strategies against human immunodeficiency virus type 1.

AIDS Res. Hum. Retrovir. **14**, 797-801

ESPERSEN, G.T., A. ELBAEK, E. ERNST, E. TOFT, S. KAALUND, C. JERSILD und N.G. GRUNNET (1990):

Effects of physical exercise on cytokines and lymphocyte subpopulations in human peripheral blood.

APMIS **98**(5), 395-400

EVANS, W.E. (2000):

Interpretation of porcine leukocyte responses.

In: Feldman, B.F., J. Zinkl und N.C. Jain (Hrsg.):

Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>th</sup> Edn., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 411-416

FACHINGER, V., T. SCHLAPP, W. STRUBE, N. SCHMEER und A. SAALMÜLLER, (2000 ):

Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes.

J. Virol. **74**, 7943-7951

FAIST, E., A. MARKEWITZ, M. STORCK, W. ERTEL, F.W. SCHILDBERG (1992):  
Der Einfluß der ausgedehnten operativen Intervention auf die zellvermittelte Immunantwort.  
Internist **33**, 370-378

FAIST, E., C. SCHINKEL, S. ZIMMER (1996):  
Update on the mechanisms of immune suppression after injury and immune modulation.  
World J. surg. **20**, 454-459

FINERTY, S., C.R.STOKES, T.J. GRUFFYDD-JONES, T.J. HILMAN, F.J. BARR und D.A.  
HABOUR (2001) :  
Targeted lymph node immunization can protect cats from a mucosal challenge with feline  
immunodeficiency virus.  
Vaccine **20**, 49-58

FLAHERTY, D.K., C.A. WAGNER, C.J. GROSS und M.A. PANYIK (1997):  
Aging and lymphocyte subsets in the spleen and peripheral blood of the Sprague- Dawley rat.  
Immunopharmacol. Immunotoxicol. **19**,185-195

GAEHTGENS, P., A.R. PRIES und B. WALZOG (1999):  
Abwehr und Immunität.  
In: Deetjen, P. und E.-J. Speckmann (Hrsg.):  
Physiologie, 3. Auflage, Urban und Fischer, München, 273-286

GOTO, Y., Y. NISHIMURA, K. BABA, T. MUZINO, Y. ENDO, K.MASUDA, K. OHNO  
und H. TSUJIMOTO (2002):  
Association of plasma viral RNA load with prognosis in cats naturally infected with feline  
immunodeficiency virus.  
J. Virol. **76**, 10079-10083

HAMMERBERG, C. und G.G. SCHÜRIG (1986):  
Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes.  
Vet. Immunol. Immunopathol. **11**,107-121.

HAUPT, W. , J. RIESE, C. MEHLER, K. WEBER, M. ZOWE, W. HOHENBERGER (1998):

Monocyte function before and after surgical trauma.

Dig. Surg. **15** (2), 102-104

HEIMLICH, F., A. DIETZ, V. DANIEL, H. MAIER (1999):

Einfluß tumorchirurgischer Eingriffe im Kopf-Hals-Bereich auf das Immunsystem.

HNO **47**, 885-892

HEINEN, P.P., E.A.DE BOER-LUIJTZE und A.T.J. BIANCHI (2001):

Respiratory and systemic humoral and cellular immune response of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection.

J. Gen. Vir. **82**, 2697-2707

HEINRITZI, K. und H. PLONAIT (2001):

Blutkrankheiten.

In: Waldmann, K.-H. und M. Wendt (Hrsg.):

Lehrbuch der Schweinekrankheiten, Parey Verlag Berlin, 169-182

HOFFMAN-FEZER, G., L. THUM, M. HERBOLD, C. ACKLEY, J. MYSLIWIEZ, K.

HARTMANN und W. KRAFT (1991):

T-Helfer und T-Suppressorzellen im peripheren Blut spontan FIV-positiver Katzen.

Tierärztl. Praxis **19**, 682-686

HOFFMANN-LEHMANN, R., E. HOLZNAGEL, P. OSSENT und H.LUTZ (1997):

Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: haematology, clinical chemistry an lymphocytes subsets.

Clin. Diag. Lab. Immunol. **4**, 33-42

HOSIE, M.J., B.J. WILLETT, D. KLEIN, T.H. DUNSFORD, C. CANNON, M. SHIMOJIMA, C. NEIL und O. JARRETT (2002):

Evolution of replication efficiency following infection with a molecularly cloned feline immunodeficiency virus of low virulency.

J. Virol. **76**, 6062-6072

HUEBNER, J., D. KLEIN, E.MÜLLER, T.W. VAHLENKAMP und I.LANGBEIN (2004):

Kombinierte anti-retrovirale Therapie (CART) bei einer mit dem Feline Immunschwächevirus (FIV)-infizierten Katze.

Kleintierpraxis **49** (8), 477-544

JANEWAY, C.A. (2002):

Einführung in die Immunologie und die angeborene Immunität.

In: Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport und M. Shlomchik (Hrsg.):

Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1-95

JOLING, P., A.T.J. BIANCHI, A.L. KAPPE und R.J. ZWART (1994):

Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age.

Vet. Immunol. Immunopathol. **40**, 105-117

JONJIC, S. und U.H. KOSZINOWSKI (1984):

Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes, I. Antibodies to membrane structure that define the cytolytic T lymphocyte subset in the swine.

J. Immunol. **133**, 647-652

JUNGI, T.W. (2000a):

Zelluläre Elemente der Abwehr: ein Überblick.

In: Jungi, T.W. (Hrsg.): Klinische Veterinärimmunologie, Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart, 3-7

JUNGI, T.W. (2000b):

Professionelle Phagozyten.

In: Jungi, T.W. (Hrsg.): Klinische Veterinärimmunologie, Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart, 18-22

JUNGI, T.W. (2000c):

T-Zellen, die Vermittler zellulärer Immunität.

In: Jungi, T.W. (Hrsg.): Klinische Veterinärimmunologie, Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart, 8-14

JUNGI, T.W. (2000d):

Antikörper.

In: Jungi, T.W. (Hrsg.): Klinische Veterinärimmunologie, Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart, 25-28

KEHLET, H. (1989):

The stress response to surgery. The release mechanisms and the modifying mechanism of pain relief.

Acta chir. Scand. **550**, 22-28.

KELLER, P. und U. FREUDIGER (1993):

Blut und Milz.

In: Freudiger, U., E.-G. Grünbaum und E. Schimke (Hrsg.):

Klinik der Hundekrankheiten, Gustav Fischer Verlag, Jena, 847-867

KENDALL, A., L. HOFMANN-GOETZ, M. HOUSTON, B. MAC NEIL und Y.

ARUMUGAM (1990):

Excercise and blood lymphocyte subset response: intensity, duration and subject fitness effects.

J. Appl. Physiol. **69**, 251-260



KIESS, W., L.L. LIU und N.R. HALL (1991):

Lymphocyte subset distribution and natural killer cell activity in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.

Acta Endocrinol. **124**, 399-404

KÖNIG, H.E. und H.G. LIEBICH (1999):

Immunsystem und lymphatische Organe (Organa lymphopoetica).

In: König, H.E. und H.G. Liebich (Hrsg.):

Anatomie der Haussäugetiere, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 189-202

KRAFT, W., U.M. DÜRR, M. FÜRLI, H. BOSTEDT und K. HEINRITZI (1999):

Hämatologie.

In: Kraft, W. und U.M. Dürr (Hrsg.):

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 43-77

KRAFT, W. (1999a):

Referenzbereich, „Normalbereich“, „Normbereich“, „Normalwert“.

In: Kraft, W. und Dürr U.M. (Hrsg.):

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1-4

KRAFT, W. (1999b):

Referenzwerte.

In: Kraft, W. und Dürr U.M. (Hrsg.):

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 344

KRAKOWKA S., J.A. ELLIS, F. MCNEILLY, D. GILPIN, B. MEEHAN, K. MCCULLOUGH und G. ALLAN (2002):

Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection.

Viral Immunol **15**, 567–582

KUBES, P., B. HEIT, G.VAN MARLE, J.B. JOHNSTON, D. KNIGHT, A. KHAN und C.POWER (2003):

In vivo impairment of neutrophil recruitment during lentivirus infection.

J. Immunol. **171** (9), 4801-4808

LANE, P.J., P. LEES und G.J. FINK (1990):

Action of dexamethasone in an equine model of acute non-immune inflammation.

Res. Vet. Sci. **48**, 87-95

LASSEN, H.C.A. , E. HENRIKSEN, R. NEUKIRCH (1956):

Treatment of tetanus: Severe bone marrow depression after prolonged nitrous oxide anaesthesia.

Lancet **1**, 527

LECKY, J.H. (1975):

Anaesthesia and the Immune system.

Surg. Clin. North. Am **55**, 795

Leukemia markers. New York: Academic Press

LOCKRIDGE, K.M., M. CHIEN, G.A. DEAN, K. S. COLE, R.C. MONTELARO, P.A.

LUCIW und E.E. SPARGER (2000):

Protective immunity against feline immunodeficiency virus induced by inoculation with vif-deleted proviral DNA.

Virology **273**, 67-79

LOHSE L., J. NIELSEN und L. ERIKSEN (2004):

Temporary CD8+ T-cell depletion in pigs does not exacerbate infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV).

Viral Immunol. **17** (4), 594-603

LOKO, M.A., S. TOURE, N. DAKOURY-DOGBO, D. GABILLARD, V. LEROY und X.

ANGLARET (2005):

Decreasing incidence of pregnancy by decreasing CD4 cell count in HIV-infected women in Cote d'Ivoire: a 7-year cohort study.

AIDS **19** (4),443-445.

LUNNEY, J.K. und M.D. PESCOVITZ (1987):

Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations.

Vet. Immunol. Immunopathol. **17**, 135-144

MARKEWITZ, A. , E. FAIST, TH. NIESEL, S. LANG, C. WEINHOLD, B. REICHART (1992):

Changes in lymphocyte subsets and mitogen responsiveness following open-heart surgery and possible therapeutic approaches.

Thorac. Cardiovasc. Surgeon **40**, 14-18

MARTI, E. (2000):

Genetische und züchterische Aspekte bei Immunkrankheiten.

In: Jungi, T.W. (Hrsg.): Klinische Veterinärimmunologie, Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart, 139-142

MATTEUCCI, D., M. PISTELLO, P. MAZETTI, S. GIANNECCHINI, P. ISOLA, A. MERICO, A. RIZZUTO und M. BENDINELLI (2000).

AIDS vaccination studies using feline immunodeficiency virus as a model: immunisation with inactivated whole virus suppresses viral replication following intravaginal challenge with infected cats.

Vaccine **18**, 119-130

MATTILA-VUORI, A. , M. SALO, E. IISALO, O. PAJULO, J. VILJANTO (2000):

Local and systemic immune response to surgery under balanced anaesthesia in children.

Paediatric. Anaesthesia **10**, 381-388

MILLER-EDGE , M. und M. WORLEY (1992):

In vitro response of cheetah mononuclear cells to feline Herpesvirus-1 and Cryptococcus neoformans.

Vet. Immunol. Immunopathol **30**, 261-274

MOORE, P.F. und W. VERNAU (2000) :

Lymphocytes: differentiation molecules in diagnosis and prognosis.

In: Feldman, B.F., J. Zinkl und N.C. Jain (Hrsg.):

Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>th</sup> Edn., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 247-255

MORROW-TESCH, J., J.J. MC GLONE und J.L. SALAK-JOHNSON (1994):

Heat and social stress effects on pig immune measures.

J. Anim. Sci. **72**, 2599-2609

MOSZCZYNSKI, P., S. SLOWINSKI, J. RUTOWSKI, S. BEM und D. JAKUS-STOGA (1995):

Lymphocytes, T and NK cells, in men occupationally exposed to mercury vapours.

Int. J. Occup. Med. Environ. Health **8**, 49-56

MOSZCZYNSKI, P., J. RUTOWSKI, S. SLOWINSKI und S. BEM (1998):

Immunological effects of occupational exposure to metallic mercury in the population of T cells and NK cells.

Analyst **123**, 99-103

NAGAHATA, H. (2004):

Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAS): a review.

J.Vet.Med.Sci. **66** (12), 1475-1482

NGUYEN, V.P., C.W. WONG, G.N. HINCH, D. SINGH und I.G. COLDITZ (1998):

Variation in the immune status of two Australian pig breeds.

Aust. Vet. J. **79**(9), 613-617

NEUMANN, R., G. MEHLDORN, H. BIER und C. BOSCHET (1985):

Der Verlauf ausgewählter endokrinologischer, hämatologischer und immunologischer Parameter des Schweines nach bronchoskopischer Untersuchung unter Barbiturat-Kurzzeitnarkose.

Arch. exper. Vet. Med. **39**, 805-816

NIELSEN J. und A. BOETNER (1997):

Hematological and immunological parameters of 4 ½ month old pigs infected with PRRS virus.

Vet. Microbiology **55**, 289-294

NOVOTNEY, C. , R.V. ENGLISH, J. HOUSMAN, M.G. DAVIDSON, M.P. NASISSE, C.-R. JENG, W.C. DAVIS und M.B. TOMPKINS (1990):

Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus.

AIDS **44**, 1213-1218

NYBERG, L. , K. LUNDSTROM, I. EDFORS-LILJA und M. RUNDGREN (1988):

Effects of transport stress on concentrations of cortisol, corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid receptors in pigs with different halothane genotypes.

J. Anim. Sci. **66**, 1201-1211

OBER, B.T., A. SUMMERFIELD, C. MATTLINGER, K.-H. WIESMÜLLER, G. JUNG, E. PFAFF, A. SAALMÜLLER und H.-J. RZIHA (1998):

Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> memory T helper cells in swine.

J. Virol. **72**, 4866-4873

ONDOA, P., S. KOBLAVI-DEME, M.Y. BORGET, M.L. NOLAN, J.N. NKENGASONG und L. KESTENS (2005):

Assessment of CD8 T cell immune activation markers to monitor response to antiretroviral therapy among HIV-1 infected patients in Cote d'Ivoire.

Clin Exp Immunol. 2005 Apr;140(1):138-148.

OSBALDISTON, G.W. und H.J. JOHNSON (1972):

Effect of ACTH and glucocorticoids on circulating blood cells in horses.

J. Am. Vet. Med. Assoc. **161**, 53-56

PABST, R. und R.M. BINNS (1994):

The immune system of the respiratory tract in pigs.

Vet. Immunol. Immunopathol. **43**, 151-156

PABST, R. und F. TREPEL (1975):

Quantitative evaluation of the total number and distribution of lymphocytes in young pigs.

Blut **31**(2), 77-86

PALELLA, F.J., K.M. DELANEY, A.C. MOORMAN, M.O. LOVELESS, J. FUHRER, G.A.:  
SATTEN, D.J. ASCHMAN und S.D. HOLMBERG (1998):

Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency  
virus infection. HIV outpatient study investigators.

N. Engl. J. Med. 338(13),853-60.

PARBROOK, G.D. (1967):

Leukopenic effects of prolonged nitrous oxid treatment

Br. J. Anesthesia **39**, 119-123

PAULY, T., M. KÖNIG, H.-J. THIEL und A. SALLMÜLLER (1998):

Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness  
of porcine T lymphocytes.

J. Gen. Virol. **79**, 31-40

PAXTON, H., P. KIDD, A. LANDAY, J. GIORGI, N. FLOMENBERG, E. WALKER, F.  
VALENTINE, J. FAHEY und R. GELMAN (1989):

Results of the flow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings.

Clin. Immunol. Immunopathol. **52**, 68-84

PESCOVITZ, M.D. , J.K. LUNNEY und D.H. SACHS (1985):

Murine anti swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative  
and cytotoxic T cells.

J. Immunol. **134**, 37-44.

PESCOVITZ, M.D., A.G. SAKOPOULOS, J.A. GADDY, J.R. HUSMANN und F.A.  
ZUCKERMANN (1994):

Porcine peripheral blood CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dual expressing T cells.

Vet. Immunol. Immunopathol. **43**, 53-62

PISTELLO, M., D. MATTEUCCI, F. BONCI, P. ISOLA, P. MAZZETTI, L. ZACCARO, A. MERICO, D. DELMAURO, N. FLYNN und M. BENDDINELLI (2003):

AIDS vaccination studies using an ex vivo feline immunodeficiency virus model: protection from an intracade challenge administered systemically or mucosally by an attenuated vaccine.

J. Virol. 77 (20), 10740-10750

REGECZY, N., G. GOROG und K. PALOCZI (2001):

Developing an expert system for immunophenotypical diagnosis in immunodeficiency. Age-related reference values of peripheral blood lymphocyte subpopulations in Hungary.

Immunol. Lett. 1, 47-54

RENZI, P. und L.C. GINNS (1987):

Analysis of T cell subsets in normal adults.

J. Immunol. Methods 98, 53-56

REYNOLDS, J.D. (1987):

Peyer's patches and the early development of B-lymphocytes.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 135, 43

ROBINSON, M., J. O'DONOHUE, G. DADIAN, A. WANKOWICZ, D. BARLTROP und J.R. HOBBS (1996):

An analysis of the normal ranges of lymphocyte subpopulations in children aged 5-13 years.

Eur. J. Pediatr. 155, 535-539

ROTH, A., M. KRIEGER, T. BRUNNER, S.C. BISCHOF, T.J. SCHALL und C.A. DAHINDEN (1992):

RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induces the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes.

J. Exp. Med. 176, 1489-1495

SAALMÜLLER, A. (1996):

Characterization of swine leukocyte differentiation antigens.

Immunol. Today 17, 352-354

SAALMÜLLER, A. und J. BRYANT (1994):

Characteristics of porcine T lymphocytes and T cell lines.

Vet. Immunol. Immunopathol. **43**, 45-52

SAALMÜLLER, A. (1998):

Antigen-specific immune response of porcine T lymphocytes to various pathogens.

Rev. Sci. Tech. **17**, 71-83

SAALMÜLLER, A., T. PAULY und E. PFAFF (1998):

Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T-Lymphozyten des Schweines.

Zentralbl. Chir. **123**, 798-802

SAALMÜLLER, A., T. PAULY, B.J. HOHLICH und E. PFAFF (1999):

Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens.

J. Biotechnol. **73**, 223-33

SAALMÜLLER, A., A. WERNER und V. FACHINGER (2002):

T helper cells from naive to committed.

Vet. Immunol. Immunopathol. **87**, 137-145

SALO M. und J. ESKOLA (1977):

Immunosuppression after Cholecystectomy.

Acta Anaest. Scand. **21**, 509-516

SCHLIESSER, T. (1990):

Immunologie.

In: Stünzi, H. und E. Weiss (Hrsg.):

Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin, 3. Auflage, Verlag Paul

Parey, Hamburg, 160-161

SCHUBERTH, J.H., H.U. RAABE, A. BEER und W. LEIBOLD (1998):

Crossreactivity of workshop monoclonale antibodies with canine blood leucocytes.

Vet. Immunol. Immunopathol. **60**, 419-424



SEGAL´ES J., J. PASTOR, R. CUENCA und M. DOMINGO (2000):

Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs.  
Vet. Rec. **146**, 675–676

SEIKI K. und K. SAKABE (1997):

Sex hormones and the thymus in relation to thymocyte proliferation and maturation.  
Arch. Histol. Cytol. **60**, 29-38

SIEVERDING, E. (2000):

Handbuch Gesunde Schweine  
Kamlage Verlag, Osnabrück, 12

SIPSAS, N.V. und P.P. SFIKAKIS (2004):

Expanding role of circulating adhesion molecules in assessing prognosis and treatment  
response in human immunodeficiency virus infection.  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. **11** (6), 996-1001

SMITH, H.E., R.M. JACOBS und C. SMITH (1994):

Flow cytometric analysis of ovine peripheral blood lymphocytes.  
Can. J. Vet. Res. **58**, 152-155

SUMMERFIELD, A., H.J. RHIZA und A. SAALMÜLLER (1996):

Functional characterization of porcine CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> extrathymic T lymphocytes.  
Cell. Immunol. **168**, 291-296

SUMMERFIELD, A. F. MCNEILLY, I. WALKER, G. ALLAN, S.M. KNOETIG und K.C.  
MCCULLOUGH (2001):

Depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>high</sup> + T cells before the onset of viraemia during classical swine  
fever.  
Vet. Immun. Immunopathol. **78**, 3-19

TERWEE, J.A., J.K. YACTOR, K.S. SONDEGROTH und S. VANDEWOUDE (2005):  
Puma lentivirus is controlled in domestic cats after mucosal exposure in the absence of  
conventional indicators of immunity.  
J. Virol. 79(5), 2797-2806

TERZIC, S., L. SVER, I. VALPOTIC, M. LOJKIC, Z. MILETIC, L. JEMERSIC, G.  
LACKOVIC, A. KOVSCA-JANJATOVIC und N. ORSOLIC (2002):  
Immunophenotyping of leukocyte subsets in peripheral blood and palatine tonsils of  
prefattening pigs.  
Vet. Res. Comm. **26**, 273-283

THIELKE, K.H. , R. PABST und H.J. ROTHKÖTTER (1999):  
Quantification of proliferating lymphocyte subsets appearing in the intestinal lymph and the  
blood.  
Clin. Exp. Immunol. **117**, 277-284

THOMSON, D.A. (1987):  
Anesthesia and the Immune System.  
J.B.C.R. **8** (6), 483-487

THORN, C.E. (2000):  
Normal hematology of the pig.  
In: Feldman, B.F., J. Zinkl und N.C. Jain (Hrsg.):  
Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>th</sup> Edn., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia,  
1089-1095

TINGSTEDT J.E. und J. NIELSEN (2004):  
Cellular immune response in the lungs of pigs infected in utero with PRRSV: an  
immunohistochemical study.  
Viral Immunol. **17** (4), 558-564

TOLLERUD D.J., S.T. ILSTAD, L.M. BROWN, J.W. CLARK, W.A. BATTNER, D.L. MANN, C.Y. NEULAND, L. PANKIW-TROST und R.N. HOVER (1990):  
T cell subsets in healthy teenagers: transition to the adult phenotype.  
Clin. Immunol. Immunopathol. **56**, 88-96

TOMPKINS, M.B. und W.A.F. TOMPKINS (2000):  
Cytokines and the immune response to infection.  
In: Feldman, B.F., J.Zinkl und N.C. Jain (Hrsg.):  
Schalm's Veterinary Hematology, 5th Edn., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia,  
256-259

TOMPKINS, M.M., M. BULL, J.L. DOW, J.M. BALL, E.W. COLLISSON, B.J. WINSLOW, A.P. PHADKE, T.W. VAHLENKAMP und W.A. TOMPKINS (2002):  
Feline immunodeficiency virus (FIV) is characterized by B7<sup>+</sup>CTLA<sup>+</sup> T cell apoptosis.  
J. Infect. Dis. 185, 1077-1093

TOTH, T.E., B. SMITH und H. PYLE (1992):  
Simultaneous separation and purification of mononuclear and polymorphonuclear cells from  
the peripheral blood of cats.  
J. Virol. Methods **36**, 185-196

UHL, E.W., T.G. HEATON-JONES, R. PU und J.K. YAMAMOTO (2002):  
FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review.  
FIV vaccine 2002 update and review.  
Vet. Immuno. Immunopathol. **90**, 113-132

VOJDANI, A., M. GHONEUM und N. BRAUTBAR (1992):  
Immune alteration associated with exposure to toxic chemicals.  
Toxicol. Ind. Health **8**, 239-254

WATERS, W.R., R. HONTECILLAS, R.E. SACCO, F.A. ZUCKERMANN, K.R. HARKINS, J. BASSAGANYARIERA und M.J. WANNEMUEHLER (2000):  
Antigen-specific proliferation of porcine CD8 cells to an extracellular bacterial pathogen.  
Immunology **101**, 333-341

WILLETT, B.J., J.N. FLYNN und M.J.HOSIE (1997):

FIV infection of the domestic cat: an animal model for AIDS.

Immunol. Today **18**, 182-189

YANG, H. und R.M.E. PARKHOUSE (1996):

Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues.

Immunology **89**, 79-83

ZEMAN, K., H. TCHORZEWSKI, E. MAJEWSKA und L. POKOCA (1988):

Relative and absolute numbers of T lymphocyte subpopulation NK-cells in male population in relation to age.

Arch. Immunol. Ther. Exp. **36**, 673-677

## 9.2. Verzeichnis der Abkürzungen

|                 |   |                                                                                                   |
|-----------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abb.            | - | Abbildung                                                                                         |
| ACT             | - | <i>engl.</i> active clotting time, aktivierte Gerinnungszeit                                      |
| APC             | - | <i>engl.</i> antigen presenting cells, antigenpräsentierende Zellen                               |
| CD              | - | <i>engl.</i> cluster of differentiation, Differenzierungsgruppen                                  |
| CD <sup>+</sup> | - | CD positiv                                                                                        |
| CTL             | - | <i>engl.</i> cytotoxic T lymphocyte, zytotoxische T-Lymphozyten                                   |
| DC              | - | <i>engl.</i> dendritic cells, dendritische Zellen                                                 |
| DP- Zellen      | - | doppelt positive Zellen                                                                           |
| EDTA            | - | Ethylendiamintetraessigsäure                                                                      |
| EKG             | - | Elektrokardiogramm                                                                                |
| <i>engl.</i>    | - | Englisch                                                                                          |
| <i>et al.</i>   | - | <i>lat.</i> et alii, und weitere                                                                  |
| FACS            | - | Fluorescence-activated cell sorter                                                                |
| FITC            | - | Fluorescein Isothiocyanat                                                                         |
| G-CSF           | - | <i>engl.</i> granulocyte-colony stimulating factor,<br>Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor |
| GH              | - | <i>engl.</i> growth hormon, Wachstumshormon                                                       |
| IEL             | - | intraepitheliale Lymphozyten                                                                      |
| Ig              | - | Immunglobulin                                                                                     |
| IL              | - | Interleukin                                                                                       |
| i.d.R.          | - | in der Regel                                                                                      |
| i.v.            | - | intravenös                                                                                        |
| <i>lat.</i>     | - | Lateinisch                                                                                        |
| MHC             | - | <i>engl.</i> major histocompatibility complex,<br>Hauptgewebekompatibilitätskomplex               |
| mAk             | - | monoklonaler Antikörper                                                                           |
| mk.             | - | männlich kastriert                                                                                |
| MW              | - | Mittelwert                                                                                        |

|           |   |                                                                                                          |
|-----------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| n         | - | Anzahl                                                                                                   |
| NIAID     | - | National Institut of Allergy and Infectious Disease                                                      |
| NK Zellen | - | Natürliche Killer Zellen                                                                                 |
| n.a.      | - | Daten nicht auswertbar                                                                                   |
| PBS       | - | Phosphatgepufferte Salzlösung                                                                            |
| PE        | - | Phytoerytrin                                                                                             |
| PG        | - | Prostaglandin                                                                                            |
| PMBC      | - | periphere mononukleäre Blutzellen                                                                        |
| PMN       | - | polymorphkernige neutrophile Granulozyten                                                                |
| post OP   | - | postoperativ                                                                                             |
| SD        | - | Standardabweichung                                                                                       |
| SLA       | - | <i>engl.</i> swine major histocompatibility complex -<br>Hauptgewebekompatibilitätskomplex des Schweines |
| sog.      | - | sogenannt                                                                                                |
| SPF       | - | spezifiziert pathogen frei                                                                               |
| SW        | - | <i>engl.</i> Swine workshop                                                                              |
| TH1       | - | T-Helferzellen Typ 1                                                                                     |
| TH2       | - | T-Helferzellen Typ 2                                                                                     |
| TNF       | - | Tumornekrosefaktor                                                                                       |
| v.a.      | - | vor allem                                                                                                |
| vs.       | - | <i>lat.</i> versus, gegenüber                                                                            |
| wbl.      | - | weiblich                                                                                                 |
| z.B.      | - | zum Beispiel                                                                                             |

### 9.3. Verzeichnis der Einheiten

|         |                           |
|---------|---------------------------|
| m       | Meter                     |
| cm      | Zentimeter ( $10^{-2}$ m) |
| mm      | Millimeter ( $10^{-3}$ m) |
| nm      | Nanometer ( $10^{-9}$ m)  |
| l       | Liter                     |
| dl      | Deziliter ( $10^{-1}$ l)  |
| ml      | Milliliter ( $10^{-3}$ l) |
| $\mu$ l | Mikroliter ( $10^{-6}$ l) |
| kg      | Kilogramm ( $10^3$ g)     |
| g       | Gramm                     |
| mg      | Milligramm ( $10^{-3}$ g) |
| $\mu$ g | Mikrogramm ( $10^{-6}$ g) |
| h       | <i>hora</i> , Stunde      |
| Min     | Minute                    |
| Tsd     | Tausend                   |
| Mio     | Millionen                 |

## **Danksagung**

**Allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen  
und mich dabei unterstützt haben, möchte ich danken!**

Mein ganz besonder Dank gilt Herrn Prof. Dr. Haberstroh für die intensive Betreuung und die Hilfestellung bei allen Fragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. von Specht danke ich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel.

Bei Herrn Prof. Dr. Moritz möchte ich mich für die Bereitschaft, als erster Gutachter zur Verfügung zu stehen und die freundliche Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich auch bei Frau Dr. Bauer für die nette und hilfreiche Korrektur dieses Manuskriptes bedanken.

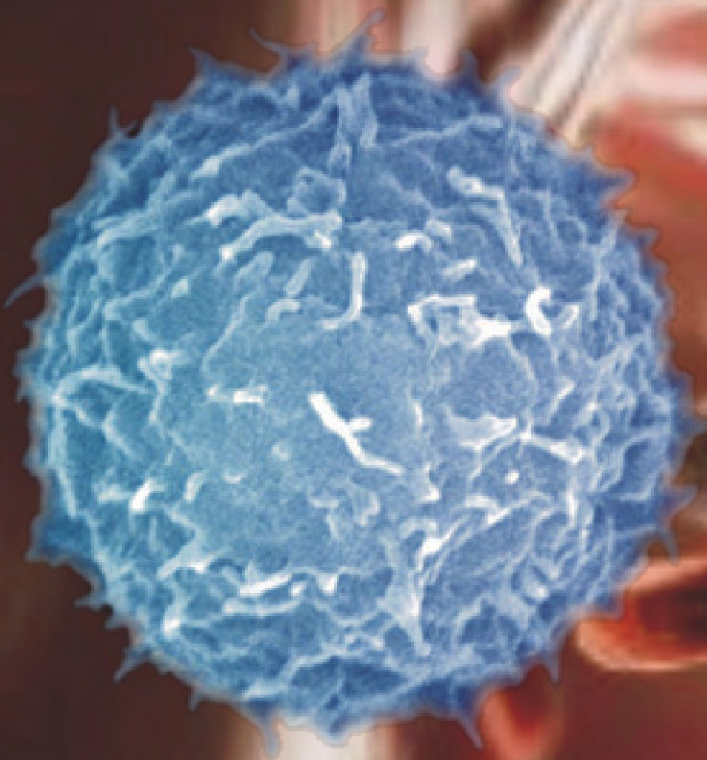
Herrn Dr. Wolff-Vorbeck danke ich für die Hilfe bei der Vorbereitung und Durchführung der Durchflusszytometrie sowie die Durchsicht des Manuskriptes.

Mein Dank geht auch an die Kolleginnen Dr. Barbara Eißner, Anja Röschmann und Dr. Katinka Matz für die Zusammenarbeit an dieser Studie.

Vielen Dank auch den Mitarbeitern der Abteilung Zentrale Klinische Forschung der Universitätsklinik Freiburg für die freundliche Unterstützung, insbesondere den Tierarzthelferinnen und Tierpflegerinnen!

*Abschließend möchte ich meinem Mann und meiner Familie  
für das Verständnis und die Unterstützung danken.*



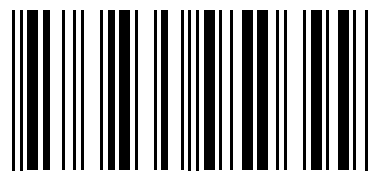


édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN 3-8359-5039-8



9 783835 950399