Einfluss verschiedener Leukozyten und von Zellkulturüberständen auf die zytotoxische Aktivität von aus Hundeblut isolierten Effektorzellen

SUSANNE SCHÖMIG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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 2008

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.

1st Edition 2008

© 2008 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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. Burkhardt

Einfluss verschiedener Leukozyten und von Zellkulturüberständen auf die zytotoxische Aktivität von aus Hundeblut isolierten Effektorzellen

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

SUSANNE SCHÖMIG

Tierärztin aus Lich (Hessen)

Gießen 2007

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Burkhardt
- 2. Berichterstatter: PD Dr. Ch. Menge

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2007

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 2.1.1 2.1.1.1 2.1.1.2	Natürliche Killerzellen Einführung Abstammung von NK-Zellen Adhärente und nichtadhärente NK-Zellen	3 3 4
2.2 2.2.1 2.2.1.1 2.2.2.2	Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Effektorzellen Isolierung von Blutlymphozyten als Effektorzellen Isolierung von NK-Zellen Quantifizierung der spontanen zytotoxischen Aktivität im	8 8 9
2.2.2.1 2.2.2.2 2.2.3	Zytotoxizitätstest Zielzellen Rose Bengal Assay (RBA) Korrelation zwischen Lymphozytengehalt und Zytotoxizität	10 10 10 12
2.3 2.3.1 2.3.1.1 2.3.1.2 2.3.1.3 2.3.1.4 2.3.2 2.3.2.1 2.3.2.1	Depletion kontaminierender Leukozyten Depletion von Monozyten Depletion von Monozyten durch Adhärenz an Oberflächen Depletion von Monozyten durch Carbonyleisenphagozytose Depletion von Monozyten über spezifische Antikörper Depletion von Monozyten durch Nylonwolle oder Sephadex G-10 Depletion von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen Immunomagnetische Separation Antikörper gegen CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen beim Hund	12 13 13 14 15 16 16 16 20
2.4 2.4.1 2.4.1.1 2.4.2 2.4.2 2.4.2.1 2.4.2.2 2.4.2.3 2.4.2.4 2.4.2.4.1 2.4.2.4.2 2.4.2.4.2 2.4.2.4.3 2.4.2.5	Leukozyten und Zytotoxizität	21 21 24 25 26 27 27 27 27 29 30 31
2.5	zytotoxische Aktivität von NK-Zellen	31
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	33
3.1 3.1.1	Material und Methoden Blutentnahme, Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild	33 33

3.1.2	Isolierung von Effektorzellen für die Messung spontaner zytotoxischer	~ 4
	Aktivitat	34
3.1.3	Zytotoxizitätstest	35
3.1.3.1	Zielzellen	35
3.1.3.2	Durchführung des Rose Bengal Assays (RBA)	36
3.1.4	Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen	38
3.1.4.1	Einfluss der Adhärenz auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität	38
3.1.4.2	Einfluss der Phagozytose auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität	39
3.1.4.3	Charakterisierung von Monozyten durch kombinierte Carbonyleisen-	
	phagozytose und α-Naphtylacetatesterasefärbung	40
3.1.5	Depletion von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen	40
3.1.5.1	Kopplung der primären Antikörper an Dynabeads [®]	41
3.1.5.1.1	Kopplung von Rat anti-Dog CD4 Antiserum an mit Sheep anti-Rat IgG	
	gekoppelten Dynabeads [®]	41
3.1.5.1.2	Kopplung von Mouse anti-Dog CD8 Antiserum an mit	
	Sheep anti-Mouse IgG gekoppelten Dynabeads [®]	42
3.1.5.2	Einfluss der Depletion von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen auf	
	Zellzusammensetzung und Zytotoxizität	42
3.1.5.3	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der an Dynabeads [®]	
	gebundenen CD4 ⁺ - oder CD8 ⁺ -Zellen	43
3.1.6	Untersuchung von Zellkulturüberständen auf spontane zytotoxische	
	Aktivität nach Koninkubation von Ziel- und Effektorzellen	44
3.1.7	Einfluss von Haltung und Geschlecht der Blutspender auf die	
	Zytotoxizität	46
240		40
3.1.8	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat	40
3.1.8 3.1.9	Statistische Auswertung	46 47
3.1.8 3.1.9	Statistische Auswertung	46 47
3.1.8 3.1.9 4	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE	46 47 49
3.1.8 3.1.9 4 4.1	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität	46 47 49 49
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild	46 47 49 49 49
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen	46 47 49 49 49 49
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen	46 47 49 49 49 50
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung	46 47 49 49 49 49 50 50
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten	46 47 49 49 49 50 50
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen	46 47 49 49 49 49 50 50
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1 4.1.3.2	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität	46 47 49 49 49 49 50 50 52 53
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1 4.1.3.2 4.1.3.2	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen	46 47 49 49 49 50 50 50 53 53
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen	46 47 49 49 49 50 50 50 52 53 53 54
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4 4.1.4.1	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen Morphologische Darstellung der Eisenphagozytose und des	46 47 49 49 49 49 50 50 50 53 53 54
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4 4.1.4.1	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat	46 47 49 49 49 49 50 50 53 53 54
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4 4.1.4.1 4.1.4.1 4.1.4.2	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen Morphologische Darstellung der Eisenphagozytose und des α-Naphtylacetatesterasegehaltes in Monozyten Einfluss der Phagozytose auf die Zellzusammensetzung	46 47 49 49 49 50 50 50 52 53 54 54 54
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4 4.1.4.1 4.1.4.1 4.1.4.2 4.1.4.3	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen Morphologische Darstellung der Eisenphagozytose und des α-Naphtylacetatesterasegehaltes in Monozyten Einfluss der Phagozytose auf die Spontane zytotoxische Aktivität Einfluss der Phagozytose auf die Spontane zytotoxische Aktivität	46 47 49 49 49 49 50 50 50 53 53 54 54 54 57
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4 4.1.4.1 4.1.4.1 4.1.4.2 4.1.4.3 4.1.4.3 4.1.5	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat. Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen Morphologische Darstellung der Eisenphagozytose und des α-Naphtylacetatesterasegehaltes in Monozyten Einfluss der Phagozytose auf die zellzusammensetzung Einfluss der Phagozytose auf die spontane zytotoxische Aktivität	46 47 49 49 49 49 50 50 53 53 53 54 54 54 57 58
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4 4.1.4.1 4.1.4.1 4.1.4.2 4.1.4.3 4.1.5 4.1.5 4.1.5	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat	46 47 49 49 49 50 50 50 50 53 53 54 54 54 54 57 58
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4.2 4.1.4.1 4.1.4.2 4.1.4.3 4.1.5 4.1.5.1	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen Morphologische Darstellung der Eisenphagozytose und des α-Naphtylacetatesterasegehaltes in Monozyten Einfluss der Phagozytose auf die spontane zytotoxische Aktivität Depletion von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen Morphologische Darstellung der gebundenen Lymphozyten an Dynabeads [®]	46 47 49 49 49 49 50 50 50 53 53 53 54 54 54 57 58
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.4.1 4.1.4.1 4.1.4.1 4.1.4.2 4.1.4.3 4.1.5 4.1.5.1 4.1.5.2	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat. Statistische Auswertung ERGEBNISSE Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild Isolierung von Effektorzellen Depletion adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen Morphologische Darstellung der Eisenphagozytose und des α-Naphtylacetatesterasegehaltes in Monozyten Einfluss der Phagozytose auf die spontane zytotoxische Aktivität Depletion von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen Morphologische Darstellung der gebundenen Lymphozyten an Dynabeads [®] Einfluss der Depletion von CD4 ⁺ -Zellen auf die Zellzusammensetzung	46 47 49 49 49 49 50 50 53 53 53 54 54 54 54 58 58
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1.1 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2.1 4.1.4 4.1.4.1 4.1.4.2 4.1.4.2 4.1.4.3 4.1.5 4.1.5.1 4.1.5.2 4.1.5.2 4.1.5.3	Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizitat	46 47 49 49 49 50 50 50 52 53 53 54 54 54 57 58 58
3.1.8 3.1.9 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.3.1 4.1.3.1 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.3.2 4.1.4.1 4.1.4.2 4.1.4.3 4.1.5 4.1.5.1 4.1.5.2 4.1.5.3	Korrelation von Lymphozytenreinneit und Zytotoxizitat. Statistische Auswertung	46 47 49 49 49 49 50 50 53 53 53 53 54 54 57 58 58 58 58

8	ABBILDUNGENI
9	LITERATURVERZEICHNIS VI
10	AnhangXX
10.1	TabellenXX
10.1.1	Herkunft und Geschlecht der BlutspendehundeXX
10.1.2	Relative Anteile der Leukozyten nach Percoll [®] -IsolierungXXI
10.1.3	Einfluss der Adhärenz auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität XXIII
10.1.4	Einfluss von Adhärenz und Phagozytose auf Zellzusammensetzung
	und Zytotoxizität XXVII
10.1.5	Einfluss der Depletion von CD4 ⁺ -Zellen auf Zellzusammensetzung
	und Zytotoxizitat XXX
10.1.6	Einfluss der Depletion von CD8 ⁻ -Zellen auf Zellzusammensetzung
1017	Zytotoxizität von Zollkulturüberständen nach Keinkubation von
10.1.7	Zytotoxizitat von Zeirkulturuberständen häch Kolnkubation von Ziel- und Effektorzellen XXXVIII
10.1.8	Korrelation von Lymphozytenreinheit und ZytotoxizitätXL
10.1.9	Einfluss der Haltung und des Geschlechts der Blutspender auf die
	ZytotoxizitätXLI
10.2	Bezugsquellen für Chemikalien und Antikörper
10.3	Bezugsquellen für Geräte und EinmalartikelXLV
10.4	Lösungen und PufferXLVI

Abb.	=	Abbildung
A-LAK	=	Adhärente Lymphokin-aktivierte Killerzellen
A-NK	=	Adhärente NK-Zellen
CD	=	Cluster of differentiation (Cluster der [Leukozyten-] differenzie- rung)
CE	=	Carbonyleisen
CF	=	Cytotoxic factor (zytotoxischer Faktor)
CRA	=	⁵¹ Chromium Release Assay
CTAC	=	Canine thyroid adenocarcinoma (kanines Schilddrüsen-Ade- nokarzinom)
CTL	=	Cytotoxic T lymphocyte (zytotoxischer T-Lymphozyt)
DSH	=	Deutscher Schäferhund
E/T ratio	=	Effector / target ratio (Effektor-Zielzellverhältnis)
FKS	=	Fetales Kälberserum
HBSS	=	Hanks Balanced Salt Solution
IFN	=	Interferon
IL-1	=	Interleukin 1
IL-2	=	Interleukin 2
KIR	=	Killer cell inhibitory receptor (inhibitorischer Killerzell-Rezeptor)
LAK	=	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LGL	=	Large granular lymphocyte (großer granulierter Lymphozyt)
LT	=	Lymphotoxin
m	=	Männlich
MHC	=	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitäts- komplex)
MEME	=	Minimum Essential Medium Eagles Gewebekulturmedium
NA-NK	=	Nichtadhärente NK-Zellen

Abkürzungen

N/C ratio	=	Nucleus : cytoplasma ratio (Kern-Zytoplasma-Verhältnis)
NKCF	=	Natural killer cytotoxic factor (zytotoxischer Faktor Natürlicher Killerzellen)
NK-Zelle	=	Natürliche Killerzelle
PBL	=	Peripheral blood lymphocytes (Periphere Blutlymphozyten)
PBMC	=	Peripheral blood mononuklear cells (mononukleäre periphere Blutzellen)
PBS	=	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PFP	=	Pore-forming protein
PGE	=	Prostaglandin E
RBA	=	Rose Bengal Assay
REM	=	Rasterelektronenmikroskop
RPMI	=	Roswell Park Memorial Institute Gewebekulturmedium
S	=	Standardabweichung
SF	=	Streufaktor
TNF	=	Tumornekrosefaktor
х	=	arithmetischer Mittelwert
Xg	=	geometrischer Mittelwert
w	=	Weiblich
ZZ	=	Zellzahl
ZZ Advia	=	Gesamtleukozytenzahl, bestimmt mit dem Advia-Durchflußzy- tometer

1 EINLEITUNG

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) besitzen eine Vielzahl von Funktionen. Von besonderer Bedeutung ist ihre Fähigkeit zu spontaner zytotoxischer Aktivität, aufgrund derer sie in den letzten Jahren zahlreichen Untersuchungen unterzogen wurden, besonders im Hinblick auf eine adoptive Immuntherapie.

Zur Bestimmung der spontanen Zytotoxizität in vitro wird eine möglichst große Reinheit der isolierten NK-Zellen als Effektorzellen angestrebt, da verunreinigende (kontaminierende) Zellen die genaue Einstellung des Effektor-Zielzellverhältnisses erschweren und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Zytotoxizitätstests beeinträchtigen. Daher werden zur Anreicherung der Effektorzellen bei den verschiedenen Spezies unterschiedliche Isolierungsverfahren angewendet.

Bisher ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, ob bestimmte kontaminierende Zellen direkt oder indirekt an der Auslösung bzw. Verstärkung der spontanen zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen beim Hund beteiligt sind. Unterstellt man eine in der Literatur beschriebene verstärkende Beeinflussung der Zytotoxizität durch andere Leukozyten, würde der Einsatz von "reinen" Effektorzellen in Zytotoxizitätstests in vitro trotz des wünschenswerten optimal einstellbaren Effektor-Zielzellverhältnisses zu nicht zufriedenstellenden Ergebnissen führen.

In vorausgegangenen Dissertationen wurde für den Hund bereits eine Anreicherungsmethode aus Vollblut entwickelt, nach deren Durchführung neben NK-Zellen noch zu einem erheblichen Anteil Lymphozyten und weitere kontaminierende Leukozyten im Isolat enthalten sind. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob diese Zellen, speziell Monozyten und CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, die spontane zytotoxische Aktivität kaniner NK-Zellen beeinflussen. Die Zytotoxizität wurde dabei mit Hilfe eines kolorimetrischen Verfahrens bestimmt, das ebenfalls bereits in vorausgegangenen Dissertationen für den Hund entwickelt wurde. Eine Aussage über den Einfluss der Leukozyten auf die Zytotoxizität sollte durch den Vergleich der spontanen zytotoxischen Aktivitäten vor und nach Depletion der oben angesprochenen Leukozytenarten getroffen werden.

1 Einleitung

Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene in der Literatur beschriebene Depletionsverfahren im Hinblick auf ihre Effektivität beim Hund untersucht. Dabei sollte eine Monozytendepletion durch Adhärenz sowohl mit als auch ohne anschließende Phagozytose von Carbonyleisen erzielt werden. Die Depletion CD4⁺- und CD8⁺-Zellen erfolgte über immunomagnetische Separation unter Verwendung bereits häufig bei dieser Tierart eingesetzter spezifischer Antikörper.

Des Weiteren wird in der Literatur diskutiert, ob NK-Zellen für die Zielzelllyse ausschließlich auf einen direkten Zell-zu-Zellkontakt angewiesen sind oder ob sich auch zytotoxische Substanzen, die in die Umgebung der Zielzelle abgegeben werden, an der Auslösung der Zytotoxizität beteiligen. Zur Klärung dieser Frage wurden Zellkulturüberstände eines in vitro durchgeführten Zytotoxizitätstests auf eine mögliche Zytotoxizität hin untersucht.

Durch die so gewonnenen Ergebnisse sollte eine Einschätzung getroffen werden, ob eine weitere Aufreinigung des Isolats, die zwangsläufig mit einer Reduktion der Gesamtzellzahl verbunden ist, sinnvoll oder aufgrund einer eventuellen Beteiligung bestimmter Leukozyten an der Zytotoxizität sogar von Nachteil ist.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Natürliche Killerzellen

2.1.1 Einführung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) übernehmen gemeinsam mit anderen Zellen des angeborenen Immunsystems die erste Abwehr des Körpers gegen Mikroorganismen, Parasiten und auch Tumorzellen (HERBERMAN et al., 1981). Im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten sind NK-Zellen als dritte Gruppe der Lymphozyten aufgrund ihrer Fähigkeit zur spontanen Zytotoxizität in der Lage, Zielzellen ohne vorherige Sensibilisierung oder Antigenpräsentation zu zerstören (MUNSON et al., 2000; ROBERTSON et al., 1990). Außerdem sind sie über eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (durch Bindung an die Fc-Stücke der Antikörper über ihre Fc-Rezeptoren) auch an der späteren Phase der Immunantwort nach der Bildung von Antikörpern beteiligt (RO-BERTSON et al., 1990).

NK-Zellen werden eine Vielzahl an Funktionen zugeschrieben: sie sind antiviral, antibakteriell, zerstören Tumorzellen, sind an der Abwehr von bestimmten Pilzen und Protozoen beteiligt und greifen über Sekretion löslicher Faktoren sowohl stimulierend als auch inhibierend in die Hämatopoese ein (HERBERMAN et al., 1981; ROBERTSON et al., 1990). Des Weiteren wird eine Beteiligung von NK-Zellen an der Abstoßung von Transplantaten, insbesondere auch Knochenmarkstransplantaten diskutiert (HERBER-MAN et al., 1981; ROBERTSON et al., 1990).

Die Überlebenszeit von NK-Zellen schwankt bei Labortieren von wenigen Tagen bis mehrere Monate (ROBERTSON et al., 1990).

Aufgrund verschiedener morphologischer Merkmale können NK-Zellen lichtmikroskopisch von B- und T-Lymphozyten unterschieden werden. Dazu gehören ein geringeres Kern-Zytoplasma-Verhältnis (N/C ratio), eine weniger intensive Anfärbbarkeit des Zytoplasmas sowie das Vorhandensein azurophiler Granula (ROITT et al., 1995), aufgrund derer sie auch als "large granular lymphocytes" (LGL) bezeichnet werden. Nach ROBERTSON et al. (1990) gibt es allerdings auch NK-Zellen, die keine LGL-Morphologie zeigen. Umgekehrt können auch zytotoxische T-Lymphozyten nach Aktivierung solche Granula im Zytoplasma besitzen (ROITT et al., 1995).

Beim **Menschen** repräsentieren LGL ca. 10 % der peripheren Blutlymphozyten (PBL; GHERNATI et al., 2000). KANE et al. (1996) konnten sogar einen Anteil der NK-Zellen im Blut von bis zu 15 % feststellen.

Im peripheren Blut des **Hundes** ist dagegen eine geringere Anzahl LGL enthalten. So beträgt deren Anteil nach JARDINE et al. (1989) bei Labradoren nur 1,6 %. McDO-NOUGH et al. (2000) nennen für den Hund einen Anteil von 0 - 10 % LGL. Auch die N/C ratio wird etwas geringer als beim Mensch angegeben (FUNK, 2001).

Nach KNAPP et al. (1993) besitzen NK-Zellen beim Hund einen Durchmesser von 5,5 – 6,5 µm. Außerdem enthalten sie mehr azurophile Granula als andere Spezies (NAKA-DA et al., 1995). Analog zu NK-Zellen des Menschen konnten KNAPP et al. (1993) bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen reichlich Zytoplasma, einen nierenförmigen Kern sowie elektronendichte, zytoplasmatische Granula nachweisen. Nach FUNK et al. (2003) stellt sich das Zytoplasma im Lichtmikroskop leicht basophil dar. Die Kernmorphologie des großen, exzentrischen, häufig auch verdichteten Zellkerns (FUNK et al., 2003) kann nach McDONOUGH et al. (2000) ebenso wie die Anzahl der prominenten Granula variieren. So weist der Kern meist eine runde oder nierenförmige, mitunter aber auch multilobuläre, kleeblattartige Struktur auf (McDONOUGH et al., 2000).

2.1.1.1 Abstammung von NK-Zellen

Betrachtet man die Evolution des Immunsystems, so gibt diese auch Hinweise auf die Abstammung von NK-Zellen. Ihr Vorkommen wird bei zahlreichen Säugetieren wie Maus, Ratte, Hamster, Katze, Hund, Affe und beim Menschen beschrieben. Auch bei einigen Fischen, Amphibien und Vögeln sowie bei entwicklungsgeschichtlich primitiven Lebewesen wie Seesternen und Regenwürmern ist eine Aktivität von NK-Zellen bekannt (ROBERTSON et al., 1990; LOTZOVA, 1991). Da bei den beiden letztgenannten Tierarten zum derzeitigen Wissensstand keine Zellen vorhanden sind, die den T- oder B-Lymphozyten der Säugetiere entsprechen, gehen ROBERTSON et al. (1990) davon aus, dass die Entwicklung von NK-Zellen in der Evolution der Entstehung dieser beiden Arten von Lymphozyten vorausgeht. Auch JANEWAY (1989) und LANGMAN (1980) beschrieben NK-Zellen als primitives, aber multifunktionelles Abwehrsystem, das in der Evolution später in der Entwicklung von T-Lymphozyten resultiere.

Vielfach wurde versucht, die Abstammung von NK-Zellen anhand der Muster von CD-Oberflächenmolekülen auf NK-Zellen zu belegen. Diskutiert wird dabei sowohl eine Verwandtschaft von NK-Zellen mit Monozyten als auch eine Abstammung von T-Lymphozyten.

BURTON et al. (1988) begründeten eine Verwandtschaft von **Monozyten** und NK-Zellen mit dem Vorhandensein von Monozyten-Markern auf NK-Zellen der Maus. Beim Menschen konnte auf NK-Zellen zwar der Monozyten-Marker OKM-1 (GRIMM et al., 1982), nicht jedoch CD14 (NAGLER et al., 1989) nachgewiesen werden.

Auch ORTALDO et al. (1981) wiesen OKM-1 beim Menschen auf LGL nach. Eine Verwandtschaft von NK-Zellen mit Monozyten sei aber dennoch unwahrscheinlich, da sich LGL im Unterschied zu Monozyten als nichtadhärent, nichtphagozytierend und lediglich schwach α-Naphtylacetatesterase-positiv darstellten.

Ähnlich verhält es sich bei der Diskussion um die Expression von **T-Zell-Markern** auf NK-Zellen. BURTON et al. (1988) berichteten bei der Maus von einer engen Beziehung zwischen NK- und T-Zellen, wobei sie allerdings nicht auf allen NK-Zellen T-Zell-Marker nachweisen konnten.

Beim Menschen erwähnten NAGLER et al. (1989) die Expression von CD8, einem Marker zytotoxischer T-Lymphozyten, auf einigen NK-Zellen. Gegen eine Verwandtschaft von NK- und T-Zellen (LANIER et al., 1983; LOTZOVA et al., 1989; PHILLIPS et al., 1986; SOMERSALO et al., 1991) spricht allerdings das Fehlen des T-Zell-Markers CD3 auf NK-Zellen (PHILLIPS et al., 1986) bzw. auf Zellen mit NK-Aktivität (LANIER et al., 1983).

Aus dieser Diskussion heraus ergibt sich auch die Frage, welche Oberflächenmarker von NK-Zellen exprimiert werden und welche nicht. So können NK-Zellen nicht über das Vorhandensein bzw. Fehlen eines einzigen Oberflächenmarkers charakterisiert werden, sondern allenfalls über die Kombination verschiedener Marker (CHAMBERS et al., 2000). CHAMBERS et al. (2000) beschrieben NK-Zellen des **Menschen** als CD3⁻/TCR⁻/CD16⁺/CD56⁺/CD94⁺/CD122⁺/CD158⁺/CD161⁺, betonten allerdings, dass diese Marker nur als Anhaltspunkte zur Identifizierung von NK-Zellen zu verstehen sind.

Zum einen werden nämlich nicht alle Marker von jeder NK-Zelle exprimiert, zum anderen erhebt die obige Beschreibung des Phänotyps menschlicher NK-Zellen keinen Anspruch auf Vollständigkeit. So ist bereits bekannt, dass auch andere Marker, beispielsweise Ly49, auf NK-Zellen vorhanden sein können.

LOUGHRAN et al. (1985) beschrieben den Phänotyp **kaniner NK-Zellen** mit Dly-1⁺/Dly-6⁺/1A1⁺/E11⁺/DT-2⁻/WIG4⁻. Aufgrund dieser Rezeptoren nahmen sie für den Hund eine Abstammung der NK-Zellen von T-Zellen an, was auch von anderen Autoren bestätigt wurde (Übersicht bei SCHMITZ, 2000).

2.1.1.2 Adhärente und nichtadhärente NK-Zellen

Obwohl NK-Zellen in der Regel als nichtadhärente, nichtphagozytierende Zellen beschrieben wurden (HERBERMAN et al., 1981; YANG et al., 1987; SOMERSALO et al., 1991), ist das Vorkommen adhärenter NK-Zellen beim **Menschen** schon seit einigen Jahren bekannt. In vivo sind Adhäsionsmoleküle von NK-Zellen für die Adhäsion und Migration von NK-Zellen verantwortlich (VIRTANEN et al., 1991). Die Existenz adhärenter NK-Zellen wurde aber auch in vitro beschrieben. So zeigten bestimmte Subpopulationen von Lymphozyten nach Stimulation mit IL-2 (LAK) eine Plastikadhärenz (KOBERDA et al., 1991; MELDER et al., 1988). Nach MELDER et al. (1988) entstehen diese adhärenten Lymphokin-aktivierten Zellen (A-LAK) jedoch erst nach einer Plastikadhärenz von 8 – 12 Tagen. Morphologisch handelte es sich bei den A-LAK um LGL mit reichlich Zytoplasma, die im Vergleich zu LAK allerdings mehr prominente Granula enthielten. Sowohl nach MELDER et al. (1988) als auch nach KOBERDA et al. (1991) sind A-LAK sehr potente zytotoxische Zellen mit dem Phänotyp CD2⁺/CD3⁺/CD56⁺/CD8^{+/-} oder CD2⁺/CD3⁻/CD56⁺/CD8^{+/-}. Dabei kam das zytotoxische Potential besonders bei einem niedrigen Effektor-Zielzellverhältnis zum Tragen (KOBERDA et al., 1991).

VITOLO et al. (1993) unterteilten menschliche NK-Zellen in drei Untergruppen. Dabei unterschieden sie zunächst zwischen adhärenten (A-NK) und nichtadhärenten NK-Zellen (NA-NK). Anschließend nahmen sie eine weitere Unterteilung der NA-NK in nichtzytotoxische und zytotoxische NK-Zellen vor. Unter den NK-Zellen im peripheren Blut sind A-NK mit einem Anteil von 4 - 30 % vertreten (VITOLO et al., 1993), WHITESIDE et al. (1995) beschrieben diesen Anteil mit etwa 26 %. Nach VUJANOVIC et al. (1995) besitzen A-NK Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, sprechen schnell auf IL-2 an und zeigen im Vergleich zu NA-NK eine höhere Proliferationsrate und Zytotoxizität. Außerdem produzierten sie Kollagenasen und könnten besser in das Innere von Tumorgewebe eindringen als NA-NK. Dementsprechend zeigten A-NK auch in vitro eine höhere Zytotoxizität gegenüber Spheroiden als dreidimensionalem Tumormodell. NA-NK besaßen dagegen in der Regel eine höhere Zytotoxizität gegenüber Monolayern.

Auch der Mechanismus der Zytotoxizität unterscheidet sich bei den verschiedenen NK-Zell-Untergruppen. So erfolgte die Lyse der Zielzellen bei NA-NK hauptsächlich über Perforin, bei A-NK zusätzlich über Apoptose (VUJANOVIC et al., 1995). Nach WHITE-SIDE et al. (1995) wird die Apoptose dabei einerseits über direkten Zellkontakt ausgelöst, andererseits indirekt über Liganden, die TNF sezernieren.

Auch bei **Ratte** und **Maus** ist das Vorkommen von adhärenten Lymphokin-aktivierten Killerzellen bekannt. Da diese auch bei jenen Tierarten eine hohe zytotoxische Aktivität besitzen, wurden sie erfolgreich in der experimentellen Tumortherapie eingesetzt (SCHWARZ et al., 1989; BASSE et al., 1991).

Beim **Hund** wurde ebenfalls die Adhärenz einiger Lymphozyten beschrieben. So setzten sich die adhärenten Zellen nach Inkubation in 96-Loch-Flachbodenplatten aus Monozyten (43 %), eosinophilen Granulozyten (ca. 8 %) und Lymphozyten (ca. 49 %) zusammen (KURZMANN et al., 1993). Nach SHAW et al. (1984) waren ca. 67 % der adhärenten Zellen Monozyten. Daneben zeigten auch neutrophile Granulozyten und Lymphozyten eine Adhärenz, wobei es sich bei letzteren hauptsächlich um B-Lymphozyten handelte.

RINGLER et al. (1985) beschrieben beim Hund eine Zytotoxizität adhärenter Zellen. Eine eindeutige Unterteilung in adhärente und nichtadhärente NK-Zellen, wie sie von VITOLO et al. (1993) für den Menschen vorgenommen wurde, ist für den Hund allerdings bislang nicht bekannt.

2.2 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Effektorzellen

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität werden zunächst NK-Zellen als Effektorzellen aus Hundeblut angereichert. Im Anschluss daran folgen eine Koinkubation der isolierten Effektorzellen mit den jeweiligen Zielzellen sowie die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität in einem geeigneten Messsystem.

2.2.1 Isolierung von Blutlymphozyten als Effektorzellen

Für die Isolierung von Blutlymphozyten aus Vollblutproben sind zahlreiche Methoden bekannt. Meist wird hierfür eine Zentrifugation über einen Einstufendichtegradienten durchgeführt, die beim **Menschen** erstmals von BÖYUM (1968) beschrieben wurde. Aufgrund ihrer unterschiedlichen spezifischen Dichte trennen sich hierbei mononukleäre Zellen von polymorphkernigen Zellen und Erythrozyten. Als Trennmedium verwendete BÖYUM (1968) **Ficoll-Hypaque**, das heute beim Menschen standardmäßig eingesetzt wird.

Auch bei **Schwein** (DE GRUIJTER et al., 1990) und **Hund** (HOLMES et al., 1989; KNAPP et al., 1993) wurde die Isolierung von Blutlymphozyten über Ficoll-Hypaque häufig als Methode der Wahl beschrieben. Allerdings muss nach DE GRUIJTER et al. (1990) im Unterschied zum Menschen eine Anpassung der Isolierungsbedingungen je nach Tierart erfolgen, beispielsweise eine Änderung der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Auch nach einer solchen Anpassung der Isolierungsmethode erzielten DE GRUIJTER et al. (1990) beim Schwein jedoch lediglich eine Lymphozytenausbeute von 60 - 75 %. Außerdem erwies sich der Anteil an Monozyten mit 10 - 15 % als relativ hoch.

DE BRUIN et al. (2005) führten das auf die unterschiedlichen relativen Anteile der Leukozyten im Blut bei verschiedenen Tierarten zurück. So erzielten sie beim Hund nach einer einstufigen Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque bei einer spezifischen Dichte von 1.079 g/cm³ und einer Osmolalität von 256 mOsm lediglich eine Lymphozytenreinheit von 42,3 %. HOLMES et al. (1989) konnten beim Hund nach Isolierung über Ficoll-Hypaque dagegen eine Lymphozytenausbeute von 85 – 96 % mit einem Monozytenanteil von weniger als 2 % erreichen. Bei **Pferd** und **Hund** bevorzugten einige Autoren die Isolierung von Lymphozyten durch Aufschichtung über einen einstufigen **Percoll**[®]-**Dichtegradienten** (JACKMAN et al., 1994; MAY et al., 1990; GONDOLF et al., 1996). Hierbei handelt es sich nicht wie bei Ficoll-Hypaque um eine reine Lösung, sondern um ein Gel aus 15 – 30 nm großen Silica-Partikelchen. PYCOCK et al. (1987) verwendeten Percoll[®] aufgrund seiner niedrigeren Viskosität im Vergleich zu Ficoll-Hypaque. Diese ermöglichte kürzere Zentrifugationszeiten, auf die PYCOCK et al. (1987) die geringeren Zellschäden nach Percoll[®]-Isolierung zurückführten. Beim Hund beobachtete GONDOLF (1994) als zusätzlichen Vorteil der Percoll[®]-Isolierung eine geringere Kontamination der Lymphozytenfraktion mit Granulozyten.

Unterschiedlich beurteilt wird beim **Hund** allerdings die benötigte Dichte des Percoll[®]-Gradienten, mit dem die höchste **Anreicherung von LGL** als Effektorzellen zu erzielen ist. NARIAI et al. (1999) konnte durch Isolierung von PBL über einen Percoll[®]-Dichtegradienten von 35 – 40 % die höchste Anreicherung von LGL sowie die höchste Zytotoxizität der isolierten Zellen beobachten. GONDOLF (1994) erzielte dagegen bei einem 58,5 %igen Dichtegradienten die höchste Anreicherung an LGL. Dabei bestimmte sie deren Anteil an den isolierten Gesamtleukozyten mit 5,7 % sowie an den isolierten Lymphozyten mit 9,4 % und erreichte so nur durch Zentrifugation über einen 58,5 %igen Percoll[®]-Dichtegradienten eine Anreicherung der LGL im Vergleich zu deren relativem Anteil im peripheren Blut.

2.2.1.1 Isolierung von NK-Zellen

Eine **direkte Isolierung** der NK-Zellen über spezifische Antikörper wurde beim **Huhn** bereits erfolgreich von GÖBEL (2000) durchgeführt. Auch beim **Menschen** ist eine direkte Isolierung von NK-Zellen mit dieser Methode prinzipiell möglich, wurde aber von BERMAN et al. (2000) abgelehnt, da es durch die Bindung von Antikörpern zu einer Aktivierung der NK-Zellen komme.

Beim **Hund** ist die direkte Isolierung kaniner NK-Zellen zurzeit wegen des Fehlens spezifischer Antikörper nicht möglich.

2.2.2 Quantifizierung der spontanen zytotoxischen Aktivität im Zytotoxizitätstest

2.2.2.1 Zielzellen

Für den Nachweis spontaner zytotoxischer Aktivität kaniner NK-Zellen stehen mehrere sensitive Tumorzelllinien zur Verfügung. Dazu gehört die beim Hund am häufigsten eingesetzte kanine Schilddrüsenadenokarzinomazelllinie epithelialen Ursprungs (CTAC-Zelllinie), die unter anderem auch von GREELEY et al. (1996), SCHMITZ (2000), FUNK (2001) und HSIAO et al. (2004) für Zytotoxizitätsuntersuchungen beim Hund verwendet wurde.

Aber auch die mesenchymalen Zielzelllinien K1 und K6 (GONDOLF et al., 1995) und die von kaninen Leukosen stammende Zielzelllinie CL-1 (NARIAI et al., 1999) kamen in Untersuchungen zur Zytotoxizität zum Einsatz.

Als Negativkontrolle setzten alle genannten Autoren die gegenüber kaninen NK-Zellen insensitive heterologe Vero-Zelllinie (Nierenzellen der grünen Meerkatze) ein.

2.2.2.2 Rose Bengal Assay (RBA)

Der Rose Bengal Assay (RBA) ist im Gegensatz zu dem standardmäßig eingesetzten, radioaktiven ⁵¹Chromium Release Assay (CRA) ein kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der spontanen zytotoxischen Aktivität, das für den Hund bereits von GONDOLF et al. (1996) und SCHMITZ et al. (2003) etabliert wurde. Der RBA basiert auf einer indirekten Messung der durch Effektorzellen lysierten Zielzellen. Nach einer Inkubationszeit des Zielzellmonolayers mit Effektorzellen von 14 Stunden (GON-DOLF, 1994; SCHMITZ, 2000) werden die nicht mehr am Kulturgefäßboden haftenden Zellen herausgewaschen. Die verbliebenen Zielzellen werden dann mit Rose Bengal gefärbt und der überflüssige Farbstoff mittels eines Microplate Washers entfernt (SCHMITZ, 2000). Durch Lysieren der Zielzellen wird der aufgenommene Farbstoff in den Überstand überführt. Die optische Dichte (OD) kann nun in einem Photometer (ELISA Reader) bestimmt und zu der optischen Dichte einer Kontrollkultur (Zielzellen

ohne Effektorzellen) ins Verhältnis gesetzt werden, woraus sich der prozentuale Anteil der abgelösten Zielzellen errechnen lässt (Schema 1).



Schema 1: Prinzip des RBA (nach SCHMITZ, 2000)

Bei gleicher Inkubationsdauer und einer E/T ratio von 100:1 überstieg die so ermittelte Zytotoxizität gegenüber CTAC-Zellen die im CRA bestimmten Werte konstant um etwa 10 % (GONDOLF et al., 1996). Dennoch wird der CRA häufig noch standardmäßig eingesetzt.

Im Gegensatz zum kolorimetrischen RBA basiert der CRA auf einer Messung des radioaktiven Materials, welches nach Zerstörung der radioaktiv markierten Zielzellen in den Überstand freigesetzt wird (BRUNNER et al., 1968). Apoptotische Zellen, deren Zellmembran noch intakt ist, werden vom CRA nicht erfasst. Da sich aber sowohl nekrotische als auch apoptotische Zielzellen von der Unterlage des Kulturgefäßes ablösen, berücksichtigt der RBA als kolorimetrisches Verfahren beide Zelltodarten gleichermaßen, worin sich die höhere Sensitivität des RBA begründet (GONDOLF et al., 1996; SCHMITZ, 2000). SCHMITZ (2000) konnte nämlich beim Hund nicht nur bei 30 % der CTAC-Zellen Anzeichen einer Nekrose, sondern auch bei 23 % dieser Zielzellen Zeichen einer Apoptose nachweisen.

Daher – und aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit – ist der RBA zur quantitativen Bestimmung der Zytotoxizität beim Hund besser geeignet als der sonst üblicher Weise eingesetzte CRA (GONDOLF et al., 1996).

2.2.3 Korrelation zwischen Lymphozytengehalt und Zytotoxizität

Für das Einstellen des Effektor-Zielzellverhältnisses ist eine bestimmte Lymphozytenreinheit wichtig (KNAPP et al., 1993). Ob diese allerdings tatsächlich einen Einfluss auf die Zytotoxizität nimmt, wird widersprüchlich beurteilt. Für den **Menschen** konnten LEVY et al. (1989) bei Patienten mit Low-NK-Syndrom keinen Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz bzw. der absoluten Zahl an NK-Zellen und der gemessenen Zytotoxizität feststellen.

Beim Hund beobachtete GONDOLF (1994) zwar ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Lymphozytengehalt und der im CRA bestimmten Zytotoxizität. Anders verhielt es sich jedoch im Hinblick auf die sogenannten kontaminierenden Zellen. So beschrieb GONDOLF (1994) eine signifikant positive Korrelation des Anteils eosinophiler Granulozyten sowie eine schwach negative Korrelation des Anteils neutrophiler Granulozyten mit der Höhe der gemessenen Zytotoxizität. Monozyten und LGL betreffend konnte sie dagegen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Zellzusammensetzung des Zellisolats und der ermittelten Zytotoxizität aufzeigen.

2.3 Depletion kontaminierender Leukozyten

Der Anteil der NK-Zellen an den peripheren Blutlymphozyten (PBL) ist verhältnismäßig gering. Beim Menschen beträgt er nach BERMAN et al. (2000) nur etwa 10 %. Deshalb wendeten zahlreiche Autoren zusätzliche Verfahren an, um den Anteil der NK-Zellen als Effektorzellen im Isolat weiter zu erhöhen. Dazu gehörten zur Entfernung kontaminie-

render Zellen die Plastikadhärenz (YANG et al., 1987), die Inkubation mit Nylonwolle (NAKADA et al., 1996) oder mit Carbonyleisen (KRAKOWKA et al., 1983/1984) sowie die Entfernung über spezifische Antikörper (BERMAN et al., 2000).

Als weitere Möglichkeit zur Anreicherung von NK-Zellen wurde bei Mensch und Hund die Zentrifugation über einen mehrstufigen Percoll[®]-Dichtegradienten beschrieben (GADDY et al., 1997; NOCERA et al., 1983; NAKADA et al., 1997).

2.3.1 Depletion von Monozyten

Es sind zahlreiche Depletionsverfahren für Monozyten bekannt. Nicht zuletzt aufgrund ihrer leichten Durchführbarkeit kommen dabei am häufigsten Verfahren zum Einsatz, welche die adhärenten und phagozytierenden Eigenschaften der Monozyten ausnutzen (s. unten). Aber auch eine positive oder negative Selektion über Antikörper ist möglich (s. 2.3.1.3). Des Weiteren kann eine Anreicherung der Monozyten mittels Zentrifugation über einen Dichtegradienten erfolgen (BLOOM et al., 1990).

2.3.1.1 Depletion von Monozyten durch Adhärenz an Oberflächen

Die Depletion von Monozyten durch **Adhärenz** an Oberflächen ist ein leicht durchzuführendes Verfahren. Daher wurde diese Methode bereits bei zahlreichen Tierarten sowie beim Menschen eingesetzt. Den Nachweis der Monozytenadhärenz an **Plastikpetrischalen** erbrachten GRIMM et al. (1982). Aber auch eine Adhärenz an **Glas** (RABI-NOWITZ, 1964; BURKHARDT, 1984; PESCOVITZ et al., 1984) ist möglich.

Standardmäßig wird bei der Plastikadhärenz eine Inkubation im CO₂-Brutschrank bei 37° C durchgeführt. Bezüglich der **Inkubationszeit** sind die Angaben allerdings sehr unterschiedlich. So schwankt diese bei Schwein und Pferd von 2 Stunden bis mehrere Tage. HAMMERBERG et al. (1986) erzielten beim **Schwein** nach einer Inkubationszeit von 2 bis 5 Tagen eine gute Monozytenreinheit unter den adhärenten Zellen. YANG et al. (1987) beobachteten dagegen schon nach einer wesentlich kürzeren Inkubationszeit von nur 2 Stunden eine Monozytenreinheit von über 99 %.

Beim **Pferd** konnten diese guten Ergebnisse nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden nicht erzielt werden (JACKMAN et al., 1994), eine Inkubationszeit von 24 Stunden erwies sich bei dieser Tierart als effektiver (SELLON et al., 1996).

Beim **Menschen** wurde am häufigsten eine Inkubationszeit von 1 Stunde angewendet (GRIMM et al., 1982). KNAPP et al. (1993) und FUNK (2001) entfernten Monozyten aus **Hundeblut** nach Isolierung von Leukozyten über einen Ficoll-Hypaque-/ bzw. einen Percoll[®]-Dichtegradienten, indem sie die gewonnenen Zellen in einer Gewebekulturflasche mit einer Bodenfläche von 75 cm² / bzw. 25 cm² für 1 Stunde inkubierten. SHAW et al. (1984) bevorzugten beim Hund dagegen eine Inkubation von 2 Stunden.

Bei Mensch, Schwein und Hund wurde außerdem die Effektivität einer **wiederholten Plastikadhärenz** untersucht, ebenfalls mit variierenden Inkubationszeiten (NOCERA et al., 1983; PESCOVITZ et al., 1984; TAN et al., 1993). Dabei gaben die Autoren entweder nur frisches Medium zu (NOCERA et al., 1983), oder die nichtadhärenten Zellen wurden entnommen und erneut in einer zweiten Petrischale inkubiert (TAN et al., 1993). Nach TAN et al. (1993) ist beim **Hund** eine erneute Inkubation von Vorteil, da auch **andere Leukozyten** eine **Adhärenz** zeigen. So beobachteten SHAW et al. (1984), dass es sich nur bei ca. 67 % der adhärenten Zellen um Monozyten handelte. Auch Lymphozyten und neutrophile Granulozyten zeigten eine Adhärenz und verringerten so die Oberfläche, an die sich Monozyten anheften konnten. Dieser Effekt wurde durch eine erneute Inkubation des nichtadhärenten Überstandes in einer zweiten Petrischale minimiert (TAN et al., 1993).

Eine so hohe Monozytenreinheit der adhärenten Zellen von 85 - 95 % beim Menschen (BLOOM et al., 1990) oder von über 99 % beim Schwein (YANG et al., 1987) wurde beim Hund durch alleinige Plastikadhärenz bisher allerdings nicht erreicht.

2.3.1.2 Depletion von Monozyten durch Carbonyleisenphagozytose

Eine Depletion von Monozyten über Plastikadhärenz führte nach Meinung zahlreicher Autoren sowohl beim Menschen als auch bei Pferd und Hund oft nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, da neben Monozyten auch noch andere Leukozyten eine Adhärenz zeigen (KRAKOWKA et al., 1983/1984; SHAW et al., 1984; KURZMANN et al., 1993; JACKMAN et al., 1994; VUJANOVIC et al., 1995; DE BRUIN et al., 2005). Daher bevorzugten diese Autoren die Depletion von Monozyten aufgrund ihrer phagozytierenden Eigenschaften durch Zugabe von Carbonyleisen. Phagozytierende Zellen nehmen das Carbonyleisen auf und werden anschließend unter Einwirkung eines Magneten entfernt. BLOOM et al. (1986) konnten so beim Menschen nach einer Koinkubation von Lymphozyten und Monozyten durch Carbonyleisenphagozytose 95 – 99 % der Monozyten zurückgewinnen.

Meist wurde die Carbonyleisenphagozytose beim Menschen sowie beim Hund und einigen anderen Tierarten mit anderen Verfahren wie der Zentrifugation über einen Dichtegradienten und anschließender Plastikadhärenz kombiniert. Häufig wurde dafür bereits das frisch isolierte Blut mit Carbonyleisen in einer bestimmten Konzentration für einen jeweils definierten Zeitraum (meist 30 – 60 Minuten) inkubiert (HELFAND et al., 1982; BANKS et al., 1981; WULFF et al., 1982). DE BRUIN et al. (2005) inkubierten isoliertes Hundeblut in einem Gemisch aus Carbonyleisen und Gummiarabikum und führten erst anschließend eine Dichtegradientenzentrifugation durch.

Aber auch die Zugabe von Carbonyleisen zu isolierten peripheren Blutleukozyten wurde beim Hund beschrieben, um die Depletion phagozytierender Zellen zu erreichen (RING-LER et al., 1985).

Da allerdings auch neutrophile und eosinophile Granulozyten zur Phagozytose befähigt sind (HELFAND et al., 1982; ROITT et al., 1995), wurde die Carbonyleisenphagozytose nicht nur zur Depletion von Monozyten, sondern auch zur Depletion neutrophiler Granulozyten aus Hundeblut eingesetzt (RIVAS et al., 1995).

Inwieweit auch eine effektive Depletion eosinophiler Granulozyten aufgrund ihrer phagozytierenden Eigenschaften möglich ist, ist bislang noch nicht hinreichend untersucht. Nach DE BRUIN et al. (2005) wird der relative Anteil eosinophiler Granulozyten weder durch Adhärenz oder Eisenzugabe noch durch eine Kombination beider Verfahren beeinflusst.

2.3.1.3 Depletion von Monozyten über spezifische Antikörper

Über spezifische Antikörper kann eine positive Selektion der Monozyten erfolgen. BERMAN et al. (2000) nutzten beim **Menschen** diese Möglichkeit, um nach Zentrifugation über einen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten und anschließender Plastikadhärenz die noch verbleibenden Monozyten zu entfernen. Dazu verwendeten sie den gegen humane Monozyten gerichteten Antikörper CD14.

Beim **Hund** könnte der Antikörper WIG4 (LOUGHRAN et al., 1985), ein Antikörper des IgG₁-Isotyps, zur Depletion von Monozyten eingesetzt werden, allerdings wird das entsprechende Antigen nicht nur von Monozyten, sondern auch von ca. 15 % der Blutlymphozyten exprimiert.

2.3.1.4 Depletion von Monozyten durch Nylonwolle oder Sephadex G-10

Die Depletion von Monozyten mittels Filtration über **Nylonwolle** ist für KOBERDA et al. (1991) beim **Menschen** Methode der Wahl. Auch für den **Hund** ist bekannt, dass es sich bei den adhärenten Zellen nach einer Filtration von PBL über Nylonwolle hauptsächlich um Monozyten handelt (GUENTHER et al., 1994).

Beim **Pferd** erzielten BANKS et al. (1981) eine Monozytendepletion, indem sie mit Ficoll-Hypaque isolierte Blutleukozyten für 30 Minuten bei 37°C über **Sephadex G-10**-Säulen schickten. Beim **Menschen** konnten auf ähnliche Weise mehr als 99 % der im Isolat enthaltenen Monozyten entfernt werden (KOREN et al., 1981). Beim **Hund** setzten KRAKOWKA et al. (1983/1984) die Filtration über Sephadex G-10 ein, konnten allerdings im Vergleich zur Carbonyleisenphagozytose keine bessere Monozytendepletion feststellen.

2.3.2 Depletion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen

2.3.2.1 Immunomagnetische Separation

Zur Depletion CD4⁺- und CD8⁺-Zellen wurde der Einsatz spezifischer Antikörper beschrieben. Dabei können Petrischalen mit entsprechenden Antikörpern überzogen und mit der Zellsuspension inkubiert werden (LANIER et al., 1983). Es kann aber auch eine **immunomagnetische Separation** durchgeführt werden, bei der man zwischen der direkten und der indirekten Methode unterscheidet (s. Schema 2). Sowohl bei der direkten als auch bei der indirekten Methode sollen die spezifischen Primärantikörper an Se-

2 Literaturübersicht

kundärantikörper binden, die bereits auf die Oberfläche von magnetischen Kügelchen (Beads) gekoppelt sind. Lediglich der Zeitpunkt, an dem die Koinkubation von Primärund Sekundärantikörpern erfolgt, ist verschieden (s. Schema 2).

So wird der spezifisch gegen Zelloberflächenmoleküle gerichtete Primärantikörper bei der **direkten Methode** zuerst an den auf die Magnetkügelchen gekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Danach erfolgt die Inkubation mit der entsprechenden Zellsuspension.

Bei der **indirekten Methode** wird dagegen zunächst der spezifische Primärantikörper allein mit der Zellsuspension inkubiert und so an sein jeweiliges Oberflächenantigen auf den Zellen gebunden. Anschließend erfolgt dann die Zugabe der Beads, auf welche zuvor Sekundärantikörper gekoppelt wurden (DYNAL[®], 1996).

GEE et al. (1991) bevorzugten die direkte Methode zur Aufreinigung von Zellsuspensionen. Als Gründe hierfür nannten sie, dass dadurch die Zahl der Primärantikörper pro Bead vorgegeben ist, was Grundvoraussetzung für eine optimale Bindung an die Sekundärantikörper sei. Denn eine zu hohe Primärantikörperdichte auf den Zielzellen, die bei der indirekten Methode nicht beeinflusst werden kann, könne die Bindung an den Sekundärantikörper sterisch behindern. Zum anderen ist nach GEE et al. (1991) bei Bindung des Primärantikörpers an die Zielzelle eine Konfigurationsänderung des Primärantikörpers möglich, welche die Bindung an den Sekundärantikörper erschweren bzw. verhindern kann.

Als weitere Vorteile der direkten Methode werden in der Informationsbroschüre von DYNAL[®] (1996) eine kürzere Inkubationszeit sowie eine geringere Menge benötigter Primärantikörper im Vergleich zur indirekten Methode hervorgehoben.



Schema 2: Darstellung direkte / indirekte Methode (nach DYNAL[®], 1996), mit freundlicher Genehmigung von Invitrogen

Sowohl bei der direkten als auch bei der indirekten Methode erfolgt im Anschluss an die Inkubation der Zellsuspension mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern die Auftrennung der gebundenen und freien Zellen durch Einwirkung eines Permanentmagneten.

Dabei ist prinzipiell eine **positive** bzw. **negative Isolierung** der gewünschten Zellen durchführbar (s. Schema 3). Bei der **positiven Isolierung** sind die gewünschten Zellen

über die entsprechenden Antikörper direkt an die Beads gekoppelt und können unter Einwirkung des magnetischen Feldes an eine Seite des Reagenzglases gezogen werden. Nach Verwerfen des Überstands mit den freien Zellen kann anschließend nach Wegnahme des Magneten die Ablösung der gebundenen Zellen erfolgen, und die isolierten Zellen stehen für weitergehende Untersuchungen zur Verfügung.





Bei der **negativen Isolierung** erfolgt nicht die Markierung der gewünschten Zellen, sondern die unerwünschten Zellen werden über Antikörper an Beads gebunden und mittels eines magnetischen Feldes entfernt. Die erwünschten Zellen befinden sich demnach noch frei im Überstand und stehen hier ebenfalls, wie auch bei der positiven Isolierung, für weitergehende Untersuchungen zur Verfügung.

Über negative Isolierung kann so der Anteil einer bestimmten Zellpopulation in einer Zellsuspension erhöht werden, indem man die kontaminierenden Zellen aus der Suspension entfernt (DYNAL[®], 1996). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Zellfunktion der gewünschten Zellen nicht durch eine Antikörperbindung beeinflusst wird.

Sowohl beim **Menschen** als auch beim **Hund** wurde auf diese Weise eine relative Anreicherung von NK-Zellen erzielt (GATELY et. al., 1991; GUENTHER et al., 1994). Außerdem werden NK-Zellen bei Anreicherung über negative Isolierung nicht aktiviert, was für weitergehende Untersuchungen von entscheidender Bedeutung sein kann (BERMAN et al., 2000).

2.3.2.2 Antikörper gegen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen beim Hund

Für den Hund sind mehrere Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD4 und CD8 bekannt. LOUGHRAN et al. (1985) beschrieben DT-2 als einen Antikörper gegen kanine **CD4⁺-Zellen**. FALDYNA et al. (2001) verwendeten den Antikörper CA13.1E4 zur Depletion CD4⁺-T-Helferzellen. Nach GEBHARD et al. (1992) reagiert der Antikörper 8.53/12.125 beim Hund mit CD4. Zahlreiche andere Autoren setzten den auch in vorliegender Arbeit verwendeten Ratten-mAk des Isotyps IgG2a (Klon YKIX302.9.3.7) ein, der spezifisch mit kaninem CD4 reagiert (DIRSCHERL et al., 1995; VOGL, 1995; WÜNSCHMANN et al., 1999; BOKEMEYER, 2003).

Als Antikörper gegen **CD8⁺-Zellen** des Hundes ist der Antikörper 1.140/4.78 zu nennen (GEBHARD et al., 1992). Auch ein Antikörper des Rindes, CC58, zeigte eine Kreuzreaktivität mit kaninem CD8 (SCHUBERTH et al., 1996). HÖTZL et al. (1991) konnten eine Kreuzreaktivität von MT811, einem Antikörper gegen humane CD8⁺-Zellen, mit kaninen CD8⁺-Zellen nachweisen. Nach VOß et al. (1993) eignet sich M10 allerdings besser als MT811, um die Wirkung kaniner Lymphozyten mit Suppressor- und zytotoxischer Funktion zu untersuchen.

Bei M10 handelt es sich um den auch in den hier durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Antikörper mouse-anti-dog CD8 (Klon Dog 10-1-1), der spezifisch mit der α -Kette des kaninen CD8-Antigens reagiert (WÜNSCHMANN, 1998).

2.4 Leukozyten und Zytotoxizität

2.4.1 NK-Zellen

2.4.1.1 Funktion von NK-Zellen

Die vielfältigen Funktionen von NK-Zellen, die als Effektorzellen für die Auslösung der spontanen Zytotoxizität verantwortlich sind, wurden bereits unter 2.1.1 beschrieben. Nicht abschließend geklärt ist allerdings die Frage, ob NK-Zellen für die Lyse von Zielzellen auf Hilfszellen angewiesen sind, bzw. ob andere Leukozyten womöglich selbst eine zytotoxische Wirkung besitzen. Diskutiert wird weiterhin, ob die Lyse der Zielzelle allein durch einen direkten Zell-zu-Zellkontakt zwischen Ziel- und Effektorzelle induziert wird oder ob zytotoxische Substanzen, die in den interzellulären Raum sezerniert werden, für die Auslösung der Zielzellyse verantwortlich gemacht werden können.

Nach VUJANOVIC et al. (1996) und KRÄHENBÜHL et al. (1991) beruht die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen auf mehreren Mechanismen.

So wird eine Zielzelllyse einerseits nach Zell-zu-Zellkontakt, andererseits nach Abgabe eines löslichen Faktors durch die Effektorzelle induziert (DUKE et al., 1986; VUJANO-VIC et al., 1996). Außerdem konnten beim Hund sowohl nekrotische als auch apoptotische Veränderungen an der lysierten Zielzelle nach Koinkubation mit Effektorzellen nachgewiesen werden (SCHMITZ et al., 2003).

Voraussetzung für die Lyse sind eine Zielzellerkennung und -bindung sowie eine Programmierung der Lyse, die in einer Zielzelllyse resultiert.

Dabei werden virusinfizierte und Tumorzellen von NK-Zellen **erkannt**, da bei diesen Zellen der MHC-Klasse-I-Rezeptor fehlt bzw. verändert ist (SCHMITZ et al., 2003). Eine NK-Zelle besitzt prinzipiell sowohl inhibierende als auch stimulierende Rezeptoren für MHC-Klasse-I. Ist der MHC-Klasse-I-Rezeptor der Zielzelle intakt, dominieren die inhibierenden Signale, das heißt, die NK-Zelle wird nicht aktiviert (KOH et al., 2001). Dabei erfolgt die Inhibierung anscheinend je nach Spezies über unterschiedliche Rezeptortypen, und zwar zum einen über Ly49, das zur C-Lektin-Superfamilie gehört, zum anderen über sogenannte Killerzell-inhibierende Rezeptoren, KIR (KÄRRE et al., 2000;

SCHMITZ, 2000). Nach TAKAHASHI et al. (2004) ist Ly49 der dominante Rezeptor bei Nagern und Pferden. KIR konnten sie dagegen bei den meisten Säugetieren wie Hund, Hauskatze, Schwein und Rind als aktive NK-Zell-Rezeptoren nachweisen.

Die Zytotoxizität einer NK-Zelle wird allerdings vermutlich nicht nur über die Wechselwirkung von MHC-Klasse-I-Rezeptor und KIR ausgelöst bzw. verhindert. Vielmehr handelt es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Rezeptoren, das auch vom Aktivierungszustand der NK-Zelle und dem Vorhandensein bestimmter Liganden auf der Zielzelle beeinflusst wird (CARBONE et al., 1997).

Beim **Hund** könnte CD44 ein solches weiteres Aktivierungssignal für NK-Zellen darstellen, indem es andere Adhäsionsmoleküle beeinflusst (TAN et al., 1993).

Die **Zielzellbindung** erfolgt bei Mensch, Schwein und Hund über Ausstülpungen der Effektorzelle, durch die ein Zell-zu-Zellkontakt zwischen Ziel- und Effektorzelle hergestellt wird (CARPEN et al., 1982; YANG et al., 1987; RINGLER et al., 1985; SCHMITZ et al., 2003). SCHMITZ et al. (2003) beobachteten beim Hund nach einer 14-stündigen Koinkubation von Effektor- und Zielzellen sogar eine Rosettenbildung von NK-Zellen um die Zielzellen.

Im Anschluss an die Zielzellbindung findet die **Programmierung der Zielzelllyse** statt. Ist diese erfolgt, kann eine Lyse selbst nach Entfernen der Effektorzelle noch beobachtet werden (RUSSELL et al., 1980; FARRAM et al., 1983).

Die eigentliche **Lyse** wird durch die Abgabe zytotoxischer Substanzen aus der NK-Zelle hervorgerufen (**natural killer cytotoxic factor, NKCF**; WRIGHT et al., 1987; NAKADA et al., 1995), die in Granula in der NK-Zelle gespeichert werden (CLARK et al., 1988; ROBERTSON et al., 1990). Zu diesen gehören Perforin, verschiedene Granzyme, Serinesterasen und Proteoglykane (CLARK et al., 1988; ROBERTSON et al., 1990) sowie Lymphotoxin (LT) und Tumornekrosefaktor (TNF), die beide entweder direkt in die Zielzelle appliziert oder in deren Umgebung freigesetzt werden (WRIGHT et al., 1987). Nach ROBERTSON et al. (1990) sind NKCF (z.B. TNF- α) für apoptotische Zellveränderungen verantwortlich. Die Serinesterasen unterstützen vermutlich das Perforin in seiner Wirkung, und den Proteoglykanen wird ein schützender Effekt für die Effektorzelle vor ihren eigenen lytischen Faktoren zugeschrieben (ROBERTSON et al., 1990).

2 Literaturübersicht

Der am häufigsten erwähnte Inhaltsstoff der Granula ist allerdings das Perforin, das auch als Zytolysin oder "pore-forming protein" (PFP) bezeichnet wird. Perforin polymerisiert in Anwesenheit von Calcium und bildet transmembranäre, ringähnliche (Donutähnliche) Poren in der Zielzellmembran, die eine erhöhte Membrandurchlässigkeit mit den daraus resultierenden typischen Anzeichen des Zelltods durch Nekrose bedingen (KRÄHENBÜHL et al., 1991; KAWASAKI et al., 1990). Nach YOUNG et al. (1987) setzt die Porenbildung in der Zielzellmembran allerdings neben der Anwesenheit von Calcium das Vorliegen eines neutralen pH-Wertes voraus. War PFP jedoch gebunden, kam es selbst dann zur Zielzelllyse, wenn die Effektorzelle keinen Kontakt mehr zur Zielzelle hatte (YOUNG et al., 1987).

Die Apoptose der Zielzelle kann, wie bereits beschrieben, durch NKCF hervorgerufen werden (ROBERTSON et al., 1990). Beim **Hund** beobachteten NARIAI et al. (1999) eine DNA-Fragmentation mit anschließender Apoptose durch bestimmte Granzyme. Nach Meinung anderer Autoren ist die Apoptose allerdings keineswegs das Resultat einer Exozytose von Granula, sondern wird durch die Bindung eines Fas-Liganden der Effektorzelle an den Fas-Rezeptor der Zielzelle in Gang gesetzt. Durch die FasRezeptor-FasLigand-Interaktion werden nach Signalübertragung Kaspasen in der Zielzelle aktiviert, die eine Fragmentation der Zielzell-DNA bedingen (CHAMBERS et al., 2000; SCHMITZ, 2000).

Beim **Hund** konnte bisher ein entsprechender Fas-Ligand noch nicht nachgewiesen werden. Dennoch wird die Zytotoxizität auch bei dieser Tierart offenbar zu einem erheblichen Teil durch Apoptose verursacht, da SCHMITZ et al. (2003) bei ihren Untersuchungen an CTAC-Zellen nach Koinkubation mit Effektorzellen bei nur etwa 30 % der Zielzellen Anzeichen einer Nekrose beobachten konnten. Weiterhin wiesen SCHMITZ et al. (2003) einen Zell-zu-Zellkontakt zwischen Ziel- und Effektorzellen nach. Durch welches zytotoxische Substrat die von NK-Zellen induzierte Apoptose beim Hund jedoch ausgelöst wird, ist bislang noch unklar.

2.4.1.2 Zytotoxizität von Zellkulturüberständen

Ob beim Hund neben dem beschriebenen Zell-zu-Zellkontakt auch eine zytotoxische Aktivität von Substanzen besteht, die bei Koinkubation von Ziel- und Effektorzellen in den Zellkulturüberstand abgegeben werden, wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Voraussetzung dafür wäre eine nachweisbare Sekretion zytotoxisch aktiver Substanzen in den Überstand, die von zahlreichen Autoren für den **Menschen** (DARMON et al, 2000; KRÄHENBÜHL et al., 1991) und für den **Hund** (NAKADA et al., 1996; NARIAI et al., 1999) beschrieben wird.

Beim **Menschen** beschrieben KRÄHENBÜHL et al. (1991) eine Zytotoxizität der in den Interzellularraum abgegebenen Substanzen. Verhinderten sie die Exozytose der in den Effektorzellen enthaltenen Granula in den interzellulären Raum, konnten sie keine zytotoxische Aktivität mehr beobachten.

Auch beim **Hund** wurde eine zytotoxische Aktivität von NKCF, die nach Zielzellkontakt von Effektorzellen in den Überstand abgegeben wurden, bereits 15 Minuten nach Koinkubation der NKCF mit Zielzellen beobachtet (NAKADA et al., 1996).

Es gibt aber auch Argumente, die gegen eine Zytotoxizität solcher freier löslicher Faktoren in Zellkulturüberständen sprechen. So werden beim **Menschen** Nachbarzellen der betroffenen Zielzellen in Zytotoxizitätsuntersuchungen meist nicht von der zytotoxischen Aktivität einer Effektorzelle beeinflusst, was allerdings auch darauf zurückzuführen sein kann, dass die Exozytose zytotoxischer Substanzen nur an den Kontaktstellen zwischen Effektor- und Zielzellen erfolgt (CARPEN et al., 1982). KRÄHENBÜHL et al. (1991) verneinen eine Zytotoxizität der Überstände außerdem, da das in den Interzellularraum sezernierte Perforin relativ schnell durch Lipide und Lipoproteine inaktiviert werde.

Beim **Hund** halten NARIAI et al. (1999) eine Zytotoxizität der Überstände für unwahrscheinlich, da ihrer Meinung nach zu wenig NKCF in den Überstand abgegeben wird, um einen zytotoxischen Effekt auszulösen. Vielmehr werde NKCF über Zellfortsätze der NK-Zelle direkt ins Zytoplasma der Zielzelle sezerniert. Auch RINGLER et al. (1985) und SCHMITZ et al. (2003) konnten nach Koinkubation von Ziel- und Effektorzellen einen Zell-zu-Zellkontakt zwischen diesen beobachten.
Möglicherweise spielen die in den Überstand sezernierten Substanzen aber eine Rolle bei der Signalübertragung und so für das Auslösen der Zytotoxizität. So beobachteten NARIAI et al. (2000) bei Untersuchungen am **Hund**, dass die Abgabe aktiven Sauerstoffs in den Überstand der Freisetzung zytotoxischer Faktoren (CF) aus den Granula vorausgeht. Fingen sie den aktiven Sauerstoff aus dem Überstand heraus, unterblieb gleichzeitig die Freisetzung von CF, und eine zytotoxische Aktivität konnte nicht mehr beobachtet werden.

2.4.2 Einfluss anderer Leukozyten auf die spontane Zytotoxizität

2.4.2.1 Monozyten

Auch eine Beteiligung anderer Leukozyten, beispielsweise Monozyten, an der Auslösung einer spontanen zytotoxischen Aktivität wird diskutiert. Für den Menschen (ROITT et al., 1995) und den Hund (SHAW et al., 1984) wird außerdem eine tumorschädigende Wirkung von Monozyten in vitro beschrieben.

Inwieweit Monozyten aber einen direkten bzw. indirekten Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen haben, ist nach wie vor strittig. So wird sowohl die Ansicht vertreten, dass Monozyten die spontane Zytotoxizität überhaupt nicht beeinflussen (HELFAND et al., 1982) als auch, dass sie diese einerseits unterdrücken (LOUGHRAN et al., 1985) oder andererseits sogar verstärken können (BLOOM et al., 1986).

BLOOM et al. (1986) beobachteten beim **Menschen** ein **Ansteigen der Zytotoxizität** in Anwesenheit von Monozyten sowohl nach Koinkubation von Lymphozyten mit Monozyten als auch nach direkter Zugabe von Monozyten zum CRA. Unklar war dabei jedoch, ob diese Steigerung der Zytotoxizität auf einer direkten Beeinflussung der Effektorzellen durch Monozyten beruhte. Denkbar sei auch eine indirekte Wirkung auf Effektorzellen, indem Monozyten zunächst "Hilfszellen" beeinflussen, die wiederum die Effektorzellen anregen (BLOOM et al., 1986).

Nach langen Inkubationszeiten von Lymphozyten zusammen mit Monozyten stellten BLOOM et al. (1986) hingegen ein **Absinken der Zytotoxizität** fest. BLOOM et al. (1990) führten dies auf den umgekehrt proportionalen Einfluss von Prostaglandin E (PGE) auf die Zytotoxizität zurück, dessen Konzentration sich mit steigender Koinkubationszeit von Lymphozyten und Monozyten erhöhte. KOREN et al. (1981) bestätigten diese Angaben. Sie beobachteten beim Menschen zum einen ein Absinken der Zytotoxizität nach Inkubation von Ziel- und Effektorzellen in Anwesenheit von Monozyten über Nacht. Zum anderen stellten sie ebenfalls eine Abnahme der Zytotoxizität fest, wenn Monozyten zur Prostaglandinsynthese angeregt wurden.

HELFAND et al. (1982) konnten dagegen beim Menschen **keinen Einfluss** der Monozyten auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen feststellen. Eine Kontamination der isolierten Blutlymphozyten mit Monozyten, aber auch mit Granulozyten und T-Zellen sei vielmehr unbedeutend.

PONTAROLLO et al. (2002) beschrieben beim **Rind** ein **Absinken der Zytotoxizität** von NK-Zellen **nach Depletion** von Monozyten. Da Monozyten NK-Zellen zur Produktion von IFN-γ anregen, werde diese Interaktion durch Depletion der Monozyten unterbrochen und die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen sinke.

Auch beim **Hund** ist diese Wechselwirkung bekannt. So erklärten RINGLER et al. (1985) das von ihnen beobachtete statistisch signifikante **Absinken der Zytotoxizität nach Depletion** phagozytierender Zellen durch Carbonyleisenphagozytose ebenfalls mit der fehlenden Interferonabgabe dieser Zellen. Ebenso beschrieben GUENTHER et al. (1994) ein Absinken der Zytotoxizität der Effektorzellen nach Depletion adhärenter Zellen um ein Drittel, wobei es sich bei den adhärenten Zellen hauptsächlich um Mono-zyten handelte.

LOUGHRAN et al. (1985) beobachteten beim Hund dagegen ein Ansteigen der Zytotoxizität der Effektorzellen nach Depletion von Monozyten und Makrophagen.

2.4.2.2 Neutrophile Granulozyten

BLOOM et al. (1986) sehen keine Beteiligung von Granulozyten an der spontanen zytotoxischen Aktivität beim **Menschen**. In ihren Untersuchungen bewirkte die Zugabe von Granulozyten zu den Effektorzellen im CRA keine Veränderung der Zytotoxizität. Nach GONDOLF (1994) besteht beim **Hund** dagegen eine schwach signifikant negative Korrelation zwischen dem Anteil neutrophiler Granulozyten und der Höhe der Zytotoxizität. Zum einen behinderten diese den Zellkontakt zwischen Ziel- und Effektorzellen, zum anderen sei eine Schädigung oder Inaktivierung der Effektorzellen infolge Freisetzung verschiedener lysosomaler Enzyme oder reaktiver O₂-Radikale aus geschädigten Granulozyten möglich. Von einer direkten Beteiligung dieser Zellen an der spontanen zytotoxischen Aktivität ging sie jedoch auch nicht aus.

2.4.2.3 Eosinophile Granulozyten

Eosinophilen Granulozyten wird als Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr eine Beteiligung an der Tumorabwehr nachgesagt. Nach BERG et al. (2001) besteht beim **Menschen** sogar ein Zusammenhang zwischen der Anzahl eosinophiler Granulozyten im Tumorinfiltrat und der Prognose, die sich mit steigender Anzahl eosinophiler Granulozyten verbessert. GONDOLF (1994) konnte beim **Hund** im Rahmen ihrer Untersuchungen eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Anteil eosinophiler Granulozyten und der Höhe der Zytotoxizität nachweisen. KNAPP et al. (1993) zeigten bei dieser Tierart im Rahmen von Zytotoxizitätsuntersuchungen eine Bindung eosinophiler Granulozyten an Zielzellen. Ihr Wirkungsmechanismus ist bisher jedoch unbekannt.

2.4.2.4 T- Lymphozyten

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten T-Lymphozyten handelte es sich um CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen.

Das Verhältnis von CD4⁺-Zellen zu CD8⁺-Zellen in Beagleblut wurde von GEBHARD et al. (1992) mit 2,14, von BOKEMEYER (2003) hingegen als wesentlich geringer mit 1,03 angegeben.

2.4.2.4.1 Funktion von CD4⁺-Zellen und Expression von CD4

Bei **CD4⁺-Zellen** handelt es sich hauptsächlich um T-Helferzellen (T_H), die ihre spezifischen Antigene in Verbindung mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) der Klasse II erkennen. Über Sekretion verschiedener Zytokine besitzen CD4⁺-Zellen allerdings nicht nur eine Helferzellfunktion, mit der sie die Antwort von T- und B-Zellen unterstützen, sondern auch eine Suppressor- und Induktionsfunktion im Hinblick auf CD8⁺-Zellen, wodurch deren zytotoxische Aktivität unterdrückt bzw. induziert wird (ROITT et al., 1995).

Sowohl beim **Menschen** als auch bei der **Maus** unterscheidet man die CD4⁺-T-Zell-Klone T_H1 und T_H2 (ROITT et al., 1995; KEMENY et al., 1994). Dabei werden T_H1-Zellen vorwiegend mit Zytotoxizität und Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht. T_H2-Zellen sind aufgrund ihrer Eigenschaften (Stimulation von B-Zellen zur Proliferation und Antikörperproduktion) an der humoralen Immunität beteiligt (ROITT et al., 1995; BERG et al., 2001).

CD4 wird als ein Glykoprotein von 55 – 65 kD beschrieben, das die Verbindung zwischen antigenpräsentierenden Zellen und MHC II stabilisiert (MOORE et al., 1992). Beim **Menschen** wird CD4 von T-Helferzellen (KEMENY et al., 1994), sowie von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und kommt in geringer Dichte auch auf eosinophilen Granulozyten vor (MOORE et al., 1992). Im Gegensatz zu CD8 konnte CD4 beim Menschen allerdings nicht auf NK-Zellen nachgewiesen werden (NAGLER et al., 1989), wenngleich einige CD4⁺-Zellen auch eine zytotoxische Aktivität besitzen (HAHN et al., 1995).

Beim Hund konnten RABANAL et al. (1995) CD4 auf T-Helferzellen sowie auf einigen antigenpräsentierenden Zellen nachweisen. Im Unterschied zu anderen Säugetieren wird CD4 bei dieser Tierart neben T-Zellen und Thymozyten allerdings auch von neutrophilen Granulozyten exprimiert (MOORE et al., 1992; DIRSCHERL et al., 1995). So konnten MOORE et al. (1992) CD4 auf 97 % der neutrophilen Granulozyten nachweisen, nach GUENTHER et al. (1994) stellten sich etwa 80 % der neutrophilen Granulozyten als CD4⁺ dar. BOKEMEYER (2003) wies mit dem auch in vorliegender Arbeit verwendeten Antikörper bei gesunden, erwachsenen Hunden 84,9 % CD4⁺-Granulozyten nach. In Beagleblut konnte er insgesamt einen Anteil von 38,2 % CD4⁺-Zellen bestimmen, der verglichen mit dem Anteil im peripheren Blut adulter Hunde unterschiedlicher Rassen signifikant geringer war. Nach FALDYNA et al. (2001) nimmt allerdings nicht nur die Rasse, sondern auch das Alter und das Geschlecht Einfluss auf die Verteilung CD4⁺-Zellen im Blut. So konnten sie bei weiblichen Tieren einen höheren Anteil CD4⁺.

2.4.2.4.2 Funktion von CD8⁺-Zellen und Expression von CD8

CD8⁺-Zellen besitzen überwiegend zytotoxische Eigenschaften und erkennen Moleküle der MHC-Klasse-I (ROITT et al., 1995). Meist werden sie als zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T lymphocyte, CTL) bezeichnet. Daneben steuern einige CD8⁺-Zellen über Sekretion verschiedener Zytokine aber auch die Immunantwort in ähnlicher Weise wie CD4⁺-Zellen (KEMENY et al., 1994; CARTER et al., 1996).

Bei **CD8** handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 30 - 38 kD, das die Verbindung zwischen dem MHC-I-Komplex auf zytotoxischen T-Zellen und deren Zielzellen stabilisiert (MOORE et al., 1992). GARCIA et al. (1996) führten diese Stabilisierung des TCR-/ MHC-Komplexes auf Ladungs- bzw. Konformationsänderungen am MHC-Komplex zurück.

CD8 kann sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer oder Multimer vorliegen (MOORE et al., 1992). ROBERTSON et al. (1990) nutzten den unterschiedlichen Konfigurationszustand von CD8 beim **Menschen** als ein wichtiges Unterscheidungskriterium zwischen T- und NK-Zellen. So stellten sich nach ihren Untersuchungen ca. 30 % der NK-Zellen als CD8⁺ dar. Allerdings wurde CD8 von diesen Zellen nicht in hoher Zahl exprimiert und lag im Gegensatz zu T-Zellen, bei denen CD8 als Heterodimer ausgebildet ist, meist als Homodimer vor.

Somit ist CD8 beim Menschen nicht nur auf T-Zellen vorhanden, sondern wird auch von einem Teil der NK-Zellen exprimiert (NAGLER et al., 1989; KOBERDA et al., 1991; VU-JANOVIC et al., 1995).

Entsprechendes gilt für den **Hund**. GUENTHER et al. (1994) beschrieben kanine NK-Zellen als CD8^{+/-} -Zellen. Nach RABANAL et al. (1995) markierte ein Antikörper gegen CD8 beim Hund sowohl zytotoxische T-Zellen als auch T-Zellen mit Suppressorfunktion, die beim Menschen als CD4⁺-Zellen gelten.

Beim Hund konnte ein Anteil von 24 % (VOGL, 1995) bzw. von 26 % (WÜNSCHMANN et al., 1999) CD8⁺-Zellen an PBL ermittelt werden. RIVAS et al. (1995) gaben einen Anteil von nur 17,7 - 18,6 % CD8⁺-Zellen in ruhenden PBMC an. BOKEMEYER (2003) bestimmte einen Anteil von 37,2 % CD8⁺-Zellen in peripherem Beagleblut und beobachtete bei dieser Rasse somit einen signifikant höheren Anteil CD8⁺-Zellen im Vergleich zu anderen Rassen. Nach FALDYNA et al. (2001) gibt es nicht nur rasse- sondern auch altersbedingte Unterschiede im prozentualen Vorkommen CD8⁺-Zellen im peripheren Blut.

2.4.2.4.3 Einfluss von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen auf die spontane zytotoxische Aktivität

Nach HAHN et al. (1995) sind beim **Menschen** sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen an der Abwehr von Tumorzellen beteiligt, jedoch müsse beiden das entsprechende Antigen präsentiert werden. Die anschließende Zielzelllyse erfolgte bei CD4⁺-Zellen hauptsächlich über eine FasRezeptor-FasLigand-Interaktion mit Induktion einer Apoptose in der Zielzelle, bei CD8⁺-Zellen dagegen vorwiegend über Exozytose ihrer lytischen Granula mit daraus resultierender Schädigung der Zielzellmembran.

BERG et al. (2001) beobachteten eine Freisetzung von IFN-γ durch CD4⁺-Zellen (Th1), wodurch es zur Stimulierung zytotoxischer T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen kam.

ORTALDO et al. (1986) fanden zwar keinen signifikanten Einfluss von T-Lymphozyten auf die Zytotoxizität von LGL. Gleichzeitig beschrieben sie jedoch beim Menschen eine Reduktion der Zytotoxizität sowohl nach Depletion CD3⁺-, als auch nach Depletion CD8⁺-Zellen.

Nach PHILLIPS et al. (1986) hing die zytotoxische Aktivität von T-Zellen besonders davon ab, ob die zytotoxischen Zellen aus Blut, Milz oder Thymus gewonnen wurden. Wurden die Effektorzellen nämlich aus Blut isoliert, so waren T-Lymphozyten beim Menschen kaum an der Gesamtzytotoxizität von LAK beteiligt.

Beim Hund konnte durch Depletion CD4⁺-Zellen kein Einfluss auf die Zytotoxizität nachgewiesen werden (MOORE et al., 1992).

Zur Beteiligung **CD8⁺-Zellen** an der spontanen zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen existieren dagegen unterschiedliche Angaben. So beobachteten MOORE et al. (1992) nach Depletion CD8⁺-Zellen eine Reduktion der Zytotoxizität. HÖTZL et al. (1991) beschrieben dagegen eine Unterdrückung der Zytotoxizität nach Zugabe von CD8⁺-Zellen.

2.4.2.5 B-Lymphozyten

Aufgrund ihrer Fähigkeit, ein bestimmtes Antigen spezifisch zu erkennen und die entsprechende Antikörperproduktion in Gang zu setzen, sind B-Lymphozyten eher in die späte Phase der Immunantwort eingebunden (ROITT et al., 1995).

NG et al. (1980) konnten beim **Menschen** weder ein B-Zellantigen auf NK-Zellen noch eine zytotoxische Aktivität von B-Lymphozyten nachweisen.

Auch beim **Hund** beobachteten NARIAI et al. (1999) keine zytotoxische Aktivität von B-Lymphozyten.

2.5 Einfluss verschiedener äußerer und innerer Faktoren auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen

Welche Faktoren die Zytotoxizität von NK-Zellen beeinflussen, ist noch nicht abschließend geklärt. Des Weiteren wurden verschiedene Faktoren nur bei bestimmten Spezies untersucht.

Beim **Menschen** beschrieben PROSS et al. (1982) ein geringes, aber signifikantes Ansteigen der Zytotoxizität von der Geburt bis zu einem mittleren **Alter**, wobei sich die Zytotoxizität im Durchschnitt verdoppelte. SANSONI et al. (1993) beobachteten dagegen in der mittleren Altersgruppe ein Absinken der Zytotoxizität sowie ein Ansteigen der Zytotoxizität mit zunehmend höherem Alter. Diesen Widerspruch zu Ergebnissen anderer Autoren erklärten SANSONI et al. (1993) mit strengeren Auswahlkriterien der Probanden ihrerseits.

Auch ein **geschlechtsspezifischer Einfluss** auf die NK-Aktivität wird diskutiert. FER-NANDES et al. (1981) berichteten von einem Anstieg der NK-Aktivität mit zunehmendem Alter bei Männern, nicht jedoch bei Frauen. Nach PROSS et al. (1982) stellte sich die Zytotoxizität bei Frauen durchschnittlich 20 % niedriger dar als bei gleichaltrigen Männern. Im Verlauf einer **Schwangerschaft** sinkt die mittlere Zytotoxizität beim Menschen (KANE et al., 1996). Des Weiteren wird **Stress** ein entscheidender Einfluss auf die Höhe der NK-Aktivität zugeschrieben. LEVY et al. (1989) untersuchten das sogenannte **Low-NK-Syndrom**, das mit persistent niedriger NK-Aktivität und genereller Antriebslosigkeit einhergeht. Betroffene Personen fühlen sich häufig deprimiert und gestresst. Auch LOTZOVA (1991) beschrieb eine verminderte Zytotoxizität bei deprimierten und gestressten Menschen.

Bei der Maus beeinflussen Alter und Jahreszeit die Zytotoxizität (MUNSON et al., 2000).

SPLITTER et al. (1993) beschrieben eine Korrelation der NK-Aktivität mit der **Abwehr**situation des Organismus gegen Virusinfektionen und Tumorerkrankungen beim **Rind**. FUNK et al. (2003) beobachteten beim **Hund** eine signifikant erniedrigte spontane Zytotoxizität bei Hunden mit Mammakarzinomen im Vergleich zu Kontrollhunden.

GREELEY et al. (1996) untersuchten den Einfluss des **Alters** auf die NK-Aktivität beim **Hund** und beobachteten ein nicht signifikantes Ansteigen der Zytotoxizität mit zunehmendem Alter. Nach FALDYNA et al. (2001) ist das Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen beim Hund nicht nur altersabhängig, auch **Rasse** und **Geschlecht** spielen eine entscheidende Rolle. Zudem konnten sie bei weiblichen Hunden insgesamt mehr Lymphozyten nachweisen.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Blutentnahme, Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild

Für die Durchführung der folgenden Versuche wurden nur adulte Beagle-Hunde sowie Foxhound-Beagle-Kreuzungen (FBI) beiderlei Geschlechts als Blutspender eingesetzt, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch unauffällig darstellten und bei denen die letzte Blutspende mindestens drei Wochen zurücklag. Alle Hunde wurden regelmäßig entwurmt und gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis, Parvovirose, Leptospirose und Tollwut geimpft. Gefüttert wurden sie mit kommerziellem Hundefutter, Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Als Blutspender standen vornehmlich Blutspendehunde der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik I und der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung (im folgenden als Klinikhunde bezeichnet, s. Tabelle 7 im Anhang). Da jedoch ein großer Teil dieser Hunde während des Untersuchungszeitraumes nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes in private Hände übergeben wurde, musste im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen auch auf Hunde aus privaten Haushalten, bei denen es sich teilweise um ehemalige Blutspendehunde aus den oben genannten Kliniken handelte, zurückgegriffen werden (im folgenden als Privathunde bezeichnet, s. Tabelle 7 im Anhang).

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Vena jugularis mit Hilfe einer Kanüle für S-Monovette[®] (Sarstedt, Nürnbrecht). Das Blut für die spätere Verarbeitung sowie für die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und des Differentialblutbildes wurde in sterilen 9 ml Ammonium-Heparin-Röhrchen (S-Monovette[®]-Blutentnahmesysteme, Sarstedt, Nürnbrecht) aufgefangen. Die Verarbeitung der Blutproben erfolgte stets am Tag der Blutentnahme.

Die Gesamtleukozytenzahl und das Differentialblutbild wurden in der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik I mit Hilfe des Hämatologiesystems Advia 120 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, USA) unter Verwendung einer Software für den Hund bestimmt. Die angegebenen Werte stellen dabei den nach Doppelmessung errechneten arithmetischen Mittelwert dar.

3.1.2 Isolierung von Effektorzellen für die Messung spontaner zytotoxischer Aktivität

Die Isolierung der Effektorzellen für die Messung spontaner zytotoxischer Aktivität erfolgte mittels Zentrifugation über einen einstufigen 58,5 %igen Percoll[®]-Dichtegradienten (GONDOLF et al., 1996).

Dazu wurde zunächst nach Angaben des Herstellers durch Verdünnung von neun Teilen Percoll[®] (amersham pharmacia biotech, Uppsala, Schweden) mit einem Teil steriler 1,5 M NaCl-Lösung eine Percoll[®]-Stammlösung angefertigt mit einer spezifischen Dichte von 1,119 g/ml. Durch Zugabe von sterilem Roswell Park Memorial Institute Gewebekulturmedium (RPMI-1640, PAA Laboratories, Cölbe) mit einem Zusatz von 1 % Penicillin (10.000 U/ml) und 1 % Streptomycin (10.000 µg/ml, beide PAA Laboratories, Cölbe), im folgenden als RPMI-1640 bezeichnet, wurde eine 58,5 %ige Gebrauchslösung (v/v) mit einer spezifischen Dichte von 1,073 g/ml hergestellt und anschließend kühl gelagert (GONDOLF, 1994; GONDOLF et al., 1996).

Zur Isolierung der Effektorzellen wurden dann je 3 ml der kühl gelagerten Percoll[®]-Gebrauchslösung in 15 ml fassende, sterile Glaszentrifugenröhrchen mit spitzem Boden (Assistent, bezogen über Laborhandel Reinke, Gießen) gegeben. Auf diese wurden jeweils 5 ml verdünntes Ammonium-Heparinblut (Verdünnung des Blutes mit sterilem RPMI-1640 in einem Verhältnis von 1:3) vorsichtig ohne Vermischen der Grenzlinien mit einer sterilen Pipette aufgeschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Röhrchen für 25 min bei 800 x g und einer Temperatur von 15° C (Hettich Rotanda/K Kühlzentrifuge, Hettich, Tuttlingen). Nach der Zentrifugation stellten sich die isolierten Leukozyten als 1 - 2 mm breite, weiße Bande zwischen dem Percoll[®]-Dichtegradienten und dem Gewebekulturmedium dar (s. Abb. 1). Die Banden wurden mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in RPMI-1640 resuspendiert. Anschließend wurde zweimal mit

RPMI-1640 gewaschen, wobei die Anzahl der Glaszentrifugenröhrchen, in die die Leukozytenbanden überführt worden waren, nach jedem Zentrifugationsschritt (400 x g, 4° C, 5 min) bis auf 1 Röhrchen kontinuierlich reduziert wurde. Um den Zellverlust so gering wie möglich zu halten, wurden die jeweils leeren Röhrchen nochmals mit je 1 ml RPMI-1640 gespült.

Nach Resuspendierung der gewaschenen Zellen in RPMI-1640 + 10 % Fetalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories, Cölbe) wurden 600 µl der Suspension für die Zellzahlbestimmung und Zelldifferenzierung im Advia entnommen.

Zusätzlich erfolgte zur Einstellung des gewünschten Effektor-Zielzellverhältnisses eine Zellzahlbestimmung und Lebend-Tot-Differenzierung in einer Neubauer-Zählkammer. Zu diesem Zweck wurden 200 µl der Suspension mit 400 µl 0,36 %iger Trypanblaulösung (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe) verdünnt und die lebenden Zellen, die im Gegensatz zu den diffus blau gefärbten toten Zellen keinen Farbstoff aufgenommen hatten, ausgezählt.

3.1.3 Zytotoxizitätstest

Um den Einfluss der eingesetzten Depletionsverfahren auf die Zytotoxizität zu bestimmen, wurde mit den isolierten Effektorzellen (s. 3.1.2) jeweils vor und nach einem Depletionsschritt ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Das eingesetzte Effektor-Zielzellverhältnis (im Folgenden als E/T ratio bezeichnet) variierte dabei je nach Versuchsreihe und damit verbundener Zellausbeute zwischen 100:1, 50:1 und 25:1.

3.1.3.1 Zielzellen

Als Zielzellen dienten die gegenüber kaninen NK-Zellen sensitiven epithelialen CTAC-Zellen (kanine Schilddrüsenadenokarzinomazelllinie, KASZA, 1964).

Als Negativkontrolle kamen die gegenüber kaninen NK-Zellen als nichtsensitiv geltenden, epithelialen Vero-Zellen (Nierenzelllinie der grünen Meerkatze) zum Einsatz.

Bei beiden Zelllinien handelte es sich um adhärent wachsende Zellen, die in sterilen 25 cm² Gewebekulturflaschen (Iwaki / Dunn Labortechnik, Asbach) in einem CO₂-Brut-

schrank (Heraeus UB 6060 EK-CO₂, Heraeus, Hanau) bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter Zusatz von 5 % CO₂ inkubiert wurden. Als Kulturmedium diente steriles Minimum Essential Medium Eagles mit Earle's Salzen (MEME, PAA Laboratories, Cölbe) mit einem Zusatz von 10 % FKS, 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin (s. 3.1.2). Die Zellen wurden alle drei Tage mit frischem Kulturmedium versorgt und wöchentlich subkultiviert. Hierfür wurde der Zellrasen in der Gewebekulturflasche jeweils zweimal mit MEME und einem Zusatz von 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin gewaschen sowie durch Zugabe von je 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,02 % EDTA und 0,05 % Trypsin, ICN Biochemicals, Costa Mesa, USA) für 5 min im Brutschrank vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst. Nach Waschen der so gewonnenen Zellen mit MEME + 10 % FKS + 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin (400 x g, 5 min, 4° C) wurden diese in neue Gewebekulturflaschen überführt. Als Zielzellen in einem Zytotoxizitätstest kamen Zellen aus einer zwei Tage vorher angelegten Passage zum Einsatz. Dafür wurden je 1,0 x 10⁵ Zellen/ml (CTAC- bzw. Vero-Zellen) in eine 96-Loch-Flachbodenplatte (Falcon[®], Becton Dickinson, Heidelberg) überführt, so dass sich nach einer Inkubationsdauer von 26 Stunden (SCHMITZ, 2000) der für den Zytotoxizitätstest benötigte einheitliche Zellrasen (Monolayer) bildete.

3.1.3.2 Durchführung des Rose Bengal Assays (RBA)

Nach der Bildung eines Zielzellmonolayers (s. 3.1.3.1) wurden 100 µl der isolierten Effektorzellen (s. 3.1.2) je nach Versuchsreihe in unterschiedlichen Effektor-Zielzellverhältnissen zugegeben. Dabei entsprachen die Effektorzellkonzentrationen 1,0 x 10^7 , 5,0 x 10^6 oder 2,5 x 10^5 Zellen/ml jeweils einer E/T ratio von 100:1, 50:1 und 25:1. Die Einstellung des Effektor-Zielzellverhältnisses ergab sich anhand der Zellausbeute, die je nach eingesetztem Depletionsverfahren teilweise erheblich variierte. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde für jedes Effektor-Zielzellverhältnis ein Sechsfachansatz angefertigt, so dass jeweils zwei der gleichen Ansätze von der selben Düse des Microplate Washers (Titertek[®] Microplate Washer S8/S12, Flow Laboratories Ltd., Irvine, Schottland) gewaschen wurden (s. unten, Berechnung der Zytotoxizität). Als Kontrolle dienten Zielzellmonolayer, die ohne Effektorzellen unter Zugabe von 100 µl RPMI-1640 + 10 % FKS inkubiert wurden.

Nach einer Koinkubationszeit der Effektor- und Zielzellen von 14 Stunden im Brutschrank (s. 3.1.3.1) erfolgte das Entfernen des Überstands samt abgelöster Ziel- und Effektorzellen nach vorausgehendem fünfmaligem vorsichtigem Mischen mit einer Mehrkanalpipette (s. Schema 1: Prinzip des RBA). Anschließend wurden jeder Plattenvertiefung je 100 µl einer 0,25 %igen Rose-Bengal-Gebrauchslösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) zugegeben und nach 3 Minuten abgeschüttet. Mit dem Microplate Washer (s. oben) wurden die Zellen dann unter Anwendung des Waschprogramms "super" dreimal mit je 650 µl NaCl-PBS pro Vertiefung gewaschen (SCHMITZ, 2000; Abb. 2a-b). Die noch vorhandene Flüssigkeit wurde aus der Platte herausgeklopft und der von den noch adhärenten Zellen aufgenommene Farbstoff durch Zugabe von 200 µl 50 %igem Ethanol-PBS pro Vertiefung aus den Zellen in den Überstand überführt. Als Kontrolle dienten 200 µl 50 %iges Ethanol-PBS in einer zellfreien Vertiefung. Nach 5 Minuten erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte des Überstandes mittels eines ELISA-Photometers (Titertek Multiscan[®] Plus, Flow Laboratories, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm zur Korrektur des unspezifischen Hintergrundes. Der angeschlossene Computer mit dem Computerprogramm EIA, Version 3.10 (Stefan Ufer und ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) erfasste die Messdaten und ermittelte jeweils die arithmetischen Mittelwerte der gleichen Ansätze eines Effektor-Zielzellverhältnisses, die mit derselben Düse des Microplate Washers gewaschen wurden. Anhand dieser Mittelwerte wurde wiederum die Zytotoxizität durch Einsetzen der Mittelwerte in folgende Formel berechnet:

Zytotoxizität in % = 100 -
$$\left(\frac{\text{OD Testansatz}}{\text{OD Kontrolle}} \times 100\right)$$

Aus dem Mittelwert der so errechneten drei Zytotoxizitätswerte pro Zelllinie und Verdünnung ergab sich sodann die jeweilige Gesamtzytotoxizität.

In Ausnahmefällen können bei Anwendung dieser Formel durch höhere optische Dichten in der Effektor-Zielzellkultur im Vergleich zur Kontrollkultur auch negative Werte entstehen. Dies ist dann der Fall, wenn bei fehlender Zytotoxizität in den Kontrollkulturen (nur Zielzellen, keine Effektorzellen zugegeben) durch den Waschvorgang mechanisch mehr Zellen entfernt werden als in den Effektor-Zielzellkulturen.

3.1.4 Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen

Um die nach 3.1.2 gewonnenen Effektorzellen weiter von kontaminierenden Zellen zu befreien, sollte eine Depletion adhärenter und / oder phagozytierender Zellen durchgeführt werden. Die Depletion adhärenter Zellen erfolgte dabei zunächst über Adhärenz in Plastikgewebekulturflaschen (im Folgenden kurz als Adhärenz bezeichnet).

Anschließend sollten auch phagozytierende Zellen durch Aufnahme von Carbonyleisen aus dem Isolat entfernt werden. Da die Zugabe von Carbonyleisen zu den isolierten Zellen für eine definierte Inkubationszeit in einer Gewebekulturflasche (s. 3.1.3.1) erfolgt, ist die Depletion phagozytierender Zellen immer auch mit einer Depletion plastikadhärenter Zellen verbunden. Dennoch soll dieses Verfahren im Folgenden nur als Phagozytose bezeichnet werden.

Um den Einfluss der Phagozytose im Unterschied zur Adhärenz bestimmen zu können, wurde zuerst der Einfluss der Adhärenz auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität untersucht.

3.1.4.1 Einfluss der Adhärenz auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität

Zunächst wurden die Zielzellen wie unter 3.1.3.1 beschrieben vorbereitet. Bei den Zielzellen handelte es sich dabei allerdings ausschließlich um CTAC-Zellen, Vero-Zellen wurden hierfür nicht eingesetzt.

Die Effektorzellen wurden zunächst wie unter 3.1.2 beschrieben isoliert, gezählt, im Advia differenziert und ein Teil im RBA bei einer E/T ratio von 50:1 eingesetzt.

Der übrige Teil des Zellisolats wurde in eine Gewebekulturflasche mit einer Bodenfläche von 25 cm² (s. 3.1.3.1) gegeben und für 2 Stunden im CO₂-Brutschrank (s. 3.1.3.1) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Flasche geschwenkt, um nicht adhärente Zellen zu resuspendieren. Diese wurden mit dem Überstand entnommen und die Flasche nochmals mit RPMI-1640 plus 10 % FKS gespült. Nach Bestimmung der Zellzahl und der Zellzusammensetzung erfolgte auch mit diesen Zellen das Ansetzen eines RBA mit einer E/T ratio von 50:1. Anschließend sollten die verbliebenen adhärenten Zellen durch zweimalige Zugabe von 7 ml EDTA-Lösung (s. Anhang) und einer Inkubationszeit von 20 – 30 Minuten im CO₂-Brutschrank (s. 3.1.3.1) vom Boden der Gewebekulturflasche gelöst werden.

Nach 2-maligem Waschen der abgelösten Zellen mit RPMI-1640 und Resuspendieren in 3 ml RPMI-1640 + 10 % FKS wurden Zellzahl und Zellzusammensetzung dieser Zellsuspension bestimmt. Zusätzlich wurde bei ausreichender Zellausbeute auch mit den adhärenten Zellen ein RBA mit einer E/T ratio von 50:1 angesetzt.

Die Auswertung der Rose Bengal Assays erfolgte jeweils nach Ablauf einer Koinkubationszeit der Effektor- und Zielzellen von 14 Stunden.

3.1.4.2 Einfluss der Phagozytose auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität

Darüber hinaus sollte der Einfluss einer Depletion phagozytierender Zellen auf die Zellzusammensetzung und die Zytotoxizität untersucht werden. Dazu wurde zunächst mit der Hälfte der Percoll[®]-isolierten Zellsuspension eine Adhärenz wie unter 3.1.4.1 beschrieben durchgeführt (Flasche 1). Die andere Hälfte wurde vor Überführung in eine Gewebekulturflasche derselben Art und Größe mit 0,05 – 0,1 g Carbonyleisenpulver HF₃ (BASF, Ludwigshafen) versetzt (Flasche 2).

Nach Zugabe von je 5 ml sterilem RPMI-1640 + 10 % FKS zu Flasche 1 und 2 erfolgte eine Inkubation für 2 Stunden im CO_2 -Brutschrank (s. 3.1.3.1), in deren Anschluss nicht adhärente Zellen durch leichtes Schwenken resuspendiert wurden. Aus Flasche 2 wurde sowohl freies als auch aufgenommenes Carbonyleisen zusammen mit den phagozytierenden Zellen durch Zugabe eines sterilen Magnetrührers für 10 Minuten entfernt. Je nach Menge des verbliebenen Carbonyleisens wurde dieser Vorgang 2 – 3-mal wiederholt.

Anschließend wurden die Überstände beider Flaschen in je ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml RPMI-1640 + 10 % FKS gewaschen. Zellzahl und Zellzusammensetzung wurden bestimmt (s. 3.1.2) und die beiden Zellsuspensionen jeweils mit einer E/T ratio von 100:1 im RBA eingesetzt (s. 3.1.3.2). Dabei musste bei Einsatz der Zellsuspension aus Flasche 2 auf die Untersuchung einer Negativkontrolle mit Verozellen verzichtet werden, da nicht mehr genügend Effektorzellen zur Verfügung standen.

3.1.4.3 Charakterisierung von Monozyten durch kombinierte Carbonyleisenphagozytose und α-Naphtylacetatesterasefärbung

Um die Eisenphagozytose lichtmikroskopisch nachzuweisen, wurden die Überstände aus Flasche 1 und Flasche 2 (s. 3.1.4.2) in einer separaten Versuchsreihe nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden im CO₂-Brutschrank in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellzahl zur Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten auf 1,0 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 300 µl dieser Zellsuspension in einer Zytozentrifuge (Thermo Electron Corporation, Dreieich) bei 800 x g für 10 Minuten auf einen Objektträger aufzentrifugiert. Nach Trocknung der Objektträger erfolgte die histochemische Färbung mit LEUKOGNOST[®]-EST (E.Merck, Darmstadt) zur Darstellung der α -Naphtylacetatesteraseaktivität nach Angabe des Herstellers:

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 0,8 g Reagenz 1 in 60 ml Aqua dest. gelöst (im Folgenden als **Lösung A** bezeichnet). Anschließend wurde eine Flasche Reagenz 2 in 2 ml Aceton gelöst und unter kräftigem Schütteln zu Lösung A gegeben (im Folgenden als **Lösung B** bezeichnet). In der leeren Flasche des Reagenz 2 wurden nun je 0,2 ml Reagenz 3a und 3b gemischt (entspricht nach einer Diazotierungszeit von 1 Minute **Lösung C**). Daraufhin wurden Lösung B und C gemischt und durch ein schnelllaufendes Filter in eine Stehküvette filtriert. Da diese Färbung maximal 2 Stunden stabil ist, wurde sofort nach der Herstellung mit der Färbung begonnen, indem die luftgetrockneten Zytozentrifugenpräparate zunächst für 1 Minute im LEUKOGNOST[®]-Fixiergemisch fixiert und anschließend für 1 Minute mit Aqua dest. abgespült wurden. Danach wurden die so behandelten Objektträger in der zuvor bereiteten Färbelösung für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert sowie anschließend für 10 Sekunden mit Aqua dest. abgespült und für 30 Minuten mit Mayers Hämalaunlösung gegengefärbt. Nach Bläuen (Abspülen) der Objektträger mit Leitungswasser für 3 – 5 Minuten wurden diese mit Glyceringel eingedeckt.

3.1.5 Depletion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen

Die Depletion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen erfolgte durch positive immunomagnetische Separation. Um eine positive Separation durchführen zu können, mussten zunächst die jeweiligen spezifischen primären Antikörper, die unter 3.1.5.1 näher spezifiziert werden, an Sekundärantikörper gebunden werden. Als Sekundärantikörper wurden Antikörper verwendet, die bereits an magnetische Kügelchen (Dynabeads[®], Invitrogen Dynal[®] AS, Oslo, Norwegen) gekoppelt waren, und zwar Dynabeads[®] Sheep anti-Rat im Falle der Depletion CD4⁺-Zellen bzw. Dynabeads[®] Sheep anti-Mouse zur Depletion CD8⁺-Zellen.

3.1.5.1 Kopplung der primären Antikörper an Dynabeads[®]

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Primärantikörper sind gegen Epitope von kaninem CD4 und kaninem CD8 gerichtet und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. W. Baumgärtner (Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um die Antikörper Rat anti-Dog CD4 (Klon YKIX302.9.3.7) und Mouse anti-Dog CD8 (Klon Dog 10-1-1).

3.1.5.1.1 Kopplung von Rat anti-Dog CD4 Antiserum an mit Sheep anti-Rat IgG gekoppelten Dynabeads[®]

Zur Kopplung des monoklonalen, von der Ratte stammenden Antikörpers anti-Dog CD4 an die mit Sheep anti-Rat - Antikörpern gekoppelten Dynabeads[®] (Dynabeads[®] M-450 Sheep anti-Rat IgG, im Folgenden kurz als "Dynabeads[®]" bezeichnet) wurden letztere zunächst 3-mal nach Angaben des Herstellers mit Waschpuffer für CD4 (s. Anhang) gewaschen. Dazu wurden die Dynabeads[®] in ein Rundbodenzentrifugenröhrchen aus Glas (Schott, bezogen über Laborhandel Reinke, Gießen) überführt (10⁷ Dynabeads[®] pro 1 µg Antikörper Rat anti-Dog CD4 bei einem erwünschten Gesamtvolumen von 2 ml) und für 1 Minute in einen Halter mit einem Permanentmagneten gestellt. Dadurch sammelten sich die Dynabeads[®] an der dem Magneten zugewandten Seite des Zentrifugenröhrchens (s. Abb. 3), und die verbleibende Flüssigkeit konnte abpipettiert werden. Anschließend wurde das Röhrchen vom Magneten entfernt, die am Röhrchenrand haftenden Beads mit 2 ml Waschpuffer resuspendiert und wieder in den Halter mit dem Magneten gestellt. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3-mal durchgeführt (s. oben).

Die anschließende Kopplung von je 10⁷ gewaschener Dynabeads[®] mit 1 µg Antikörper Rat anti-Dog CD4 (Klon YKIX302.9.3.7) erfolgte durch Inkubation in einem Rundbodenzentrifugenröhrchen (s. oben) im Dynal[®] Sample Mixer für 30 Minuten bei 4° C (entspricht im Folgenden der Bezeichnung "gekoppelte Beads"). Danach wurden die gekoppelten Beads nach Herstellerangaben erneut 4-mal mit Waschpuffer für CD4 gewaschen und im ursprünglich angesetzten Volumen (2 ml) resuspendiert. Die Aufbewahrung der gekoppelten Beads erfolgte im Kühlschrank bei 4° C.

3.1.5.1.2 Kopplung von Mouse anti-Dog CD8 Antiserum an mit Sheep anti-Mouse IgG gekoppelten Dynabeads[®]

Die Kopplung des monoklonalen Antikörpers Mouse anti-Dog CD8 (Klon Dog 10-1-1) an mit Sheep anti-Mouse gekoppelten Dynabeads[®] (Dynabeads[®] M-450 Sheep anti-Mouse IgG) erfolgte in gleicher Weise (s. 3.1.5.1.1). Allerdings wurde der im Anhang beschriebene Waschpuffer für CD8 eingesetzt, und die gekoppelten Beads wurden nach Herstellerangaben im Anschluss an die Inkubation 3-mal gewaschen.

3.1.5.2 Einfluss der Depletion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität

Erneut wurden Effektorzellen isoliert sowie Zellzahl und Zellzusammensetzung des Isolats bestimmt (s. 3.1.2). Anschließend wurde die Zellzahl je nach gewünschter E/T ratio eingestellt und ein RBA angesetzt (s. 3.1.3). Untersucht wurden die Effektor-Zielzellverhältnisse 100:1, 50:1 und 25:1. Als Zielzellen dienten jeweils CTAC- und Verozellen, wobei – eine ausreichend große Zellausbeute vorausgesetzt – ein Sechsfachansatz gleicher Zellzusammensetzung angefertigt wurde (s. 3.1.3.2).

Nach Ansetzen eines RBA mit der entsprechenden E/T ratio und Bestimmung der Zellzusammensetzung im Advia wurden die verbleibenden Effektorzellen bei 4° C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Die benötigte Menge gekoppelter Beads (nach Herstellerangaben 2 x 10^7 Beads pro ml Zellsuspension) wurde resuspendiert und in einem Rundbodenzentrifugenröhrchen aus Glas gewaschen (PBS/BSA-Puffer, pH = 7,4, s. Anhang, Waschvorgang s. 3.1.5.1.1). Das Waschen der Beads wurde den Herstellerangaben entsprechend bei Depletion CD4⁺-Zellen insgesamt 4-mal, bei Depletion CD8⁺-Zellen 3-mal wiederholt. Nach dem letzten Waschen erfolgte die Resuspendierung der Beads mit dem ursprünglich errechneten Volumen, so dass eine Konzentration von 2 x 10^7 Beads pro ml Zellsuspension sichergestellt war. Die gekühlten Effektorzellen wurden in das runde Zentrifugenröhrchen mit den gewaschenen Beads überführt und für 30 Minuten bei 4° C in einem Dynal[®] Sample Mixer inkubiert. Nach erneuter Einwirkung des Magnetfeldes für 2 – 3 Minuten wurde der Überstand, also die CD4⁺- oder CD8⁺-freie Zellsuspension, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl im Überstand erfolgte das Ansetzen eines RBA mit dem jeweiligen Effektor-Zielzellverhältnis (s. oben) und die Bestimmung der Zellzusammensetzung im Advia nach dem Depletionsvorgang.

Die Bindung CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen an die gekoppelten Beads wurde bei jedem Effektorzellisolat nach Resuspendierung lichtmikroskopisch überprüft. Auf gleiche Weise konnte in Vorversuchen eine Kreuzreaktivität der isolierten Effektorzellen mit den Sekundärantikörpern auf den Beads (also mit Dynabeads[®] M-450 Sheep anti-Rat IgG und mit Dynabeads[®] M-450 Sheep anti-Mouse IgG) ausgeschlossen werden.

Um die Bindung der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen an die gekoppelten Beads besser darzustellen, wurde nach Depletion dieser Zellen von einigen Effektorzellisolaten Zytozentrifugenpräparate hergestellt (s. 3.1.4.3), mit Kernechtrot gefärbt und in Ölimmersion fotografiert.

3.1.5.3 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der an Dynabeads[®] gebundenen CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen

Zur Darstellung der bereits im Lichtmikroskop beobachteten Rosettenbildung wurden zusätzlich rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dazu wurden die nach 3.1.5.2 gewonnenen gebundenen CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen zunächst nochmals mit ihrem jeweiligen Waschpuffer, anschließend in reiner HBSS (PAA Laboratories, Cölbe) 1-mal gewaschen. Nach Resuspendierung des Pellets in 100 μ I HBSS wurden 250 μ I 1,2 %ige Glutaraldehyd-Fixierungslösung in 0,1 M Cacodylatpuffer zugegeben (s. Anhang). Nach einer Fixierung bei Zimmertemperatur für 1 Stunde wurde 2-mal mit 0,166 M Cacodylatpuffer gewaschen (s. Anhang). Die Nachfixierung erfolgte in 200 μ I 1 % OsO₄ in 0,1 M Cacodylatpuffer über Nacht (s. Anhang). Am nächsten Morgen wurde erneut mit 250 μ I 0,166 M Cacodylatpuffer gewaschen, in 50 μ I 0,166 M Cacodylatpuffer gewaschen, in 50 μ I 0,166 M Cacodylatpuffer seiter Suspendiert und anschließend 1 Tropfen der Suspension in die Vertiefung einer speziellen Metallkammer, deren Boden und nach Verschluss auch deren obere Öffnun-

gen mit Filterpapier zum Durchströmen mit Flüssigkeiten verschlossen wurden, auf ein vorher in die Metallkammer eingelegtes, mit einem Locher ausgestanztes Staniolplättchen überführt (BURKHARDT, 1980). Danach wurden die Zellen in der Kammer durch Einhängen in die verschiedenen Bäder einer aufsteigenden n-Propanol-Reihe entwässert (30 %, 50 %, 70 %, 90 % je 1 x für 10 Minuten, sowie 3 x für 10 Minuten in 100 % n-Propanol) und danach für jeweils 10 Minuten in Mischungen aus Alkohol und Isoamylacetat überführt (Mischungen 3:1, 1:1, 1:3 und 2 x reines Iso-amylacetat). Anschließend wurde die Trocknungskammer zur Kritischen-Punkt-Trocknung (E 2000 II, Polaron Equipment, Wetford, Herdfordshire) mit CO₂ gespült, um überschüssigen Alkohol zu entfernen. Es folgte die Trocknung des Präparates in der Druckkammer nach Aufheizen des flüssigen CO₂ am kritischen Punkt bei 41° C und 86 bar. Nach Befestigung der Staniolplättchen mit den getrockneten Zellen auf einem Präparatträger für die Rasterelektronenmikroskopie mit flüssigem Graphit (Taab Laboratories Equipment Limited, England, C126) konnte das Präparat mit Gold bedampft werden (Sputter-Gerät Balzers Union, Liechtenstein). Die Untersuchung der Präparate erfolgte im Rasterelektronenmikroskop des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Digital Scanning Microscope DSM 940, Zeiss, Deutschland), die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer eingebauten Kleinbildkamera auf Rollfilm angefertigt.

3.1.6 Untersuchung von Zellkulturüberständen auf spontane zytotoxische Aktivität nach Koninkubation von Ziel- und Effektorzellen

Um eine zytotoxische Aktivität von Zellkulturüberständen nach 14-stündiger Koinkubation von Ziel- und Effektorzellen und damit eine mögliche Bedeutung löslicher Faktoren zu untersuchen, wurde zunächst ein Zytotoxizitätstest (RBA) mit Percoll[®]-isolierten Effektorzellen bei einer E/T ratio von 100:1 angesetzt (Platte I, Schema 4; s. auch 3.1.3). Dabei wurden die isolierten Effektorzellen auf Platte I allerdings nicht nur mit, sondern auch ohne Zielzellkontakt (CTAC- und Verozellen) inkubiert (Schema 4). Unmittelbar vor Durchführung des RBA mit Platte I wurden je 120 µl der Überstände von Platte I auf eine zweite 96-Loch-Flachbodenplatte mit CTAC- und Vero-Zellen als Zielzellen überführt (Platte II, Schema 4). Anschließend wurde die Zytotoxizität zunächst auf Platte I mittels RBA bestimmt, nach Ablauf der Inkubationszeit von 14 Stunden wurde auch auf Platte II ein RBA durchgeführt (s. 3.1.3).



Schema 4: Untersuchung auf Zytotoxizität der Überstände (Versuchsaufbau)

Das relativ geringe Volumen von 120 µl wurde gewählt, um ein Überführen noch intakter Effektorzellen beim Abpipettieren und damit eine Zellkontamination der Überstände möglichst auszuschließen.

Die Überführung erfolgte dabei grundsätzlich ohne vorherige Zentrifugation, da in Vorversuchen bei einem Volumen von 120 µl kein Unterschied in der Zytotoxizität zwischen der Übertragung zentrifugierter und unzentrifugierter Überstände festgestellt werden konnte (Daten nicht dargestellt). Lediglich bei den Effektorzellen, die ohne Zielzellkontakt auf Platte I inkubiert wurden, wurde vor der Überführung eine Zentrifugation vorgenommen, um ein Übertragen noch aktiver Effektorzellen und damit ein falsch positives Ergebnis zu verhindern.

3.1.7 Einfluss von Haltung und Geschlecht der Blutspender auf die Zytotoxizität

Da für die durchgeführten Untersuchungen teilweise nicht genügend Klinikhunde zur Verfügung standen, mussten auch Beagle aus privaten Haushalten als Blutspender herangezogen werden. Um einen möglichen Einfluss der Haltungsform und des Geschlechts auf die Zytotoxizität zu untersuchen, wurden die Hunde in Klinikhunde und Privathunde eingeteilt (s. 3.1.1; Tabelle 7 im Anhang).

Anschließend wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung der Zytotoxizitäten beider Gruppen bei den Effektor-Zielzellverhältnissen 100:1 und 50:1 direkt nach Percoll[®]-Isolierung ermittelt. Mit diesen Daten wurde dann eine zweifaktorielle Varianzanalyse für unabhängige Stichproben durchgeführt, bei der auch das Geschlecht der untersuchten Tiere Berücksichtigung fand.

In einem Fall wurde ein Hund sowohl als Klinikhund als auch später als Privathund zur Blutentnahme herangezogen. Dabei handelte es sich um die Beaglehündin Tine, Hund Nummer 14 bzw. 31 (Tabelle 7 im Anhang).

3.1.8 Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität

Des Weiteren sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Lymphozytenreinheit und ermittelter Zytotoxizität untersucht werden. Dafür wurden zunächst der direkt nach Percoll[®]-Isolierung mittels Advia bestimmte Lymphozytenanteil und die ermittelte Zytotoxizität aller Blutspendertiere bei einer E/T ratio von 100:1 und 50:1 gegenübergestellt. Die Analyse dieser Daten erfolgte anschließend anhand einer linearen Regression.

3.1.9 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen erfolgte an den Rechnern der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dabei wurden die statistischen Auswertungen unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/-Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993) durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit Hilfe des Programms PlotIT für Windows (Version 3.20h, EISENSMITH, 1994) erzeugt.

Sofern eine Normalverteilung vorlag, wurden arithmetische Mittelwerte (x) und Standardabweichungen (s) bestimmt, bei schiefer Verteilung erfolgte eine logarithmische Transformation der Daten und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten (x_g) und Streufaktoren (SF).

Der Einfluss der Adhärenz sowie einer zusätzlichen Phagozytose auf Zahl und Anteil der Leukozytenarten sowie auf die Zytotoxizität wurde mit einem t-Test für verbundene Stichproben mit dem Programm BMDP 3D untersucht.

Die Auswertungen bezüglich eines Einflusses der Depletion CD4⁺- und CD8⁺-Zellen auf Zahl und Anteil der Leukozytenarten sowie auf die Zytotoxizität erfolgten bei Normalverteilung mit Hilfe eines t-Tests für abhängige Stichproben, bei schiefer Verteilung mit dem Wilcoxon-Test (Programm BMDP 3D).

Auch das Vorliegen einer spontanen zytotoxischen Aktivität von Zellkulturüberständen nach Koinkubation von Ziel- und Effektorzellen wurde anhand eines t-Tests überprüft, allerdings anhand paarweiser Vergleiche für die Zielgröße "Zytotoxizität" (Programm BMDP 3D).

Eine Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität wurde mit einem t-Test auf lineare Abhängigkeit ebenfalls mit dem Programm BMDP 3D überprüft.

Die Bestimmung eines Einflusses von Haltung und Geschlecht auf die Zytotoxizität erfolgte mit dem Programm BMDP 7D im Rahmen einer zweifaktoriellen Varianzanalyse für unabhängige Stichproben. Bei der Benennung der Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

- $p \le 0,001$: hoch signifikant
- $p \le 0,01$: signifikant
- $p \le 0,05$: schwach signifikant
- p > 0,05 : nicht signifikant

In den Grafiken und Tabellen gibt "n" jeweils die Zahl der untersuchten Hunde an.

4 ERGEBNISSE

4.1 Quantitativer Nachweis zytotoxischer Aktivität

4.1.1 Gesamtleukozytenzahl und Differentialblutbild

Die Gesamtleukozytenzahl der klinisch unauffälligen Beagle-Hunde lag mit ihrem arithmetischem Mittelwert von 7,31 x 10^9 /l innerhalb des von KRAFT et al. (1999) angegebenen Referenzbereichs für die Tierart Hund von 6 - 12×10^9 /l Leukozyten im peripheren Blut (Tabelle 1). Auch die arithmetischen Mittelwerte der einzelnen Leukozytenarten verließen die genannten Referenzbereiche nicht. Einzig der Anteil der Monozyten überschritt mit einem Prozentsatz von 5,45 leicht den Referenzbereich von 0 - 4 %.

Leakezytenaten in penpheren Diat (Aavia messang)				
	Referenzbereich	Blutspendehunde		
Gesamtleukozytenzahl [10 ⁹ /l]	6 - 12	7,31 ± 2,98		
Neutrophile Granulozyten [%]	55 - 75	60,78 ± 8,04		
Neutrophile Granulozyten [10 ⁹ /l]	3 - 9	4,51 ± 2,33		
Lymphozyten [%]	13 - 30	29,4 ± 7,32		
Lymphozyten [10 ⁹ /l]	1 - 3,6	2,10 ± 0,78		
Eosinophile Granulozyten [%]	0 - 6	2,85 ± 1,63		
Eosinophile Granulozyten [10 ⁹ /l]	0,04 - 0,6	0,23 ± 0,19		
Monozyten [%]	0 - 4	5,45 ± 2,70		
Monozyten [10 ⁹ /I]	0,04 - 0,5	0,38 ± 0,18		

Tabelle 1:Referenzbereiche und Mittelwerte (Minimum, Maximum) der Gesamt-
leukozytenzahl sowie der relativen und absoluten Zellzahlen der einzelnen
Leukozytenarten im peripheren Blut (Advia-Messung)

4.1.2 Isolierung von Effektorzellen

Bei der Isolierung von Effektorzellen mittels Zentrifugation über einen Percoll[®]-Dichtegradienten von 58,5 % konnte eine Lymphozytenreinheit von über 90 % erzielt werden. Im Verhältnis dazu stellte sich der Anteil "kontaminierender" Zellen mit einem Prozentsatz von jeweils 4 % oder weniger als relativ gering dar (Grafik 1, Tabelle 8 im Anhang).



Grafik 1: Mittelwerte der relativen Anteile einzelner Leukozyten [%] nach Percoll[®]-Isolierung; n = 74

4.1.3 Depletion adhärenter Zellen

4.1.3.1 Einfluss der Adhärenz auf die Zellzusammensetzung

Die **Gesamtleukozytenzahl** verringerte sich durch Adhärenz von einem geometrischen Mittelwert von 4,72 x 10^{9} /l direkt nach Percoll[®]-Isolierung auf einen geometrischen Mittelwert von 2,34 x 10^{9} /l nach Adhärenz (Tabelle 2, Tabellen 9b-c im Anhang). Diese Reduktion erwies sich mit einem p-Wert von p < 0,001 als statistisch hoch signifikant.

Bei den relativen Anteilen der **Leukozyten** konnte ein leichter Anstieg des **Lymphozytenanteils** von 91,6 % direkt nach Percoll[®]-Isolierung auf 92,49 % nach Adhärenz festgestellt werden. Dieser Anstieg stellte sich jedoch als nicht signifikant heraus (Grafik 2, Tabelle 2, Tabellen 9b-c im Anhang).

	vor Adhärenz	nach Adhärenz
Zellzahl Advia [10 ⁹ /l] ¹⁾	4,72 ; 2,19	2,34 ; 2,30
Lymphozyten [%] ²⁾	91,60 ± 4,71	92,49 ± 4,58
Neutrophile Granulozyten [%] 1)	1,04 ; 1,95	1,03 ; 2,03
Eosinophile Granulozyten [%] 1)	3,53 ; 1,95	2,92 ; 2,14
Monozyten [%] ¹⁾	1,79 ; 2,10	1,47 ; 1,96

Tabelle 2:Gesamtleukozytenzahl isolierter Leukozyten und relative Anteile der Leu-
kozyten am Zellisolat vor und nach Adhärenz; n = 20

 $^{1)}X_{g}$; SF

²⁾ X ± S

Bei den **kontaminierenden Zellen** (Monozyten sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten) resultierte die Adhärenz dagegen in einer geringgradigen Reduktion der relativen Zellanteile der Monozyten und eosinophilen Granulozyten (Grafik 3, Tabelle 2, Tabellen 9b-c im Anhang). Diese Reduktion erwies sich jedoch lediglich bei den eosinophilen Granulozyten mit einem p-Wert von 0,02 als statistisch schwach signifikant, während die Reduktion der Monozyten statistisch nicht signifikant ausfiel. Die relativen Anteile der neutrophilen Granulozyten blieben durch die Adhärenz dagegen nahezu unbeeinflusst (Grafik 3, Tabelle 2, Tabellen 9b-c im Anhang).



Grafik 2: Relativer Anteil isolierter Lymphozyten [%] vor und nach Adhärenz; Mittelwert und Standardabweichung; n = 20



Grafik 3: Relativer Anteil **kontaminierender Zellen** [%] **vor und nach Adhärenz**; geometrischer Mittelwert und Streufaktor; n = 20

4.1.3.1.1 Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten adhärenter Zellen

Bei der **Gesamtleukozytenzahl** der adhärenten Zellen konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden, da es nicht in allen Fällen gelang, die adhärenten Zellen komplett vom Boden der Plastikflaschen abzulösen. Dadurch war die Zahl der untersuchten Hunde, deren Daten in die Statistik einflossen, nur äußerst gering. Dennoch kann festgehalten werden, dass die Zellausbeute der adhärenten Zellen äußerst gering war. Die Daten sind trotz fehlender statistischer Signifikanz in Tabelle 9d im Anhang dargestellt.

Auch von den adhärenten Zellen wurden die relativen Anteile der **Leukozyten** mittels Advia bestimmt, obgleich die Ergebnisse keine statistische Signifikanz aufweisen (s. Gesamtleukozytenzahl). Unter den adhärenten Zellen stellten Lymphozyten mit einem Anteil von ca. 41 % die stärkste Fraktion dar. Aber auch eosinophile und neutrophile Granulozyten waren im arithmetischen Mittel mit ca. 29 % bzw. mit ca. 20 % zahlreich vertreten. Der Anteil der Monozyten betrug dagegen lediglich ca. 8 %, wobei generell hohe Standardabweichungen zu verzeichnen waren (Tabelle 9d im Anhang).

4.1.3.2 Einfluss der Adhärenz auf die spontane zytotoxische Aktivität

Bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 50:1 wurden jeweils arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC-Zellen vor und nach Adhärenz bestimmt. Dabei wird unter der Bezeichnung "vor Adhärenz" die Zytotoxizität der Effektorzellen direkt nach Percoll[®]-Isolierung dargestellt. Vor Adhärenz ergab sich ein arithmetischer Mittelwert der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC-Zellen von 24,2 % (Standardabweichung 17,4 %). Nach Adhärenz halbierte sich dieser Wert bei einer ebenso hohen Standardabweichung annähernd auf 13,3 % (Grafik 4, Tabelle 9e im Anhang). Diese doch beachtliche Reduktion der spontanen Zytotoxizität stellte sich mit einem p-Wert von 0,01 als statistisch signifikant dar.



Grafik 4: **Spontane zytotoxische Aktivität** isolierter Leukozyten [%] gegenüber CTAC- Zellen vor und nach Adhärenz; E/T ratio 50:1; Mittelwert und Standardabweichung; n = 12

4.1.3.2.1 Spontane zytotoxische Aktivität der adhärenten Zellen

Die angestrebte Ermittlung der **Zytotoxizität der adhärenten Zellen** konnte aufgrund zu geringer Zellausbeute (s. oben) nur in drei Fällen mit einem Effektor-Zielzellverhältnis von 50:1 durchgeführt werden. Daher wurde auf die Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

4.1.4 Depletion adhärenter und phagozytierender Zellen

4.1.4.1 Morphologische Darstellung der Eisenphagozytose und des α-Naphtylacetatesterasegehaltes in Monozyten

Zur Charakterisierung von Monozyten wurde neben der Eisenphagozytose gleichzeitig auch der α-Naphtylacetatesterasegehalt beurteilt. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung in Ölimmersion konnten Monozyten aufgrund ihrer dunkelbraunen, körnigen Farbreaktion identifiziert werden. In einigen Monozyten war auch Carbonyleisen als grauschwarze Körnchen im Zytoplasma zu erkennen (Abb. 4a-b). In anderen Leukozyten konnte im Gegensatz dazu kein phagozytiertes Carbonyleisen nachgewiesen werden (Abb. 4a).

4.1.4.2 Einfluss der Phagozytose auf die Zellzusammensetzung

Bei kombinierter Anwendung von Adhärenz und Phagozytose, im Folgenden nur als Phagozytose bezeichnet, konnte eine hoch signifikante Reduktion (p < 0,0001) der **Gesamtleukozytenzahl** im Vergleich zur Leukozytenzahl nach Adhärenz beobachtet werden. Die bereits unter 4.1.3.1 beschriebene hoch signifikante Abnahme der Gesamtleukozytenzahl durch Adhärenz verglichen mit der Gesamtleukozytenzahl nach Percoll[®]-Isolierung bestätigte sich somit (p < 0,0001, Tabelle 3, Tabellen 10b-d im Anhang).

Tabelle 3:Gesamtleukozytenzahl isolierter Leukozyten und relative Anteile der Leukozyten am Zellisolat vor und nach Adhärenz sowie nach Phagozytose; n = 8

	vor Adhärenz	nach Adhärenz	nach Phagozytose
ZZ Advia [10 ⁹ /l] ¹⁾	4,83 ; 1,71	2,62 ; 1,79	1,80 ; 1,63
Lymphozyten [%] 2)	92,71 ± 2,54	93,42 ± 3,17	93,39 ± 3,01
Neutrophile G. [%] 1)	1,56 ; 1,50	1,33 ; 1,62	1,67 ; 3,50
Eosinophile G. [%] ¹⁾	3,34 ; 1,72	2,72 ; 2,05	3,37 ; 2,00
Monozyten [%] 1)	2,10 ; 1,71	1,56 ; 1,89	0,69 ; 1,64

¹⁾ X_g; SF

Nach Bestimmung der relativen **Leukozytenanteile** im Advia vor und nach Adhärenz sowie nach Phagozytose zeigten **Monozyten** nach **Adhärenz** erneut eine nicht signifikante Verringerung ihres relativen Anteils (vgl. 4.1.3.1). Durch zusätzliche **Phagozytose** kam es zu einer weiteren, jetzt allerdings signifikanten Reduktion des relativen Monozytenanteils (p = 0,007). Eine vollständige Monozytendepletion konnte allerdings auch auf diesem Weg nicht erzielt werden (Grafik 5).





Um den Einfluss der durchgeführten Depletionsverfahren auf die Monozytenzahl besser aufzuzeigen, wurde die vor Adhärenz bestimmte Monozytenzahl als 100 % dargestellt (Grafik 6). Durch **Adhärenz** verringerte sich der relative Monozytenanteil um ca. 26 % nicht signifikant (p = 0,22). Erst die Kombination von Adhärenz und Zugabe von Carbonyleisen (**Phagozytose**) bewirkte mit p = 0,007 eine signifikante Reduktion der Monozyten um ca. 67 % (Grafik 6).

Auch nach kombinierter Adhärenz und Phagozytose ist also noch ca. ein Drittel des ursprünglichen Monozytenanteils im Isolat enthalten.



Grafik 6: Relativer Anteil von **Monozyten nach Adhärenz bzw. nach Phagozytose** im Vergleich zum Monozytenanteil vor Adhärenz (entspricht 100 %); geometrischer Mittelwert und Streufaktor; n = 8

Die relativen Anteile von Lymphozyten (Grafik 7) sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Grafik 5) zeigten dagegen nur geringfügige, nicht signifikante Veränderungen. Die unter 4.1.3.1 beschriebene Reduktion des relativen Anteils eosinophiler Granulozyten nach Adhärenz bestätigte sich zwar, stellte sich hier bei einer geringeren Anzahl untersuchter Hunde allerdings nicht als statistisch signifikant dar.



Grafik 7: Relativer Anteil isolierter Lymphozyten [%] vor und nach Adhärenz sowie nach Phagozytose; Mittelwert und Standardabweichung; n = 8

4.1.4.3 Einfluss der Phagozytose auf die spontane zytotoxische Aktivität

Bestimmt wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC- und Vero-Zellen bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1.

Gegenüber **CTAC**-Zellen verringerte sich der nach Adhärenz bestimmte arithmetische Mittelwert der spontanen zytotoxischen Aktivität von 20,2 % um fast die Hälfte auf 10,9 % nach Phagozytose (Grafik 8, Tabelle 10e im Anhang). Mit p = 0,21 war diese Reduktion jedoch nicht statistisch signifikant.

Wegen des hohen Zellverlustes bei den jeweiligen Depletionsverfahren konnte die spontane zytotoxische Aktivität gegenüber **Vero**-Zellen als Negativkontrolle nur nach Adhärenz bestimmt werden, jedoch nicht nach der Kombination von Adhärenz und Phagozytose (Grafik 8). Eine Zytotoxizität gegenüber Vero-Zellen war jedoch nicht nachzuweisen (Grafik 8, Tabelle 10e im Anhang).



Grafik 8: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten [%] nach Adhärenz (CTAC- und Vero-Zellen) sowie nach Phagozytose (CTAC-Zellen); E/T ratio 100:1; Mittelwert und Standardabweichung; n = 8

Wie auch aus Grafik 8 ersichtlich, war bei beiden Depletionsverfahren eine hohe Standardabweichung der spontanen zytotoxischen Aktivität zu beobachten (Tabelle 10e im Anhang).

4.1.5 Depletion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen

4.1.5.1 Morphologische Darstellung der gebundenen Lymphozyten an Dynabeads[®]

Die Bindung CD4⁺- und CD8⁺-Zellen wurde bei jedem Hund nach Inkubation der isolierten Effektorzellen mit den gekoppelten Dynabeads[®] **lichtmikroskopisch** kontrolliert. In Abbildung 5a sind CD8⁺-Zellen nach Kernechtrotfärbung dargestellt, die an mit Primärund Sekundärantikörpern gekoppelte Dynabeads[®] gebunden sind. Dabei war meist die Bindung mehrerer Beads an eine CD8⁺-Zelle zu beobachten, die häufig in einer Rosettenbildung der Beads um eine CD8⁺-Zelle resultierte. Es traten aber auch Agglomerate von mehreren Lymphozyten mit an ihrer Oberfläche gebundenen Magnetkügelchen auf. Gleiches war bei der **rasterelektronenmikroskopischen** Darstellung CD8⁺-Zellen zu beobachten, wobei die Rosettenbildung hier besonders gut zu erkennen war (Abb. 5b, Abb. 6-7).

4.1.5.2 Einfluss der Depletion von CD4⁺-Zellen auf die Zellzusammensetzung

Die **Gesamtleukozytenzahl** verringerte sich durch Inkubation der Percoll[®]-isolierten Effektorzellen mit Rat anti-Dog CD4 deutlich um ca. 58 %. Dabei stellte sich diese Reduktion der Gesamtleukozytenzahl mit einem p-Wert von < 0,0001 hoch signifikant dar (Tabelle 4, Tabellen 11b-c im Anhang).

	vor Depletion	nach Depletion
ZZ Advia [10 ⁹ /l]	7,43 ± 8,42	3,07 ± 4,31
Lymphozyten [%]	92,07 ± 2,44	91,67 ± 3,89
Neutrophile Granulozyten [%]	1,96 ± 1,09	2,72 ± 1,87
Eosinophile Granulozyten [%]	3,19 ± 1,52	3,44 ± 1,59
Monozyten [%]	2,35 ± 1,16	1,82 ± 1,44

Tabelle 4:Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten vor und
nach Depletion CD4⁺-Zellen; Mittelwert und Standardabweichung; n = 19

Nach der Depletion CD4⁺-Zellen konnte bei den verschiedenen **Leukozyten** lediglich ein signifikanter Anstieg des relativen Anteils neutrophiler Granulozyten beobachtet werden (p = 0,03). Ansonsten fiel kein signifikanter Unterschied in der Leukozytenverteilung auf (Grafik 9, Tabelle 4, Tabellen 11b-c im Anhang), insbesondere war auch die geringfügige Abnahme des relativen Lymphozytenanteils statistisch nicht signifikant.





4.1.5.3 Einfluss der Depletion von CD4⁺-Zellen auf die spontane zytotoxische Aktivität

Untersucht wurden die Effektor-Zielzellverhältnisse 100:1, 50:1 und 25:1, wobei jeweils die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC- und Vero-Zellen bestimmt wurden.

Gegenüber **CTAC-Zellen** ergab sich direkt nach Percoll[®]-Isolierung bei einem **Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1** eine zytotoxische Aktivität von 37,3 % im arithmetischen Mittel bei einer Standardabweichung von 31,2 %. Nach Depletion CD4⁺-Zellen konnte dagegen ein arithmetischer Mittelwert der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC-Zellen von 42,0 % mit einer geringeren Standardabweichung von 21,8 % ermittelt werden (Grafik 10, Tabellen 11d-e im Anhang). Dieser geringe Anstieg der Zytotoxizität stellte sich mit einem p-Wert von p > 0,05 jedoch als nicht signifikant dar.

Auch bei den Effektor-Zielzellverhältnissen 50:1 und 25:1 veränderte sich die zytotoxische Aktivität gegenüber CTAC-Zellen nach Depletion CD4⁺-Zellen kaum. Bei dem **Effektor-Zielzellverhältnis von 50:1** zeigte sich mit einem arithmetischen Mittelwert von 44,8 % vor Depletion CD4⁺-Zellen zwar ein leichter Anstieg des arithmetischen Mittelwerts nach Depletion auf 46,7 %. Dieser Anstieg war mit p = 0,59 jedoch nicht signifikant (Grafik 10, Tabellen 11d-e im Anhang).



Grafik 10: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten [%] gegenüber CTAC- Zellen vor und nach Depletion CD4⁺-Zellen; E/T ratio 100:1, 50:1 und 25:1; Mittelwert und Standardabweichung; n = 19

Beim Vergleich der arithmetischen Mittelwerte vor und nach Depletion CD4⁺-Zellen konnte bei dem **Effektor-Zielzellverhältnis von 25:1** sogar ein leichtes Absinken der Zytotoxizität von 31,7 % auf 29,4 % beobachtet werden. Dieser Unterschied war mit p = 0,51 jedoch ebenfalls nicht signifikant (Grafik 10, Tabellen 11d-e im Anhang).
Gegenüber **Vero-Zellen** konnte bei dem **Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1** eine nicht signifikante Reduktion der Zytotoxizität von einem arithmetischen Mittelwert von 2,8 % vor Depletion CD4⁺-Zellen auf –9,9 % nach Depletion dieser Zellen beobachtet werden (Grafik 11, Tabellen 11d-e im Anhang).

Bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 50:1 war ein arithmetischer Mittelwert von 13,9 % vor Depletion sowie ein nahezu unveränderter arithmetischer Mittelwert von 16,0 % nach Depletion zu verzeichnen (p > 0,05; Grafik 11, Tabellen 11d-e im Anhang).

Bei dem ebenfalls untersuchten **Effektor-Zielzellverhältnis von 25:1** war dagegen ein Absinken des arithmetischen Mittelwerts der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber Vero-Zellen von 11,8 % vor Depletion CD4⁺-Zellen auf 3,0 % nach Depletion dieser Zellen zu beobachten. Auch in diesem Fall stellte sich das Absinken der Zytotoxizität jedoch als nicht signifikant dar (Grafik 11, Tabellen 11d-e im Anhang).

Wie in Grafik 11 weiterhin zu sehen ist, ergab sich bei Bestimmung der Zytotoxizität bei allen eingesetzten Effektor-Zielzellverhältnissen eine relativ hohe Standardabweichung (s. auch Tabellen 11d-e im Anhang).



Grafik 11: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten [%] gegenüber Vero-Zellen vor und nach Depletion CD4⁺-Zellen; E/T ratio 100:1, 50:1 und 25:1; Mittelwert und Standardabweichung; n = 19

4.1.5.4 Einfluss der Depletion von CD8⁺-Zellen auf die Zellzusammensetzung

Die Depletion CD8⁺-Zellen resultierte in einer Reduktion der **Gesamtleukozytenzahl** von etwas mehr als 50 %. Dabei erwies sich die Erniedrigung der Zellzahl mit p = 0,0001 als hoch signifikant (Tabelle 5, Tabellen 12b-c im Anhang).

Tabelle 5:	Gesamtle	eukozytenzahl	und	relative	Anteile	der	Leukozyten	vor	und
	nach De	pletion CD8 ⁺ -2	Zeller	n; Mittelw	ert und	Stand	dardabweichu	ng; n	= 18

	vor Depletion	nach Depletion
ZZ Advia [10 ⁹ /l]	8,39 ± 6,62	$3,85 \pm 3,30$
Lymphozyten [%]	91,88 ± 3,16	91,15 ± 2,81
Neutrophile Granulozyten [%]	1,55 ± 1,53	1,92 ± 1,54
Eosinophile Granulozyten [%]	3,89 ± 2,36	4,04 ± 2,31
Monozyten [%]	2,17 ± 1,20	2,21 ± 1,37



Grafik 12: Relative Anteile isolierter Leukozyten [%] vor und nach Depletion CD8⁺-Zellen; Mittelwert und Standardabweichung; n = 18

Ein signifikanter Einfluss der Depletion CD8⁺-Zellen auf die **Leukozytenarten** konnte nicht beobachtet werden (Tabelle 5, Tabellen 12b-c im Anhang, Grafik 12).

4.1.5.5 Einfluss der Depletion von CD8⁺-Zellen auf die spontane zytotoxische Aktivität

Bestimmt wurden erneut jeweils die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC- und Vero-Zellen bei den Effektor-Zielzellverhältnissen 100:1, 50:1 und 25:1.

Gegenüber **CTAC-Zellen** ergab sich direkt nach Percoll[®]-Isolierung bei einem **Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1** ein arithmetischer Mittelwert der zytotoxischen Aktivität von 28,1 % bei einer Standardabweichung von 35,0 %. Nach Depletion CD8⁺-Zellen erhöhte sich dieser Wert auf 43,1 % bei einer Standardabweichung von 23,0 %. Dieser Anstieg der zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC-Zellen um den Faktor 1,5 war mit einem p-Wert von 0,07 jedoch statistisch nicht signifikant (Grafik 13, Tabellen 12d-e im Anhang).

Bei den Effektor-Zielzellverhältnissen 50:1 und 25:1 konnten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC-Zellen nach Depletion CD8⁺-Zellen beobachtet werden. Bei dem **Effektor-Zielzellverhältnis von 50:1** betrug der arithmetische Mittelwert der Zytotoxizität vor Depletion CD8⁺-Zellen 36,0 % bei einer Standardabweichung von 21,0 %. Der arithmetische Mittelwert nach Depletion lag fast unverändert bei 37,3 % (Standardabweichung 15,5 %).

Bei dem **Effektor-Zielzellverhältnis von 25:1** war mit einem arithmetischen Mittelwert von 15,3 % vor Depletion CD8⁺-Zellen und einem Mittelwert von 19,6 % nach der Depletion ebenfalls ein nur geringfügiger Anstieg zu verzeichnen. Die Standardabweichung erwies sich in beiden Fällen als hoch (Grafik 13, Tabellen 12d-e im Anhang).



Grafik 13: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten [%] gegenüber CTAC-Zellen vor und nach Depletion CD8⁺-Zellen; E/T ratio 100:1, 50:1 und 25:1; Mittelwert und Standardabweichung; n = 18

Gegenüber Vero-Zellen konnte bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1 ein statistisch nicht signifikanter Anstieg der zytotoxischen Aktivität nach Depletion CD8⁺-Zellen von 8,0 % auf 18,9 % festgestellt werden (arithmetische Mittelwerte, p = 0,06). Die Standardabweichung lag jeweils bei etwa 20 % (Grafik 14, Tabellen 12d-e im Anhang).

Bei den Effektor-Zielzellverhältnissen 50:1 und 25:1 war ebenfalls ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Zytotoxizität gegenüber Vero-Zellen zu verzeichnen. Dabei stieg der arithmetische Mittelwert der spontanen zytotoxischen Aktivität bei dem **Effektor-Zielzellverhältnis 50:1** von - 4,4 % vor auf (+) 4,4 % nach Depletion CD8⁺-Zellen.

Bei einem **Effektor-Zielzellverhältnis von 25:1** betrug die mittlere Zytotoxizität vor Depletion CD8⁺-Zellen 1,3 %. Nach Depletion erhöhte sich der arithmetische Mittelwert auf 9,1 % (p > 0,05, Grafik 14, Tabellen 12d-e im Anhang).



Grafik 14: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten [%] gegenüber Vero-Zellen vor und nach Depletion CD8⁺-Zellen; E/T ratio 100:1, 50:1 und 25:1; Mittelwert und Standardabweichung; n = 18

4.2 Zytotoxizität von Zellkulturüberständen nach Koinkubation von Ziel- und Effektorzellen

4.2.1 Isolierung von Effektorzellen

Die Ergebnisse der Percoll[®]-Isolierung (s. 3.1.2) sind in Tabelle 6 und in Tabelle 13b im Anhang dargestellt. Die Werte für die **Gesamtleukozytenzahl** und die relativen Anteile der einzelnen **Leukozytenarten** liegen in ähnlicher Höhe wie diejenigen der bereits durchgeführten Isolierungen (Tabellen 10b, 11b, 12b im Anhang).

	Percoll [®] -Isolierung
Zellzahl Advia [10 ⁹ /l] 1)	6,92 ; 2,82
Lymphozyten [%] ²⁾	89,34 ± 3,79
Neutrophile Granulozyten [%] 1)	1,86 ; 1,86
Eosinophile Granulozyten [%] 1)	3,09 ; 2,14
Monozyten [%] ¹⁾	3,80 ; 1,66

Tabelle 6: Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten nach Percoll[®]-Isolierung; n = 8

¹⁾ X_g; SF

²⁾ X ± S

4.2.2 Spontane zytotoxische Aktivität von Zellkulturüberständen

Der auf Platte I durchgeführte Nachweis spontaner zytotoxischer Aktivität der direkt nach Percoll[®]-Isolierung erhaltenen Effektorzellen (**Zytox 1**) ergab im arithmetischen Mittel eine zytotoxische Aktivität gegenüber **CTAC**-Zellen von 30,9 % bei einer Standardabweichung von 18,2 % (Schema 5, Grafik 15, Tabelle 13c im Anhang). Der arithmetische Mittelwert der Zytotoxizität gegenüber **Vero**-Zellen betrug dagegen -9,6 % mit einer sehr hohen Standardabweichung von 31,8 % (Grafik 16, Tabelle 13d im Anhang). Dabei stellte sich der Unterschied zwischen der spontanen zytotoxischen Aktivität von CTAC-Zellen und Vero-Zellen mit p = 0,006 statistisch signifikant dar.

Bei der anschließend überprüften spontanen zytotoxischen Aktivität von Kulturüberständen der Platte I (**Zytox 2**, Schema 5) konnte sowohl gegenüber CTAC- als auch gegenüber Vero-Zellen keine spontane zytotoxische Aktivität gemessen werden. Der arithmetische Mittelwert der Zytotoxizität der Überstände gegenüber **CTAC**-Zellen betrug 4,2 % bei einer Standardabweichung von 2,5 % (Grafik 15, Tabelle 13c im Anhang). Mit einem p-Wert von p = 0,002 stellte sich dieses Ergebnis ebenfalls statistisch signifikant dar.



Schema 5: Zytotoxizität der Überstände (Versuchsaufbau)

Der arithmetische Mittelwert der spontanen Zytotoxizität gegen **Vero**-Zellen lag mit -2,0 % und einer Standardabweichung von 8,9 % im negativen Bereich (p > 0,05, Grafik 16, Tabelle 13d im Anhang).

Somit war weder gegenüber CTAC- noch gegenüber Vero-Zellen eine spontane zytotoxische Aktivität der Zellkulturüberstände nachweisbar.

Auch die zentrifugierten Überstände der Effektorzellen, die vor Überführen auf Platte II noch keinen Zielzellkontakt hatten, zeigten praktisch keine Zytotoxizität **(Zytox 3**, Schema 5).



Grafik 15: **Spontane zytotoxische Aktivität Percoll®-isolierter Leukozyten** und deren **Überstände** [%] gegenüber **CTAC-Zellen**; Mittelwert und Standardabweichung; n = 8



Grafik 16: **Spontane zytotoxische Aktivität Percoll[®]-isolierter Leukozyten** und deren Überstände [%] gegenüber Vero-Zellen; Mittelwert und Standardabweichung; n = 8

4 Ergebnisse

Gegenüber **CTAC**-Zellen konnte ein arithmetischer Mittelwert der spontanen Zytotoxizität von lediglich 3,2 % mit einer Standardabweichung von 5,0 % gemessen werden (Grafik 15, Tabelle 13c im Anhang), mit einem p-Wert von p > 0,05 war dieses Ergebnis jedoch statistisch nicht signifikant.

Auch gegenüber **Vero**-Zellen war mit einem arithmetischen Mittelwert der spontanen Zytotoxizität von -7,1 % keine zytotoxische Aktivität nachweisbar (p = 0,04, Grafik 16, Tabelle 13d im Anhang).

Der Vergleich der unter Zytox 2 und Zytox 3 ermittelten Zytotoxizitäten erwies sich mit p jeweils > 0,05 weder gegenüber CTAC-Zellen noch gegenüber Vero-Zellen als statistisch signifikant.

4.3 Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität

Weder bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1 noch von 50:1 ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang (p > 0,05) zwischen der durchschnittlichen Zytotoxizität und dem relativen Lymphozytengehalt der isolierten Zellsuspension, wie dies anhand einer linearen Regressionsanalyse untersucht wurde (Grafiken 17 und 18, Tabellen 14a-b im Anhang).



Grafik 17: Lineare Regressionsanalyse von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität; E/T ratio 100:1; n = 46



Grafik 18: Lineare Regressionsanalyse von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität; E/T ratio 50:1; n = 14

4.4 Einfluss der Haltung und des Geschlechts der Blutspender auf die Zytotoxizität

Nach Einteilung der untersuchten Hunde in Haltungsgruppen (s. 3.1.1, Tabelle 7 im Anhang) ergab sich bei einem **Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1** ein deutlicher Unterschied zwischen den zu vergleichenden Gruppen (Grafik 19). Für die Gruppe der Klinikhunde konnte insgesamt (männliche und weibliche Tiere zusammengenommen) ein arithmetischer Mittelwert der spontanen zytotoxischen Aktivität von 28,7 % ermittelt werden, der in der Gruppe der Privathunde auf 60,1 % anstieg (Tabellen 15a-b im Anhang). Die Standardabweichung lag mit 16,4 % bei den Klinikhunden und 21 % bei den untersuchten Privathunden jeweils in einem ähnlichen Bereich. Der beobachtete Gruppenunterschied war mit p = 0,003 statistisch signifikant.



Grafik 19: Spontane zytotoxische Aktivität von Klinikhunden und Privathunden in [%] gegenüber CTAC-Zellen; E/T ratio 100:1 und 50:1; Mittelwert und Standardabweichung

Bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1 können zum Vergleich der Zytotoxizitäten der Klinik- und Privathunde auch die Ergebnisse des Hundes "Tine" herangezogen werden, deren Blut sowohl als Klinikhund als auch zu einem späteren Zeitpunkt als Privathund für die Untersuchungen zur Verfügung stand. Auch hier zeigte sich ein Anstieg der zytotoxischen Aktivität von 58,3 % in Gruppenhaltung in der Klinik auf 89,5 % nach Blutentnahme in Privathaltung (Tabellen 15a-b im Anhang, Hund Nr. 14 bzw. 31).

4 Ergebnisse

Im Gegensatz dazu stellten sich die Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität der Vergleichsgruppen bei einem **Effektor-Zielzellverhältnis von 50:1** als nicht signifikant dar. Hier lag der arithmetische Mittelwert der spontanen Zytotoxizität mit 29,4 % in der Gruppe der Klinikhunde zwar unter dem der Privathunde mit 38,6 %, unterschied sich jedoch nicht so deutlich wie bei dem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1 (Grafik 19). Die Standardabweichung betrug bei den Klinikhunden 18,4 % sowie 24,2 % bei den Privathunden (Tabellen 15c-d im Anhang).

Bei der Untersuchung eines Geschlechtseinflusses auf die spontane zytotoxische Aktivität der verschiedenen Haltungsgruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

5 DISKUSSION

5.1 Monozyten

5.1.1 Depletion von Monozyten

5.1.1.1 Adhärenz

Die Adhärenz wurde bei Mensch (HELFAND et al., 1982) und Schwein (YANG et al., 1987) als effektives und gut durchführbares Verfahren zur Depletion oder zur Gewinnung von Monozyten beschrieben. Auch beim Hund wurde die Adhärenz zur Monozytendepletion eingesetzt (KNAPP et al., 1993). In vorliegender Arbeit zeigten jedoch Monozyten des Hundes eine geringere Adhärenz als die von Mensch und Schwein. So erzielten YANG et al. (1987) beim Schwein eine Monozytenreinheit der adhärenten Zellen von über 99 %. Auch beim Menschen handelte es sich bei den adhärenten Zellen mit einem Anteil von mehr als 95 % hauptsächlich um Monozyten (HELFAND et al., 1982). So verringerte sich in den Untersuchungen von HELFAND et al. (1982) der Anteil der Monozyten am Isolat von 10 - 25 % vor Adhärenz auf weniger als 1 % Monozyten nach Adhärenz. Beim Hund wurde in vorliegender Untersuchung durch Adhärenz dagegen lediglich eine nicht signifikante Reduktion der Monozyten um ca. 26 % erzielt. Auch KRAKOWKA et al. (1983/1984) konnten beim Hund durch Adhärenz selten mehr als 50 % der ursprünglich vorhandenen Monozyten entfernen.

Die in vorliegender Arbeit beobachtete Reduktion der Gesamtleukozytenzahl durch Adhärenz stellte sich beim Hund mit ungefähr 50 % höher dar (Ergebnis hoch signifikant) als die von BERMAN et al. (2000) für den Menschen beschriebene Reduktion um durchschnittlich ein Drittel. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass beim Hund neben Monozyten auch andere Leukozytenarten eine Adhärenz an Plastikoberflächen zeigen. SHAW et al. (1984) bestimmten unter den adhärenten Zellen einen Anteil an Monozyten von 67 %. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten zeigten in ihrer Untersuchung ebenfalls eine Adhärenz. KURZMANN et al. (1993) beobachteten beim Hund auch eine Adhärenz eosinophiler Granulozyten. Ihren Untersuchungen zufolge befanden sich etwa 50 % Lymphozyten sowie etwa 8 % eosinophile Granulozyten und nur ca. 43 % Monozyten unter den adhärenten Zellen, was im Widerspruch zu der von HELFAND et al. (1982) und YANG et al. (1987) erwähnten Dominanz der Monozyten unter den adhärenten Zellen steht.

Somit kann beim Hund keine sichere Depletion von Blutmonozyten durch Adhärenz alleine erreicht werden. Dies entspricht den Ergebnissen von KRAKOWKA et al. (1983/ 1984), die für den Hund auch Monozyten beschreiben, welche nicht adhärent sind und somit von einer Depletion durch Adhärenz nicht erfasst werden. Auch DE BRUIN et al. (2005) beobachteten nach Adhärenz noch einen relativen Monozytenanteil von 8 % im Isolat.

5.1.1.2 Phagozytose

Die Zugabe von Carbonyleisen zu Blut oder zu einem Isolat erfolgt, um zusätzlich zu den adhärenten Eigenschaften auch phagozytierende Eigenschaften einiger Leukozytenarten für ihre Depletion zu nutzen (RASKIN et al., 1989; KRAKOWKA et al., 1983/ 1984). KRAKOWKA et al. (1983/1984) und DE BRUIN et al. (2005) steigerten beim Hund die mittels Adhärenz erzielte Reinheit eines Isolats durch zusätzliche Carbonyleisenphagozytose und erreichten so eine effektivere Monozytendepletion. RINGLER et al. (1985) konnten durch Inkubation mit Carbonyleisen den Anteil phagozytierender Zellen von 9 – 14 % nach Isolierung über Ficoll-Hypague auf 0 – 2 % im Zellisolat reduzieren. Dies entspricht den Ergebnissen vorliegender Arbeit. Auch hier verblieben nach Carbonyleisenphagozytose im Mittel 0,69 % Monozyten im Zellisolat (geometrischer Mittelwert). Allerdings wird durch eine Kombination von Adhärenz und Phagozytose genau wie nach Adhärenz alleine keine vollständige Monozytendepletion beim Hund erreicht. KRAKOWKA et al. (1983/1984) führten diese Tatsache auf die Existenz nichtadhärenter, nichtphagozytierender Monozyten zurück. So erzielten sie in ihren Untersuchungen durch Adhärenz selten eine Reduktion der Monozyten um mehr als 50 %. Durch zusätzliche Carbonyleisenphagozytose erhöhte sich diese Reduktion hingegen auf rund 75 %, was den hier gefundenen Ergebnissen in etwa entspricht.

Die in der Literatur beschriebene verstärkte Monozytendepletion durch eine Kombination von Adhärenz und Carbonyleisenphagozytose im Vergleich zu alleiniger Adhärenz bestätigte sich somit im Rahmen vorliegender Arbeit, und die Ergebnisse erwiesen sich mit p = 0,007 auch als statistisch signifikant.

Durch Carbonyleisenzugabe muss allerdings im Vergleich zur Adhärenz alleine eine weitere, statistisch hoch signifikante (p < 0,001) Reduktion der Gesamtleukozytenzahl in Kauf genommen werden.

5.1.1.3 Immunomagnetische Separation

Sowohl die Depletion CD4⁺-Zellen als auch die Depletion CD8⁺-Zellen hatte keinen signifikanten Einfluss auf den prozentualen Monozytenanteil im Zellisolat. Dennoch war ein unspezifischer Zellverlust bei den Monozyten festzustellen, da der nach Depletion CD4⁺- und CD8⁺-Zellen eigentlich zu erwartende Anstieg der relativen Anteile anderer Leukozytenarten bei den Monozyten nicht beobachtet werden konnte. Eine unspezifische Bindung von Leukozyten an Dynabeads[®] konnte als Ursache hierfür in Vorversuchen bereits ausgeschlossen werden, nachdem isolierte Leukozyten mit Dynabeads[®] Sheep anti-Rat bzw. Dynabeads[®] Sheep anti-Mouse ohne entsprechende Primärantikörper auf den Beads inkubiert wurden. GEE et al. (1991) wirkten einem unspezifischen Zellverlust bei Depletion über immunomagnetische Separation durch Erhöhung des Volumens der Suspensionsflüssigkeit entgegen, um zwischen den Beads "gefangene", aber nicht über spezifische Antikörper gebundene Zellen in den Überstand zu überführen. In vorliegender Arbeit wurde allerdings schon mit relativ großen Flüssigkeitsvolumina gearbeitet. Somit dürfte für den beobachteten Zellverlust der Leukozyten in erster Linie eine Adhärenz dieser Zellen an der Glasoberfläche des bei Depletion verwendeten Zentrifugenröhrchens verantwortlich gewesen sein. Eine eindeutige Klärung dieser Frage war im Rahmen dieser Untersuchungen allerdings nicht möglich.

5.1.2 Einfluss der Monozyten auf die spontane Zytotoxizität

Der arithmetische Mittelwert der spontanen zytotoxischen Aktivität von Effektorzellen gegenüber CTAC-Zellen halbierte sich nach Adhärenz bei einer E/T ratio von 50:1 statistisch signifikant (p = 0,01). Auch nach der kombinierten Anwendung von Adhärenz und Phagozytose reduzierte sich die spontane zytotoxische Aktivität gegenüber CTAC-

5 Diskussion

Zellen im Vergleich zur Adhärenz um annähernd die Hälfte (E/T ratio 100:1). Diese Reduktion erwies sich jedoch mit einem p-Wert von 0,21 als nicht signifikant.

Demnach muss die spontane zytotoxische Aktivität sowohl von adhärenten als auch von phagozytierenden Zellen positiv beeinflusst werden. Da jedoch verschiedene Leukozytenarten eine Adhärenz zeigen bzw. zur Phagozytose befähigt sind (SHAW et al., 1984; KURZMANN et al., 1993; RIVAS et al., 1995; ROITT et al., 1995), ist noch nicht abschließend geklärt, welche Leukozyten für das Absinken der Zytotoxizität verantwortlich sind.

Monozyten, deren prozentualer Anteil durch Adhärenz um 26 % sowie durch zusätzliche Phagozytose um ca. 67 % verringert wurde, wird prinzipiell sowohl eine **direkte** als auch eine **indirekte Beteiligung an der Auslösung einer zytotoxischen Aktivität** zugeschrieben. Zum einen zeigten sie nach Aktivierung selbst eine tumorschädigende Wirkung in vitro (SHAW et al., 1984). Zum anderen wird eine Beeinflussung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen über Sekretion verschiedener Botenstoffe diskutiert, mit deren Hilfe Monozyten sowohl eine inhibitorische als auch eine stimulierende Wirkung auf die Zytotoxizität ausüben (MYSLIWSKA et al., 1992; LOUGHRAN et al., 1985; NOCERA et al., 1983; PONTAROLLO et al., 2002; GUENTHER et al., 1994).

Außerdem wird eine **zeitabhängige Beeinflussung der Zytotoxizität** bei Depletion durch Adhärenz diskutiert. BLOOM et al. (1990) beschrieben beim Menschen nach Depletion der Monozyten durch 60-minütige Adhärenz ein Ansteigen der Zytotoxizität der verbliebenen Effektorzellen. Bei Inkubationszeiten von mehr als 12 Stunden kam es hingegen zu einem Absinken ihrer Zytotoxizität. BLOOM et al. (1990) führten dies auf das **Verhältnis von PGE und IL-1** zurück. Der Gehalt an PGE stieg bei Koinkubation von Effektorzellen und Monozyten mit der Inkubationsdauer an und wirkte sich umgekehrt proportional auf die Zytotoxizität aus (BLOOM et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten der Adhärenz nicht untersucht. Eine Inkubationszeit der Percoll[®]-isolierten Zellen von zwei Stunden wurde gewählt, um auch bei der Kombination von Adhärenz und Carbonyleisenphagozytose eine ausreichend lange Inkubationszeit für die Phagozytose zu gewährleisten.

Ein **inhibitorischer Effekt** von Monozyten auf die spontane zytotoxische Aktivität wird von MYSLIWSKA et al. (1992) für den **Menschen** beschrieben. Dabei war die Suppression der zytotoxischen Aktivität von Monozyten besonders bei Individuen ausgeprägt, bei denen nur eine geringe Zytotoxizität gemessen werden konnte.

Beim **Hund** berichteten LOUGHRAN et al. (1985) ebenfalls von einer Unterdrückung der Zytotoxizität durch Monozyten, da in ihren Untersuchungen die Zytotoxizität nach Depletion von Monozyten und Makrophagen anstieg.

Das in vorliegender Arbeit sowohl nach Adhärenz als auch nach Phagozytose beobachtete Absinken der spontanen Zytotoxizität wurde von anderen Autoren durch eine **Reduktion der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen nach Depletion** von Monozyten und Makrophagen bestätigt. RINGLER et al. (1985) berichteten beim Hund nach Depletion phagozytierender Zellen von einem Absinken der Zytotoxizität von 17 – 66 %. Dabei führten sie diese Reduktion auf die nach Depletion fehlende Abgabe von IFN durch diese Zellen zurück, was auch von PONTAROLLO et al. (2002) für das Rind beschrieben wurde. Nach TAN et al. (1993) erfolgt die Aktivierung von NK-Zellen beim Hund dagegen monozytenunabhängig, was den Untersuchungen von HELFAND et al. (1982) beim Menschen entspricht.

Worauf das Absinken der Zytotoxizität nach Adhärenz und Phagozytose zurückzuführen ist, kann nicht eindeutig beantwortet werden, da neben Monozyten auch alle anderen Leukozytenarten eine Adhärenz zeigen bzw. auch Granulozyten grundsätzlich zur Phagozytose fähig sind. Ein Einfluss von Monozyten auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen konnte jedenfalls nicht nachgewiesen werden.

5.2 Neutrophile Granulozyten

5.2.1 Depletion neutrophiler Granulozyten

5.2.1.1 Adhärenz

Neben Monozyten zeigen auch neutrophile Granulozyten beim Hund eine Adhärenz an Plastikoberflächen (SHAW et al., 1984). Dementsprechend wurde die Adhärenz auch zur Depletion von Granulozyten eingesetzt (FUNK, 2001).

Im Gegensatz dazu stellten sich die relativen Anteile neutrophiler Granulozyten in der hier vorgestellten Untersuchung nach zweistündiger Adhärenz nahezu unverändert dar (s. 4.1.3.1). Eine effektive Depletion neutrophiler Granulozyten durch Adhärenz konnte somit nicht erzielt werden. Dies entspricht den Beobachtungen von DE BRUIN et al. (2005) beim Hund.

5.2.1.2 Phagozytose

Neben der Depletion von Monozyten führt die Zugabe von Carbonyleisen zum Zellisolat auch zur Depletion anderer phagozytierender Leukozyten. RIVAS et al. (1995) setzen die Carbonyleisenphagozytose ein, um neutrophile Granulozyten aus Hundeblut zu entfernen. Dazu versetzten sie Hundeblut mit HBSS und inkubierten es für 1 Stunde bei 39° C im Wasserbad mit Carbonyleisen. Im Rahmen vorliegender Arbeit konnte jedoch keine signifikante Reduktion der neutrophilen Granulozyten durch Carbonyleisenzugabe beobachtet werden. Es trat vielmehr ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der relativen Granulozytenanteile im Zellisolat nach Carbonyleisenzugabe auf. Dieser erklärt sich durch die signifikante Reduktion des relativen Monozytenanteils, da die Leukozytenarten, die durch das Carbonyleisen unbeeinflusst bleiben, dann höhere relative Anteile aufweisen.

Eine statistisch signifikante Depletion neutrophiler Granulozyten durch Carbonyleisenzugabe konnte in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu den Beobachtungen von RIVAS et al. (1995) nicht festgestellt werden, was allerdings den Beobachtungen von DE BRUIN et al. (2005) entspricht.

5.2.1.3 Immunomagnetische Separation

Obwohl CD4 beim Hund von einigen neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (GUEN-THER et al., 1994; WÜNSCHMANN, 1998; BOKEMEYER, 2003), war in vorliegender Arbeit dennoch ein signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten nach Depletion CD4⁺-Zellen im Zellisolat zu beobachten (p = 0,03), der im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen nicht erklärt werden kann. Denkbar wäre eine Depletion aller anderen Leukozyten über eine unspezifische Bindung dieser an Dynabeads[®] als Ursache für den Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Eine solche Bindung konnte in Vorversuchen allerdings ausgeschlossen werden (s. 5.1.1.3).

Die Depletion CD8⁺-Zellen hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die relativen Anteile neutrophiler Granulozyten im Zellisolat.

5.2.2 Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die spontane Zytotoxizität

BLOOM et al. (1986) beobachteten beim Hund keine Beteiligung von Granulozyten an der spontanen zytotoxischen Aktivität, wobei keine Angaben darüber gemacht werden, ob es sich hierbei um neutrophile oder um eosinophile Granulozyten handelt. In ihren Untersuchungen bewirkte die Zugabe von Granulozyten zu den Effektorzellen im CRA keine Veränderung der spontanen Zytotoxizität.

GONDOLF (1994) beschrieb beim Hund dagegen eine schwach signifikant negative Korrelation zwischen dem relativen Anteil neutrophiler Granulozyten im Percoll[®]-Isolat und der Höhe der spontanen Zytotoxizität. Als mögliche Ursachen hierfür vermutete sie zum einen die Behinderung des Zellkontakts zwischen Ziel- und Effektorzellen durch kontaminierende Zellen, zum anderen die mögliche Schädigung oder Inaktivierung der Effektorzellen infolge der Freisetzung verschiedener lysosomaler Enzyme oder reaktiver O₂-Radikale aus geschädigten Granulozyten.

5 Diskussion

Demnach könnten neutrophile Granulozyten einen negativen Einfluss auf die Zytotoxizität ausüben, allerdings müsste die Zytotoxizität dann nach Depletion dieser Zellen ansteigen. In vorliegender Arbeit wurde jedoch ein Absinken der Zytotoxizität nach Adhärenz und Phagozytose beobachtet. Ein negativer Einfluss neutrophiler Granulozyten auf die Zytotoxizität konnte somit nicht festgestellt werden.

5.3 Eosinophile Granulozyten

5.3.1 Depletion eosinophiler Granulozyten

5.3.1.1 Adhärenz

KURZMANN et al. (1993) beschrieben eine Adhärenz von Monozyten, eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten beim Hund, wobei sie ca. 8 % eosinophile Granulozyten unter den adhärenten Zellen nachweisen konnten. Auch in vorliegender Arbeit konnte eine Reduktion der eosinophilen Granulozyten nach zweistündiger Plastikadhärenz gezeigt werden. Dabei stellte sich die Reduktion der eosinophilen Granulozyten durch Adhärenz alleine als statistisch schwach signifikant dar (p = 0,02; s. 4.1.3.1). Somit ist eine Depletion eosinophiler Granulozyten durch Adhärenz beim Hund möglich.

5.3.1.2 Phagozytose

Nach KURZMANN et al. (1993) und ROITT et al. (1995) zeigen eosinophile Granulozyten nicht nur eine Adhärenz, sondern sind auch zur Phagozytose fähig. In der vorliegenden Untersuchung war jedoch durch Zugabe von Carbonyleisen im Vergleich zur Adhärenz keine weitere Reduktion, sondern vielmehr ein nicht signifikanter Anstieg des Anteils eosinophiler Granulozyten zu verzeichnen. Dieser Anstieg erklärt sich durch die signifikante Reduktion des relativen Monozytenanteils, da Leukozytenarten, die durch das Carbonyleisen unbeeinflusst bleiben, ansteigende relative Anteile erkennen ließen (s. 5.2.1.2). Demnach ist die Carbonyleisenphagozytose kein geeignetes Verfahren, um eosinophile Granulozyten aus Percoll[®]-isolierten Effektorzellen zu entfernen, was den Aussagen von DE BRUIN et al. (2005) beim Hund entspricht.

5.3.1.3 Immunomagnetische Separation

Es konnte keine signifikante Veränderung der Anteile eosinophiler Granulozyten nach Depletion CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen festgestellt werden.

5.3.2 Einfluss eosinophiler Granulozyten auf die spontane Zytotoxizität

Eine Beteiligung eosinophiler Granulozyten an der spontanen zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen wird unterschiedlich beurteilt. So verneinten BLOOM et al. (1986) beim Hund eine Beteiligung aller Granulozyten an der spontanen zytotoxischen Aktivität, da sie in ihren Untersuchungen nach Zugabe von Granulozyten zu den Effektorzellen im CRA keine Veränderung der Zytotoxizität beobachteten. Dennoch zeigten eosinophile Granulozyten des Hundes in Untersuchungen zur spontanen Zytotoxizität eine Bindung an Zielzellen (KNAPP et al., 1993). GONDOLF (1994) berichtete bei dieser Tierart von einer positiven Korrelation des relativen Anteils eosinophiler Granulozyten im Isolat und der Höhe der spontanen Zytotoxizität.

Die in vorliegender Arbeit beobachtete Reduktion der spontanen Zytotoxizität nach Adhärenz und Phagozytose könnte somit auch auf eine Beteiligung eosinophiler Granulozyten an der spontanen zytotoxischen Aktivität zurückzuführen sein, da eosinophile Granulozyten durch Adhärenz auch depletiert werden. Eine eindeutige Klärung dieser Frage ist zum derzeitigen Zeitpunkt jedoch nicht möglich, da das beobachtete Absinken der Zytotoxizität zum einen nicht signifikant war, und zum anderen auch andere Leukozytenarten eine Adhärenz zeigen und / oder zur Phagozytose fähig sind, so dass diese ebenfalls für das Absinken der Zytotoxizität verantwortlich sein könnten.

5.4 CD4⁺-Zellen

5.4.1 Depletion von CD4⁺-Zellen

Sowohl die Depletion CD4⁺-Zellen als auch die Depletion CD8⁺-Zellen erfolgte mittels immunomagnetischer Separation. Für die hier beschriebene Untersuchung wurde die direkte Methode bevorzugt, da hierbei die Bindung der Primär- an die Sekundärantikörper vor Inkubation mit den Zielzellen stattfindet, so dass selbst bei einer zu hohen Primärantikörperdichte auf den Zielzellen die Bindung an den Sekundärantikörper nicht behindert wird. Außerdem wird die Kopplung der Primär- an die Sekundärantikörper bei einer möglichen Konfigurationsänderung des Primärantikörpers nach Bindung an die Zielzelle nicht beeinflusst (GEE et al., 1991).

In vorliegender Untersuchung wurde der Antikörper Rat anti-Dog CD4, ein monoklonaler Antikörper der Subklasse IgG2a (Klon YKIX302.9.3.7), zur Depletion eingesetzt, der beim Hund spezifisch CD4⁺-Zellen bindet (VOGL, 1995; WÜNSCHMANN et al., 1999). GUENTHER et al. (1994) ermittelten einen Anteil von 41 % CD4⁺-Lymphozyten an Leukozyten in Hundeblut. BOKEMEYER (2003) konnte mit dem auch in vorliegender Arbeit verwendeten Antikörper beim Beagle insgesamt einen Gehalt CD4⁺-Zellen von 38,2 % im Blut nachweisen. In seinen Vorversuchen stellten sich sogar 42,4 % der Leukozyten als CD4⁺-Zellen dar. In der vorliegenden Untersuchung konnte dagegen eine signifikante Reduktion der Gesamtleukozytenzahl nach Depletion CD4⁺-Zellen um etwa 58 % beobachtet werden, was sich nur mit einem unspezifischen Zellverlust erklären lässt, der im Rahmen des Depletionsverfahrens auftritt (s. 5.1.1.3).

Im Ergebnis können CD4⁺-Zellen beim Hund durch immunomagnetische Separation effektiv mit dem Antikörper Rat anti-Dog CD4 entfernt werden. Die Bindung der Zielzellen an die gekoppelten Beads konnte im Anschluss an jede Depletion lichtmikroskopisch, sowie bei Isolaten von einigen Hunden auch rasterelektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

5.4.2 Einfluss von CD4⁺-Zellen auf die spontane Zytotoxizität

Für den Menschen beschrieben BERG et al. (2001) eine Steigerung der Zytotoxizität durch CD4⁺-Zellen, indem diese IFN-γ freisetzten, durch das wiederum zytotoxische T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen stimuliert wurden. Auch HAHN et al. (1995) berichteten beim Menschen von einer zytotoxischen Aktivität CD4⁺-Zellen nach vorheriger Präsentation des entsprechenden Antigens. Für den Hund konnten diese Beobachtungen allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da bei keinem untersuchten Effektor-Zielzellverhältnis ein signifikanter Anstieg oder eine Reduktion der Zytotoxizität beobachtet wurde. Die zytotoxische Aktivität der eingesetzten Effektorzellen stellte sich vor und nach der Depletion CD4⁺-Zellen nahezu unverändert dar. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von MOORE et al. (1992), nach denen die Depletion CD4⁺-Zellen beim Hund ebenfalls keinen Einfluss auf die Zytotoxizität nahm.

Aufgrund vorliegender Ergebnisse bestehen beim Hund somit keine Anzeichen dafür, dass CD4⁺-Zellen an der Auslösung der spontanen zytotoxischen Aktivität beteiligt sind.

Auffällig war allerdings die bei einigen Hunden beobachtete spontane Zytotoxizität gegenüber Vero-Zellen von mehr als 10 % (s. Tabellen 11d-e im Anhang). Vero-Zellen gelten als insensitiv gegenüber einer spontanen zytotoxischen Aktivität kaniner NK-Zellen und wurden daher auch in vorliegender Arbeit als Negativkontrolle eingesetzt, obwohl bereits GONDOLF (1994) in ihren Untersuchungen bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1 im Mittel eine Zytotoxizität von 14,1 % gegen Vero-Zellen im RBA beobachten konnte. Auch HOLMES et al. (1989) beschrieben eine Zytotoxizität einzelner Hunde gegenüber insensitiven Zielzellen. Dabei konnten sie diese Zytotoxizität aber nicht spezifisch bei einem Hund nachweisen. Bei Wiederholungsmessungen desselben Hundes zu unterschiedlichen Zeitpunkten waren erhebliche Schwankungen zu beobachten. Diese Befunde entsprechen zum Teil den in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen. So wurde Hund Nr. 26 mehrfach als Blutspender eingesetzt, eine Zytotoxizität gegenüber Vero-Zellen war allerdings nur einmal nachweisbar.

HOLMES et al. (1989) machten dafür vorausgehende klinisch inapparente Virusinfektionen verantwortlich, die in einer Aktivierung von NK-Zellen resultierten. Ob das Auftre-

5 Diskussion

ten einer Zytotoxizität gegen Vero-Zellen allerdings auch in vorliegender Arbeit auf klinisch inapparente Virusinfektionen zurückzuführen ist, kann nicht sicher geklärt werden. Die Blutspender und deren Differentialblutbild zeigten jedenfalls zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine klinischen Auffälligkeiten.

Außerdem wiesen in der vorliegenden Untersuchung bestimmte Hunde (Hund Nr. 17, 19, 27 und 30) auch nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Blutentnahme bei allen untersuchten Effektor-Zielzellverhältnissen eine deutlich über 10 % liegende spontane Zytotoxizität gegenüber Vero-Zellen auf.

Dies legt die Vermutung nahe, dass NK-Zellen einzelner Hunde die Fähigkeit besitzen, üblicherweise insensitive Zelllinien zu lysieren. Für den Menschen wird eine solche Fähigkeit von LAK ebenfalls beschrieben (GRIMM et al., 1982).

5.5 CD8⁺-Zellen

5.5.1 Depletion von CD8⁺-Zellen

Beim Menschen wird CD8 sowohl von zytotoxischen T-Lymphozyten (BENNETT et al., 1998) als auch von ca. 30 % der NK-Zellen exprimiert (ROBERTSON et al., 1990). Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Antikörper Mouse anti-Dog CD8 (Klon Dog 10-1-1 oder M10) gehört zur Subklasse IgG1 (VOß et al., 1993). Er reagiert spezifisch mit der α -Kette des kaninen CD8-Antigens, das als Oberflächenglykoprotein von zytotoxischen und immunmodulierenden T-Zellen exprimiert wird (WÜNSCHMANN, 1998). Unter Einsatz dieses Antikörpers bestimmte BOKEMEYER (2003) einen Anteil von 37,2 % CD8⁺-Zellen in Beagleblut. Bei der hier vorgestellten Untersuchung wurde nach Depletion CD8⁺-Zellen sogar eine schwach signifikante Reduktion der Gesamtleukozytenzahl den von BOKEMEYER (2003) ermittelten Anteil CD8⁺-Zellen um etwa 10 % überschreitet und die relativen Anteile anderer Leukozytenarten durch die Depletion kaum beeinflusst werden, findet anscheinend auch eine Reduktion anderer Leukozytenarten statt, wie schon unter 5.1.1.3 beschrieben.

Die Ergebnisse zeigen, dass CD8⁺-Zellen durch immunomagnetische Separation effektiv entfernt werden können. Eine Bindung CD8⁺-Zellen an den an Dynabeads[®] gekoppelten Antikörper Mouse anti-Dog CD8 wurde nicht nur licht-, sondern auch rasterelektronenmikroskopisch kontrolliert und dargestellt (s. Abb. 5-7).

5.5.2 Einfluss von CD8⁺-Zellen auf die spontane Zytotoxizität

ORTALDO et al. (1986) beobachteten beim Menschen ein Absinken der Zytotoxizität im CRA nach Einsatz eines spezifischen Antikörpers gegen CD8. Dennoch wird nach ihren Untersuchungen die Zytotoxizität hauptsächlich durch CD3⁻CD8⁻ LGL hervorgerufen. BERG et al. (2001) gehen zwar von einer Beteiligung CD8⁺-Zellen an der spezifischen Tumorabwehr aus, diese erfolgte aber erst nach Aktivierung dieser Zellen. Beim Hund reduzierte sich die Zielzelllyse nach Einsatz des Antikörpers gegen CD8⁺-Zellen (MausmAk, Klon Dog 10-1-1 oder M10) in Zytotoxizitätsversuchen um 58 % (VOß et al., 1993).

Im Gegensatz dazu führte die Depletion CD8⁺-Zellen in den hier vorgestellten Untersuchungen bei einer E/T ratio von 100:1 zu einem nicht signifikanten Ansteigen der Zytotoxizität um den Faktor 1,5 (p = 0,07). Dieser Anstieg deckt sich zwar mit Befunden von HÖTZL et al. (1991), nach denen MT811⁺-Zellen (CD8⁺-Zellen) die spontane Zytotoxizität beim Hund unterdrückten. Allerdings konnte bei den in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchten Effektor-Zielzellverhältnissen von 50:1 und 25:1 ein Anstieg der Zytotoxizität nicht beobachtet werden.

Vermutlich ist das beobachtete Ansteigen der Zytotoxizität eher auf einen höheren relativen Anteil von NK-Zellen in der Funktion als Effektorzellen zurückzuführen, der sich besonders bei dem Effektor-Zielzellverhältnis 100:1 bemerkbar macht.

Wie bei den Untersuchungen zur Depletion CD4⁺-Zellen konnte auch in dieser Versuchsreihe eine Zytotoxizität gegen Vero-Zellen beobachtet werden (Tabellen 12d-e im Anhang). Auf den Effekt einer zytotoxischen Aktivität gegen diese gegenüber kaninen NK-Zellen eigentlich insensitive Zelllinie wurde bereits unter 5.4.2 eingegangen.

Insgesamt ergeben sich anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Anzeichen dafür, dass CD8⁺-Zellen an der spontanen zytotoxischen Aktivität beim Hund beteiligt sind.

5.6 Adhärente NK-Zellen (A-NK-Zellen)

Nach VITOLO et al. (1993) existieren beim Menschen adhärente NK-Zellen (A-NK), die nicht nur eine Plastikadhärenz zeigen, sondern auch eine besondere zytotoxische Aktivität besitzen. Auch beim Hund konnte eine Plastikadhärenz von Lymphozyten nachgewiesen werden. So bestimmten KURZMANN et al. (1993) 50 % Lymphozyten unter den adhärenten Zellen, was im Einklang mit den hier gefundenen Ergebnissen steht. Die Differenzierung der adhärenten Zellen im Advia ergab einen Anteil von ca. 41 % Lymphozyten.

Nach SHAW et al. (1984) handelt es sich beim Hund bei den adhärenten Lymphozyten um B-Lymphozyten, die keinen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität ausüben (NARIAI et al., 1999). Im Gegensatz dazu erwähnten RINGLER et al. (1985) eine Zytotoxizität adhärenter Zellen beim Hund, die auch nach den hier vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden kann, da eine signifikante Reduktion der spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber CTAC-Zellen nach Adhärenz beobachtet wurde (p = 0,01).

Inwiefern adhärente NK-Zellen bei Zytotoxizitätsbestimmungen in vitro eine Rolle spielen, bei denen die Zielzellen als Monolayer vorliegen, ist allerdings fraglich. Nach VU-JANOVIC et al. (1995) übertraf beim Menschen nämlich die zytotoxische Aktivität von NA-NK-Zellen in vitro die der adhärenten NK-Zellen, sofern Monolayer als Zielzellen eingesetzt wurden. A-NK-Zellen waren dagegen nach ihren Untersuchungen in vivo zu einer effektiveren Bekämpfung von Tumorzellen fähig, da sie über ihre Adhäsionsmoleküle in Tumore eindringen konnten. Wie VUJANOVIC et al. (1995) durch in vitro Untersuchungen an Spheroiden zeigten, ermöglichten A-NK-Zellen dabei auch NA-NK-Zellen das Eindringen in das Tumorinnere.

Zusätzlich beobachteten VUJANOVIC et al. (1995) einen unterschiedlichen Zytotoxizitätsmechanismus von A-NK und NA-NK-Zellen. Nach ihren Untersuchungen bewirkten NA-NK-Zellen ihren zytotoxischen Effekt hauptsächlich über die Sekretion von Perforin, während A-NK-Zellen zusätzlich in der Lage waren, eine Apoptose in der Zielzelle hervorzurufen.

Beim Hund beschrieben SCHMITZ et al. (2003) bei Koinkubation von Percoll[®]-isolierten Effektorzellen mit CTAC-Zielzellen bei ca. 30 % der Zielzellen Zeichen einer Nekrose

und bei 13 – 23 % Zeichen einer Apoptose. Ob allerdings unterschiedliche Adhärenzeigenschaften von NK-Zellen dafür verantwortlich sind, ist bislang nicht bekannt. Weiterhin kann anhand der hier gefundenen Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden, inwieweit das Absinken der Zytotoxizität nach Adhärenz auf adhärente NK-Zellen zurückzuführen ist. Hierzu wäre eine genaue Identifizierung der adhärenten Zellen erforderlich, was allerdings wegen fehlender spezifischer Antikörper für NK-Zellen beim Hund zurzeit nicht möglich ist.

Das Vorkommen adhärenter NK-Zellen beim Hund kann aufgrund der hier vorliegenden Untersuchungen jedenfalls nicht ausgeschlossen werden.

5.7 Zytotoxizität von Zellkulturüberständen

Über den Mechanismus, der NK-Zellen befähigt, Zielzellen abzutöten, wird seit längerer Zeit kontrovers diskutiert. Umstritten ist dabei auch die Frage, ob zytotoxische Substanzen in den Überstand abgegeben werden und so eine Zytotoxizität überhaupt erst oder zumindest mit verursachen können. Dafür sprechen Befunde von DUKE et al. (1986), nach deren Beobachtungen die Lyse der Zielzellen sowohl über einen direkten Zell-zu-Zellkontakt als auch über die Sekretion löslicher Faktoren der Effektorzellen hervorgerufen werden konnte.

Bisher erfolgte die Bestimmung einer Zytotoxizität von Zellkulturüberständen beim **Hund** meist mittels CRA (NAKADA et al., 1996). Durch den CRA werden allerdings vorwiegend sekretorische Prozesse berücksichtigt, die in einer Nekrose resultieren. Da mittels RBA nicht nur nekrotische, sondern zusätzlich auch apoptotische Zielzellen erfasst werden (GONDOLF et al., 1996; SCHMITZ et al., 2003), wurde in der vorliegenden Arbeit eine Zytotoxizität der Kulturüberstände unter Verwendung eines RBA untersucht.

Dabei wurde zunächst in einem Zytotoxizitätstest nach Koinkubation von Percoll[®]-isolierten Effektorzellen mit CTAC-Zielzellen die spontane zytotoxische Aktivität der Effektorzellen nachgewiesen. Der Kulturüberstand dieser Zellen war jedoch nicht in der Lage, eine Zytotoxizität an Zielzellen auf einer zweiten Kulturplatte auszulösen. Im Gegensatz dazu konnten DUKE et al. (1986) beim Menschen lösliche zytotoxische Substanzen (NKCF) im zellfreien Überstand nachweisen, die eine DNA-Fragmentation in den Zielzellen verursachten. Auch NAKADA et al. (1996) beschrieben beim Hund einen zytotoxischen Effekt durch NKCF im Überstand.

Nach Befunden anderer Autoren sind die in den Überstand abgegebenen Substanzen hingegen überhaupt nicht oder nur unwesentlich an der Auslösung einer Zytotoxizität beteiligt. KRÄHENBÜHL et al. (1991) vermuteten für den Menschen, dass die Zytotoxizität nicht allein auf der Abgabe zytotoxischer Substanzen in den Überstand basiert. Zum einen werde das in den Überstand abgegebene Perforin relativ schnell durch Lipide und Lipoproteine inaktiviert, zum anderen stelle die Exozytose zytotoxischer Substanzen in den interzellulären Raum einen streng calciumabhängigen Prozess dar. Da aber auch eine calciumunabhängige Zytotoxizität beobachtet werden kann, könne die Zytotoxizität somit nicht allein auf eine Sekretion zytotoxischer Substanzen in den Überstand zurückzuführen sein.

Ähnliches beschrieben NARIAI et al. (1999) für den **Hund**. So geben NK-Zellen des Hundes zwar zytotoxische Faktoren in den Zellkulturüberstand ab, NARIAI et al. (1999) vermuteten jedoch, dass die Zytotoxizität, die durch diese Faktoren hervorgerufen wird, eher schwach ist. Sie konnten vielmehr zeigen, dass Zellfortsätze zwischen Ziel- und Effektorzellen gebildet werden, was für einen direkten Zell-zu-Zellkontakt und somit für das Auftreten einer NK-zellvermittelten Zytotoxizität entscheidend ist. SCHMITZ et al. (2003) beobachteten beim Hund nicht nur eine Kontaktaufnahme mit der Zielzelle über Ausstülpungen der Effektorzelle, sondern auch eine Rosettenbildung der NK-Zellen um die Zielzelle nach einer Koinkubation der Effektor- und Zielzellen von 14 Stunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde dementsprechend zwar nach 14 Stunden eine signifikante Zytotoxizität der Effektorzellen festgestellt, eine zytotoxische Aktivität der Zellkulturüberstände konnte nach Ablauf der Inkubationszeit aber nicht gemessen werden. Demnach sind lösliche Faktoren, die in den Überstand abgegeben werden, nicht für die Auslösung einer Zytotoxizität entscheidend. Vielmehr scheint die Ausbildung eines direkten Zell-zu-Zellkontakts der entscheidende Vorgang für die Zielzelllyse zu sein.

5.8 Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität

Ausgehend von der Überlegung, dass eine steigende Lymphozytenreinheit mit einem höheren Anteil von NK-Zellen korreliert sein könnte, sollte ein Zusammenhang zwischen Lymphozytenreinheit und zytotoxischer Aktivität überprüft werden. Auch andere Autoren beschäftigten sich mit dieser Fragestellung. Nach KNAPP et al. (1993) nimmt die Lymphozytenreinheit insofern Einfluss auf die Zytotoxizität, als bei einem hohen Anteil kontaminierender Zellen das Effektor-Zielzellverhältnis nicht sicher eingestellt werden kann. Auch GONDOLF (1994) vermutete eine Behinderung des Zellkontakts zwischen Ziel- und Effektorzellen durch kontaminierende Zellen als Ursache für eine schwach signifikant negative Korrelation zwischen dem Anteil neutrophiler Granulozyten und der Höhe der zytotoxischen Aktivität.

LEVY et al. (1989) untersuchten beim Menschen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Low-NK-Syndrom, das mit persistent niedriger NK-Aktivität einhergeht, und der prozentualen oder absoluten Zahl von NK-Zellen, konnten allerdings keinen Zusammenhang nachweisen.

In der Mehrzahl der Untersuchungen zur spontanen zytotoxischen Aktivität wurde bei Mensch und Hund die Isolierung von Effektorzellen über einen einstufigen Ficoll-Hypaque-Gradienten vorgenommen. Bei diesem Trennmedium erhält man beim Hund jedoch meist nur eine relativ niedrige Lymphozytenausbeute von wenig mehr als 70 % (SCHMITZ, 2000). KNAPP et al. (1993) konnten zwar beim Hund bei einer Isolierung über Ficoll-Hypaque (1.066/1.119) eine Lymphozytenreinheit von knapp 93 % erzielen. Über den Anteil von LGL treffen sie jedoch keine Aussage. In den vorliegenden Untersuchungen wurde daher die bereits von GONDOLF (1994) für den Hund beschriebene Isolierung von Blutlymphozyten über einen einstufigen Percoll[®]-Dichtegradienten von 58,5 % durchgeführt, da bei diesem Gradienten ein hoher Anteil an LGL im Isolat enthalten ist. So identifizierte GONDOLF (1994) mit dieser Methode durchschnittlich 9,4 % der isolierten Lymphozyten als LGL bei einem mittleren Anteil von 72,3 % Lymphozyten im Isolat (Zelldifferenzierung anhand nach Giemsa gefärbter Zytozentrifugenpräparate). In vorliegender Arbeit wurde das Differentialblutbild dagegen mit Hilfe des automatischen Hämatologiesystems Advia 120 erstellt, so dass wesentlich mehr Zellen zur Zelldifferenzierung herangezogen werden konnten. Hierbei wurde ein durchschnittlicher relativer Lymphozytenanteil von 91 % direkt nach Percoll[®]-Isolierung ermittelt. Dem höheren Lymphozytenanteil entsprechend befanden sich auch weniger kontaminierende Zellen im Isolat (s. 4.1.2, Grafik 1, Tabelle 8 im Anhang).

Trotz der in der vorliegenden Arbeit erzielten hohen Lymphozytenreinheit ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Lymphozytenreinheit und zytotoxischer Aktivität (E/T ratio 100:1, 50:1). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von GONDOLF (1994), die beim Hund ebenfalls keinen signifikanten Einfluss des Lymphozytenanteils auf die Zytotoxizität feststellen konnte, wobei sie allerdings hierbei die Zytotoxizität mittels CRA bestimmte.

Dennoch bleibt natürlich bei starker Kontamination mit anderen Zellen das Problem des schlecht einstellbaren Effektor-Zielzellverhältnisses mit den daraus resultierenden Konsequenzen für die Vergleichbarkeit von Zytotoxizitäten innerhalb einer E/T ratio bestehen, so dass allein aus diesem Grund die Durchführung weiterer Aufreinigungsschritte erforderlich erscheint. Außerdem hat sich nach immunomagnetischer Separation CD8⁺-Zellen gezeigt, dass eine Depletion von Nicht-NK-Zellen einen positiven Einfluss auf die Zytotoxizität nehmen kann.

5.9 Einfluss von Haltung und Geschlecht der Blutspender auf die Zytotoxizität

Nach Percoll[®]-Isolierung konnte sowohl bei einer E/T ratio von 100:1 als auch von 50:1 eine höhere Zytotoxizität der Privathunde im Vergleich zu den Klinikhunden beobachtet werden, wobei sich dieser Unterschied allerdings nur bei einer E/T ratio von 100:1 als signifikant darstellte. Die beobachtete Differenz in der Höhe der Zytotoxizität warf die Frage auf, ob dieses Ergebnis allein auf die Haltungsbedingungen oder auch auf andere Faktoren wie Alter und Geschlecht zurückzuführen ist.

Nach GREELEY et al. (1996) kommt es beim Hund zu einem leichten, wenn auch nicht signifikanten Anstieg der Zytotoxizität im Alter. Eine Unterteilung der untersuchten Hunde in verschiedene Altersgruppen war im Rahmen vorliegender Arbeit zwar nicht mög-

5 Diskussion

lich, da nicht genügend Tiere einer Altersgruppe zur Verfügung standen, um eine statistisch gesicherte Aussage treffen zu können. Dennoch kann die bei den Privathunden beobachtete höhere Zytotoxizität nicht allein auf einen etwaigen Alterseinfluss zurückgeführt werden, da sowohl bei den Klinikhunden als auch bei den Privathunden Tiere verschiedenen Alters von 1 – 11 Jahren untersucht wurden.

Beim Menschen beschrieben FERNANDES et al. (1981) und PROSS et al. (1982) einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der NK-Aktivität, wonach die Zytotoxizität nur bei älter werdenden männlichen Probanden, nicht jedoch bei Frauen anstieg. Die hier durchgeführten Untersuchungen liefern indes keine Hinweise auf einen geschlechtsspezifischen Einfluss.

Die signifikant höhere zytotoxische Aktivität der Privathunde im Vergleich zu den Klinikhunden bei einer E/T ratio von 100:1 sowie die nicht signifikant höhere Zytotoxizität bei einer E/T ratio von 50:1 kann daher anhand dieser Ergebnisse nicht hinreichend sicher erklärt werden. Sie geben jedoch Anhaltspunkte dafür, dass die Haltungsbedingungen über die jeweils unterschiedlichen psychosozialen Belastungen auch Auswirkungen auf die Zytotoxizität haben.

Für den Menschen beschrieben LEVY et al. (1989) und LOTZOVA (1991) einen negativen Einfluss von Stress auf die Aktivität von NK-Zellen. Damit wäre eine größere psychische Belastung der Tiere, die im Zwinger in Gruppenhaltung leben, als Ursache für die festgestellte Diskrepanz zwischen der Zytotoxizität von Klinik- und Privathunden denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

- 1. Im Literaturteil wird ein kurzer Überblick über Morphologie und Funktion von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie den Mechanismus ihrer Zytotoxizität gegeben. Da im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von anderen Leukozytenarten auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen untersucht werden sollte, erfolgen zunächst Angaben bezüglich der Isolierung von Lymphozyten aus Blut, sowie der Depletion kontaminierender Leukozytenarten, speziell von Monozyten sowie CD4⁺- und CD8⁺-Zellen. Auch die Messmethode der zytotoxischen Aktivität der im Isolat enthaltenen Zellen wird kurz dargestellt. Außerdem wird der bisher bekannte Einfluss einzelner Leukozytenarten auf die Zytotoxizität beschrieben.
- 2. Die beim Menschen bereits beschriebene und besonders ausgeprägte zytotoxische Aktivität sogenannter adhärenter NK-Zellen (A-NK) wird diskutiert. Um einen Einfluss der Adhärenz an Plastikoberflächen auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität zu untersuchen, wurde jeweils vor und nach der Depletion plastikadhärenter Leukozyten sowohl ein Zytotoxizitätstest als auch eine Bestimmung der relativen Zellanteile durchgeführt. Dabei stellten sich die relativen Anteile isolierter Lymphozyten und neutrophiler Granulozyten nach Adhärenz nahezu unverändert dar. Monozyten und eosinophile Granulozyten zeigten jeweils eine Reduktion ihres relativen Zellanteils nach Adhärenz. Diese erwies sich allerdings nur hinsichtlich der eosinophilen Granulozyten als statistisch schwach signifikant (p = 0,02). Die von einigen Autoren beschriebene effektive Monozytendepletion durch Adhärenz bestätigte sich nach den hier vorliegenden Ergebnissen für den Hund nicht.

Bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 50:1 konnte nach Adhärenz eine statistisch signifikante Reduktion der zytotoxischen Aktivität um knapp die Hälfte beobachtet werden (p = 0,01). Dies könnte ein Hinweis auf die Existenz adhärenter NK-Zellen beim Hund sein, da bei Differenzierung der adhärenten Zellen Lymphozyten nachgewiesen werden konnten. Eine mögliche Beteiligung anderer adhärenter Zellen (beispielsweise Monozyten und eosinophile Granulozyten) an der spontanen zytotoxischen Aktivität ist aufgrund dieser Ergebnisse zwar nicht si-

6 Zusammenfassung

cher auszuschließen, direkte Hinweise darauf konnten allerdings nicht ermittelt werden.

3. Zur Erzielung einer effektiveren Monozytendepletion wurde die Adhärenz mit einer Carbonyleisenzugabe zu den isolierten Zellen kombiniert. Mit einem p-Wert von p = 0,007 stellte sich die auf diesem Weg erreichte weitere Reduktion der Monozyten zwar als signifikant heraus, eine vollständige Monozytendepletion konnte allerdings auch hierdurch nicht erzielt werden. Ein signifikanter Einfluss der Carbonyleisenphagozytose auf die relativen Anteile der anderen isolierten Leukozytenarten, nämlich von Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei dem Vergleich der zytotoxischen Aktivität ohne bzw. nach Zugabe des Carbonyleisens ergab sich ein statistisch nicht signifikantes Absinken der Zytotoxizität von 20,2 % nach alleiniger Adhärenz auf 10,9 % nach kombinierter Adhärenz und Carbonyleisenphagozytose. Ob diese Reduktion nur durch Monozyten oder auch durch neutrophile bzw. eosinophile Granulozyten bedingt ist, kann aufgrund vorliegender Ergebnisse nicht sicher beantwortet werden.

4. Die Depletion CD4⁺-Zellen erfolgte mittels immunomagnetischer Separation. Dabei wurde der spezifische Antikörper Rat anti-Dog CD4 eingesetzt. Die Depletion von CD4⁺-Zellen resultierte in einer signifikanten Erniedrigung der Gesamtleukozytenzahl, die allerdings nicht nur auf eine Depletion CD4⁺-Zellen zurückzuführen ist. Vielmehr müssen auch andere Leukozytenarten bei der Depletion verloren gehen. Eine unspezifische Bindung dieser Zellen an Dynabeads[®] mit ihrem bereits gekoppelten Sekundärantikörper Sheep anti-Rat konnte in Vorversuchen ausgeschlossen werden. Ob der Zellverlust auf eine Adhärenz der Leukozyten an der Oberfläche des verwendeten Zentrifugenröhrchens zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Ein Einfluss CD4⁺-Zellen auf die Zytotoxizität konnte bei keinem untersuchten Effektor-Zielzellverhältnis beobachtet werden. Die Zytotoxizität stellte sich vielmehr im Vergleich vor und nach Depletion CD4⁺-Zellen nahezu unverändert dar (p > 0,05).

Dieses Ergebnis weist klar darauf hin, dass CD4⁺-Zellen nicht an der Auslösung der spontanen zytotoxischen Aktivität beim Hund beteiligt sind.

6 Zusammenfassung

5. Nach immunomagnetischer Separation von CD8⁺-Zellen mittels eines an Dynabeads[®] Sheep anti-Mouse gekoppelten spezifischen Antikörpers (Mouse anti-Dog CD8) konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Gesamtleukozyten-zahl beobachtet werden. Diese Reduktion ist allerdings nicht nur auf eine Depletion CD8⁺-Zellen zurückzuführen, sondern wie bei der Depletion CD4⁺-Zellen gingen auch andere Leukozytenarten bei dieser Methode verloren.

Die Ermittlung der zytotoxischen Aktivität erfolgte bei unterschiedlichen Effektor-Zielzellverhältnissen. Bei einer E/T ratio von 100:1 konnte dabei gegenüber CTAC-Zellen ein nicht signifikanter Anstieg der zytotoxischen Aktivität nach Depletion CD8⁺-Zellen um den Faktor 1,5 beobachtet werden. Bei Untersuchung der Effektor-Zielzellverhältnisse 50:1 und 25:1 konnte jedoch kein bzw. nur ein geringgradiger, nicht signifikanter Anstieg der zytotoxischen Aktivität verzeichnet werden (p > 0,05).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CD8⁺-Zellen ebenfalls keinen bedeutenden Einfluss auf die spontane Zytotoxizität von kaninen NK-Zellen nehmen. Der bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1 beobachtete Anstieg der Zytotoxizität ist vermutlich auf eine Anreicherung der Effektorzellen im Isolat zurückzuführen. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass beim Hund die spontane Zytotoxizität im Wesentlichen auf NK-Zellen beruht.

- 6. Nach Koinkubation von Ziel- und Effektorzellen konnte keine zytotoxische Aktivität von löslichen zytotoxischen Faktoren im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (p = 0,002). Demzufolge ist beim Hund ein direkter Zell-zu-Zellkontakt zwischen Ziel- und Effektorzellen für die Auslösung der spontanen Zytotoxizität von entscheidender Bedeutung, lösliche zytotoxische Faktoren im Zellkulturüberstand spielen hierbei offenbar keine Rolle.
- 7. Da alle in vorliegender Arbeit nach der Percoll[®]-Isolierung angewendeten Aufreinigungsverfahren mit einem hohen Zellverlust einhergehen, sollte überprüft werden, ob eine weitere Aufreinigung der Percoll[®]-isolierten Effektorzellen für den Einsatz im Zytotoxizitätstest überhaupt sinnvoll ist. Zwischen dem Anteil isolierter Lymphozyten und der Höhe der Zytotoxizität ergab sich weder bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1 noch bei einer E/T ratio von 50:1 ein statistisch

6 Zusammenfassung

gesicherter Zusammenhang (p > 0.05). Inwieweit ein Nutzen aus zusätzlichen Aufreinigungsverfahren, die signifikant mit einer Reduktion der Gesamtleukozytenzahl verbunden sind, gezogen werden kann, muss daher je nach Untersuchungsziel überdacht werden. Zumindest ist bei einer starken Kontamination der isolierten Lymphozyten mit anderen Leukozytenarten das Effektor-Zielzellverhältnis nur schlecht einzustellen, da als Effektorzellen in erster Linie die Gruppe der Lymphozyten mit den darin enthaltenen NK-Zellen entscheidend sind.

8. Weiterhin wurde der in der Literatur diskutierte Einfluss äußerer Faktoren auf die zytotoxische Aktivität untersucht. Dazu wurde die jeweils mittlere zytotoxische Aktivität von Klinikhunden, die unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden, mit der von Hunden aus privatem Besitz bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 100:1 bzw. 50:1 direkt nach Percoll[®]-Isolierung verglichen. Die Privathunde wiesen bei einer E/T ratio von 100:1 mit einem p-Wert von 0,003 eine signifikant höhere mittlere Zytotoxizität auf (60,1 % im Vergleich zu 28,7 %). Auch bei der E/T ratio von 50:1 zeigten die Privathunde eine geringgradig höhere mittlere Zytotoxizität, die sich allerdings als nicht signifikant darstellte.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Haltung und möglicherweise damit verbundene Stressfaktoren der Tiere einen Einfluss auf das Immunsystem und auf die spontane zytotoxische Aktivität nehmen. Das für den Menschen beschriebene Low-NK-Syndrom, welches mit erniedrigter NK-Aktivität einhergeht und häufig bei deprimierten und gestressten Personen auftritt, könnte somit auch beim Hund vorkommen.

7 SUMMARY

- The morphology and function of natural killer cells (NK cells) as well as their killing mechanisms and the determination of NK cell activity is described shortly. Furthermore, information about lymphocyte isolation from canine blood, depletion methods of contaminating leucocytes, especially concerning monocytes, CD4⁺ and CD8⁺ cells, is given. The function of these leucocytes as well as their influence on spontaneous cytotoxicity, as far as it is known, is described.
- 2. The possible role of adherent NK cells (A-NK), which are reported to show an especially high cytotoxic activity in humans, is discussed and examined in this study. Therefore, of each Beagle dog the total blood cell numbers and differential blood counts as well as the spontaneous cytotoxic activities of the isolated cells were determined prior to and after incubation in plastic culture dishes. Although depletion of adherent cells had no effect on lymphocytes and neutrophilic granulocytes, a reduction in the relative cell counts of monocytes and eosinophilic granulocytes could be observed after adherence to plastic surfaces. However, only the number of eosinophilic granulocytes was reduced significantly (p = 0.02) after plastic adherence. A significant depletion of monocytes through plastic adherence, which is often described in literature, could not be demonstrated in the present study for the dog.

At an effector to target cell ratio of 50:1 the spontaneous cytotoxic activity was significantly reduced by almost 50 % (p = 0.01) after adherence to plastic surfaces. These results suggest that adherent cells with cytotoxic activity (NK cells) also exist in dogs, due to lymphocytes being recognized in the adherent cell fraction. Nevertheless, monocytes and eosinophilic granulocytes showed adherence to plastic surfaces, too, and may therefore also be responsible for the observed reduction in cytotoxic activity.

3. Since in the present study monocytes could not be depleted sufficiently by plastic adherence, this method was combined with phagocytosis of carbonyl iron by the isolated cells. This way a significant reduction of monocytes could be achieved (p = 0.007), although monocytes were not depleted completely. The relative cell
7 Summary

numbers of lymphocytes, neutrophilic and eosinophilic granulocytes were not significantly influenced by carbonyl iron phagocytosis.

The cytotoxic activity was not significantly reduced from a mean cytotoxic activity of 20.2 % after plastic adherence to a mean cytotoxic activity of 10.9 % after depletion of adherent and phagocytosing cells, which could be due to either monocytes, neutrophilic granulocytes or eosinophilic granulocytes.

4. Depletion of CD4⁺ cells was carried out by immunomagnetic separation with Dynabeads[®] Sheep anti-Rat coupled with the specific monoclonal antibody Rat anti-Dog CD4. Depletion of CD4⁺ cells resulted in a significantly decreased absolute cell count, which can not only be due to the depletion of CD4⁺ cells, since other leucocytes are reduced as well. No unspecific binding of these cells to Dynabeads[®] Sheep anti-Rat could be observed, though. Whether the cell loss has to be attributed to an adherence of leucocytes to the glass surface of centrifugation tubes, cannot be answered in the present study.

In the present study no difference in cytotoxic activity prior to and after depletion of CD4⁺ cells could be observed (p > 0.05), indicating CD4⁺ cells are not involved in spontaneous cytotoxic activities in dogs.

5. After immunomagnetic separation of CD8⁺ cells with Dynabeads[®] Sheep anti-Mouse, coupled with the specific monoclonal antibody Mouse anti-Dog CD8, a significantly decreased absolute cell count could be observed, which again – as described for CD4⁺ cells – cannot only be due to the depletion of CD8⁺ cells. At an effector to target cell ratio of 100:1 the cytotoxic activity against CTAC cells increased not significantly 1.5 times. Concerning the effector to target cell ratios 50:1 and 25:1 no or only a slight increase of the cytotoxic activity could be observed (p > 0.05).

These results suggest CD8⁺ cells do not influence the cytotoxic activity of canine NK cells significantly. The observed, not significant increase of cytotoxicity at an effector to target cell ratio of 100:1 may rather be due to an enrichment of effector cells in the isolated cell suspension. Altogether, the results of the present study indicate spontaneous cytotoxic activity in the dog is basically induced by NK-cells.

7 Summary

- 6. Additionally, a cytotoxic activity of supernatants produced in a cytotoxicity assay, which is often described in literature, was examined. Nevertheless, no such cytotoxic activity could be observed in the present study (p = 0.002). Therefore, in dogs a direct cell-to-cell contact between effector and target cells is crucial to induce cytotoxicity in target cells.
- 7. Since all described isolation and depletion methods resulted in a significant reduction of the absolute cell count, a correlation between the relative lymphocyte cell count (including NK cells) and the mean cytotoxicity of the effector cells measured after Percoll[®] isolation was examined. In the present study no such correlation was observed, though, neither at an effector to target cell ratio of 100:1 nor at an effector to target cell ratio of 50:1 (p > 0.05).

Nevertheless, inaccuracies in the effector to target cell ratios due to contaminating cells should always be considered.

8. Finally, the mean cytotoxicity after Percoll[®] isolation of Beagle dogs living in private households was compared to that of Beagle dogs living in standardized conditions. At an effector to target cell ratio of 100:1 dogs living in private households showed a mean cytotoxicity of 60.1 %, which was significantly higher than the cytotoxic activitity measured in dogs living in standardized conditions (28.7 %, p = 0.003). At an effector to target cell ratio of 50:1 dogs living in private households again showed a slightly increased cytotoxic activity, which was not significant this time, though.

These results suggest that living conditions (e.g. stress) may influence the immune system and spontaneous cytotoxic activity. Therefore, a "low NK syndrome", which in humans often occurs in depressed and stressed persons and is characterized by persistently low NK activity, might also exist in dogs.

8 ABBILDUNGEN

Die Vergrößerungsangaben beziehen sich bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen jeweils auf das verwendete Objektiv. Die eingesetzte Fotokamera hat hier einen zusätzlichen Vergrößerungsfaktor von 2,5.



Abb. 1 Isolierung von Blutlymphozyten über einen Percoll[®]-Dichtegradienten

Leukozytenbande als wolkige Trübung zwischen darüber stehendem Gewebekulturmedium und darunter befindlichem Percoll[®]-Gradienten sowie Erythrozytensäule im unteren Teil des Röhrchens nach Zentrifugation



- Abb. 2 Zellmonolayer nach Anwendung des Waschprogramms "super" im RBA
 - a) CTAC ohne Effektorzellen (Kontrolle), noch annähernd dichter Zellrasen vorhanden, Rose Bengal Färbung, Primärvergrößerung: 100 x
 - b) CTAC mit Effektorzellen, nur noch einige adhärente CTAC vorhanden, Rose Bengal Färbung, Primärvergrößerung: 80 x



Abb. 3 Dynabeads[®] unter Einwirkung eines Permanentmagneten im Zentrifugenröhrchen (nach Dynal[®], mit freundlicher Genehmigung von Invitrogen)



- Abb. 4 α-Naphtylacetatesterasefärbung und Carbonyleisenphagozytose
 - a) Darstellung der Anfärbbarkeit verschiedener Leukozyten bei Färbung mit α-Naphtylacetatesterase; Monozyten (→): diffuse, körnige dunkelbraune Färbung und schwarze Carbonyleisenpartikel im Zytoplasma; Lymphozyten (→): einzelne körnige braune Farbreaktionen im Zytoplasma, keine Carbonyleisenpartikel; neutrophile Granulozyten (▶): gelappter Kern, keine Farbreaktion, keine Carbonyleisenpartikel, Vergrößerung: Ölimmersion



b) Von einem Monozyten phagozytiertes Carbonyleisen als schwarze, unterschiedlich große Partikel im Zytoplasma erkennbar, daneben diffus braune Niederschläge von α-Naphtylacetat, links basophil gefärbter, eingebuchteter Kern vorhanden, α-Naphtylacetatesterasefärbung, Vergrößerung: Ölimmersion



- Abb. 5 $CD8^+$ -Zellen (\rightarrow), gebunden an mit Mouse anti-Dog CD8 gekoppelten Dynabeads[®] Sheep anti-Mouse ($\blacktriangleright / \succ$)
 - a) Kernechtrotfärbung, Vergrößerung: Ölimmersion
 - b) REM, Primärvergrößerung: 2500 x



- Abb. 6 Agglomerate von Dynabeads[®] um CD8⁺-Zellen, Lymphozyten mit fingerförmigen Oberflächenfortsätzen, Dynabeads[®] mit glatter Oberfläche, REM
 - a) Lymphozyten (→) vorwiegend oberflächlich im Agglomerat gebunden (Dynabeads[®], >), Primärvergrößerung: 3000 x
 - b) Lymphozyt (->) tiefer im Agglomerat erkennbar, Primärvergrößerung: 3000 x



- Rosettenbildung von Dynabeads[®] um CD8⁺-Zellen, REM Abb. 7

 - a) Zirkulär angeordnete Dynabeads[®], Primärvergrößerung: 2500 x
 b) Kappenartig angeordnete Dynabeads[®], Primärvergrößerung: 3000 x

9 LITERATURVERZEICHNIS

Banks, K.L.; Greenlee, A. (1981)

Isolation and identification of equine lymphocytes and monocytes Am J Vet Res **42**: 1651-1654

Basse, P.; Herberman, R.B.; Nannmark, U.; Johansson, B.R.; Hokland, M.; Wasserman, K.; Goldfarb, R.H. (1991)

Accumulation of adoptively transferred adherent, lymphokine-activated killer cells in murine metastases J Exp Med **174**: 479-488

Bennett, S.R.M.; Carbone, F.R.; Karamatis, F.; Flavell, R.A.; Miller, J.F.A.P.; Heath, W.R. (1998)

Help for cytotoxic – T – cell responses is mediated by CD40 signaling Nature **393**: 478-480

Berg, P.A.; Stein, G.M. (2001)

Beeinflußt die Misteltherapie die Abwehr epithelialer Tumoren? Eine kritische Immunologische Analyse Dtsch Med Wschr **126**: 339-345

Berman, M.E.; Muller, W.A. (2000)

Assay for the transendothelial migration of human natural killer cells Methods in Molecular Biology **121**: 115-123

Bloom, E.T.; Babbitt, J.T.; Kawakami, K. (1986)

Monocyte-mediated augmentation of human natural killer cell activity: conditions, monocyte and effector cell characteristics J Immunol **137**: 172-178

Bloom, E.T.; Babbitt, J.T. (1990)

Prostaglandin E2, monocyte adherence and interleukin-1 in the regulation of human natural killer cell activity by monocytes Nat Immun Cell Growth Regul **9**: 36-48

Bokemeyer, J. (2003)

Durchflußzytometrische Analyse von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Hunden mit immunsuppressiven Erkrankungen Vet Med Diss, Gießen

Böyum, A. (1968)

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood Scand J Clin Invest **21** (Suppl. 97): 77-89

Brunner, K.T.; Mauel, J.; Cerottini, J.-C.; Chapuis, B. (1968)

Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs Immunology **14**: 181-196

Burkhardt, E. (1980)

Scanning and Transmission Electron Microscopy of Glass Bead Column-Separated Monocytes from Mononuclear Leucocyte Suspensions of Peripheral Blood of the Chicken

Journal of the Reticuloendothelial Society 28: 103-109

Burkhardt, E. (1984)

Morphologische, immunologische und virologische Untersuchungen zur Charakterisierung aus Hühnerblut isolierter Lymphozyten und Monozyten Habilitationsschrift Gießen

Burton, R.C.; Koo, G.C.; Smart, Y.C.; Clark, D.A.; Winn, H.J. (1988)

Surface antigens of murine natural killer cells Int Rev Cytol **111**: 185-210

Carbone, E.; Ruggiero, G.; Terrazzano, G.; Palomba, C.; Manzo, C.; Fontana, S.; Spits, H.; Kärre, K.; Zappacosta, S. (1997)

A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction J Exp Med **185**: 2053-2060

Carter, L.L.; Dutton, R.W. (1996)

Type 1 and Type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets Curr Op Immunol **8**: 336-342

Carpen, O.; Virtanen, I.; Saksela, E. (1982)

Ultrastructure of human natural killer cells: nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion J Immunol **128**: 2691-2697

Chambers, W.; Watkins, S.M.; Basse, P.H. (2000)

Methods for in vivo analyses of natural killer (NK) cells Methods in Molecular Biology **121**: 95-114

Clark, W.; Ostergaard, H.; Gorman, K.; Torbett, B. (1988)

Molecular mechanisms of CTL-mediated lysis: a cellular perspective Immunol Rev **103**: 37-51

Darmon, A.; Page, L.J.; Griffiths, G.M. (2000)

Methods for detecting lytic granules in natural killer cells Methods in Molecular Biology **121**: 145-153

De Bruin, T.; de Rooster, H.; van Bree, H.; Cox, E. (2005)

The effect of different isolation procedures on canine leucocyte populations and on lectin-induced lymphocyte proliferation J Vet Med **52**: 460-465

De Gruijter, M.; van Rijn, M.A.; Verkerk, A.; Jongkind, J.F. (1990)

Isolation of human and porcine monocytes and lymphocytes by three parameter flow sorting

J Vet Med (Zentralblatt Veterinärmedizin) 37: 585-591

Dirscherl, P.; Beisker, W.; Kremmer, E.; Mihalkov, A.; Voss, C.; Ziesenis, A. (1995)

Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes

Vet Immunol Immunopathol 48: 1-10

Dixon, W.J. (1993)

BMDP statistical software manual, volume 1 and 2 University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

Duke, R.C.; Cohen, J.J.; Chervenak, R. (1986)

Differences in target cell DNA fragmentation induced in mouse cytotoxic *T lymphocytes and natural killer cells* J Immunol **137**: 1442-1447

DYNAL[®] (1996)

Cell Separation and Protein Purification Technical Handbook, Second edition

Eisensmith, S.P. (1994)

PlotIT for Windows Scientific programming enterprises, Haslett, MI 48840, USA

Faldyna, M.; Leva, L.; Knötigova, P.; Toman, M. (2001)

Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - a flow cytometric study Vet Immunol Immunopathol **82**: 23-37

Farram, E.; Targan, S.R. (1983)

Identification of human natural killer soluble cytotoxic factor(s) (NKCF) derived from NK-enriched lymphocyte populations: specificity of generation and killing J Immunol **130**: 1252-1256

Fernandes, G.; Gupta, S. (1981)

Natural killing and antibody-dependent cytotoxicity by lymphocyte subpopulations in young and aging humans J Clin Immunol **1**: 141-148

Funk, J. (2001)

Quantitative Untersuchungen zur Zytotoxizität und Mitogenstimulation isolierter Blutleukozyten von Hunden mit unterschiedlichen Tumoren Vet Med Diss, Gießen

Funk, J.; Bach, U.; Failing, K.; Burkhardt, E. (2003)

Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 110 dogs with tumours Res Vet Sci **74**: 129-135

Gaddy, J.; Broxmeyer, H.E. (1997)

Cord blood CD16⁺56⁻ cells with low lytic activity are possible precursors of mature natural killer cells Cell Immunology **180**: 132-132

Garcia, K.C.; Scott, C.A.; Brunmark, A.; Carbone, F.R.; Peterson, P.A.; Wilson, I.A.; Teyton, L. (1996)

CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes

Nature 384: 577-581

Gately, M.K.; Desai, B.B.; Wolitzky, A.G.; Quinn, P.M.; Dwyer, C.M.; Podlaski, F.J.; Familletti, P.C.; Sinigaglia, F.; Chizonnite, R.; Gubler, U.; Stern, A.S. (1991)

Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor) J Immunol **147**: 874-882

Gebhard, D.H.; Carter, P.B. (1992)

Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies Vet Immunol Immunopathol **33**: 187-199

Gee, A.P.; Mansour, V.H.; Weiler, M.B. (1991)

Effects of target antigen density on the efficacy of immunomagnetic cell separation

J Immunol Meth **142**: 127-136

Ghernati, I.; Corbin, A.; Chabanne, L.; Auger, C.; Magnol, J.P.; Fournel, C.; Monier, J.C.; Darlix, J.L.; Rigal, D. (2000)

Canine large granular lymphocyte leukemia and its derived cell line produce infectious retroviral particles Vet Pathol **37**: 310-317

Göbel, T.W.F. (2000)

Isolation and analysis of natural killer cells in chickens Methods in Molecular Biology **121**: 337-345

Gondolf, C. (1994)

Untersuchungen zur Zytotoxizität von Natural Killer (NK)- und Lymphokin-aktivierten Killer (LAK)-Zellen aus dem peripheren Blut des Hundes Vet Med Diss. Gießen

Gondolf, C.; Kipar, A.; Burkhardt, E. (1995)

Zwei mesenchymale Tumorzelllinien zur Bestimmung der Natürlichen Killer (NK)-Zell-Aktivität im peripheren Blut des Hundes Berl Münch Tierärztl Wschr 108: 47-50

Gondolf, C.; Burkhardt, E.; Failing, K.; Stitz, L. (1996)

A new colorimetric method for measuring cell-mediated cytotoxicity in dogs Vet Immunol Immunopathol 55: 11-22

Greeley, E.H.; Kealy, R.D.; Ballam, J.M.; Lawler, D.F.; Segre, M. (1996)

The influence of age on the canine immune system Vet Immunol Immunopathol 55: 1-10

Grimm, E.A.; Mazumder, A.; Zhang, H.Z.; Rosenberg, S.A. (1982)

Lymphokine-activated killer cell phenomen: lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by Interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes

J Exp Med 155: 1823-1841

Guenther, W.; Schumm, M.; Buettner, M.; Voss, C.; Kremmer, E.; Thierfelder, S.; Wilmanns, W.; Kolb, H.J. (1994)

NK activity of canine blood and marrow cells Tissue Antigens **43**: 198-201

Hahn, S.; Gehri, R.; Erb, P. (1995)

Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity Immunol Rev 146: 57-79

Hammerberg, C.; Schurig, G.G. (1986)

Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leucocytes Vet Immunol Immunopathol 11: 107-121

Helfand, S.L.; Werkmeister, J.; Roder, J.C. (1982)

Chemiluminiscence response of human natural killer cells I. The relationship between target cell binding, chemiluminescence, and cytolysis J Exp Med **156**: 492-505

Herberman, R.B.; Ortaldo, J.R. (1981)

Natural killer cells: their role in defences against disease Science 214: 24-30

Holmes, M.A.; Duffus, W.P.H.; Gorman, N.T. (1989)

Natural cytotoxitiy in the dog: description of two new allogeneic tumour targets Vet Immunol Immunopathol **23**: 161-170

Hötzl, C.; Kolb, H.J.; Holler, E.; Hahn, J.; Schumm, M.; Beisser, K.; Mysliwietz, J.; Rieber, P.; Mempel, W.; Wilmanns, W.; Thierfelder, S. (1991)

Functional characterization of canine lymphocyte subsets Ann Hematol **63**: 49-53

Hsiao, Y-W.; Liao, K-W.; Hung, S-W.; Chu, R-M. (2004)

Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGFβ1 and restores the lymphokine-activated killing activity J Immunol **172**: 1508-1514

Jackman, B.R.; Moore, J.N.; Barton, M.H.; Morris, D.D. (1994)

Comparison of the effects of ketoprofen and flunixin meglumine on the in vitro response of equine peripheral blood monocytes to bacterial endotoxin Can J Vet Res **58**: 138-143

Janeway, C.A. (1989)

A primitive immune system Nature **341**: 108

Jardine, J.H.; Jackson, H.J.; Lotzova, E.; Savary, C.A.; Small, S.M. (1989) *Tumoricidal effect of interleukin-2-activated killer cells in canines* Vet Immunol Immunopathol **21**: 153-160

Kärre, K.; Schneider, G. (2000)

The footprint of a killer Nature **405**: 527-528

Kane, K.L.; Ashton, F.A.; Schmitz, J.L.; Folds, J.D. (1996)

Determination of natural killer cell function by flow cytometry Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology **3**: 295-300

Kasza, L. (1964)

Establishment and characterization of canine thyroid adenocarcinoma and canine melanoma cells Am J Vet Res **25**: 1178-1185

Kawasaki, A.; Shinkai, Y.; Kuwana, Y.; Furuya, A.; ligo, Y.; Hanai, N.; Itoh, S.; Yagita, H.; Okumara, K. (1990)

Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells International Immunology **2**: 677-684

Kemeny, D.M.; Noble, A.; Holmes, B.J.; Diaz-Sanchez, D. (1994)

Immune regulation: a new role for the CD8⁺ T cell Immunology Today 15: 107-110

Knapp, D.W.; Leibnitz, R.R.; DeNicola, D.B.; Turek, J.J.; Teclaw, R.; Shaffer, L.; Chan, T.C.K. (1993)

Measurement of NK activity in effector cells purified from canine peripheral lymphocytes

Vet Immunol Immunopathol 35: 239-251

Koberda, J.; Bergmann, L.; Mitrou, P.S.; Hoelzer, D. (1991)

High release of tumor necrosis factor α , interferon γ and interleukin-6 by adherent lymphokine activated killer cells phenotypically derived from T cells J Cancer Res Clin Oncol 117: 425-430

Koh, C.Y.; Blazar, B.R.; George, T.; Welniak, L.A.; Capitini, C.M.; Raziuddin, A.; Murphy, W.J.; Bennett, M. (2001)

Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo

Blood 97: 3132-3137

Koren, H.S.; Anderson, S.J.; Fischer, D.G.; Copeland, C.S.; Jensen, P.J. (1981)

Regulation of human natural killing: I. The role of monocytes, interferon and prostaglandins

J Immunol 127: 2007-2013

Kraft, W.; Dürr, U.M. (1999)

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 5. Auflage Schattauer Verlag

Krähenbühl, O.; Tschopp J. (1991)

Perforin-induced pore forming Immunology Today 12: 399-401

Krakowka, S.; Wallace, A.L. (1983/1984)

In vitro properties of diffuse cytoplasmic esterase-positive canine mononuclear leucocytes Vet Immunol Immunopathol 5: 1-13

Kurzmann, I.D.; Shi, F.; MacEwen, E.G. (1993)

In vitro and in vivo canine mononuclear cell production of tumor necrosis factor induced by muramyl peptides and lipopolysaccharide Vet Immunol Immunopathol 38: 45-56

Langman, R. (1980)

Natural killer cells Nature 286: 208

Lanier, L.L.; Le, A.M.; Phillips, J.H.; Warner, N.L.; Babcock, G.F. (1983)

Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens J Immunol **131**: 1789-1796

Levy, S.M.; Herberman, R.B.; Simons, A.; Whiteside, T.; Lee, J.; McDonald, R.; Beadle, M. (1989)

Persistently low natural killer cell activity in normal adults: immunological, hormonal and mood correlates Nat Immun Cell Growth Regul **8**: 173-186

Lotzova, E.; Ades, E.W. (1989)

Natural killer cells: definition, heterogeneity, lytic mechanism, functions and clinical application Nat Immun Cell Growth Regul **8**: 1-9

Lotzova, E. (1991)

Natural killer cells: immunobiology and clinical prospects Cancer Investigation **9(2)**: 173-184

Loughran J.R.; Thomas, P.; Deeg, H.J.; Storb, R. (1985)

Morphologic and phenotypic analysis of canine natural killer cells: evidence for Tcell lineage Cellular Immunology **95**: 207-217

May, S.A.; Hooke, R.E.; Lees, P. (1990)

The characterization of equine interleukin-1 Vet Immunol Immunopathol **24**: 169-175

McDonough, S.P.; Moore, P.F. (2000)

Clinical, hematologic, and immunophenic characterization of canine large granular lymphocytosis Vet Pathol **37**: 637-646

Melder, R.J.; Whiteside, T.L.; Vujanovic, N.L.; Hiserodt, J.C.; Herberman, R.B. (1988)

A new approach to generating antitumor effectors for adoptive immunotherapy using human adherent lymphokine-activated killer cells Cancer Res **48**: 3461-3469

Moore, P.F.; Rossitto, P.V.; Wielenga, J.J.; Raff, R.F.; Severns, E. (1992)

Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional Tlymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils Tissue Antigens **40**: 75-85

Munson, A.E.; Phillips, K.E. (2000)

Natural killer cells and immunotoxicology Methods in Molecular Biology **121**: 359-365

Mysliwska, J.; Mysliwska, A.; Romanowski, P.; Bigda, J.; Sosnowska, D.; Foerster, J. (1992)

Monocytes are responsible for depressed natural killer (NK) activity in both young and elderly low NK responders Gerontology **38**: 41-49

Nagler, A.; Lanier, L.L.; Cwirla, S.; Phillips, J.H. (1989)

Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells J Immunol **143**: 3183-3191

Nakada, Y.; Tsukatani, Y.; Kosaka, T.; Miyamori, M.; Kuwabara, M.; Tanaka, S.; Koide, F. (1995)

Release of natural killer cytotoxic factor (NKCF) from canine natural killer (NK) cells stimulated with cytoplasmic membran of target cells J Vet Med Sci **57**: 165-167

Nakada, Y.; Tokumitu, K.; Kosaka, T.; Kuwabara, M.; Tanaka, S.; Koide, F. (1995) Correlation between canine NK cell mediated cytotoxicity and radical production Vet Immunol Immunopathol **45**: 285-295

Nakada, Y.; Soga, M.; Kosaka, T.; Tsukatani, Y.; Miyamori, M.; Kuwabara, M.; Tanaka, S.; Koide, F.; Fujiwara, K. (1996)

Characterization of natural killer cytotoxic factor (NKCF) from canine NK cells Vet Immunol Immunopathol **49**: 283-293

Nakada, Y.; Tsukatani, Y.; Kosaka, T.; Kuwabara, M.; Tanaka, S.; Fujiwara, K. (1997)

Relationship between radical production and natural killer cytotoxic factor (NKCF) in canine natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity Vet Immunol Immunopathol **55**: 273-282

Nariai, Y.; Nariai, K.; Kosaka, T.; Kuwabara, Y. (1999)

Morphological observation of canine natural killer cells mediated cytotoxicity J Vet Med Sci 61: 835-838

Nariai, Y.; Kitagawa, K.; Nariai, K.; Kosaka, T.; Kuwabara, M.; Kiuchi, Y. (2000)

Active-oxygen involvement in canine NK-mediated cytotoxicity J Vet Med Sci **62**: 457-460

NG, Ah-Kau; Indiveri, F.; Pellegrino, M.A.; Molinaro, G.A.; Quaranta, V.; Ferrone, S. (1980)

Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human lymphocytes depleted of HLA-DR bearing cells with monoclonal HLA-DR antibodies

J Immunol **124**: 2336-2340

Nocera, A.; Montesoro, E.; Balbo, P.; Ferrarini, M.; Leprini, A.; Zicca, A.; Grossi, C.E. (1983)

Complement receptor distinguishes between two subsets of large granular lymphocytes with different natural killer activity and cytochemical and ultrastructural features Scand J Immunol **18**: 345-354

Ortaldo, J.R.; Sharrow, S.O.; Timonen, T.; Herbermann, R.B. (1981)

Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies J Immunol **127**: 2401-2409

Ortaldo, J.R.; Mason, A.; Overton, R. (1986)

Lymphokine-activated killer cells J Exp Med **164**: 1193-1205

Pescovitz, M.D.; Lunney, J.K.; Sachs, D.H. (1984)

Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL

J Immunol 133: 368-375

Phillips, J.H.; Lanier, L.L. (1986)

Dissection of the lymphokine-activated killer phenomen: relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis J Exp Med **164**: 814-825

Pontarollo, R.A.; Rankin, R.; Babiuk, L.A.; Godson, D.L.; Griebel, P.J.; Hecker, R.; Krieg, A.M.; van Drunnen Liitel-van den Hurk, S. (2002)

Monocytes are required for optimum in vitro stimulation of bovine peripheral blood mononuclear cells by non-methylated CpG motifs Vet Immunol Immunopathol **84**: 43-59

Pross, H.F.; Baines, M.G. (1982)

Studies of human natural killer cells. I. In vivo parameters affecting normal cytotoxic function Int J Cancer **29**: 383-390

Pycock, J.F.; Allen, W.E.; Morris, T.H. (1987)

Rapid, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinous Percoll density gradient Res Vet Sci **42**: 411-412

Rabanal, R.M.; Ferrer, L.; Else, R.W. (1995)

Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues Vet Immunol Immunopathol **47**: 13-23

Rabinowitz, Y. (1964)

Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass columns including tissue culture observations Blood **23**: 811-828

Raskin, R.E.; Tvedten, H.W.; Bull, R.W.; Crow, S.E.; Dunstan, R.W.; Krehbiel, J.D. (1989)

Natural killer cell activity in untreated and treated dogs with lymphoma Am J Vet Res **50**: 483-487

Ringler, S.S.; Krakowka, S. (1985)

Cell surface markers of the canine natural killer cell Vet Immunol Immunopathol **9**: 1-11

Rivas, A.L.; Kimball, E.S.; Quimby, F.W.; Gebhard, D. (1995)

Functional and phenotypic analysis of in vitro stimulated canine peripheral blood mononuclear cells Vet Immunol Immunopathol **45**: 55-71

Robertson, M.J.; Ritz, J. (1990)

Biology and clinical relevance of human natural killer cells Blood **76**: 2421-2438

Roitt, I.M.; Brostoff, J.; Male, D.K. (1995)

Kurzes Lehrbuch der Immunologie Thieme Verlag

Russell, J.H.; Masakowski, V.R.; Dobos, C.B. (1980)

Mechanisms of immune lysis: I. physiological distinction between target cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes and antibody plus complement J Immunol **124**: 1100-1105

Sansoni, P.; Cossarizza, A.; Brianti, V.; Fagnoni, F.; Snelli, G.; Monti, D.; Marcato, A.; Passeri, G.; Ortolani, C.; Forti, E.; Fagiolo, U.; Passeri, M.; Franceschi, C. (1993)

Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians

Blood 82: 2767-2773

Schmitz, G. (2000)

Qualitative und quantitative Untersuchungen der zytotoxischen Aktivität aus Hundeblut isolierter Leukozyten gegenüber verschiedenen kaninen Tumorzelllinien

Vet Med Diss, Gießen

Schmitz, G.; Armien, A.G.; Fonfara, S.; Teifke, J.P.; Burkhardt, E. (2003)

Induction of apoptosis by canine natural killer cells J Vet Med **50**: 156-159

Schuberth, H.-J.; Beer, A.; Rabe, H.-U.; Leibold, W. (1996)

Reactivity of workshop antibodies with a non-ruminant species: Crossreactivity with canine blood leukocytes Vet Immunol Immunopathol **52**: 427-433

Schwarz, R.E.; Vujanovic, N.L.; Hiserodt, J.C. (1989)

Enhanced antimetastatic activity of lymphokine-activated killer cells purified and expanded by their adherence to plastic Cancer Res **49**: 1441-1446

Sellon, D.C.; Walker, K.M.; Russell, K.E.; Perry, S.T.; Covington, P.; Fuller, F. (1996)

Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses J Virol **70**: 590-594

Shaw, S.E.; Anderson, N.V. (1984)

Isolation and functional analysis of normal canine blood monocytes and resident alveolar macrophages Am J Vet Res **45**: 87-90

Somersalo, K.; Saksela, E. (1991)

Fibronectin faciliates the migration of human natural killer cells Eur J Immunol **21**: 35-42

Splitter, G.; Choi, S.H. (1993)

Bovine natural killer activity against virally infected cells inhibited by monoclonal antibodies

Vet Immunol Immunopathol 39: 269-274

Takahashi, T.; Yawata, M.; Raudsepp, T.; Lear, T.L.; Chowdhary, B.P.; Antcak, D.F.; Kasahara, M. (2004)

Natural killer cell receptors in the horse: evidence for the existence of multiple transcribed Ly49 genes Eur J Immunol **34**: 773-784

Tan, P.H.S.; Santos, E.B.; Rossbach, H.-C.; Sandmaier, B.M. (1993)

Enhancement of natural killer activity by an antibody to CD44 J Immunol **150**: 812-820

Virtanen, I.; Ylänne, J.; Vartio, T.; Saksela, E. (1991)

Human natural killer cells express different integrins and spread on fibronectin Scand J Immunol **33**: 421-428

Vitolo, D.; Vujanovic, N.L.; Rabinowich, H.; Schlesinger, M.; Herberman, R.B.; Whiteside, T.L. (1993)

Rapid IL-2-Induced adherence of human natural killer cells J Immunol **151**: 1926-1937

Vogl (geb. Voß), C. (1995)

Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen kanine (Hunde) T-Zellen Diss Rer Nat. München

Voß, C.; Kremmer, E.; Hoffmann-Fezer, G.; Schumm, M.; Günther, W.; Kolb, H.J.; Thierfelder, S. (1993)

Identification and characterization of a mouse monoclonal antibody (M10) directed against canine (dog) CD8⁺ lymphocytes Vet Immunol Immunopathol **38**: 311-325

Vujanovic, N.L.; Yasumura, S.; Hirabayashi, H.; Lin, W.; Watkins, S.; Herberman, R.B.; Whiteside, T.L. (1995)

Antitumor activities of subsets of human IL-2-activated natural killer cells in solid tissues

J Immunol 154: 281-289 (1995)

Vujanovic, N.L.; Nagashima, S.; Herberman, R.B.; Whiteside, T.L. (1996)

Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells J Immunol **157**: 1117-1126

Whiteside, T.L.; Herberman, R.B. (1995)

The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer Curr Op Immunol **7**: 704-710

Wright, S.; Bonavida, B. (1987)

Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity: VII. Functional comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor J Immunol **138**: 1791-1798

Wulff, J.C.; Deeg, H-J.; Storb, R. (1982)

A monoclonal antibody (DT-2) recognizing canine T lymphocytes Transplantation **33**: 616-620

Wünschmann, A. (1998)

Phänotypische Identifizierung von Lymphozyten in lymphatischen Organen und im Gehirn von Hunden mit natürlicher Staupevirusinfektion Vet Med Diss, Gießen

Wünschmann, A.; Alldinger, S.; Kremmer, E.; Baumgärtner, W. (1999)

Identification of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis

Vet Immunol Immunopathol 67: 101-116

Yang, W.C.; Schultz, R.D.; Spano, J.S. (1987)

Isolation and characterization of porcine NK cells Vet Immunol Immunopathol **14**: 345-356

Young, J.D.; Damiano, A.; DtNome, M.A.; Leong, L.G.; Cohn, Z.A. (1987)

Dissociation of membrane binding and lytic activities of the lymphocyte pore-forming protein (perforin) J Exp Med **165**: 1371-1382

10 ANHANG

10.1 Tabellen¹⁾

10.1.1 Herkunft und Geschlecht der Blutspendehunde

Tabelle 7:

Herkunft	Hund Nr.	Name	Geschlecht
Klinikhunde	1	Eddie	m
	2	Dusty	m
	3	Nena	W
	4	Luise	W
	5	Cora	W
	6	Charly	m
	7	Doro	W
	8	Paula	W
	9	Biene	W
	10	Lasse	m
	11	Marko	m
	12	Gonzo	m
	13	Robby	m
	14	Tine	W
	15	Jacky	W
	16	Lucy	W
	17	Babsie	W
	18	Camilla	W
	19	Tara	W
	20	Pia	W
	21	Lotte	W
Privathunde	22	Nina	W
	23	Salli	W
	24	Henry	m
	25	Eileena	W
	26	Minou	W
	27	Ela	W
	28	Henry	m
	29	James	m
	30	Frodo	m
	31	Tine	W

1) * = keine Angaben bzw. nicht bestimmt; weitere Angaben zu den verwendeten Abkürzungen finden sich im Abkürzungsverzeichnis

10.1.2 Relative Anteile der Leukozyten nach Percoll[®]-Isolierung

Hund	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	92,95	1,60	3,35	1,95
	86,50	1,45	5,80	5,75
	93,75	0,40	3,15	2,45
	81,45	5,25	7,85	4,85
	88.15	0.50	8.00	2.80
	88.20	2.35	6.05	2.55
	90.40	0.60	6.60	1.90
	91.60	2.05	4.35	1.80
2	91.50	3.00	2.80	2.50
_	96.00	1.00	2.20	0.40
	88,10	0.45	9.75	1.25
	91.50	0.75	5,75	1,0
	93.80	1 20	2 20	2 10
	91 85	4 65	1 60	1.35
3	87.55	1,50	8.30	2 55
4	81.80	5 55	7 00	3 10
5	97.40	0.70	1 40	0,10
Ŭ	87.55	*	*	8.45
	95.05	0.60	2.05	1 65
	88.30	3.45	2,00	5.20
	00,30	2 50	2,10	3,20
6	90,70	2,50	2.00	1.50
0	94,10	3 50	2,00	1,50
	80.20	2,50	2,75	3.40
	03,20	1 70	4,13	1.80
	95,05	0.75	1,40	2.65
	91,40 80.05	3.60	4,00	2,05
	86 70	3,00	2,30	3,05
7	03.50	3,03	7,95	2,10
- /	93,30	0,00	3,00	1,90
0	95,40	0,40	2,20	1,70
9	90,10	1,10	1,90	0,60
10	90,25	2,05	2,00	4,10
10	91,75	0,90	5,25	1,75
11	95,05	0,95	2,40	1,30
12	94,05	0,70	2,50	2,45
	92,60	1,05	1,85	3,95
	93,60	1,35	2,55	2,25
	94,65	0,70	2,95	1,10
	93,70	0,90	2,00	1,40
	94,70	1,65	2,40	0,95
- 40	94,60	0,50	1,90	2,40
13	87,35	0,80	9,45	1,80
	80,75	1,35	12,40	4,80
	93,20	0,60	2,50	3,30
	86,95	4,15	4,85	3,75
	96,10	1,15	1,50	1,05
14	92,20	1.20	1.70	4.30

Tabelle 8:	Relative Anteile der Lo	eukozyten nach	Percoll[®]-Isolierung n = 74
		cunceyton nuon	

Tabelle 8:	Relative Anteile der Leukozyten nach Percoll [®] -Isolierung; $n = 74$
[Fortsetzung]]

Hund	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
15	92,20	1,40	1,40	4,30
	85,95	1,85	6,10	4,70
16	81,30	3,35	6,15	8,85
	92,95	0,70	3,85	2,15
	94,35	0,50	3,20	1,65
17	95,85	0,65	1,25	1,35
	92,85	2,40	2,05	2,75
18	94,95	0,95	1,20	1,50
	91,10	4,75	1,90	2,15
19	87,75	4,30	2,65	5,20
20	79,05	4,05	11,95	4,05
21	90,05	0,65	6,70	2,05
22	96,60	1,30	1,20	0,40
	91,65	2,85	1,50	3,75
	92,85	2,70	1,55	2,70
23	79,90	1,50	15,95	2,45
24	92,35	0,70	4,40	2,35
25	93,70	0,70	3,50	2,00
26	94,25	0,95	3,45	1,00
	95,85	0,50	2,70	0,70
	93,50	2,80	1,60	1,85
27	91,25	0,40	6,80	1,25
	91,75	0,60	5,80	1,65
28	93,50	2,00	1,85	2,55
29	91,70	1,45	3,95	2,75
30	89,65	2,35	5,15	2,60
31	94,40	0,80	3,60	0,90

10.1.3 Einfluss der Adhärenz auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität

Tabelle 9a: Gesamtleukozytenzahl im B	Blut und Differentialblutbild; n = 20
---------------------------------------	--

Hund	Leukozyten	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	5,20	33,55	53,45	3,15	8,05
1	5,80	12,15	62,15	1,70	23,10
1	6,20	34,70	56,45	2,50	5,90
2	5,00	33,30	59,10	3,20	3,10
2	5,40	19,80	69,35	1,80	7,35
2	5,60	29,90	54,00	2,90	10,00
3	13,00	25,40	61,10	7,10	4,30
4	12,10	27,75	61,35	5,30	4,00
5	7,90	25,80	65,60	1,60	6,35
6	11,40	23,75	68,75	3,70	3,50
7	*	*	*	*	*
8	8,00	25,25	65,90	1,00	4,20
9	5,00	30,05	62,85	1,05	4,60
10	7,10	37,70	49,45	7,40	4,60
11	9,10	31,65	63,25	1,45	3,20
12	5,10	36,45	56,95	2,95	4,00
22	3,80	24,25	69,75	1,20	4,40
23	10,70	36,45	48,65	8,25	4,85
24	6,90	34,40	53,10	5,50	6,45
25	8,80	36,20	54,65	2,80	5,45
Х	7,48	29,39	59,78	3,40	6,18
S	2,71	6,68	6,53	2,26	4,47

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	2,00	86,50	1,45	5,80	5,75
1	8,40	92,95	1,60	3,35	1,95
1	7,57	93,75	0,40	3,15	2,45
2	10,40	91,50	3,00	2,80	2,50
2	3,20	96,00	1,00	2,20	0,40
2	5,45	88,10	0,45	9,75	1,25
3	9,80	87,55	1,50	8,30	2,55
4	1,40	81,80	5,55	7,00	3,10
5	4,70	97,40	0,70	1,40	0,50
6	1,10	94,10	2,10	2,00	1,50
7	7,20	93,50	0,60	3,80	1,90
8	8,80	95,40	0,40	2,20	1,70
9	1,87	90,10	1,10	1,90	6,80
10	3,41	91,75	0,90	5,25	1,75
11	3,01	95,05	0,95	2,40	1,30
12	5,93	94,05	0,70	2,50	2,45
22	2,10	96,60	1,30	1,20	0,40
23	22,50	79,90	1,50	15,95	2,45
24	9,30	92,35	0,70	4,40	2,35
25	5,90	93,70	0,70	3,50	2,00
Х	6,20	91,60	1,33	4,44	2,25
S	4,88	4,71	1,18	3,57	1,58
Хg	4,72	*	1,04	3,53	1,79
SF	2,19	*	1,95	1,95	2,10

Tabelle 9b:Gesamtleukozytenzahl isolierter Leukozyten und relative Anteile der Leukozytenkozyten am Zellisolat vor Adhärenz; n = 20

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	0,73	89,40	2,90	4,65	2,70
1	4,90	93,40	0,60	3,35	2,30
1	4,31	96,70	0,50	1,70	0,60
2	2,90	93,40	1,60	2,60	2,25
2	1,60	95,60	1,15	2,30	0,45
2	3,11	87,05	0,60	10,80	1,15
3	4,00	88,30	0,95	9,10	1,50
4	0,64	81,55	8,25	4,40	5,50
5	2,40	97,60	0,70	1,10	0,50
6	0,50	95,20	2,20	1,30	0,80
7	4,60	93,00	0,70	4,20	1,90
8	4,30	94,25	0,45	2,85	2,15
9	1,04	91,95	1,05	1,90	4,85
10	1,55	93,10	1,40	3,15	1,55
11	1,48	93,90	1,50	2,40	1,90
12	3,49	97,40	0,50	0,95	0,85
22	1,00	96,05	1,15	0,90	1,40
23	12,50	82,20	0,85	14,70	1,95
24	4,80	94,35	0,60	3,70	1,15
25	3,60	95,35	0,75	2,65	0,95
Х	3,17	92,49	1,42	3,94	1,82
S	2,67	4,58	1,72	3,58	1,32
Xg	2,34	*	1,03	2,92	1,47
SF	2,30	*	2,03	2,14	1,96

Tabelle 9c:	Gesamtleukozytenzahl isolierter Leukozyten und relative Anteile der Leu-
	kozyten am Zellisolat nach Adhärenz; n = 20

Tabelle 9d:Gesamtleukozytenzahl isolierter Leukozyten und relative Anteile der Leukozytenkozyten am Zellisolat;adhärente Zellen;n = 12

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	0,23	81,60	6,60	7,80	4,05
1	0,05	26,45	25,30	37,75	9,50
2	0,81	73,95	4,40	15,90	4,85
2	0,04	19,15	34,75	36,50	9,55
3	0,40	46,25	9,25	31,15	12,70
4	0,04	25,65	25,00	42,40	5,80
5	0,07	47,90	15,00	23,30	12,90
6	0,01	17,15	36,45	34,30	8,55
22	0,05	11,30	64,00	14,85	9,85
23	0,23	37,75	3,15	56,25	1,70
24	0,12	61,15	6,00	26,00	6,40
25	0,10	50,55	13,00	24,70	9,85
Х	0,18	41,57	20,24	29,24	7,98
S	0,23	22,74	18,01	13,38	3,44
Xg	0,10	*	13,80	25,70	7,08
SF	3,24	*	2,51	1,70	1,78

Hund Nr.	vor Adhärenz	nach Adhärenz
1	2,3	-22,0
1	10,9	-1,9
2	15,6	-0,5
2	47,5	15,6
3	9,1	8,4
4	37,1	17,6
5	14,3	7,1
6	53,6	39,2
22	11,9	7,0
23	37,5	26,5
24	39,0	45,9
25	11,8	16,9
Х	24,22	13,32
S	17,40	18,38

Tabelle 9e:Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten in [%] gegenüber
CTAC- Zellen vor und nach Adhärenz; E/T ratio 50:1; n = 12

10.1.4

Zellzusammensetzung und Zytotoxizität

Hund	Leukozyten	Lymphozyten	Neutrophile Eosinophile		Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	6,20	34,70	56,45	2,50	5,90
2	5,60	29,90	54,00	2,90	10,00
7	*	*	*	*	*
8	8,00	25,25	65,90	1,00	4,20
9	5,00	30,05	62,85	1,05	4,60
10	7,10	37,70	49,45	7,40	4,60
11	9,10	31,65	63,25	1,45	3,20
12	5,10	36,45	56,95	2,95	4,00
Х	6,59	32,24	58,41	2,75	5,21
S	1,55	4,34	5,84	2,21	2,26

Tabelle 10a: Gesamtleukozytenzahl im **Blut** und Differentialblutbild; n = 8

Tabelle 10b: Gesamtleukozytenzahl isolierter Leukozyten und relative Anteile der Leukozyten am Zellisolat vor Adhärenz; n = 8

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	7,57	93,75	0,40	3,15	2,45
2	5,45	88,10	0,45	9,75	1,25
7	7,20	93,50	0,60	3,80	1,90
8	8,80	95,40	0,40	2,20	1,70
9	1,87	90,10	1,10	1,90	6,80
10	3,41	91,75	0,90	5,25	1,75
11	3,01	95,05	0,95	2,40	1,30
12	5,93	94,05	0,70	2,50	2,45
Х	5,41	92,71	0,69	3,87	2,45
s	2,45	2,54	0,27	2,61	1,81
Xg	4,83	*	1,56	3,34	2,10
SF	1,71	*	1,50	1,72	1,71

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile Eosinophile		Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	4,31	96,70	0,50	1,70	0,60
2	3,11	87,05	0,60	10,80	1,15
7	4,60	93,00	0,70	4,20	1,90
8	4,30	94,25	0,45	2,85	2,15
9	1,04	91,95	1,05	1,90	4,85
10	1,55	93,10	1,40	3,15	1,55
11	1,48	93,90	1,50	2,40	1,90
12	3,49	97,40	0,50	0,95	0,85
Х	2,99	93,42	0,84	3,49	1,87
S	1,44	3,17	0,42	3,11	1,32
Xg	2,62	*	1,33	2,72	1,56
SF	1,79	*	1,62	2,05	1,89

Tabelle 10c: Gesamtleukozytenzahl isolierter Leukozyten und relative Anteile der Leukozyten am Zellisolat nach Adhärenz; n = 8

Tabelle 10d: Gesamtleukozytenzahl isolierter Leukozyten und relative Anteile der Leukozyten am Zellisolat [%] nach Phagozytose; n = 8

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	2,36	88,65	8,05	1,95	0,85
2	1,96	90,15	0,60	7,65	0,90
7	2,10	92,70	0,70	6,10	0,40
8	2,95	95,80	0,25	2,95	0,60
9	0,71	96,20	0,80	1,00	1,80
10	1,61	92,00	0,60	6,30	0,70
11	1,16	94,65	0,40	4,10	0,55
12	2,93	96,95	0,10	2,40	0,40
Х	1,97	93,39	1,44	4,06	0,78
s	0,80	3,01	2,68	2,39	0,45
Xg	1,80	*	1,67	3,37	0,69
SF	1,63	*	3,50	2,00	1,64

Tabelle 10e: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten in [%] nach Adhärenz (CTAC- und Vero-Zellen) sowie nach Phagozytose (CTAC-Zellen); E/T ratio 100:1; n = 8

Hund	CTAC	CTAC	Vero
Nr.	nach Adhärenz	nach Phagozytose	nach Adhärenz
1	28,80	24,40	-0,85
2	36,00	31,00	13,00
7	22,50	-16,40	-17,50
8	10,00	9,30	3,30
9	-4,20	4,20	*
10	9,60	15,20	-6,90
11	5,10	5,90	1,60
12	53,50	13,50	-3,50
X	20,16	10,89	-1,55
S	18,81	14,29	9,42

10.1.5 Einfluss der Depletion von CD4⁺-Zellen auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität

Hund	Leukozyten	Lymphozyten	Neutrophile Eosinophile		Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	4,80	29,10	60,05	3,50	5,60
1	5,60	34,30	54,80	3,35	6,10
2	5,00	24,90	65,75	1,85	6,15
5	8,50	21,00	68,65	2,40	6,50
6	10,50	26,05	67,20	3,60	2,30
12	5,00	23,20	67,60	1,90	6,40
12	5,60	25,55	65,75	2,30	5,50
13	8,30	27,00	64,20	2,45	5,65
16	10,50	34,80	56,60	3,10	4,40
18	7,00	42,00	49,65	2,20	4,35
22	*	29,70	63,15	1,55	4,70
22	3,80	24,50	69,05	1,85	3,80
26	*	28,70	62,85	2,15	4,90
26	6,60	19,05	71,30	1,05	7,45
27	7,10	46,80	41,45	7,05	3,80
28	7,30	25,05	66,90	1,45	5,15
29	7,20	30,05	60,65	3,30	4,60
30	5,90	18,60	73,75	2,35	4,25
31	6,30	41,40	43,90	2,65	10,35
Х	6,76	29,04	61,75	2,63	5,37
S	1,88	7,76	8,89	1,29	1,69

Tabelle 11a: Gesamtleukozytenzahl im **Blut** und Differentialblutbild; n = 19

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	1,30	88,20	2,35	6,05	2,55
1	2,10	91,60	2,05	4,35	1,80
2	4,50	93,80	1,20	2,20	2,10
5	0,40	88,30	3,45	2,10	5,20
6	3,70	89,95	3,60	2,30	3,85
12	3,10	94,65	0,70	2,95	1,10
12	3,20	94,70	1,65	2,40	0,95
13	16,00	86,95	4,15	4,85	3,75
16	33,90	92,95	0,70	3,85	2,15
18	0,90	94,95	0,95	1,20	1,50
22	*	91,65	2,85	1,50	3,75
22	2,40	92,85	2,70	1,55	2,70
26	*	94,25	0,95	3,45	1,00
26	10,50	93,50	2,80	1,60	1,85
27	8,30	91,75	0,60	5,80	1,65
28	3,20	93,50	2,00	1,85	2,55
29	14,50	91,70	1,45	3,95	2,75
30	5,00	89,65	2,35	5,15	2,60
31	13,30	94,40	0,80	3,60	0,90
Х	7,43	92,07	1,96	3,19	2,35
S	8,42	2,44	1,09	1,52	1,16

Tabelle 11b: Gesamtleukozytenzahl ur	d relative Anteile de	er Leukozyten vor	Depletion
von CD4⁺-Zellen ; n = 19		-	-

Tabelle 11c: Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten nach Depletion von CD4⁺-Zellen; n = 19

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	0,60	89,30	2,80	5,35	1,85
1	0,60	89,60	4,00	3,40	2,80
2	2,00	94,30	1,30	2,50	1,50
5	0,20	77,70	8,30	6,60	7,05
6	1,60	90,05	3,05	5,60	1,10
12	1,30	93,20	1,10	3,50	1,40
12	1,50	93,45	2,90	2,70	0,75
13	*	93,90	1,80	3,10	1,10
16	17,80	91,95	1,10	3,60	3,15
18	0,40	89,55	2,35	4,80	1,55
22	*	93,05	2,65	1,60	2,50
22	1,00	90,40	6,25	1,25	1,85
26	*	94,70	1,05	3,10	0,90
26	4,50	93,40	3,85	1,50	1,15
27	3,60	90,60	2,00	6,05	1,10
28	1,50	93,70	2,60	1,65	1,80
29	5,60	93,40	1,40	3,60	1,50
30	1,30	94,95	1,90	2,30	0,65
31	5,60	94,55	1,30	3,10	0,85
Х	3,07	91,67	2,72	3,44	1,82
S	4,31	3,89	1,87	1,59	1,44

Tabelle 11d: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten in [%] gegenüber CTAC- und Vero-Zellen vor Depletion von CD4⁺-Zellen; E/T ratio 100:1, 50:1 und 25:1; n = 19

Hund		CTAC			Vero	
Nr.	(100:1)	(50:1)	(25:1)	(100:1)	(50:1)	(25:1)
1	62,30	*	*	*	*	*
1	56,90	20,50	9,40	*	*	13,90
2	20,70	*	*	-3,70	*	*
5	-11,10	*	*	*	*	*
6	0,00	*	*	*	*	*
12	48,00	*	*	-30,20	*	*
12	*	50,30	41,00	*	14,10	-5,40
13	12,20	*	*	*	*	*
16	-29,80	*	*	32,20	*	*
18	53,90	*	*	*	*	*
22	52,80	*	*	-7,30	*	*
22	46,90	34,30	24,00	*	6,30	8,10
24	*	29,20	19,80	*	2,60	22,30
26	34,40	*	*	-6,70	*	*
26	46,30	38,40	31,90	40,20	32,30	26,60
27	65,30	57,50	19,70	11,20	32,60	9,90
29	*	22,90	18,80	*	13,30	8,90
30	49,00	69,90	63,50	*	23,70	27,60
31	89,50	80,60	57,40	-13,40	-13,60	-5,80
Х	37,33	44,84	31,72	2,79	13,91	11,79
S	31,21	21,12	18,60	23,66	15,70	12,32

Tabelle 11e: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten in [%] gegenüber CTAC-Zellen nach Depletion von CD4⁺-Zellen; E/T ratio 100:1, 50:1 und 25:1; n = 19

Hund		CTAC			Vero	
Nr.	(100:1)	(50:1)	(25:1)	(100:1)	(50:1)	(25:1)
1	*	*	*	*	*	*
1	10,80	31,00	13,30	*	22,50	15,40
2	43,20	*	*	-7,60	*	*
5	21,70	*	*	-61,70	*	*
6	6,10	*	*	*	*	*
12	40,10	*	*	*	*	*
12	49,40	57,00	35,30	*	5,00	1,50
13	9,60	*	*	*	*	*
16	27,70	*	*	-0,90	*	*
18	53,80	*	*	-84,60	*	*
22	49,30	*	*	-8,20	*	*
22	51,00	40,30	34,10	*	13,60	-6,20
24	*	42,10	18,20	*	1,30	-28,80
26	45,60	*	*	-5,20	*	*
26	52,90	53,60	41,50	56,60	52,20	35,30
27	63,80	37,20	14,60	-24,80	1,60	4,20
29	34,30	35,40	19,50	27,20	27,20	-3,20
30	70,10	68,90	48,80	*	23,80	17,20
31	85,10	54,40	39,20	10,00	-2,90	-8,20
Х	42,03	46,66	29,39	-9,92	16,03	3,02
S	21,76	12,41	13,12	40,54	17,49	18,24

10.1.6 Einfluss der Depletion von CD8⁺-Zellen auf Zellzusammensetzung und Zytotoxizität

Hund	Leukozyten	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten[%]	[%]
1	6,00	27,35	58,95	3,80	7,85
1	4,80	29,10	60,05	3,50	5,60
2	4,30	26,00	66,20	2,70	3,70
2	8,80	18,10	74,70	1,35	4,40
5	5,70	30,20	56,70	4,20	6,30
6	16,60	14,60	79,00	2,10	3,90
6	10,20	26,20	68,15	2,70	2,40
12	5,70	30,20	61,15	2,30	4,40
12	4,90	28,75	63,20	2,80	4,10
13	10,60	24,80	67,75	1,55	5,25
13	11,20	28,85	63,50	1,65	5,35
15	4,30	34,35	56,90	1,70	4,70
16	10,50	34,80	56,60	3,10	4,40
17	5,70	33,80	55,50	0,80	7,65
18	7,90	41,60	49,25	3,40	4,60
19	7,10	24,35	67,30	3,10	3,90
26	*	28,70	62,85	2,15	4,90
27	7,10	46,80	41,45	7,05	3,80
Х	7,73	29,36	61,62	2,78	4,84
S	3,26	7,46	8,72	1,40	1,36

Tabelle 12a: Gesamtleukozytenzahl im **Blut** und Differentialblutbild; n = 18
Zellzahl Advia

[10⁹/I]

13,50

2,70

7,70

1,70

7,50

17,70

1,80

4,70

0,70

16,10

3,10

1,30

19,40

5,20

14,50

7,30

*

17,70

8,39

6,62

91,40

86,70

93,60

93,70

93,20

96,10

85,95

94,35

95,85

91,10

87,75

95,85

91,25

91,88

3,16

Hund

Nr.

1 1

2

2

5

6

6

12

12

13

13

15

16

17

18

19

26

27

Х

s

Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten[%]	[%]
88,15	0,50	8,00	2,80
90,40	0,60	6,60	1,90
91,50	0,75	5,75	1,60
91,85	4,65	1,60	1,35
95,05	0,60	2,05	1,65

4,85

7,95

2,55

2,00

2,50

1,50

6,10

3,20

1,25

1,90

2,65

2,70

6,80

3,89

2,36

Tabelle 12b: Gesamtleukozytenzahl und	relative Anteile der	Leukozyten vor	Depletion
von CD8⁺-Zellen ; n = 18		-	-

0,75

3,05

1,35

0,90

0,60

1,15

1,85

0,50

0,65

4,75

4,30

0,50

0,40

1,55

1,53

Tabelle 12c: Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten nach Depletion von CD8⁺-Zellen; n = 18

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten[%]	[%]
1	6,60	89,20	1,05	7,55	1,75
1	1,00	88,55	1,70	6,25	2,60
2	3,00	93,20	1,30	3,50	1,30
2	0,70	93,00	1,40	4,20	1,30
5	3,20	95,40	0,75	1,50	1,80
6	8,20	91,55	0,65	0,65	2,60
6	0,80	88,20	5,05	5,55	1,00
12	1,70	93,10	1,40	1,30	3,90
12	0,20	88,55	4,10	5,95	1,35
13	*	92,50	0,80	4,00	2,30
13	1,30	94,10	2,55	2,70	0,55
15	*	85,50	1,40	8,00	3,55
16	10,50	92,20	0,90	3,60	3,00
17	2,40	94,65	0,85	1,45	1,95
18	6,80	90,95	4,90	1,90	2,00
19	3,30	86,70	4,20	2,65	6,35
26	*	92,80	1,05	4,70	1,05
27	8,10	90,55	0,55	7,30	1,35
Х	3,85	91,15	1,92	4,04	2,21
s	3,30	2,81	1,54	2,31	1,37

2,65

2,10

2,25

1,40

3,30

1,05

4,70

1,65

1,35

2,15

5,20

0,70

1,25 2,17

1,20

Tabelle 12d: Spontane zytotoxische Aktivität isolierter Leukozyten in [%] gegenüber CTAC- und Vero-Zellen vor Depletion von CD8⁺-Zellen; E/T ratio 100:1, 50:1 und 25:1; n = 18

Hund		CTAC			Vero	
Nr.	(100:1)	(50:1)	(25:1)	(100:1)	(50:1)	(25:1)
1	16,70	*	*	6,70	*	*
1	*	39,20	34,20	*	-59,80	8,50
2	36,30	*	*	15,40	*	*
2	*	*	28,80	*	*	*
5	-32,50	*	*	-22,50	*	*
6	62,40	*	*	-4,40	*	*
6	*	58,10	5,10	*	*	*
12	5,50	*	*	0,00	*	*
12	*	51,30	14,10	*	*	*
13	62,00	*	*	43,80	*	*
13	46,40	33,50	6,60	*	*	-11,50
15	39,90	*	*	*	*	*
16	-37,25	33,90	14,90	-32,20	-13,10	-8,80
17	38,30	*	*	7,40	*	*
18	44,50	7,60	4,40	21,50	4,50	2,00
19	-5,15	2,20	-7,40	28,90	25,10	19,00
26	33,90	33,30	8,70	*	-5,70	-8,30
27	82,50	64,90	43,10	23,10	22,70	8,20
Х	28,11	36,00	15,25	7,97	-4,38	1,30
S	35,00	21,02	15,53	22,25	31,08	11,34

Tabelle 12e: Spontane zytotoxische	Aktivit	ät isolierter	Leuł	kozyten ii	n [%]	gege	nüber
CTAC- und Vero-Zellen	nach	Depletion	von	CD8 ⁺ -Z	ellen;	E/T	ratio
100:1, 50:1 und 25:1 ; n =	= 18						

Hund		CTAC			Vero	
Nr.	(100:1)	(50:1)	(25:1)	(100:1)	(50:1)	(25:1)
1	27,60	*	*	7,10	*	*
1	38,80	35,00	20,20	*	2,60	3,80
2	44,20	*	*	27,50	*	*
2	*	57,70	55,10	*	*	12,20
5	51,60	*	*	13,60	*	*
6	61,00	*	*	14,40	*	*
6	*	48,00	20,20	*	5,00	11,00
12	12,20	*	*	0,00	*	*
12	*	50,00	21,00	*	*	*
13	59,40	*	*	58,60	*	*
13	64,80	44,80	26,60	*	-8,50	12,60
15	31,60	*	*	8,80	*	*
16	31,70	22,40	13,10	-8,80	-15,50	-0,30
17	77,40	*	*	54,60	*	*
18	49,20	25,00	11,60	25,00	26,60	26,70
19	3,65	9,10	8,40	10,30	30,00	26,60
26	15,05	29,90	-3,50	*	-12,10	-4,90
27	78,50	50,80	23,60	15,60	7,20	-6,10
Х	43,11	37,27	19,63	18,89	4,41	9,07
S	23,02	15,49	15,25	20,14	16,88	12,17

10.1.7 Zytotoxizität von Zellkulturüberständen nach Koinkubation von Ziel- und Effektorzellen

Tabelle 13a: Gesamtleukozytenzahl im **Blut** und Differentialblutbild; n = 8

Hund	Leukozytenzahl	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	5,52	31,80	57,10	3,80	6,75
5	6,36	27,95	60,30	*	5,45
6	20,37	15,40	77,40	3,20	3,00
9	4,21	23,75	64,35	1,50	6,35
12	3,64	47,00	42,50	3,20	4,20
13	9,67	27,00	60,10	6,15	5,45
14	5,26	38,45	52,65	1,00	5,50
15	4,46	35,30	52,70	2,85	5,95
Х	7,44	30,83	58,39	3,10	5,33
S	5,55	9,65	10,16	1,68	1,21

Tabelle 13b: Gesamtleukozytenzahl und relative Anteile der Leukozyten nach Percoll[®]-Isolierung; n = 8

Hund	Zellzahl Advia	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Monozyten
Nr.	[10 ⁹ /l]	[%]	Granulozyten [%]	Granulozyten [%]	[%]
1	3,80	81,45	5,25	7,85	4,85
5	27,84	87,55	*	*	8,45
6	2,08	91,10	3,50	2,75	1,80
9	1,52	90,25	2,05	2,85	4,10
12	6,72	92,60	1,05	1,85	3,95
13	12,15	87,35	0,80	9,45	1,80
14	8,16	92,20	1,20	1,70	4,30
15	21,91	92,20	1,40	1,40	4,30
Х	10,52	89,34	2,18	3,98	4,19
S	9,63	3,79	1,63	3,27	2,07
Хg	6,92	*	1,86	3,09	3,80
SF	2,82	*	1,86	2,14	1,66

XXXIX

Hund Nr.	Zytox 1	Zytox 2	Zytox 3
1	32,60	1,70	7,60
5	27,70	4,90	-1,30
6	11,60	4,10	11,90
9	14,60	7,00	5,20
12	31,40	5,40	3,10
13	56,30	6,50	2,90
14	58,30	-0,40	-3,00
15	14,80	4,20	-1,20
X	30,91	4,18	3,15
S	18,15	2,46	5,03

Tabelle 13c: Spontane zytotoxische Aktivität Percoll[®]-isolierter Leukozyten und deren Überstände in [%] gegenüber CTAC-Zellen; n = 8

Zytox 1 = E/T ratio 100:1

Zytox 2 = Überstand E/T ratio 100:1

Zytox 3 = Überstand Effektorzellen allein (ohne vorherige Koinkubation mit Zielzellen)

Tabelle 13d: Spontane zytotoxische Aktivität Percoll[®]-isolierter Leukozyten und deren Überstände in [%] gegenüber Vero-Zellen; n = 8

Hund Nr.	Zytox 1	Zytox 2	Zytox 3
1	5,90	-6,70	-5,70
5	-69,80	0,80	1,60
6	-34,10	1,80	-9,50
9	*	*	*
12	5,50	-2,10	-2,60
13	24,80	13,70	-0,60
14	2,20	-14,10	-17,00
15	-1,80	-7,70	-15,60
X	-9,61	-2,04	-7,06
S	31,82	8,85	7,26

Zytox 1 = E/T ratio 100:1

Zytox 2 = Überstand E/T ratio 100:1

Zytox 3 = Überstand Effektorzellen allein (ohne vorherige Koinkubation mit Zielzellen)

10.1.8 Korrelation von Lymphozytenreinheit und Zytotoxizität

Hund Nr	Lymphozyten	Zytotoxizität
	[%]	[%]
1	75,80	54,50
1	93,80	28,80
1	81,50	32,90
1	88,20	16,70
1	88,20	62,30
1	91,60	56,90
2	88,10	36,00
2	91.50	36.30
2	93 80	20,70
5	87 60	27 70
6	91 10	11 60
6	91 40	62 40
6	90.00	0.00
7	93 50	22 50
8	95.40	10.00
0	00,40	-4.20
9	90,10	-4,20
9 10	90,30	0.60
10	91,00	9,00 5,10
10	95,10	5,10
12	94,10	33,30
12	92,60	31,40
12	94,60	40,30
12	93,60	5,50
12	94,70	48,00
13	87,40	56,30
13	93,20	62,00
13	87,00	12,20
13	96,10	46,40
14	92,20	58,30
14	94,40	89,50
15	92,20	14,80
15	86,00	39,90
16	93,00	-29,80
16	94,40	-37,25
17	95,90	38,30
18	94,60	53,90
18	91,10	44,50
19	87,80	-5,15
22	91,70	52,80
22	92,90	46,90
26	94,30	34,40
26	95,90	33,90
26	93,50	46,30
27	91,30	82,50
27	91,80	65,30
30	89,70	49,00

Tabelle 14a: Einfluss der Lymphozytenreinheit auf die Zytotoxizität; E/T ratio 100:1; n = 46

Hund Nr	Lymphozyten	Zytotoxizität
Hund Nr.	[%]	[%]
1	88,2	39,2
1	91,6	20,5
12	93,7	51,3
12	94,7	50,3
13	96,1	33,5
14	94,4	80,6
18	91,1	7,6
19	87,8	2,2
22	92,9	34,3
26	95,9	33,3
26	93,5	38,4
27	91,3	64,9
27	91,8	57,5
30	89,7	69,9

Tabelle 14b: Einfluss der Lymphozytenreinheit auf die Zytotoxizität; E/T ratio 50:1; n = 14

10.1.9 Einfluss der Haltung und des Geschlechts der Blutspender auf die Zytotoxizität

Tabelle 15a: Spontane zytotoxische Aktivität von Klinikhunden in [%] gegenüber CTAC-Zellen; E/T ratio 100:1; n = 15

Klinikhunde	Zytotox 1	Zytotox 2	Zytotox 3	Zytotox 4	Zytotox 5	Zytotox 6	Х
1	28,80	32,60	16,70	62,30	56,90	54,50	41,97
2	36,00	36,30	20,70	*	*	*	31,00
5	27,70	*	*	*	*	*	27,70
6	11,60	62,40	0,00	*	*	*	24,67
7	22,50	*	*	*	*	*	22,50
8	10,00	*	*	*	*	*	10,00
9	-4,20	14,60	*	*	*	*	5,20
10	9,60	*	*	*	*	*	9,60
11	5,10	*	*	*	*	*	5,10
12	53,50	31,40	5,50	48,00	40,30	*	35,74
13	56,30	62,00	12,20	46,40	*	*	44,23
14	58,30	*	*	*	*	*	58,30
15	14,80	39,90	*	*	*	*	27,35
17	38,30	*	*	*	*	*	38,30
18	53,90	44,50	*	*	*	*	49,20
Х							28,72
S							16,35

Privathunde	Zytotox 1	Zytotox 2	Zytotox 3	X
22	52,80	46,90	*	49,90
26	34,40	33,90	46,30	38,20
27	82,50	65,30	*	74,00
30	49,00	*	*	49,00
31	89,50	*	*	89,50
Х				60,12
S				21,00

Tabelle 15b: Spontane zytotoxische Aktivität von Privathunden in [%] gegenüber CTAC-Zellen; E/T ratio 100:1; n = 5

Tabelle 15c: **Spontane zytotoxische Aktivität von Klinikhunden** in [%] gegenüber CTAC-Zellen; **E/T ratio 50:1**; n = 12

Klinikhunde	Zytotox 1	Zytotox 2	Zytotox 3	X
1	39,20	20,50	2,30	20,70
2	47,50	*	*	47,50
3	9,10	*	*	9,10
4	37,10	*	*	37,10
5	14,30	*	*	14,30
6	58,10	53,60	*	58,10
12	51,30	*	*	51,30
13	33,50	*	*	33,50
16	33,90	*	*	33,90
18	7,60	*	*	7,60
19	2,20	*	*	2,20
20	25,10	50,30	*	37,70
Х				29,42
S				18,41

Tabelle 15d: **Spontane zytotoxische Aktivität von Privathunden** in [%] gegenüber CTAC-Zellen; **E/T ratio 50:1**; n = 10

Privathunde	Zytotox 1	Zytotox 2	Zytotox 3	Х
22	34,30	11,90	*	23,10
23	11,90	*	*	11,90
24	39,00	*	*	39,00
25	11,80	*	*	11,80
26	33,30	38,40	*	35,90
27	64,90	57,50	*	61,20
28	29,20	*	*	29,20
29	22,90	*	*	22,90
30	69,90	*	*	69,90
31	80,60	*	*	80,60
Х				38,55
S				24,19

10.2 Bezugsquellen für Chemikalien und Antikörper

amersham pharmacia biotech, Uppsala, Schweden

Percoll[®], steril, 17-0891-01

Agar Scientific, Essex

Glutaraldehyd 25 %, R1010

BASF, Ludwigshafen

Carbonyleisenpulver HF₃, 2268

Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe

Cacodylsäure, Natriumsalz Trihydrat, 5169.2 Ethanol absolut p.a., 9065.4 Osmiumtetroxidlösung, 7436.1 Trypanblau, 4856

E. Merck, Darmstadt

Iso-amylacetat, 101231 Kaliumchlorid, p.a., 4936.0500 Kaliumdihydrogenphosphat, 1.04873.0250 LEUCOGNOST[®]-EST, 116301 Natriumchlorid, p.a., 1.06400.5000 di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 1.06580.1000

GSF, München

 caCD4: Ratten-mAk, Isotyp IgG2a (Klon YKIX302.9.3.7), Gebrauchsverdünnung 1:100, überlassen von Prof. Dr. Baumgärtner, Stiftung Tieräztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie
caCD8: Maus-mAk Isotyp IgG1 (Klon Dog 10-1-1, synonym M10), Gebrauchsverdünnung 1:1000, überlassen von Prof. Dr. Baumgärtner, Stiftung Tieräztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie

ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA

Trypsin-EDTA (0,02% EDTA, 0,05% Trypsin), 16-891-49

Invitrogen Dynal[®] AS, Oslo, Norwegen

Dynabeads[®] M-450 Sheep anti-Rat IgG, 110.07 Dynabeads[®] M-450 Sheep anti-Mouse IgG, 110.02

PAA Laboratories, Cölbe

FKS, Fetales Kälberserum, A15-043 HBSS, 6450 MEME, E15-825 Penicillin/Streptomycin, 10.000 U bzw. 10.000 μ l/ml, P-11-010 RPMI-1640, E15-840

Serag-Wiessner GmbH und Co KG, Naila

Isotonische Kochsalzlösung (NaCI-Lösung, 0,9 %)

Serva, Laborhandel Reinke, Gießen

Serum Albumin V, 11930

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, 71500 Rose Bengal, R 4507

10.3 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

Assistent, Laborhandel Reinke, Gießen

Duram Glaszentrifugenröhrchen, konisch, 948/1

Bayer Diagnostics, Tarrytown, USA

Advia 120, IR 346

Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg 96-Loch Flachbodenplatte

Flow Laboratories, Schottland bzw. Schweiz

ELISA-Photometer, Titertek Multiscan[®] Plus Titertek[®] Microplate Washer S8/S12

Heraeus, Hanau

Begasungsbrutschrank, UB 6060 EK-CO₂

Hettich, Tuttlingen Kühlzentrifuge Rotanda/K, 3512

Invitrogen Dynal[®] AS, Oslo, Norwegen Dynalmagnet Dynal[®] Sample Mixer

Iwaki/Dunn Labortechnik, Asbach

Gewebekulturflasche mit Vent. Cap, 25 cm³, 3103-025

Sarstedt, Nürnbrecht

S-Monovette[®]-Blutentnahmesysteme (Ammonium-Heparin-Röhrchen, 9 ml, steril) S-Monovette[®]-Kanüle

Schleicher und Schüll, Laborhandel Reinke, Gießen 0,2 µ Filter, FP 30-0.2CA-S

Schott, Laborhandel Reinke, Gießen Rundbodenzentrifugenröhrchen

Thermo Electron Corporation, Dreieich Zytozentrifuge "Shandon Elliot"

Zeiss, Deutschland Digital Scanning Microscope DSM 940

10.4 Lösungen und Puffer

NaCI-Lösung, 1,5M

87,66 g NaCl

ad 1000 ml Aqua dest.

Trypanblaulösung 0,36%

0,36 g Trypanblau ad 100 ml 0,9 % NaCl-Lösung, filtrieren

Rose Bengal Gebrauchslösung, 0,25%

0,25 g Rose Bengal ad 100 ml NaCI-PBS mischen, im Kühlschrank aufbewahren

NaCL-PBS, pH 7,4 (für RBA)

1,42 g $Na_2HPO_4x2H_2O$ 0,2 g KH_2PO_4 8,0 g NaCI0,2 g KCIad 1000 ml Aqua dest, pH-Wert mit 1N HCI einstellen

Ethanol-PBS, 50% (v/v)

Ethanol und NaCI-PBS zu gleichen Teilen, mischen

PBS/BSA, pH 7,4 (Waschpuffer CD8)

0,18 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O 0,98 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O 8,10 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest., pH-Wert mit 1 N HCl einstellen 1g BSA zufügen

PBS/BSA, pH 7,4 (Waschpuffer CD4)

0,18 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O 4,02 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O 8,10 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest., pH-Wert mit 1 N HCl einstellen 1g BSA zufügen

1,2% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (Fixierungslösung für das REM)

480 μl 25% Glutaraldehyd ad 10 ml 0,1 M Cacodylatpuffer

0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,3)

21,4 g Na-Cacodylsäure ad 1000 ml Aqua dest., pH-Wert mit 1 N HCl einstellen 35,5 g Na-Cacodylsäure ad 1000 ml Aqua dest., pH-Wert mit 1 N HCl einstellen

1 % OsO₄ in 0,1 M Cacodylatpuffer zum Nachfixieren

500 mg OsO4-Kristalle 50 ml 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,3 in dunkler, fest verschlossener Flasche im Dunkeln bei 4°C aufbewahren

Gepufferte Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-Lösung)

0,2 g Na₂-EDTA 8,3 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na₂HPO₄ 0,2 g KH₂PO₄ 0,2 g Glucose ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4, Osmolalität 290-310 mOsmol Lösen der Substanzen in obiger Reihenfolge, autoklavieren

Danksagung

Allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Beratung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut.

Ebenso danke ich allen Blutspendehunden und deren Besitzern für die gute Kooperation. Ohne sie wäre das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Herrn Dr. K. Failing und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin möchte ich mich für die statistische Beratung und Auswertung bedanken.

Zum Schluss noch ein herzliches Dankeschön an meine Eltern und Schwiegereltern für die geleistete Unterstützung sowie für die zahlreichen Stunden der Kinderbetreuung.

Außerdem danke ich natürlich meinem Mann Tim, der mir immer zur Seite stand und durch seine Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat sowie meinen Söhnen David und Ben Jonathan, die "verständnisvoll" viele Stunden auf ihre Mama verzichteten.

édition scientifique VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG STAUFENBERGRING 15 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890 redaktion@doktorverlag.de www.doktorverlag.de

