

Histochemische, enzym- und immunhistochemische Darstellung reifer neutrophiler Granulozyten des Hundes im Licht- und Elektronenmikroskop

Histochemical, enzyme-histochemical and immunohistochemical demonstration of mature canine neutrophils in the light and electron microscope

R. Siebein

Zusammenfassung: Die Arbeit beschreibt die histochemische, enzym- und immunhistochemische Darstellung der reifen neutrophilen Granulozyten des Hundes im Licht- und Elektronenmikroskop. Die Markierung der primären Granula erfolgte lichtmikroskopisch über den enzymhistochemischen Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase und der Myeloperoxidase, ultrastrukturell nur über den enzymhistochemischen Nachweis der Myeloperoxidase. Zur Darstellung der sekundären Granula wurden 2 Methoden zum Nachweis von Laktoferrin etabliert: Eine funktionell-zytochemische Methode (FeNTA-Technik) und eine immunhistochemische Methode, für die ein kommerzieller polyklonaler Antikörper gegen humanes Laktoferrin (Dako GmbH, Hamburg, Nr. A 186) verwendet wurde. Die FeNTA-Technik beruht auf der Fähigkeit des Laktoferrins Eisen zu binden, welches in einem schwachen Eisen-Nitrilotriacetat-Komplex (FeNTA) angeboten wird und dessen intrazelluläre Bindung anschließend durch den Eisennachweis nach Perls dargestellt wird. Bei der Überprüfung der Reaktivität der Antikörper an Granulozyten-Lysaten von Hund und Mensch im Immunoblot-Verfahren reagierten die Proben des Hundes schwächer. In den Ausstrichen und Zytozentrifugenpräparaten reagierten ausschließlich die neutrophilen Granulozyten. Sie zeigten sowohl bei der indirekten Peroxidase- als auch bei der Avidin-Biotin-Komplex-Technik ein granuläres Reaktionsmuster. Auf ultrastruktureller Ebene wurde die Darstellung des Laktoferrins mit histochemischen und immunhistochemischen Methoden sowohl in Preembedding- als auch in Postembedding-Verfahren untersucht. Für die Preembedding-Verfahren wurden die Zellen in Epon 812 eingebettet, für die Postembedding-Verfahren außerdem in Lowicryl K4M. Mit der FeNTA-Technik gelang eine Markierung der sekundären Granula sowohl in Preembedding- als auch in Postembedding-Verfahren, wobei die Exaktheit der Markierungen in den Preembedding-Verfahren wesentlich besser war. Dagegen war mit keiner der untersuchten Methoden ein eindeutiger immunhistochemischer Nachweis von Laktoferrin im Elektronenmikroskop möglich. Über die semiquantitative Auswertung der FeNTA-Technik wurde der NEB-Index (Eisenbindungs-Index der neutrophilen Granulozyten) von klinischem Einsendungsmaterial ermittelt. Es wurden 42 Hunde verschiedener Rassen und Altersstufen ausgewertet, wobei die Tiere drei Klassen zugeordnet wurden: Klasse K1: gesunde Hunde, deren Leukozytenwerte im physiologischen Bereich lagen; Klasse K2: Hunde mit Leukozytosen über 15.000 Leukozyten/ μ l; Klasse K3: Hunde mit Leukopenien unter 5.000 Leukozyten/ μ l. Der Minimalwert der NEB-Indizes betrug 337, der Maximalwert 387. Für die Gruppe der gesunden Hunde wurde ein Mittelwert von 359,9 ermittelt (Standardfehler 2,04). Für die Hunde mit Leukozytose ergab sich ein Mittelwert von 369,6 (Standardfehler 3,58), für die Hunde mit Leukopenie dagegen ein Mittelwert von 346,8 (Standardfehler 4,87). Der NEB-Index eines Hundes mit chronischer myeloischer Leukose lag mit einem Wert von 351 im unteren Bereich der Normalwerte und unterschied sich damit deutlich von den Werten, die bei Hunden mit Leukozytosen anderer Ursachen ermittelt wurden. Die semiquantitative Auswertung der FeNTA-Technik scheint geeignet, einen Beitrag zur Differenzierung von leukämoiden Reaktionen und leukämischen Blutbildern bei myeloischen Leukosen beim Hund zu leisten.

Summary: The present work describes the histochemical, enzyme-histochemical and immunohistochemical demonstration of mature canine neutrophils in the light and electron microscope. Labelling of the primary granules in the light microscope utilizes enzyme-histochemical demonstration via Naphthol-AS-D-Chloracetate esterase and myeloperoxidase. Ultrastructural demonstration relies on myeloperoxidase alone. In order to visualize the secondary granules, two methods for determining lactoferrin were established: a

functional, cytochemical method (FeNTA-technique), and an immunohistochemical method in which a commercial polyclonal antibody to human lactoferrin (Dako GmbH, Hamburg, BRD, No. A 186) was used. The FeNTA-technique is based on the ability of lactoferrin to bind iron, which is supplied as a weak iron-nitrilo-triacetate (FeNTA) complex. The intracellular binding of FeNTA is then demonstrated using the iron determination according to Perls. Immunoblotting designed to test the reactivity of the antibody on granulocytic lysates from dogs and humans, showed canine samples to be less reactive. In smears and cytocentrifugal preparations, only the neutrophils reacted. They exhibited a granular reaction pattern by both the indirect peroxidase method and the avidin-biotin-complex technique. At an ultrastructural level, the demonstration of lactoferrin by histochemical and immunohistochemical methods was investigated in pre- as well as postembedding procedures. For the preembedding procedures, cells were embedded in Epon 812, for postembedding procedures also in Lowicryl K4M. Labelling of the secondary granules with the FeNTA-technique succeeded in both pre- and postembedding procedures, whereby accuracy of labelling was substantially better in the preembedding procedures. Contrary to this, none of the methods investigated made possible a clear-cut electron microscopical demonstration of lactoferrin. Semiquantitative evaluation of the FeNTA-technique allowed the NEB-index (neutrophilic iron binding index) of clinical samples to be determined. Forty-two dogs of various breeds and ages were evaluated, after assignment to one of three groups: group K1: healthy dogs, whose WBC counts lay within the physiological range; group K2: dogs with WBC counts over 15,000 cells/ μ l; group K3: dogs with leukopenia (WBC < 5,000 cells/ μ l). The minimum value of the NEB-index corresponded to 337; the maximum 387. An average of 359.9 (standard error 2.04) was determined for the healthy dogs. Dogs with leukocytosis had a mean value of 369.6 (standard error 3.58), whereas those with leukopenia had a mean value of 346.8 (standard error 4.87). The NEB-index of a dog with chronic myelocytic leukemia lay at the lower end of the normal range with a value of 351, thereby clearly distinguishing it from leukocytoses of other origins. The semiquantitative evaluation of the FeNTA-technique appears suited to offer an advance in the differential diagnosis of leukemoid reactions and leukemic blood profiles in canine myelocytoses.